

UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR

THÈSE

**Pour l'obtention du grade de Docteur
de l'Université Louis Pasteur**

**« Biosynthèse des isoprénoïdes :
synthèses d'analogues du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate,
inhibiteurs potentiels de la voie du méthylérythritol phosphate »**

Présentée par

Odile MEYER

Soutenue le 26 novembre 2004 devant la Commission d'examen

M. Jean-Marie BEAU

Mme Catherine GROSDÉMANGE-BILLIARD

M. Charles MIOSKOWSKI

M. David O'HAGAN

M. Michel ROHMER

Rapporteur Externe

Co-Directrice de Thèse

Rapporteur Interne

Rapporteur Externe

Directeur de Thèse

A mes parents, à mes frères,

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à tous ceux qui m'ont soutenue :

Monsieur le Professeur Michel Rohmer pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour ses nombreuses discussions, sa patience, sa confiance, sa rigueur, pour la formation scientifique qu'il m'a apportée pour mener à bien ce travail.

Madame le Docteur Catherine Grosdemange-Billiard pour la qualité de son encadrement, ces années formidables partagées, pour son aide quotidienne, son écoute attentive, sa sympathie.

Monsieur le Docteur Charles Mioskowski, Messieurs les Professeurs Jean-Marie Beau et David O'Hagan pour l'honneur qu'ils m'ont accordé en acceptant de juger ce travail.

Monsieur le Docteur Denis Tritsch pour sa collaboration, sa patience et ses nombreuses discussions scientifiques.

Monsieur Raymond Huber pour l'enregistrement des spectres de masse et Monsieur Jean-Daniel Sauer pour les spectres RMN.

Mes remerciements à mes collègues d'enseignement, à mon tuteur Jean-Marc Weibel pour sa disponibilité, sa formation et sa sympathie, aux maîtres de conférences m'ayant encadrée, Antoinette De Nicola, Catherine Grosdemange-Billiard, Michel Holler, Christophe Jeandon, Roland Jost, aux moniteurs m'ayant accompagnée, Loïc Jierry, Jean-Michel Becht, Christine Goze, Steve Lanners, Stefan Chassaing, Djalil Coowar, Sébastien Fuchs, Jean-Louis Schmitt, Benoît Champin pour leur enthousiasme et leur sympathie.

A mes camarades et collègues de travail au sein du laboratoire, un merci spécial à mes deux coloc. de hotte, Jeff H. et Lionel K., pour leur patience et leur aide. Merci à Myriam S., Lionel C., Guillaume H., Murielle W., Tayeb B., Jeff F., Sophie C., David S., Victor P., Mathias K., Sarah P., Olivier T., Antoine Y., Audrey W., Grégory H., Emmanuel M., Erasmienne N. pour les bons moments partagés ensemble.

Ma reconnaissance toute spéciale au regretté Docteur Daniel Martina qui m'a encouragée à choisir cette voie.

Un immense merci à mes amis, Myriam Ernst, Christine Goze, Lydie Antonietti, Loïc Jierry, Catherine Noban, Mazen Hanbali, Olivier Terenzi, Thalia Salinas, Nathalie Huther, Sédami Médégan, Isabelle Deblir, à mes amis de l'IBMP, pour leur aide, leur disponibilité, leurs encouragements. Merci à Thierry Muller pour son soutien durant ces années.

Milles mercis à mes parents pour leur aide si précieuse, leurs conseils avisés, leur patience sans failles et leur indispensable soutien. Merci aussi à mes frères Etienne et Jacques pour leur présence chaleureuse et leurs encouragements.

Sommaire

Introduction générale.

| | | |
|-------------|--|-----------|
| I. | Microorganismes et pathologies | 1 |
| I.1 | Les microorganismes | 1 |
| | a. Les microorganismes auxiliaires de l'homme | 2 |
| | b. Les microorganismes domestiqués | 3 |
| | c. Les microorganismes génétiquement transformés | 3 |
| | d. Les microorganismes pathogènes | 4 |
| I.2 | Les moyens de lutte contre les microorganismes pathogènes | 5 |
| | a. Contre les protozoaires | 5 |
| | b. Contre les champignons | 6 |
| | c. Contre les bactéries | 7 |
| II. | Les isoprénoïdes, nouvelles cibles pour la synthèse d'antibiotiques | 17 |
| II.1 | Les isoprénoïdes | 17 |
| II.2 | La voie du mévalonate | 20 |
| II.3 | La voie du MEP | 22 |
| | a. Etape catalysée par la DXS | 24 |
| | b. Etape catalysée par la DXR | 25 |
| | c. Etape catalysée par YgbP | 26 |
| | d. Etape catalysée par YchB | 28 |
| | e. Etape catalysée par YgbB | 28 |
| | f. Etape catalysée par GcpE | 29 |
| | g. Etape catalysée par LytB | 30 |
| II.4 | Distribution de la voie du MEP et du MVA | 32 |
| II.5 | Inhibiteurs de la voie du MEP | 35 |
| | a. Inhibiteurs de la DXS | 35 |
| | b. Inhibiteurs de la DXR | 36 |
| | c. Inhibiteurs des autres enzymes | 38 |
| III. | Analogues de composés naturels | 39 |
| III.1 | Analogues du groupement monophosphate | 39 |
| | a. Les phosphonates | 39 |
| | b. Les thiophosphates | 41 |
| | c. Les phosphoramides | 43 |
| | d. Autres analogues de phosphates | 44 |
| III.2 | Analogues du groupement méthyle | 44 |
| IV. | Objectifs de la thèse | 46 |
| | Bibliographie | 49 |

chapitre 1.
synthèse du substrat naturel de la DXR.

| | |
|--|-----------|
| Introduction | 59 |
| I. Synthèse enzymatique du DXP | 60 |
| II. Synthèses chimiques du DXP | 61 |
| II.1 Synthèses du DXP à partir de molécules chirales | 61 |
| a. Synthèse à partir de dérivés du tartrate et du thréitol | 61 |
| b. Synthèse à partir de dérivé du mannitol | 65 |
| II.2 Synthèse par synthèse asymétrique | 66 |
| III. Synthèse du DXP | 67 |
| IV. Synthèse du [5,5-²H₂]DXP | 70 |
| V. Synthèse du DX | 71 |
| V.1 Synthèses chimiques du DX décrites dans la littérature | 72 |
| a. Synthèses du DX à partir de chirons | 72 |
| b. Synthèses du DX par synthèse asymétrique | 74 |
| V.2 Synthèse du DX | 75 |
| VI. Synthèse du [5,5-²H₂]DX | 78 |
| Conclusion | 80 |
| Bibliographie | 81 |

chapitre 2.
synthèse d'analogues du DXP à partir de chirons.

| | |
|--|-----------|
| I. Synthèse d'analogues par modification de la fonction phosphate | 85 |
| I.1 Analogues phosphonates | 85 |
| a. Introduction | 85 |
| b. Synthèse des analogues phosphonates | 87 |
| c. Tentatives de synthèse des analogues phosphonate α -fluorés | 89 |
| d. Synthèse des analogues phosphonate / hydroxamate | 93 |
| I. 2 Synthèse d'analogues thiophosphates du DXP | 95 |
| a. Introduction | 95 |

| | |
|--|------------|
| b. Synthèse de l'analogue thiophosphate du DXP sous sa forme thione | 97 |
| c. Synthèse de l'analogue thiophosphate du DXP sous sa forme thiol | 102 |
| II. Synthèse d'analogues du DXP par modification de la fonction méthyle | 106 |
| II.1 Introduction | 106 |
| II.2 Synthèse des analogues 1,1,1 trifluorés du DXP | 108 |
| Conclusion | 115 |
| Bibliographie | 117 |

chapitre 3.
synthèse d'analogues du DXP par synthèse asymétrique.

| | |
|---|------------|
| Introduction | 121 |
| I. Synthèses de la DHAP | 124 |
| I.1 Synthèses enzymatiques de la DHAP | 124 |
| I.2 Synthèses chimiques de la DHAP | 125 |
| I.3 Nouvelle synthèse de la DHAP | 128 |
| a. Synthèse de la DHAP à partir du benzylglycérol | 128 |
| b. Synthèse de la DHAP à partir du benzylglycidol | 130 |
| II. Synthèse d'analogues du DXP | 139 |
| Conclusion | 141 |
| Bibliographie | 143 |

chapitre 4.
études biochimiques des analogues du DXP.

| | |
|---|------------|
| Introduction | 147 |
| I. Test des composés en tant que substrats de la DXR | 150 |
| II. Détermination des constantes d'inhibition | 154 |

| | |
|--|------------|
| III. Test sur la croissance des bactéries | 158 |
| Conclusion | 160 |
| Bibliographie | 161 |

conclusion.

partie expérimentale.

| | |
|---|------------|
| Produits synthétisés | 165 |
| Généralités | 169 |
| Modes opératoires | 173 |
| 1. Protections | 173 |
| 2. Déprotections | 174 |
| 3. Activation d'alcool | 176 |
| 4. Ouverture d'époxyde | 177 |
| 5. Oxydations | 178 |
| 6. Réductions | 182 |
| 7. Transformation d'un ester en cétone via l'amide de Weinreb | 185 |
| 8. Hydrolyse d'un ester | 186 |
| 9. Fluoration | 187 |
| 10. Aldolisation | 187 |
| 11. Formation de phosphate | 188 |
| 12. Formation de thiophosphate | 191 |
| 13. Formation de phosphonate | 193 |
| 14. Tests enzymatiques | 194 |
| Fiches analytiques des produits synthétisés | 197 |

publications.

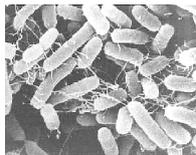
introduction.

I. Microorganismes et pathologies

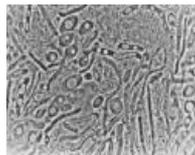
I.1 Les microorganismes

Les microorganismes sont définis historiquement comme des organismes vivants trop petits pour être distingués à l'oeil nu et généralement formés d'une seule cellule. Ce terme est donc utilisé pour désigner des organismes unicellulaires ou constitués d'un nombre limité de cellules.

Parmi les organismes unicellulaires, nous trouvons des procaryotes (les **archéobactéries** et les **eubactéries**) et des eucaryotes (les **protistes** et certains **champignons** dont les levures). Le terme protiste désigne l'un des règnes du vivant regroupant tous les êtres vivants mobiles et unicellulaires. Le règne des protistes se divise généralement en deux parties: les *protozoaires* à affinités animales et les *protophytes* à affinités végétales (Figure 1).



Bactérie
Salmonella
enteritidis



Champignon
Candida
albicans



Protozoaire
Trypanosoma
brucei



Protophyte
Pediastrum
albicans

Figure 1. Microorganismes

Les microorganismes sont donc présents dans toute la structure de la taxonomie. Ils vivent dans tous types d'environnements, y compris ceux hostiles. En effet, il existe des bactéries thermophiles (qui vivent à des températures avoisinant 100°C), des psychrophiles (qui se développent à des températures avoisinant 0°C), les barophiles (qui aiment les hautes pressions) et les halophiles (qui survivent dans des environnements très salés). Ainsi des bactéries ont été trouvées dans des environnements tels que les pôles (cyanobactéries), les volcans (*Thermoproteus uzoniensis*, *Desulfurococcus mucosus*), les geysers au fond des océans (*Methanococcus jannashii* et *Methanopyrus kandleri* vivent à des profondeurs de 2000 à 2600 m). De toutes les bactéries connues par l'homme, la plus résistante est *Deinococcus radiodurans* qui peut résister aux radiations, au froid, au vide, aux oxydants.

La peau et les muqueuses de l'homme hébergent une infinie variété de microorganismes commensaux ou saprophytes qui en constituent la flore normale ou résidente.

Les microorganismes peuvent être néfastes et/ou utiles pour l'environnement, les humains et les animaux, c'est pourquoi il est possible de distinguer :

- les microorganismes auxiliaires de l'homme dans les conditions naturelles,
- les microorganismes domestiqués,
- les microorganismes génétiquement transformés,
- les microorganismes pathogènes.

a. Les microorganismes auxiliaires de l'homme dans les conditions naturelles

Les sols et les eaux regorgent de microorganismes dont les activités ont directement ou indirectement des répercussions sur notre vie.

Nul sol ne serait fertile si des microorganismes n'y provoquaient des transformations chimiques comme la transformation de l'azote en ammoniac. En effet, la décomposition de la fraction organique du sol se fait sous l'action de microorganismes et produit des composés minéraux comme le gaz carbonique, l'ammoniac, les nitrates, les carbonates et de l'humus (composés à noyaux aromatiques, riches en radicaux libres, acides fulviques et humiques). D'autres microorganismes du sol s'associent directement aux plantes, en particulier au niveau des racines. Une telle association est souvent bénéfique à leur croissance (bactéries pour les légumineuses), voire à la germination des graines (champignons inférieurs pour les orchidées).

Dans le plancton marin, des microorganismes assurent environ le tiers de la "production primaire" mondiale, c'est-à-dire la conversion de substances minérales (nitrates, gaz carbonique) en matière vivante avec le concours de l'énergie solaire. Sans cette part de la production primaire, la mer n'offrirait à peu près aucune ressource exploitable pour l'alimentation humaine. De plus, de par leur capacité à dégrader ou à synthétiser des matières organiques et minérales, de nombreux microorganismes ont un rôle en terme de dépollution des eaux surchargées en carbone, en azote et en phosphore.

b. Les microorganismes domestiqués

Des bactéries et des levures sont souvent utilisées par l'homme dans les processus de fermentation comme la transformation du lait en fromage, la fabrication de boissons fermentées comme le vin ou la bière, la fermentation des végétaux par exemple pour la choucroute. Elles sont également utilisées en boulangerie traditionnelle et industrielle.

Des microorganismes vivants, appelés " probiotiques " (des bactéries et des levures, présentes ou non dans la microflore intestinale résidente) peuvent également être ingérés sous forme de médicaments et de nombreuses études leur accordent des effets bénéfiques pour la santé de part leur action sur l'amélioration de l'équilibre microbien intestinal et sur la stimulation du système immunitaire.

L'action bactériostatique (inhibition de la croissance) de certains microorganismes envers d'autres a été mise en évidence par Fleming et a permis la découverte de la pénicilline par isolement de cette molécule à partir du champignon *Penicillium notatum*. En dehors de ce microorganisme, les bactéries du genre *Streptomyces* produisent de nombreux antibiotiques, environ deux tiers de tous les antibiotiques connus.

c. Les microorganismes génétiquement transformés

Le « génie génétique » a permis d'inclure dans le matériel génétique de certaines bactéries (*E. coli* ou colibacille) les gènes responsables de la synthèse de molécules normalement produites par l'organisme humain et de faire fonctionner ces gènes étrangers. Ainsi, il existe des microorganismes génétiquement modifiés capables de produire de l'insuline humaine : cette insuline peut être utilisée pour soigner des patients atteints de diabète plus efficacement que l'insuline extraite d'animaux, et sans danger de contamination par des organismes pathogènes présents chez les donneurs. Le nombre de médicaments produits de cette manière s'accroît constamment. De la même manière, on peut obtenir des vaccins contre des maladies graves (hépatite B, par exemple) sans aucun risque de déclencher la maladie.

d. Les microorganismes pathogènes

A côté de ces microorganismes bénéfiques, il existe des organismes (bactéries, protozoaires ou champignons) qui pénètrent dans l'organisme humain et causent des maladies.

Les maladies les plus ravageuses ont été causées par des bactéries qui sont responsables de pathologies comme la tuberculose, le tétanos, la lèpre, la typhoïde, la diphtérie, la syphilis, le choléra, la peste etc. Ces maladies infectieuses sont responsables de 17 millions de décès par an, ce qui représente un tiers de la mortalité observée annuellement sur la planète. En effet, les maladies respiratoires aiguës bactériennes causent 3 millions de décès par an, les maladies diarrhéiques (*Escherichia coli* pathogènes, choléra, fièvre typhoïde ...) 2,5 millions, la tuberculose près de 2 millions.¹

D'autres microorganismes, et non des moindres, sont des eucaryotes, des protozoaires : l'agent responsable du paludisme (*Plasmodium*), qui atteint près d'un homme sur trois dans le monde (1.5 à 3 millions de personnes atteintes par an dont 1 million d'enfants de moins de cinq ans), celui de la maladie du sommeil (Trypanosome) ou encore celui de la dysenterie amibienne (*Entamoeba*). Les microorganismes s'attaquent également aux animaux domestiques. En effet, les coccidies, causent des pertes importantes dans les élevages de lapins et de volailles.

Des champignons sont également responsables de maladies. De plus, la dépression du système immunitaire favorise le développement de germes habituellement inoffensifs comme certaines levures du genre *Candida* (responsables de mycoses). Beaucoup plus rares, elles peuvent se localiser par exemple dans les poumons : aspergillose, cryptococcose, histoplasmosse. Les plantes cultivées peuvent être touchées par des champignons comme par exemple le mildiou de la vigne (un oomycète) ou les charbons des céréales (des eumycètes).

Les microorganismes sont nettement plus nombreux que les hommes et ont une capacité extraordinaire à s'adapter à leur environnement. Or, plus la population humaine augmente, plus elle permet aux organismes pathogènes de se développer, et de les transmettre. Il est donc important de posséder des moyens efficaces pour lutter contre ces microorganismes néfastes pour l'homme.

I.2 Les moyens de lutte contre les microorganismes pathogènes

Il existe de nombreuses molécules utiles pour lutter contre les microorganismes pathogènes. Dans cette partie nous avons choisi de présenter quelques exemples de composés efficaces pour combattre les protozoaires,² les champignons et les bactéries.

a. Contre les protozoaires ...

Il existe divers moyens pour lutter contre le protozoaire *Plasmodium falciparum* responsable du paludisme, véritable fléau actuel.³ Les molécules les plus efficaces agissent lors de la phase d'infection des globules rouges responsable de la pathologie. Ce sont la chloroquine et la quinine qui est extraite de l'écorce des quinquinas et est aujourd'hui le médicament de référence (Figure 2). Ces composés se concentrent dans la vacuole du parasite en entraînant sa mort. En effet, la digestion de l'hémoglobine de l'hôte par le plasmodium libère une hémine. Ce composé est ensuite éliminé par complexation à une protéine produite par le parasite. L'antipaludique inhibe cette complexation de l'hémine en se fixant à cette protéine. Ainsi, l'hémine toxique s'accumule dans le parasite et provoque sa lyse.⁴ Cependant, le développement de clones de *Plasmodium falciparum* de plus en plus résistants à ces molécules pose de graves problèmes soulignant la nécessité de trouver de nouveaux agents antipaludéens.

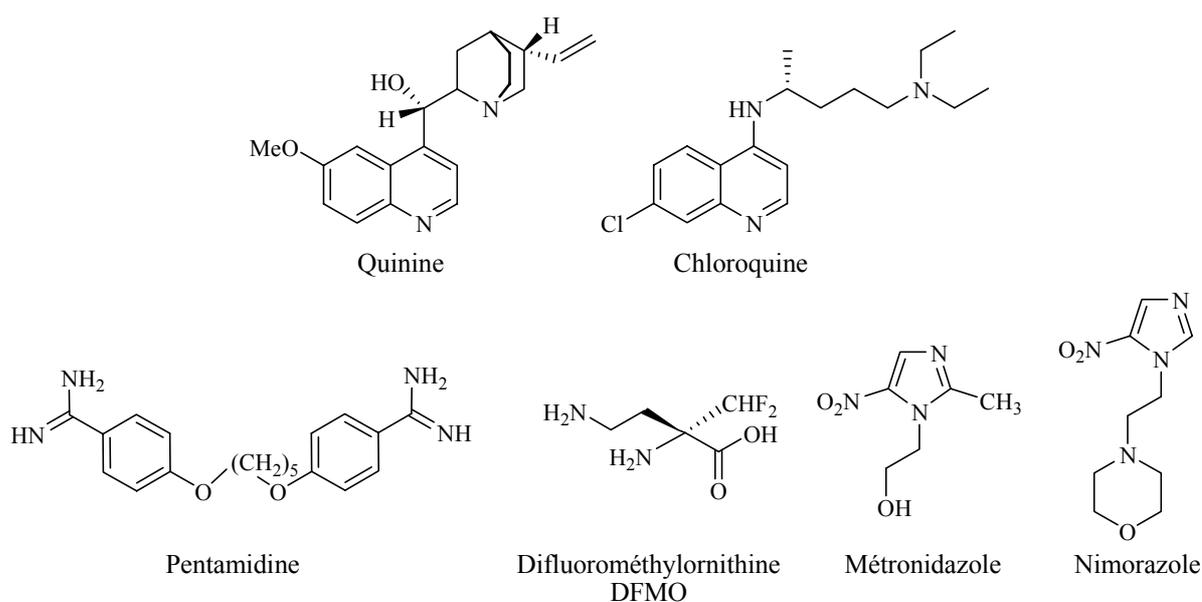


Figure 2. Exemples de composés utilisés pour soigner des maladies causées par des protozoaires

Un autre exemple concerne le trypanosome responsable de la maladie du sommeil. Les composés actifs jouent un rôle sur la biosynthèse des polyamines qui sont indispensables pour la croissance et la différenciation cellulaire de ce protozoaire. Les polyamines ont pour effet de moduler la structure ribosomale, de diminuer la flexibilité membranaire et de stabiliser le cytosquelette en se liant aux phospholipides. La difluorométhylornithine (DMFO, Figure 2), analogue de l'ornithine, inhibe de façon irréversible l'ornithine décarboxylase, enzyme essentielle à la synthèse des polyamines, et de ce fait empêche la prolifération des trypanosomes.⁵ La pentamidine (Figure 2) inhibe également la synthèse des polyamines en se liant à l'ADN du trypanosome ce qui détruit l'ADN mitochondrial dans le kinétoplaste et entraîne la mort du protozoaire.⁶

La dysenterie amibienne ou amibiase, causée par *Entamoeba histolytica*, est traitée par des dérivés de l'imidazole comme le métronidazole ou le nimorazole (Figure 2). La réduction du groupement nitro de ces molécules s'opère préférentiellement à celle des coenzymes bactériens (NAD^+ et NADP^+), conduisant à une diminution du stock des enzymes importants pour le métabolisme du protozoaire.⁷

Cependant, de nombreux protozoaires sont devenus résistants aux médicaments couramment utilisés et il est actuellement nécessaire de trouver de nouveaux composés efficaces.^{8,9}

b. Contre les champignons ...

Les principales maladies causées par des champignons sont les candidoses, affections dues à des levures du genre *Candida*, les cryptococcoses, mycoses dues à une levure encapsulée (*Cryptococcus neoformans*) et les aspergilloses, mycoses les plus souvent pulmonaires, provoquées par un champignon filamenteux du genre *Aspergillus*. Ces affections sont traitées par des composés comme l'amphotéricine B ou le fluconazole (Figure 3).

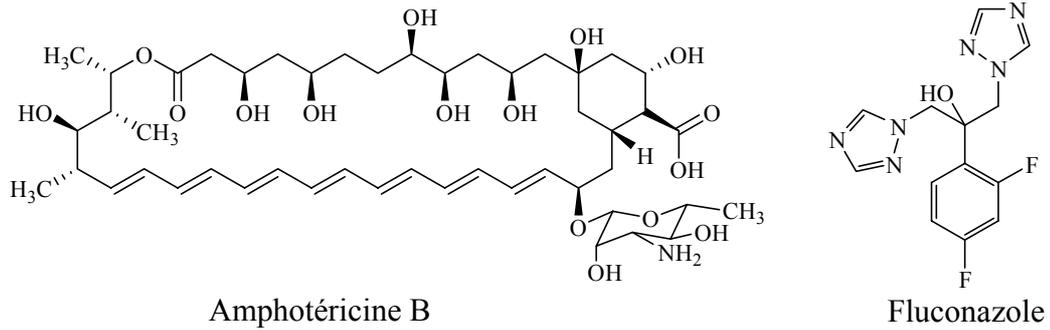


Figure 3. Exemples de composés utilisés pour soigner des maladies causées par des champignons

L'amphotéricine B se fixe sur les stérols de la membrane, en général l'ergostérol, en formant des structures toriques perturbant l'étanchéité de la membrane.¹⁰ Le fluconazole empêche la constitution d'une membrane plasmique fongique normale en bloquant la biosynthèse des stérols.¹¹

c. Contre les bactéries ...

Pour soigner les maladies infectieuses, les antibiotiques sont les outils efficaces les plus fréquemment utilisés. Ces composés qui altèrent le fonctionnement normal des bactéries peuvent inhiber leur croissance (antibiotique bactériostatique) ou les détruire (antibiotique bactéricide).

L'action bactériostatique de certains microorganismes envers d'autres avait été observée en 1877 par Pasteur et Joubert (à propos du bacille charbonneux), mais ce n'est qu'en 1929 que Fleming constate que la culture en boîte de Petri de staphylocoques est inhibée par la présence de moisissures du genre *Penicillium*. Fleming proposa que le champignon sécrétait une substance chimique bactériostatique, utilisable en thérapeutique humaine. Un peu plus tard, la culture en masse permit de disposer de grandes quantités de cette substance : la pénicilline.

En dehors des microorganismes du genre *Penicillium*, les bactéries du genre *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* produisent de nombreux antibiotiques. En effet, les *Streptomyces* produisent environ deux tiers de tous les antibiotiques connus. L'abondance et la

diversité structurale des antibiotiques synthétisés par ces bactéries ne se retrouve dans aucun autre genre bactérien.

Depuis les années 60, ces antibiotiques naturels peuvent être obtenus par hémisynthèse ou synthèse et peuvent être répertoriés en différentes classes selon leur nature chimique : les β -lactamines, les aminoglycosidiques, les macrolides, les cyclines...¹² Ils peuvent également être classés selon d'autres critères comme leur origine, leur spectre d'action ou leur mécanisme d'action. En effet, ils peuvent agir soit directement sur la biosynthèse de métabolites (synthèse protéique ou de l'ADN), soit sur la structure de la bactérie (synthèse de la paroi, de la membrane cytoplasmique) (Figure 4).

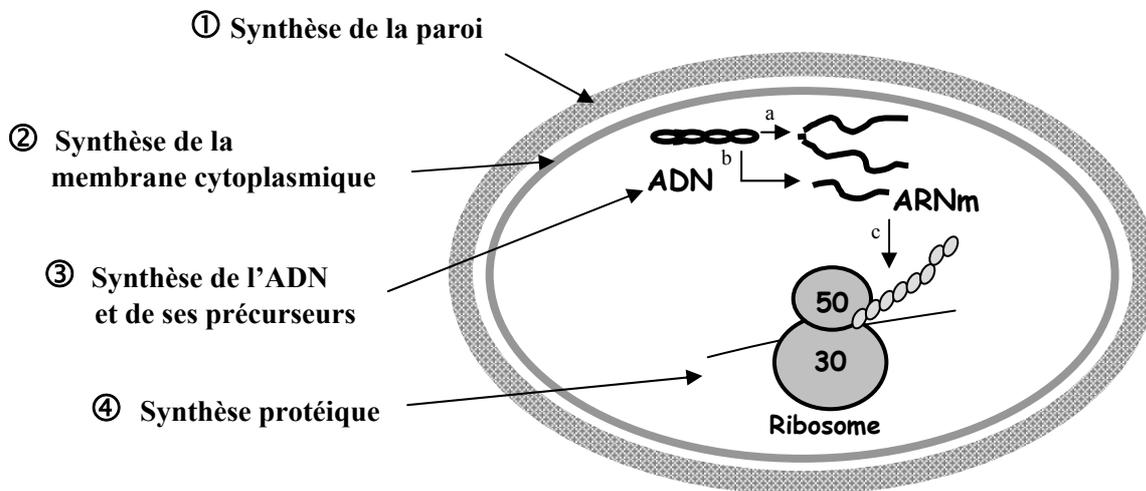


Figure 4. Mode d'action des antibiotiques

(a : réplication de l'ADN, b : transcription de l'ADN, c : traduction de l'ARNm)

La connaissance du mode d'action des antibiotiques se révèle extrêmement utile car elle ouvre la voie de la découverte d'autres molécules.¹³ Souvent un antibiotique se comporte comme un analogue de substrat, mais certains peuvent agir au niveau des co-enzymes, parfois par analogie stérique, ou plus souvent en inhibant leur synthèse. Ces composés devraient alors être actifs sur un grand nombre de cellules. La sélectivité de leur pénétration peut expliquer la spécificité de leur action sur certains microorganismes.

① Action sur la paroi bactérienne

Les bactéries sont entourées d'une paroi, une coque en peptidoglycane. Ce dernier est un polymère qui constitue un réseau tridimensionnel entourant complètement la bactérie. Il constitue un caractère original et constant chez les eubactéries. Le peptidoglycane est constitué par la polymérisation d'unités disaccharide-peptide (disaccharides = résidu N-acétylglucosamine et résidu d'acide N-acétylmuramique; peptide = chaîne pentapeptidique). La biosynthèse du peptidoglycane fait intervenir de nombreuses réactions que l'on peut regrouper en quatre étapes :

- (1) élaboration des précurseurs du peptidoglycane, au niveau du cytoplasme
- (2) transport de ces précurseurs au travers de la membrane cytoplasmique
- (3) incorporation des unités de disaccharides-pentapeptide sur le squelette du peptidoglycane existant, à la face externe de la membrane cytoplasmique
- (4) réticulation des polysaccharides linéaires pour aboutir au peptidoglycane réticulé

- Inhibition de la synthèse des précurseurs du peptidoglycane

La **fosfomycine** (Figure 5) est un antibiotique bactéricide produit par différentes espèces de bactéries du genre *Streptomyces* mais aussi par *Pseudomonas syringae*. Cette molécule agit par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. En effet, elle se comporte comme un analogue du phosphoénolpyruvate et inhibe la pyruvyl-transférase (ou pyruvate-UDP-N-acétylglucosamine-transférase), ce qui a pour conséquence de bloquer la formation d'acide N-acétylmuraminique, l'un des constituants essentiels du peptidoglycane de la paroi bactérienne.^{14,15} Un autre composé, la **D-cyclosérine** (Figure 5), isolée de *Streptomyces orchidaceus*, est un analogue structural de la D-alanine et inhibe la D-alanyl-D-alanine synthétase, enzyme intervenant dans la construction de la paroi bactérienne.¹⁶

- Inhibition du transfert des précurseurs

La **bacitracine** (Figure 5) est un complexe d'antibiotiques polypeptidiques produit par *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* et qui interfère sur le transfert des précurseurs du peptidoglycane sur un lipide porteur, permettant leur transport à la membrane plasmique.¹⁷

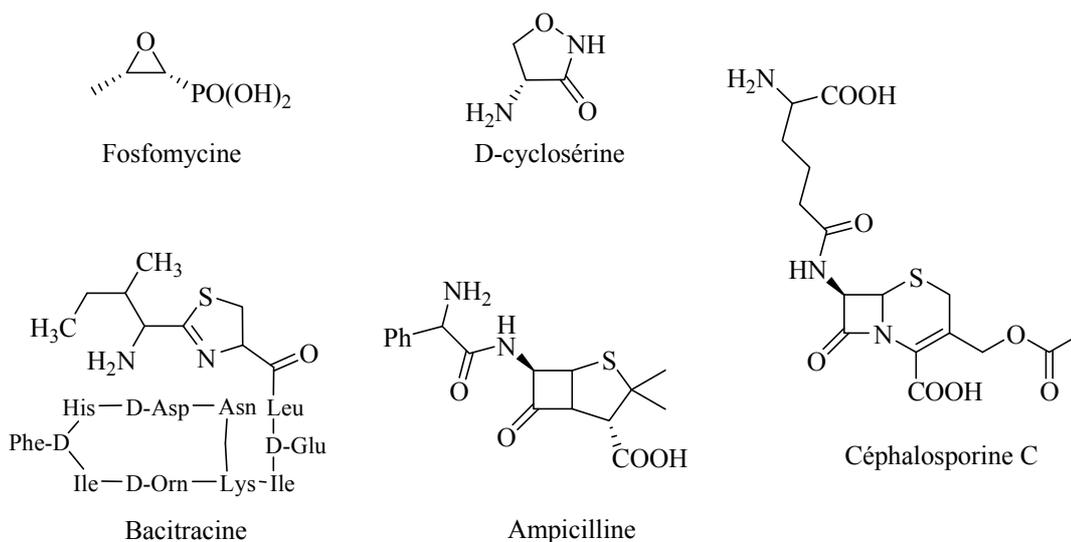


Figure 5. Antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne

- Inhibition de l'étape de transglycosylation et de transpeptidation

Les antibiotiques possédant ce type d'action sont de type « **β-lactamines** » et sont constitués comme leur nom l'indique d'un cycle β-lactame. Cette famille comprend les pénicillines (**ampicilline**) et les **céphalosporines** (Figure 5).¹⁸ La pénicilline découverte chez *Penicillium notatum* fut plus tard extraite de cultures de *Penicillium chrysogenum*. De nombreuses pénicillines de synthèse virent ensuite le jour par substitution du noyau pénicillanique. Le cycle β-lactame associé à un noyau thiazolidine forme l'acide 6-aminopénicillanique qui représente la structure de base des pénicillines. Il peut être substitué par acylation sur sa fonction aminée pour donner naissance à des dérivés qui se distinguent par leur pharmacocinétique, leur stabilité, le spectre antibiotique et la résistance aux β-lactamases. Le cycle β-lactame est la partie efficace de la molécule. L'action de ces composés inhibe l'activité des trans-peptidases impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne.^{19,20} Des variations au niveau du groupe acyle par greffage de chaînes latérales différentes de celles des produits naturels permettent de modifier les propriétés de la molécule antibiotique. Par exemple l'addition d'une chaîne greffée au niveau de la fonction acide permet l'ingestion de l'antibiotique par voie orale tout en augmentant la diversité et le spectre d'action en contournant les résistances des bactéries et de leurs enzymes de dégradation.

D'autres composés, les **glycopeptides**, sont des molécules complexes, constituées d'un heptapeptide cyclique sur lequel viennent se greffer des sucres : comme le glucose greffé sur la vancosamine dans la **vancomycine** (Figure 6). Ce composé est le premier glycopeptide isolé en 1956 à partir d'échantillon de sols prélevés en Inde et en Indonésie, contenant le germe *Streptomyces orientalis* (*Nocardia orientalis*).

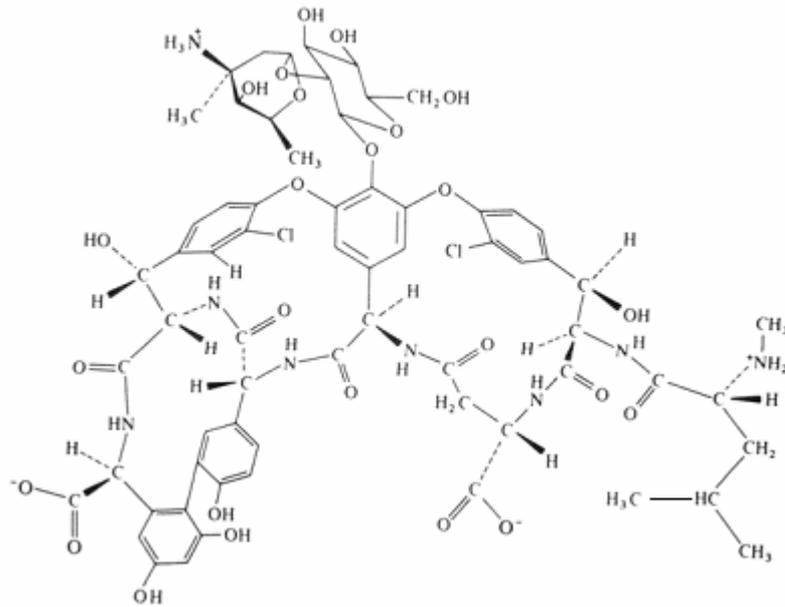


Figure 6. Structure de la Vancomycine

Les glycopeptides sont des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Leur action est toutefois différente de celle des β -lactamines : ils se fixent aux niveau des extrémités peptidyl-D-Ala-D-Ala des précurseurs lipopeptidiques lorsqu'ils émergent de la membrane cytoplasmique durant leur transport à travers celle-ci. Ils inhibent ainsi les étapes de transglycosylation et de transpeptidation, nécessaire à la synthèse du peptidoglycane fonctionnel.²¹

② Action sur la membrane cytoplasmique

Les antibiotiques de type « **polypeptide** » comme la **gramicidine** agissent sur la membrane cytoplasmique. Ces molécules forment un pore traversant la membrane plasmique en détruisant l'intégrité de la structure garantissant l'effet de barrière osmotique.²² Les constituants de faible masse molaire s'échappent, et les cellules se lysent. Les principaux effets indésirables de ce type de composés sont une toxicité au niveau du système nerveux et des reins, ce qui leur confère donc un usage très limité.

D'autres composés, les **polymyxines** sont des antibiotiques peptidiques cycliques. Elles agissent comme des détergents cationiques : grâce à leur caractère amphipathique, elles pénètrent dans la cellule bactérienne et s'insèrent parmi les phospholipides de la paroi, perturbant ainsi la perméabilité membranaire.²³

③ Action sur la synthèse de l'ADN et de ses précurseurs

Les « **quinolones** » comprenant l'**acide nadilixique** (Figure 7) sont des antibactériens de synthèse chimique regroupant quatre familles dérivées de la quinoléine, de la naphtyridine, de la cinnoline, de la pyrido-2-3-pyrimidine et ont pour cible la topoisomérase IV ainsi que l'ADN-gyrase bactérienne.²⁴

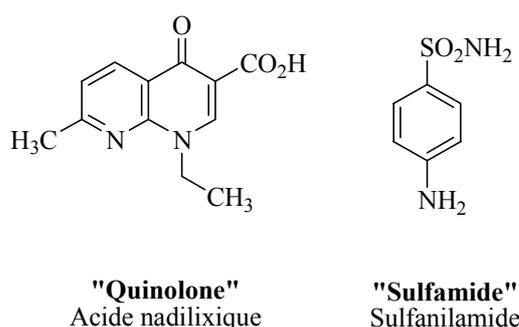


Figure 7. Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'ADN et de ses précurseurs

Les antibactériens de type « **sulfamide** » c'est-à-dire les sulfamides ou sulfonamides sont des dérivés soufrés possédant des noyaux aromatiques (ex : le **sulfanilamide**, Figure 7). Ces substances de synthèse sont appelées anti-métabolites ou analogues structuraux car elles agissent par inhibition compétitive avec les métabolites normaux de la cellule.²⁵ Les

sulfamides inhibent la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, cofacteur de la synthèse ultérieure des bases puriques et pyrimidiques. En présence de sulfamides, les bactéries s'appauvrissent en acide tétrahydrofolique et cessent de produire des bases azotées ou des acides aminés tels que la méthionine et la sérine. Ainsi ces composés sont des inhibiteurs de la synthèse des précurseurs de l'ADN. Leur action est bactériostatique mais peut devenir bactéricide en association avec les diaminopyridines comme par exemple le triméthoprime. Ces produits ont reçu des applications pharmaceutiques de tout premier ordre, notamment dans plusieurs domaines de la chimiothérapie anti-microbienne. En effet, les bactéries doivent synthétiser l'acide folique alors que les eucaryotes assimilent directement ce composé apporté par l'alimentation.

④ Action sur la synthèse protéique

Différentes classes d'antibiotiques inhibent la synthèse protéique bactérienne au niveau de l'une des trois étapes principales de la traduction : l'initiation, l'élongation (transpeptidation) et la terminaison (translocation). Les ribosomes procaryotes ne sont pas constitués des mêmes protéines que les ribosomes eucaryotes, et ont d'ailleurs des coefficients de sédimentation différents :

- 70S (procaryotes) : 50S pour la sous-unité lourde et 30S pour la sous unité légère
- 80S (eucaryotes) : 60S pour la sous-unité lourde et 40S pour la sous unité légère

Il existe différents types d'inhibiteurs suivant qu'ils se lient à la sous-unité 30S ou 50S.

- Inhibiteurs se fixant sur la sous-unité 30S

Les composés ayant ce mode d'action agissent sur la synthèse des protéines au niveau des ribosomes en se fixant sur la sous-unité 30S de ceux-ci et en empêchant la pénétration ou la fixation du complexe ARNt – acide aminé. Cela engendre une erreur de lecture du code génétique et provoque l'incorporation d'acides aminés ne correspondant pas à l'information des codons de l'ARNm. La production de telles protéines dites « non sens » est létale.

Les antibiotiques de type « **cycline** » et de type « **aminoside ou aminoglycoside** » ont de telles propriétés. Les cyclines, antibiotiques isolés de souches de *Streptomyces* et aujourd'hui obtenus par hémisynthèse, ont pour caractéristiques de posséder quatre cycles accolés (ex : la **tétracycline**, Figure 8).²⁶ Elles sont capables de pénétrer les cellules eucaryotes et elles ont donc pour cible les microorganismes intra-cellulaires comme *Chlamydia pneumoniae*. Ces molécules sont bactériostatiques, il y a donc un risque de récurrence. Les aminosides sont des molécules à base de sucres, le plus souvent aminées. Les premiers aminosides découverts l'ont été en tant que molécules naturelles, produites par des souches de *Streptomyces* (**streptomycine**, Figure 8) ou d'*Actinomyces*.

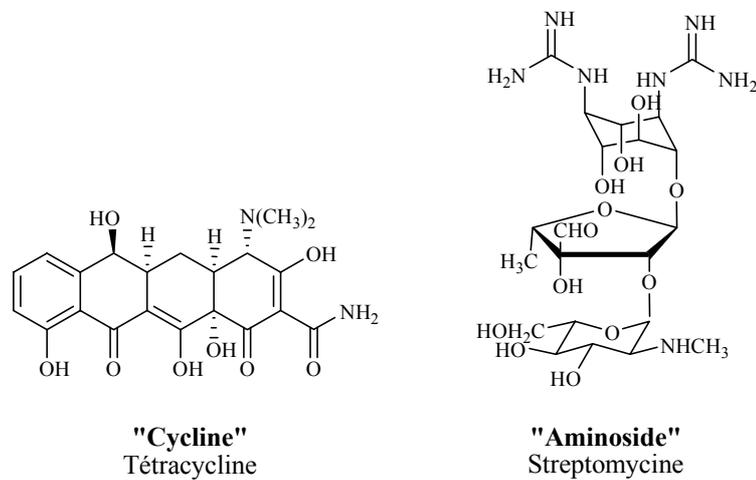


Figure 8. Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique au niveau de la sous-unité 30S du ribosome

- Inhibiteurs se fixant sur la sous-unité 50S

Trois familles d'antibiotiques agissent sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien et n'ont pas d'effet sur les ribosomes 80S des cellules eucaryotes. Ce sont les antibiotiques de type « **phénicolé** », « **macrolide** » et « **polypeptide** ».

Les phénicolés sont des amides dérivés de l'acide dichloroacétique, porteurs aussi d'un phényle substitué. Le groupement dichloroacétamide est certainement important pour l'activité antibiotique (ex : le **chloramphénicol**, Figure 9). Ces composés bloquent la

croissance du peptide sur le ribosome bactérien par inhibition de la transpeptidation (formation des liaisons peptidiques entre les acides aminés). En effet, ils se fixent à la sous-unité 50S des ribosomes bactériens et empêchent la liaison du complexe amino-acyl-ARNt à son site de fixation.²⁷ Ce sont des molécules très simples ayant un spectre d'action très large mais pour lesquelles les résistances sont nombreuses et les effets secondaires importants, car elles inhibent la synthèse des protéines mitochondriales.

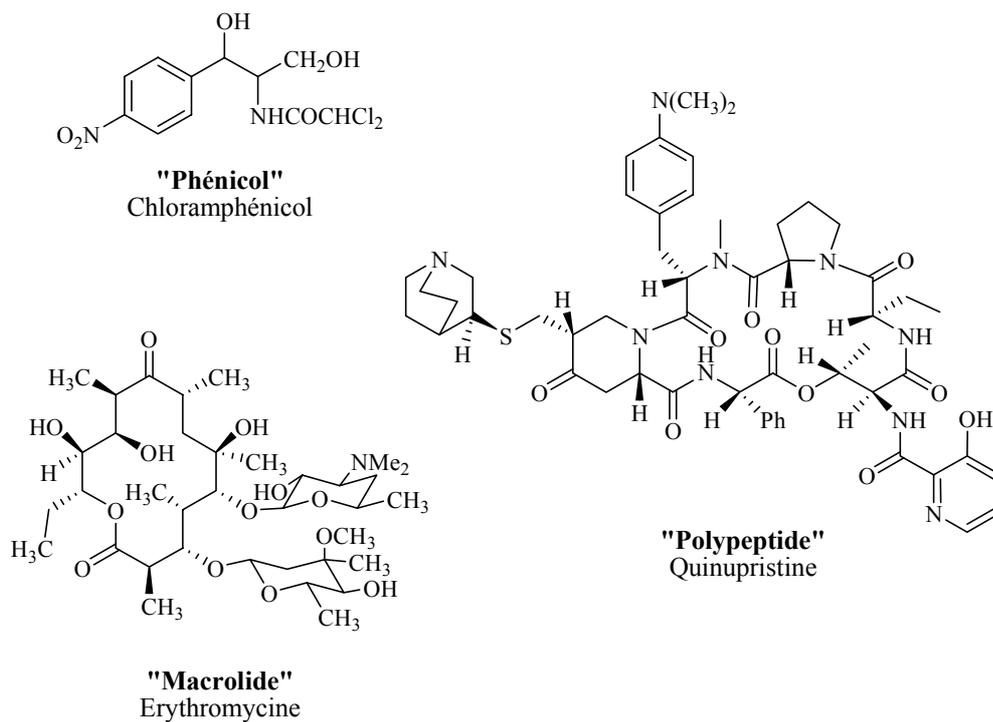


Figure 9. Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique au niveau de la sous-unité 50S du ribosome

Les macrolides sont constitués de macrocycles, porteurs de fonctions lactones, sur lesquels sont greffés des sucres neutres ou aminés (ex : l'**érythromycine**, Figure 9) et sont obtenus soit à partir de bactéries, soit par hémisynthèse. Ces composés agissent sur la synthèse des protéines au niveau des ribosomes par inhibition de la translocation c'est-à-dire que le complexe ARNt – acide aminé ne peut pas passer au niveau de deux sites voisins. Ainsi, en se fixant à la sous-unité 50S ils empêchent l'élongation de la chaîne peptidique.²⁸ Ces antibiotiques sont capables de diffuser dans les tissus et sont surtout utilisés dans le cas des infections pulmonaires.

Les polypeptides, comme la **quinupristine** (Figure 9), agissent sur le ribosome bactérien et interfèrent avec le métabolisme de l'ARN en s'opposant à l'incorporation de l'ARNt au niveau des ribosomes et en empêchant la traduction de l'ARNm.²⁹

De nos jours, beaucoup d'antibiotiques sont connus, mais leur utilisation croissante tend à entraîner des situations de résistance. En effet, malgré tous les progrès réalisés en médecine, on observe une nette émergence et réémergence des maladies infectieuses dans les pays industrialisés. Les bactéries ont acquis la capacité de se défendre contre l'effet d'un antibiotique et beaucoup de bactéries pathogènes sont devenues résistantes aux nombreux antibiotiques traditionnels.

Ce phénomène est en partie le résultat de l'utilisation abusive et non adaptée d'antibiotiques en médecine ainsi qu'en élevage industriel des animaux. L'antibiotique utilisé crée une pression de sélection qui favorise les mutations naturelles induisant la résistance à l'antibiotique en question. Les spécialistes critiquent dans ce contexte la prescription parfois trop légère de certains antibiotiques. Le phénomène serait aussi amplifié par l'usage de doses trop faibles ou sur une durée trop courte.

Par conséquent, la recherche de nouvelles armes anti-infectieuses est plus que jamais nécessaire.³⁰ Dans cet objectif, nous nous sommes intéressés à une cible jusqu'à présent peu exploitée pour la mise au point de nouveaux antibiotiques : les **isoprénoïdes**.

II. La biosynthèse des isoprénoïdes, nouvelle cible pour la mise au point d'antibiotiques

II.1 Les isoprénoïdes

Les isoprénoïdes constituent une vaste famille de substances naturelles³¹ dont le squelette carboné est formellement constitué d'un élément de base commun à squelette ramifié à cinq atomes de carbone et dérivé de l'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène) **1** (Figure 10).

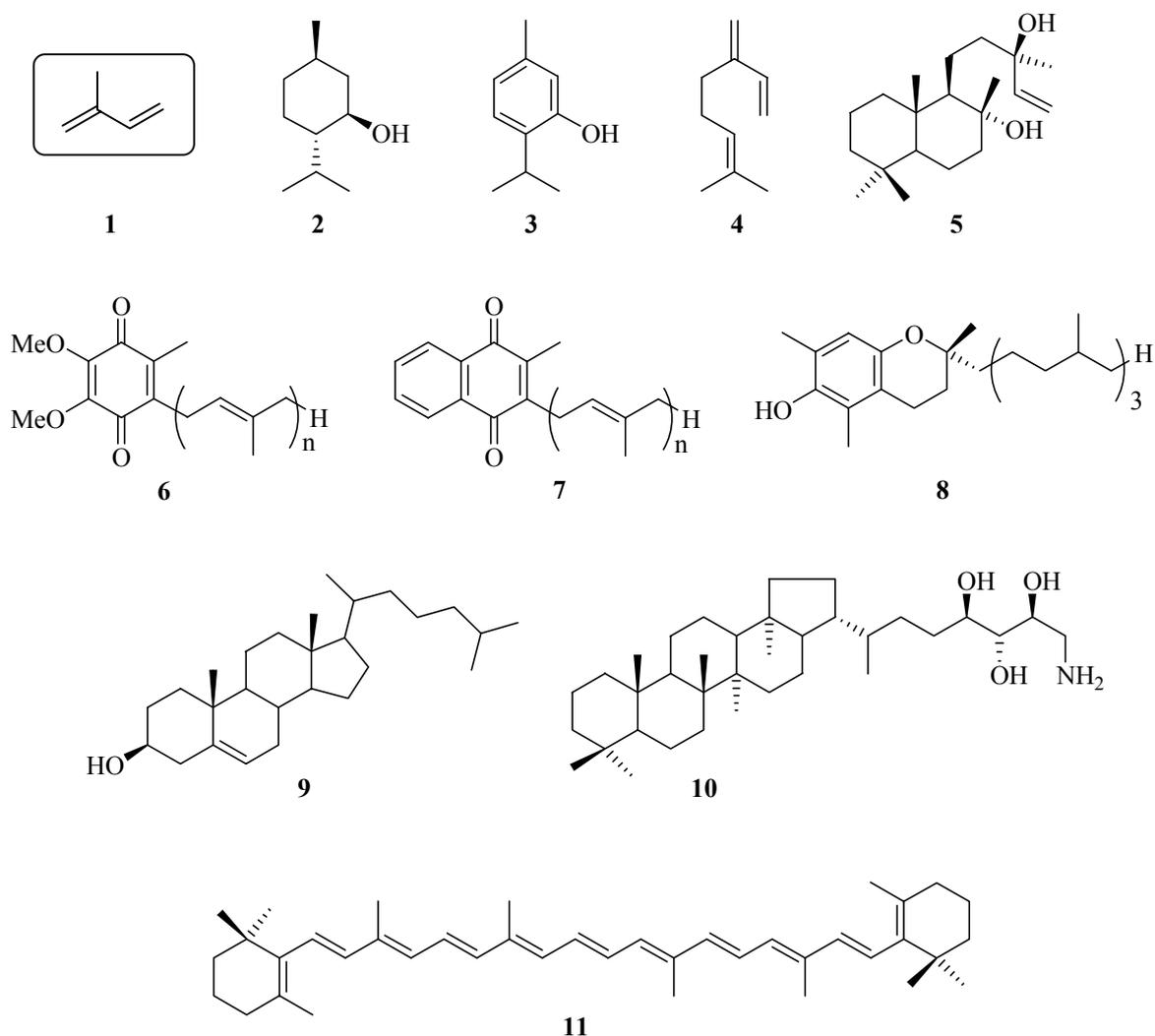


Figure 10. Exemples d'isoprénoïdes :

Menthol **2**, Thymol **3**, Myrcène **4**, Sclaréol **5**, Ubiquinones **6**, Ménaquinones **7**, Vitamine E **8**,
Cholestérol **9**, Aminobactériohopanetriol **10**, β -Carotène **11**

Les isoprénoïdes sont présents chez tous les êtres vivants et possèdent des structures, des propriétés physiques et chimiques, et des activités biologiques très diverses. Plusieurs d'entre eux sont exploités à l'échelle industrielle (industrie des cosmétiques et des parfums, industrie du caoutchouc, industrie agroalimentaire pour les arômes et les colorants alimentaires, etc...).

Parmi les exemples proposés (Figure 10), certains sont des substances odorantes, comme par exemple le menthol **2** et thymol **3**, provenant d'huiles essentielles extraites respectivement de feuilles de menthe et de fleurs de thym. Le myrcène **4** est un constituant du houblon et le sclaréol **5** est notamment utilisé en parfumerie pour la synthèse de l'ambre gris.

D'autres isoprénoïdes possèdent des rôles physiologiques très importants. Les ubiquinones **6** et les ménaquinones **7** permettent le transport d'électrons lors des processus respiratoires. La vitamine E **8**, connue pour son action anti-oxydante, stabilise *in vitro* les acides gras insaturés et les protège en empêchant leur peroxydation par piégeage des radicaux libres. La famille des stérols, métabolites essentiels, comprend le cholestérol **9** qui a pour principale fonction de réguler la stabilité, la fluidité et la perméabilité des membranes cellulaires. Chez les bactéries, les hopanoïdes, comme l'amniobactériohopanetriol **10**, jouent un rôle analogue à celui des stérols chez les Eucaryotes. Les caroténoïdes comme le β -carotène **11** sont des pigments, qui absorbent la lumière et qui, de ce fait, sont considérés comme protecteurs vis-à-vis de la photo-oxydation.

L'existence des motifs isopréniques a été envisagée pour la première fois par Wallach en 1887 qui fut le premier à proposer que des condensations successives d'unités isoprène de manière « tête-à-queue » donnent des composés chimiques à n fois cinq atomes de carbone (C_{5n}).³² Plus tard, cet aspect a été développé par Ruzicka, qui proposa un concept appelé "règle isoprénique biogénétique", la règle de Ruzicka.^{33,34} Ainsi tous les squelettes isopréniques peuvent être déduits en utilisant quelques règles en accord avec les réactions classiques de chimie organique, comme par exemple, la formation d'isoprénoïdes acycliques par condensation d'unités isopréniques en C_5 , la formation de carbocation induisant la cyclisation de 1,5-polyènes et des réarrangements de type Wagner-Meerwein.

Les diphosphates d'isopentényle (IPP) **12** et de diméthylallyle (DMAPP) **13**, équivalents biologiques de l'isoprène, sont les précurseurs communs de tous les isoprénoïdes (Figure 11) et peuvent s'isomériser grâce à une enzyme, l'IPP isomérase.^{35,36,37,38}

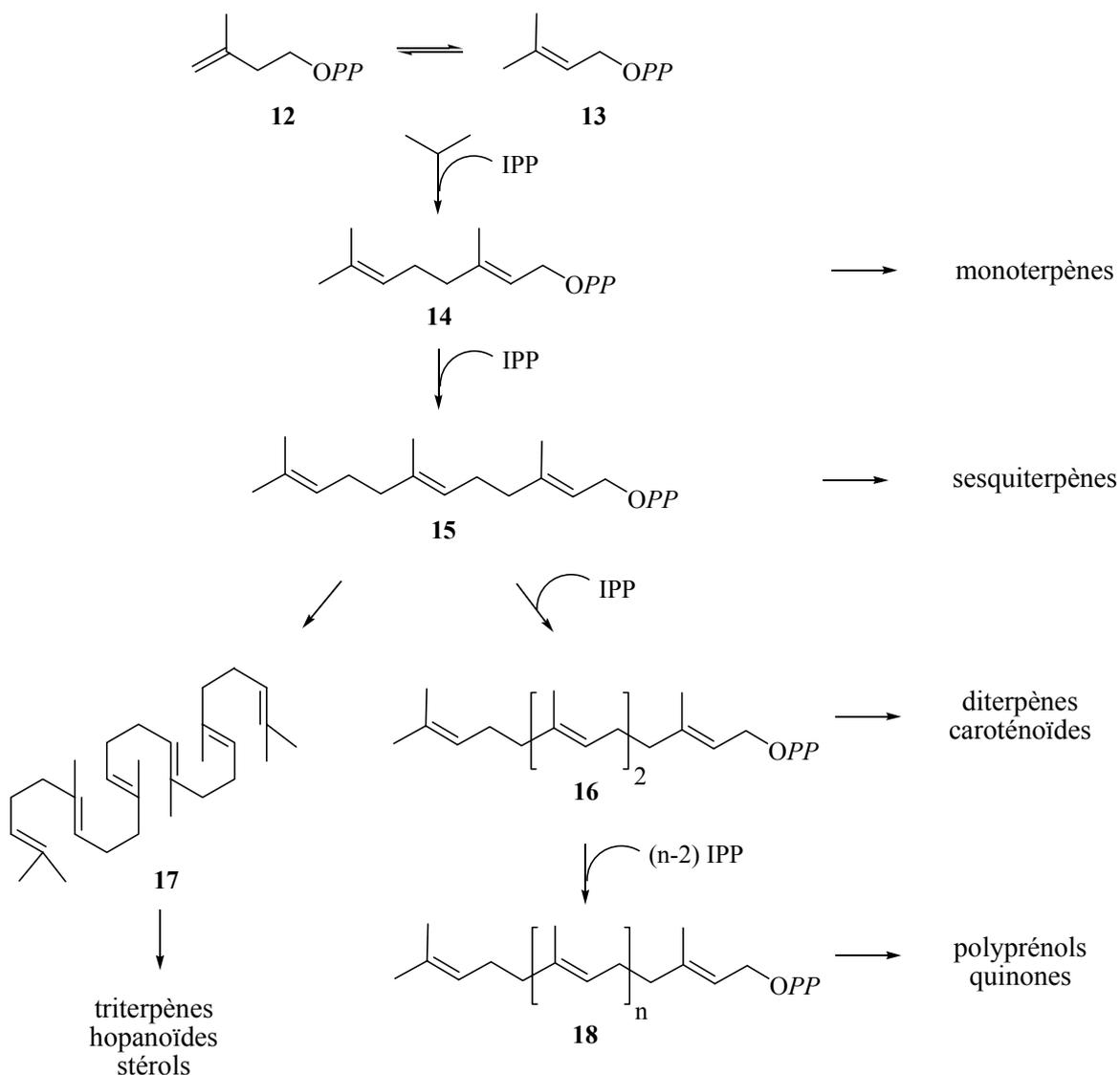


Figure 11. Biosynthèse des isoprénoïdes à partir du diphosphate d'isopentényle (IPP) **12**

La condensation du diphosphate d'isopentényle **12** (entité nucléophile) sur le diphosphate de diméthylallyle **13** (entité électrophile) mène au diphosphate de géranyle **14** (GPP, C₁₀), précurseur des monoterpènes (Figure 11). Une condensation supplémentaire de type tête-à-queue de l'IPP sur le GPP conduit au diphosphate de farnésyle **15** (FPP, C₁₅), précurseur des sesquiterpènes. Une élongation supplémentaire du diphosphate de farnésyle avec une entité d'IPP, conduit au diphosphate de géranylgéranyle **16** (GGPP), précurseur des diterpènes et des caroténoïdes. Tandis qu'une condensation "tête-à-tête" de deux molécules de diphosphate de farnésyle aboutit au squalène **17** (C₃₀), précurseur des triterpènes, des stérols et des hopanoïdes. Enfin, les composés isopréniques en C_{5n}, précurseurs des polyprényls et des quinones, proviennent de condensations successives de l'IPP sur le GGPP **16**. Les

prényles transférases permettent l'élongation des chaînes prényles par addition d'une molécule d'IPP.³⁹ Ces précurseurs acycliques isopréniques **18** peuvent subir différentes réactions chimiques (oxydations, cyclisations suivies de transpositions), ce qui permet de dénombrer à ce jour plus de 22 000 isoprénoïdes.⁴⁰

La formation des diphosphates d'isopentényle (IPP) et de diméthylallyle (DMAPP) a été considérablement étudiée, spécialement dans les tissus de foie. Cela a permis la découverte, dans les années 50, de **la voie du mévalonate** ou voie du MVA, longtemps considérée comme l'unique voie de biosynthèse des isoprénoïdes dans tous les organismes vivants. Cependant, durant ces dernières décennies, une voie alternative indépendante au mévalonate a été découverte chez plusieurs eubactéries, chez les algues et dans les chloroplastes de plantes supérieures, c'est la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate ou **la voie du MEP**.

II.2 La voie du mévalonate

Les premières étapes de la voie du mévalonate ont été parfaitement étudiées durant ces dernières décennies, et la littérature reporte de nombreux travaux sur son élucidation, ses caractéristiques et sa régulation, y compris au niveau des gènes.^{41,42,43,44}

Les tissus de foie et la levure de bière sont les principaux systèmes biologiques qui ont été étudiés pour élucider cette voie de biosynthèse. Au début des années 40, Bloch et Rittenberg ont découvert que l'incorporation d'acétate de sodium deutérié chez les souris et les rats permettait la formation de cholestérol deutérié.⁴⁵ Dix ans plus tard, Ottke a abouti à un résultat similaire en incubant de l'acétate de sodium deutérié ou marqué par du ¹³C ou ¹⁴C dans l'ergostérol d'une souche mutante du champignon *Neurospora crassa*.⁴⁶ Peu de temps après, Folkers a mis en évidence chez un mutant de *Lactobacillus acidophilus* une substance pouvant se substituer à l'acétate : le mévalonate.⁴⁷ Après incorporation de mévalonate dans le foie de rats, Tavormina a montré que les unités isopréniques de cholestérol provenaient du mévalonate.⁴⁸

Différentes études ultérieures ont permis d'établir un schéma biogénétique unique pour la formation du diphosphate d'isopentényle mettant en jeu le mévalonate (Figure 12).^{49,50}

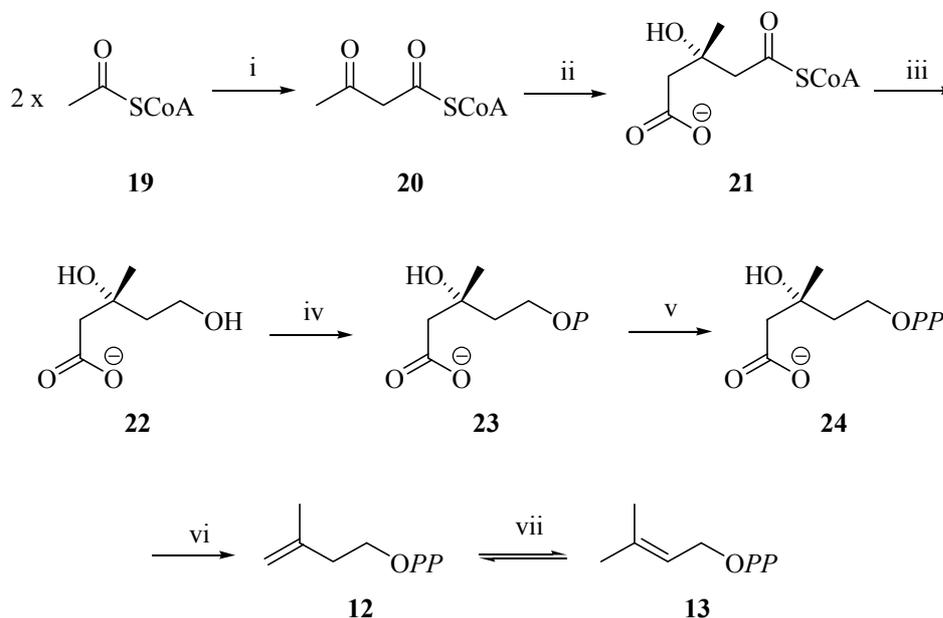


Figure 12. Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle **12** selon la voie du mévalonate :

i. Acétoacétyl-CoA thiolase; ii. HMG-CoA synthase; iii. HMG-CoA réductase; iv. Mévalonate kinase; v. Mévalonate 5-phosphate kinase; vi. Mévalonate 5-diphosphate décarboxylase; vii. IPP isomérase

Le produit de départ est l'acétate activé sous forme d'acétyl-CoA **19** (Figure 12). Une condensation de type Claisen de deux unités d'acétyl-CoA mène à l'acétoacétyl-CoA **20**. La condensation d'une troisième molécule d'acétyl-CoA conduit à la formation de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA **21**, qui est réduit en mévalonate **22** par l'HMGCoA réductase. Cette enzyme joue un rôle clé au niveau de la régulation de la biosynthèse des isoprénoïdes chez les animaux. L'alcool primaire du mévalonate est ensuite phosphorylé par la mévalonate kinase, pour mener au phosphate de mévalonate **23**, qui est converti en diphosphate de mévalonate **24** par la phosphomévalonate kinase. Ce dernier est transformé en IPP **12** par la diphosphomévalonate décarboxylase. Cette enzyme, utilisant de l'ATP, catalyse la phosphorylation de l'alcool tertiaire qui est converti en bon groupe partant, favorisant ainsi la décarboxylation concomitante de l'acide β -hydroxy phosphorylé. Cette chaîne de réactions partant de l'acétyl-CoA et conduisant à l'IPP est appelée **voie du mévalonate**.

II.3 La voie du MEP

Pendant des décennies, la voie du mévalonate a été unanimement acceptée comme étant la seule voie de biosynthèse menant à l'IPP **12** chez tous les organismes vivants. Cependant des résultats expérimentaux contradictoires ont été observés dans la biosynthèse des isoprénoïdes chez certaines bactéries et chez certaines plantes. En effet, des expériences d'incorporation d'acétate ou de mévalonate marqué au ^{13}C chez certaines bactéries n'ont pas toujours donné les résultats attendus.^{51,52} La localisation du marquage était en contradiction avec celle attendue avec la voie du mévalonate. Suite à de nombreuses expériences d'incorporation de précurseurs marqués, une nouvelle voie de biosynthèse indépendante du mévalonate a été découverte dans les eubactéries, les algues et les plantes supérieures.^{52,53,54,55}

Les deux premiers précurseurs de cette voie sont le pyruvate **25** et le glycéraldéhyde 3-phosphate **26** (GAP) (Figure 13), tous deux issus directement du métabolisme du glucose. La première réaction, catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS), conduit au 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate **27** (DXP). Ce pentulose subit un réarrangement intramoléculaire suivi d'une réduction concomitante de l'aldéhyde intermédiaire pour fournir le 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate **28** (MEP). Ce tétrol présente d'ores et déjà le motif isoprénique à cinq atomes de carbone. Ces deux réactions sont catalysées par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase (DXR). Les étapes suivantes correspondent à des modifications du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate **28**: la formation du 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol **29** (CDP-ME) suivie de la phosphorylation de l'alcool tertiaire pour donner le 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol **30** (2P-CDP-ME) et finalement la formation du 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate **31** (MECDP). Ce composé est ensuite transformé en diphosphate de (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle (HMBPP) **32**. Le dernier précurseur de cette voie indépendante du mévalonate est finalement transformé soit en diphosphate d'isopentényle soit en diphosphate de diméthylallyle. Toutes ces étapes constituent le voie de biosynthèse des isoprénoïdes selon le MEP.^{56,57,58,59,60,61}

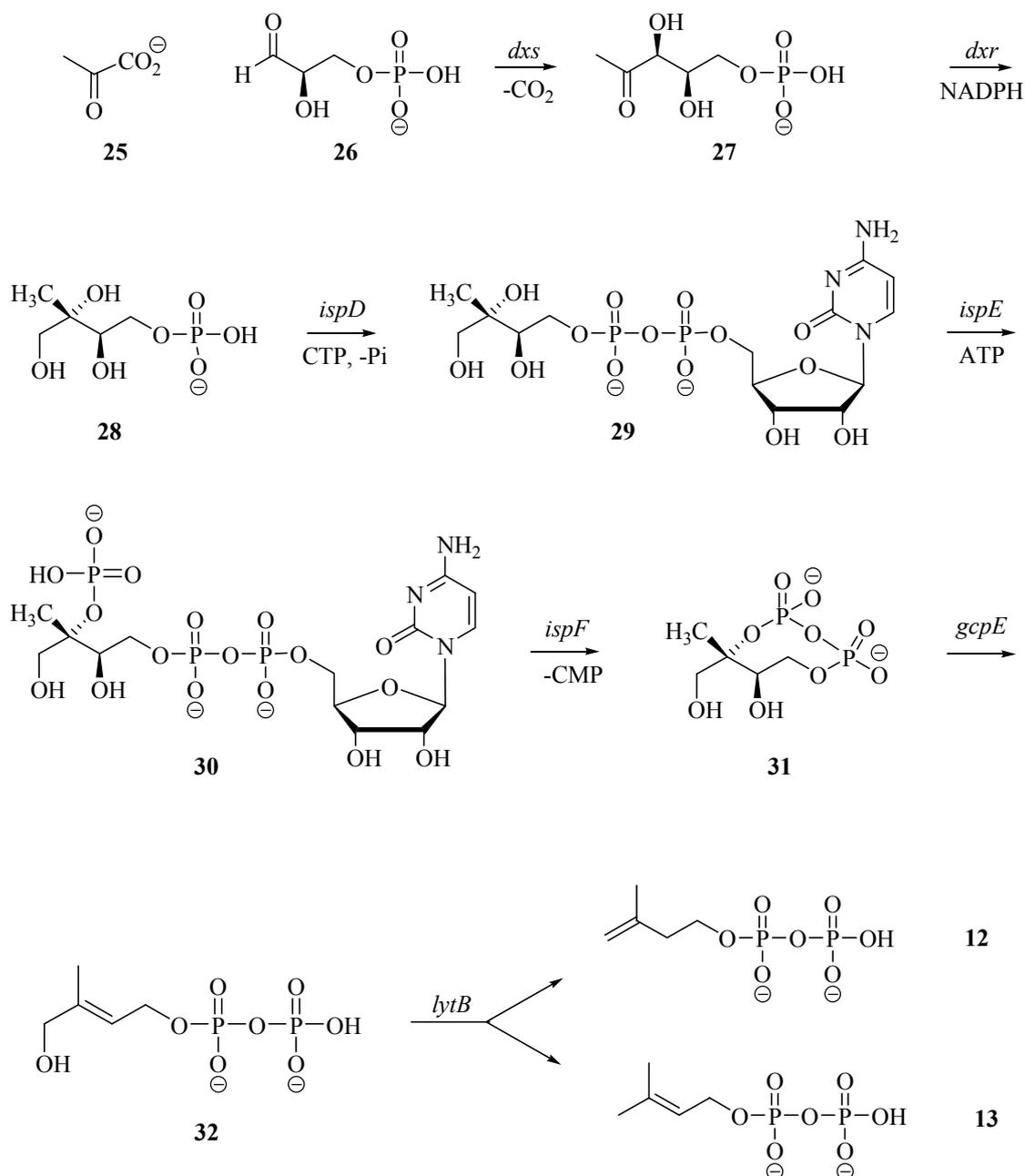


Figure 13. Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle **12** et de diméthylallyle **13** selon la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate.

a. Etape catalysée par la DXS

L'enzyme catalysant la formation du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate **27** à partir du pyruvate **25** et du D-glycéraldéhyde 3-phosphate **26** a été identifiée pour la première fois chez *E. coli*. Le gène *dxs* codant pour cette enzyme a été cloné, surexprimé et la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase a été purifiée et caractérisée.^{62,63} Par la suite, le gène de cette enzyme a également été cloné chez *Capsicum annuum*,⁶⁴ *Mentha X piperita*,⁶⁵ *Synechococcus leopoliensis*,⁶⁶ *Bacillus subtilis*, *Synechocystis* sp.,⁶⁷ *Streptomyces* sp.⁶⁸ et finalement chez *Pseudomonas aeruginosa*.⁶⁹ La 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase d'*E. coli* est un homodimère formé de deux sous-unités à 67 kDa. Cette enzyme requiert le diphosphate de thiamine (TPP) comme cofacteur.

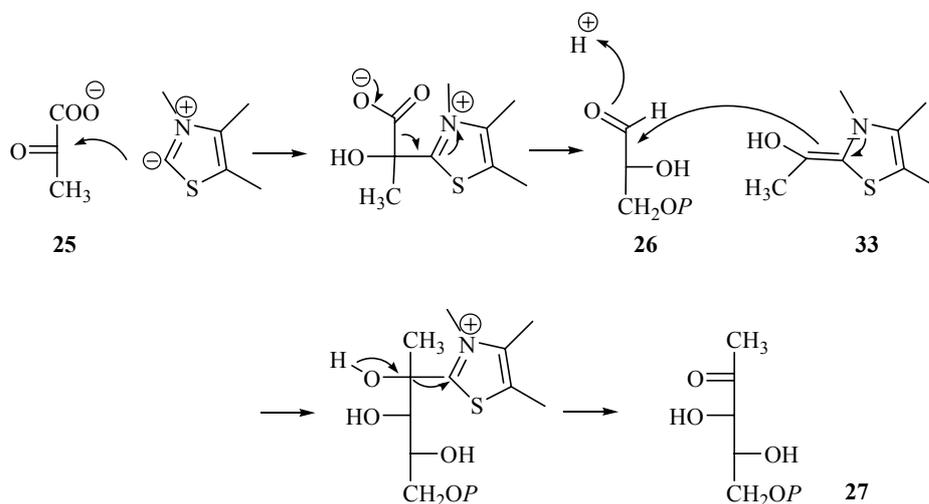


Figure 14. Etape catalysée par la **DXS**
1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (*dxs*).

La réaction catalysée par cette enzyme est une condensation de l'hydroxyéthylthiamine **33**, dérivée de la décarboxylation du pyruvate **25**, sur le groupement carbonyle C-1 du D-glycéraldéhyde 3-phosphate **26** (Figure 14). Ainsi, les premiers précurseurs, le pyruvate **25** et le D-glycéraldéhyde 3-phosphate **26** (GAP), permettent d'obtenir le 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate **27**.

b. Etape catalysée par la DXR

L'enzyme catalysant le réarrangement du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) **27** en 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate **28** (MEP) (Figure 15) est la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase (DXR) spécifiée par le gène *yaeM* (désigné également *dxr* ou *ispC*).^{70,71} La présence du groupement 5-phosphate est indispensable puisque le désoxyxylulose libre n'est pas substrat de la DXR. Le réarrangement du DXP **27** conduit à un aldéhyde **33** (2-C-méthyl-D-érythrose 4-phosphate). Cet intermédiaire n'a pas pu être directement caractérisé à ce jour et n'est probablement pas libéré du site actif.⁷²

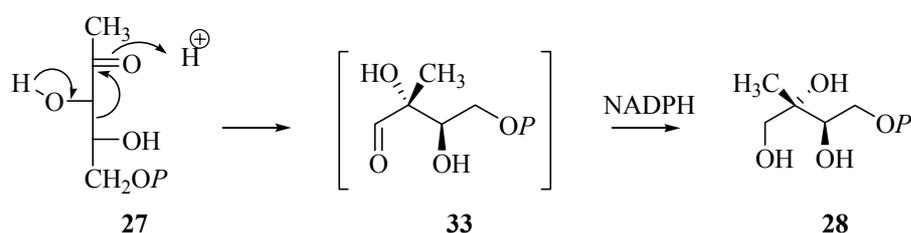


Figure 15. Etape catalysée par la **DXR**
1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase (*dxr* ou *ispC*).

L'enzyme requiert impérativement la présence d'un cation divalent tel que du Co²⁺, du Mn²⁺ ou du Mg²⁺, ainsi que le cofacteur NADPH.

Différents groupes ont également cloné et/ou caractérisé le gène *dxr* dans divers organismes, notamment chez les plantes *Arabidopsis thaliana*⁷³ et *Mentha x piperita*,⁷⁴ chez le parasite *Plasmodium falciparum*,⁷⁵ les bactéries *Synechocystis* sp.,⁷⁶ *Pseudomonas aeruginosa*,⁷⁷ *Zymomonas mobilis*⁷⁸ et *Streptomyces coelicolor*.⁷⁹ Poulter et ses collaborateurs se sont intéressés aux études cinétiques de la désoxyxylulose phosphate isoméro-réductase d'*E. coli* ainsi qu'aux interactions substrat-protéine.⁸⁰ Au laboratoire, le mécanisme de la DXP isoméro-réductase a été étudié chez *E. coli* et il a été montré que le méthylérythrose phosphate est un intermédiaire non isolable de la réaction.⁷² De plus, la conversion du DXP en MEP est réversible et l'équilibre est fortement déplacé en faveur du produit.⁷²

La stéréochimie de l'étape de réduction catalysée par la DXP isoméro-réductase a été déterminée chez une plante supérieure (*Liriodendron tulipifera*)⁸¹ et chez la cyanobactérie (*Synechocystis* sp. PCC6803).⁷⁶

En effet, des incubations de [3-²H]-1-désoxy-D-xylulose chez des feuilles de *Liriodendron tulipifera* ont fourni du méthylérythritol marqué sur la position C-1. De plus, l'hydrure provenant du réducteur biologique NADPH se retrouve sur la position correspondant à l'hydrogène *pro-R* de la position C-1 du méthylérythritol (Figure 16).⁸¹

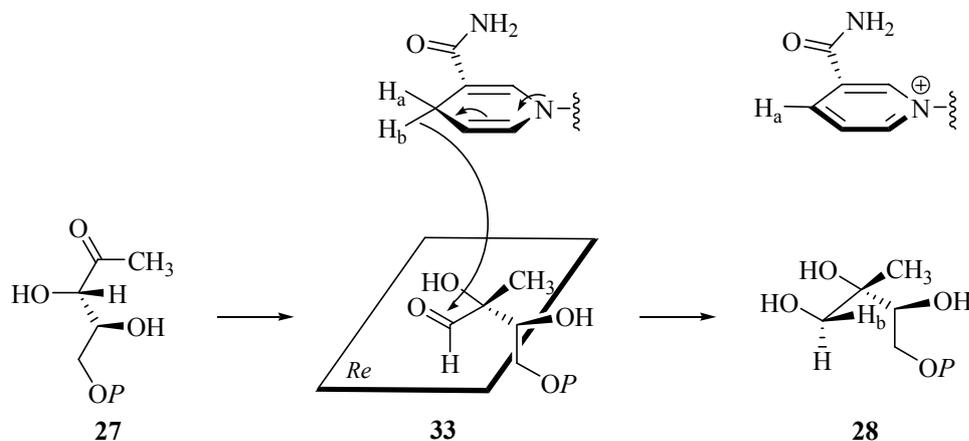


Figure 16. Stéréochimie de la réaction catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase (DXR).

Parallèlement à ces travaux, Proteau et ses collaborateurs ont montré que le proton *pro-S* de la position C-1 du 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate **28** provient du proton de la position C-3 du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate **27** lors de la réaction catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase de *Synechocystis* PC6803 qui possède également la voie indépendante au mévalonate.^{82,83} Par conséquent, l'attaque de l'hydrure provenant du NADPH a lieu sur la face *Re* de l'intermédiaire aldéhydique **33** (2-*C*-méthyl-D-érythrose 4-phosphate) (Figure 16). Le proton *pro-S* en C-4 du NADPH est transféré, indiquant que cette enzyme fait partie de la famille des déshydrogénases de classe B.⁷⁶ Des expériences similaires réalisées avec l'enzyme d'*E. coli* ont démontré que la DXP isoméro-réductase est aussi une réductase de classe B.⁸⁴

c. Etape catalysée par YgbP

L'étape suivante, la transformation du 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate **28**, est catalysée par l'enzyme YgbP ou 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyltransférase (Figure 17). Des incubations de [2-¹⁴C]-méthylérythritol 4-phosphate avec un milieu acellulaire d'*E. coli* en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et de Mg²⁺ ont permis de

détecter un nouveau composé radioactif.⁸⁵ Une fraction de l'enzyme catalysant la formation de ce composé a été partiellement purifiée puis incubée en présence de MEP et de cytidine triphosphate (CTP), ce dernier étant un cofacteur plus efficace que l'ATP. Le produit a été analysé par RMN ^{13}C , ^1H et ^{31}P . Ces données ont permis d'identifier le 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol **29** (CDP-ME) comme produit de transformation.

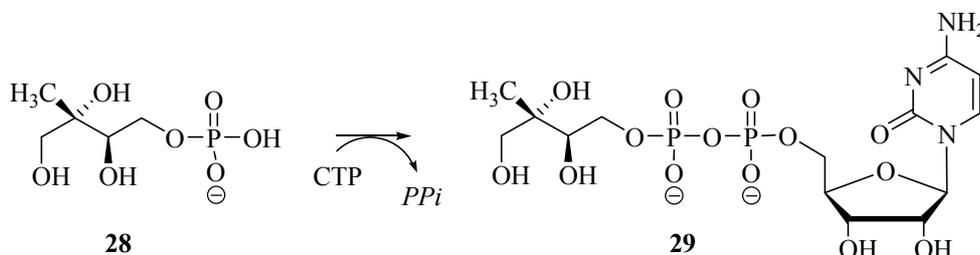


Figure 17. Etape catalysée par **YgbP**:
2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyltransférase (*ispD*).

Rohdich et ses collaborateurs ont ainsi mis en évidence une nouvelle enzyme de la voie du MEP, la protéine YgbP (codée par le gène *ygbP*), qui catalyse la formation du CDP-ME **29** à partir du MEP **28**. D'autres expériences de marquage ont montré que le [2- ^{14}C]-CDP-ME est incorporé dans les caroténoïdes des chromoplastes de *C. annuum* et suggère que le CDP-ME **29** est un intermédiaire de la biosynthèse des isoprénoïdes.

Indépendamment l'équipe de Seto a également identifié cette enzyme selon une approche différente.⁸⁶ Leur stratégie repose sur la production de souches d'*E. coli* par mutations statistiques dont la voie du MEP a été bloquée entre le MEP **28** et l'IPP **12**. De telles mutations sont létales pour la bactérie. C'est pourquoi, des gènes de la voie du mévalonate ont été ajoutés dans ces mutants d'*E. coli*. Les souches issues de cette transformation peuvent ainsi synthétiser des isoprénoïdes en utilisant la voie du mévalonate mais requièrent obligatoirement la présence de mévalonate pour pousser et survivre.

Ces souches ont ensuite permis d'identifier et de cloner le gène *ygbP*. L'enzyme codant pour ce gène a été purifiée et il a été montré qu'elle convertit le MEP en un produit inconnu en présence de cytidine triphosphate. La structure de ce composé a été déterminée à l'aide de méthodes spectroscopiques. Il s'agit du CDP-ME **29**.

d. Etape catalysée par YchB

A l'aide de méthodes bioinformatiques, il a été constaté que le gène *ychB* suit la même distribution que les gènes *dxs*, *dxr* et *ygbP*, qui sont impliqués dans la voie du MEP. Ce gène, *ychB*, semblait être impliqué dans cette nouvelle voie.⁸⁷ Ainsi, le [2-¹⁴C]-CDP-ME a été incubé avec la protéine YchB (codée par le gène *ychB*) d'*E. coli* en présence d'ATP. L'analyse par RMN ¹³C, ¹H et ³¹P du produit formé a permis d'identifier ce composé comme le 2-phosphate de 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol **30** (CDP-ME2P), produit de l'enzyme YchB (Figure 18).

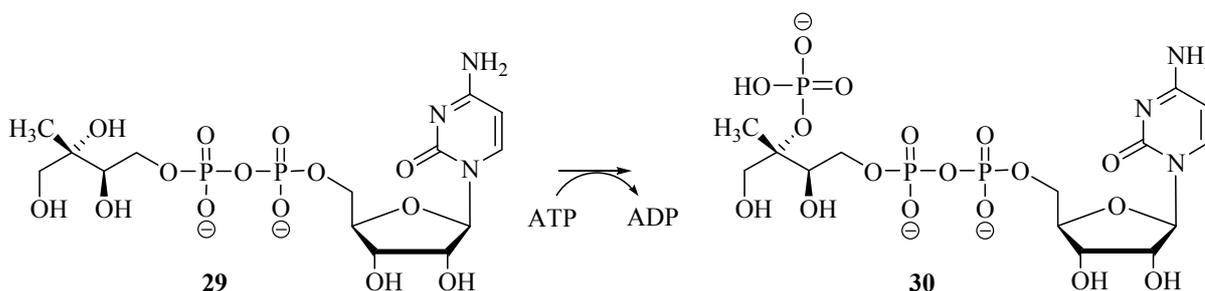


Figure 18. Etape catalysée par **YchB**
4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol kinase (*ispE*).

Le CDP-ME2P a été incorporé à nouveau dans les caroténoïdes des chromoplastes de *C. annuum* indique qu'il est un nouvel intermédiaire de la voie du MEP.

Comme pour l'étape précédente, l'équipe de Seto a également identifié indépendamment ce gène (*ychB*) ainsi que le produit (CDP-ME2P) de l'enzyme correspondante (YchB).⁸⁸

e. Etape catalysée par YgbB

Dans de nombreux organismes, le gène *ygbB* est étroitement lié au gène *ybgP*.⁸⁹ Après expression de ce gène chez *E. coli*, la protéine correspondante a été incubée en présence de 2-phosphate de 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol **30** et d'un cation divalent (Mn²⁺ ou Mg²⁺). D'après les données de RMN, le 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate **31** (ME-2,4cPP) est obtenu ainsi que de la cytidine monophosphate (Figure 19).

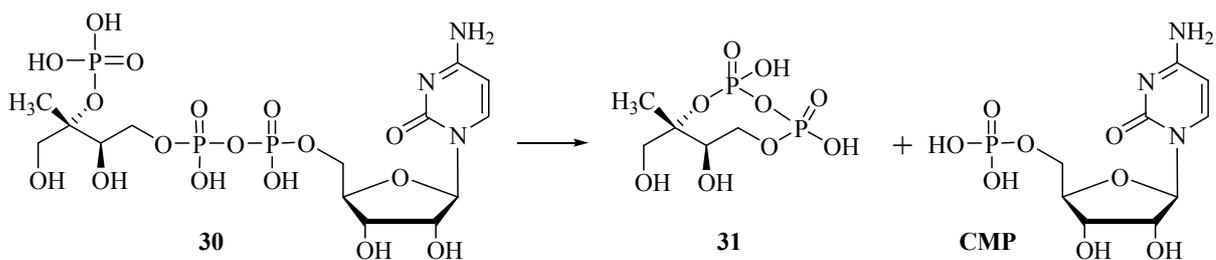


Figure 19. Etape catalysée par **YgbB**
2-C-méthyl-D-érythritol cyclodiphosphate synthase (*ispF*).

Le diphosphate cyclique **31** est bien un intermédiaire de la voie indépendante du mévalonate, car il est incorporé dans les caroténoïdes des chromoplastes de *C. annuum*.

L'équipe de Seto a également identifié le gène *ygbB* ainsi que le produit, ME-2,4cPP, de l'enzyme correspondante (YgbB) à partir de mutants d'*E. coli*.⁹⁰

f. Etape catalysée par GcpE

L'avant dernière étape de la voie du MEP est catalysée par l'enzyme GcpE qui transforme le 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate **31** en diphosphate de (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle **32** (Figure 20). La construction de mutants d'*E. coli* a permis de montrer que le gène *gcpE* codant pour l'enzyme GcpE est un gène essentiel de la voie du MEP et que le substrat de cette enzyme est le 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate **31**.^{91,92} La protéine codée par *gcpE* a ensuite été clonée puis surexprimée chez *E. coli* et incubée en présence de [2-¹⁴C]-ME cyclodiphosphate et d'un inhibiteur de phosphatase. Les résultats ont montré que le produit formé est le diphosphate de (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle **32**.^{93,94}

Au laboratoire, il a été montré que la protéine GcpE possède un centre [4Fe-4S]²⁺ et est active en présence d'un réducteur chimique tel que la DAF (5-déazaflavine) ou en présence d'un réducteur biologique, le système flavodoxine / flavodoxine réductase / NADPH.⁹⁵

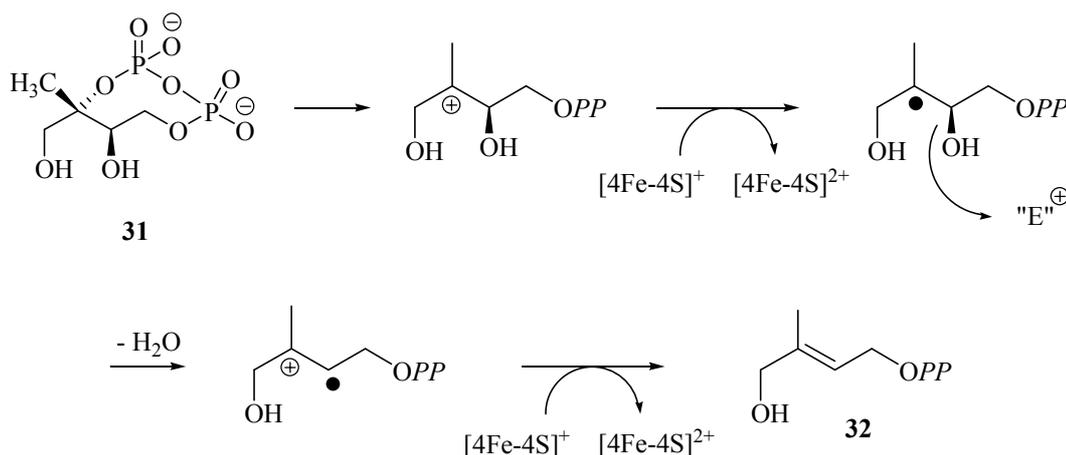


Figure 20. Etape catalysée par **GcpE** et mécanisme hypothétique de réaction

La présence du centre $[4\text{Fe-4S}]$ dans GcpE suggère une réaction radicalaire correspondant à une réduction par transfert de deux électrons. Un mécanisme hypothétique a été proposé par analogie avec d'autres réactions catalysées par des enzymes à centres $[4\text{Fe-4S}]$. L'ouverture de cycle du MEcPP conduirait à un carbocation tertiaire. La réduction par un électron fourni par le centre $[4\text{Fe-4S}]^+$, suivi d'une déshydratation conduirait à un intermédiaire radical-cation. Par transfert d'un deuxième électron provenant du centre $[4\text{Fe-4S}]$ de GcpE, le dernier intermédiaire de la voie du MEP, le diphosphate de (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle **32** serait ainsi formé.

g. Etape catalysée par LytB

A l'aide de recherches bioinformatiques et de construction de mutants d'*E. coli*, il a été montré que *lytB* est un gène de la voie du MEP et que ce gène est essentiel car sa suppression est létale.^{96,97} Il a également été établi que le diphosphate de (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle **32** est le substrat de la protéine LytB, que le gène *lytB* correspond au point de branchement de la voie du MEP et que l'IPP **12** et le DMAPP **13**, précurseurs communs de tous les isoprénoïdes, sont les produits de réaction catalysée par LytB (Figure 21).^{98,99}

Au laboratoire, il a été montré que la protéine LytB possède un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$. Le test enzymatique nécessite la présence d'un système réducteur endogène d'*E. coli* (flavodoxine / flavodoxine réductase / NADPH).¹⁰⁰

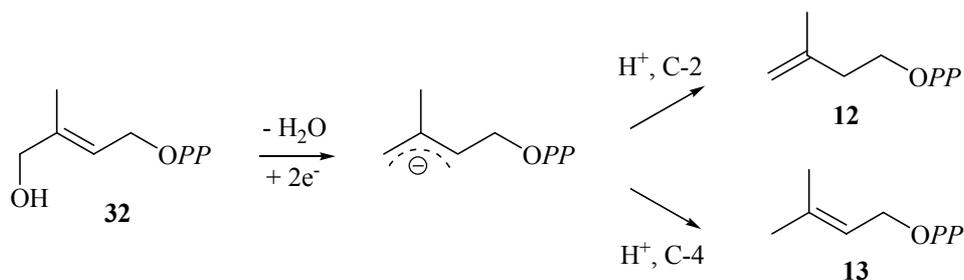


Figure 21. Etape catalysée par **LytB** et mécanisme hypothétique de réaction

Le site actif de LytB est un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ et un mécanisme hypothétique a été proposé. Après transfert de deux électrons puis élimination d'eau, un anion allylique pourrait être obtenu qui après une protonation en C-2 conduirait à l'IPP **12** alors qu'une protonation en C-4 conduirait au DMAPP **13**. Dans les essais enzymatiques, le centre oxydé est alors réduit en présence soit de dithionite, soit du radical semiquinone de la DAF, soit du système réducteur flavodoxine / flavodoxine réductase / NADPH.

Toutes les étapes de la voie du MEP sont à présent élucidées. Il reste cependant à confirmer les mécanismes des deux dernières étapes conduisant aux précurseurs des isoprénoïdes : l'IPP et le DMAPP.

II.4 Distribution des voies du MVA et du MEP

La voie de biosynthèse des isoprénoïdes selon le mévalonate est présente chez les animaux, les champignons, les végétaux (cytoplasme), quelques eubactéries et les archéobactéries (Figure 22).⁵²

| Bactéries | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>Borrelia burgdorferi</i> | <i>Nannocystis exedens</i> |
| <i>Chloroflexus aurantiacus</i> | <i>Paracoccus</i> sp |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Flavobacterium</i> sp | <i>Staphylococcus carnosus</i> |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | <i>Streptococcus mutans</i> |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| <i>Myxococcus fulvus</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |

Figure 22. Distribution de la voie du MVA chez les Bactéries

La distribution de la voie du MEP résulte en premier lieu des résultats biochimiques obtenus après des expériences d'incubations de précurseurs marqués par des isotopes stables et analyse des marquages des isoprénoïdes obtenus.^{52,101} Ces expériences ont été appliquées aux bactéries puis étendues aux algues unicellulaires et aux plantes. Par la suite, une analyse bioinformatique des gènes connus de la voie du MEP a précisé la distribution de cette voie dans les organismes étudiés.¹⁰²

La voie indépendante du mévalonate est répandue parmi les bactéries (Figure 23). Elle a été détectée dans les bactéries Gram-négatives et Gram-positives.

Dans des *Streptomyces* sp., les deux voies sont présentes, mais ne sont pas simultanément exprimées.^{103,104} La voie du MEP est préférentiellement utilisée pendant la phase exponentielle de croissance correspondant à la biosynthèse des métabolites essentiels comme les ménaquinones, tandis que la voie du mévalonate est impliquée pendant la phase stationnaire où des métabolites secondaires comme les antibiotiques à motif isoprénique sont synthétisés.

| Bactéries | | |
|--|--------------------------------------|--|
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | <i>Ehrlichia chaffeensis</i> | <i>Psychrobacter</i> sp |
| <i>Acinetobacillus actinomycetemcomitans</i> | <i>Erwinia carotovora</i> | <i>Ralstonia pickettii</i> |
| <i>Acinetobacillus pleuropneumoniae</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Rhodobacter capsulatus</i> |
| <i>Acinetoplanes</i> sp A40644 | <i>Eubacterium</i> sp | <i>Rhodopseudomonas acidophila</i> |
| <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> | <i>Francisella tularensis</i> | <i>Rhodopseudomonas palustris</i> |
| <i>Anaplasma phagocytophilum</i> | <i>Fusobacterium nucleatum</i> | <i>Salmonella enterica</i> |
| <i>Aquifex aeolicus</i> | <i>Gardnerella vaginalis</i> | <i>Salmonella enteritidis</i> |
| <i>Bacillus anthracis</i> | <i>Haemophilus ducreyi</i> | <i>Salmonella typhi</i> |
| <i>Bacillus cereus</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> | <i>Salmonella typhimurium</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Helicobacter jejuni</i> | <i>Serratia marcescens</i> |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | <i>Helicobacter pylori</i> | <i>Shewanella putrefaciens</i> |
| <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> | <i>Klebsilla pneumoniae</i> | <i>Shigella flexneri</i> |
| <i>Bifidobacterium longum</i> | <i>Leptospira interrogans</i> | <i>Shigella dysenteriae</i> |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Sphingobacterium multivorum</i> |
| <i>Bordetella pertussis</i> | <i>Mannheimia haemolytica</i> | <i>Streptomyces aeriouvifer</i> CL190* |
| <i>Brucella melitensis</i> | <i>Methylobacterium fujisawaense</i> | <i>Streptomyces blastmyceticum</i> |
| <i>Brucella suis</i> | <i>Methylobacterium organophilum</i> | <i>Streptomyces exfoliatus</i> |
| <i>Burkholderia caryophylli</i> | <i>Moraxella catarrhalis</i> | <i>Streptomyces ghanaensis</i> |
| <i>Burkholderia cepacea</i> | <i>Mycobacterium avium</i> | <i>Streptomyces griseolosporus</i> * |
| <i>Burkholderia gladioli</i> | <i>Mycobacterium bovis</i> | <i>Streptomyces niveus</i> |
| <i>Burkholderia mallei</i> | <i>Mycobacterium leprae</i> | <i>Streptomyces spheroides</i> |
| <i>Burkholderia pseudomallei</i> | <i>Mycobacterium phlei</i> | <i>Streptomyces</i> sp QC45B |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | <i>Mycobacterium smegmatis</i> | <i>Streptomyces</i> sp UC5319 |
| <i>Caulobacter crescentus</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | <i>Streptomyces</i> sp JP95 |
| <i>Chlamydia muridarum</i> | <i>Mycoplasma penetrans</i> | <i>Synechocystis</i> sp PCC 6803 |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i> | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | <i>Tannerella forsythensis</i> |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | <i>Neisseria meningitidis</i> | <i>Thermotoga maritima</i> |
| <i>Chlamydophila pneumoniae</i> | <i>Nocardia brasiliensis</i> | <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> |
| <i>Chlorobium tepidum</i> | <i>Neorickettsia sennetsu</i> | <i>Treponema denticola</i> |
| <i>Citrobacter freundii</i> | <i>Pasteurella multocida</i> | <i>Treponema pallidum</i> |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> | <i>Peptostreptococcus</i> sp | <i>Tropheryma whipplei</i> |
| <i>Clostridium botulinum</i> | <i>Porphyromonas gingivalis</i> | <i>Vibrio cholerae</i> |
| <i>Clostridium difficile</i> | <i>Prevotella intermedia</i> | <i>Vibrio vulnificus</i> |
| <i>Clostridium perfringens</i> | <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Wolbachia</i> sp |
| <i>Clostridium tetani</i> | <i>Providencia stuartii</i> | <i>Xylella fastidiosa</i> |
| <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Yersinia pestis</i> |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | <i>Yersinia enterocolitica</i> |
| <i>Deinococcus radiodurans</i> | <i>Pseudomonas putida</i> | <i>Zymomonas mobilis</i> |

* organismes possédant les deux voies

Figure 23. Distribution de la voie du MEP chez les bactéries

La voie du MEP est également présente dans les chloroplastes de plantes supérieures (Figure 24). En effet, chez les végétaux où coexistent les deux voies de biosynthèses, une compartimentation a été trouvée.¹⁰⁵ La voie du mévalonate est présente dans le cytoplasme où sont synthétisés les triterpènes, incluant les stéroïdes qui jouent un rôle de stabilisateur des membranes, et la chaîne prényle de l'ubiquinone. A l'opposé, la plastoquinone ou encore les caroténoïdes sont formés dans les chloroplastes par la voie du MEP. Lors de travaux menés sur des embryons de *Ginkgo biloba*, il a été montré que les stéroïdes du cytoplasme sont synthétisés selon la voie du mévalonate alors que les diterpénoïdes synthétisés dans les chloroplastes proviennent de la voie indépendante du mévalonate. Toutefois dans cette compartimentation, l'IPP peut être échangé entre le cytoplasme et les chloroplastes.

| Algues vertes | Plantes supérieures | |
|----------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | <i>Daucus carota</i> | <i>Hordeum vulgare</i> |
| <i>Chlorella fusca</i> | <i>Hordeum vulgare</i> | <i>Persea americana</i> |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | <i>Lemna gibba</i> | <i>Spinacea oleacea</i> |
| <i>Prototheca wickermanii</i> | <i>Ginkgo biloba</i> | <i>Eucalyptus globulus</i> |
| <i>Conocephalum conicum</i> | <i>Taxus chinensis</i> | <i>Clematis vitisalba</i> |
| <i>Ricciocarpos natans</i> | <i>Salvia miltiorrhiza</i> | <i>Hedera helix</i> |
| <i>Botryococcus braunii</i> | <i>Marrubium vulgare</i> | <i>Passiflora caerulea</i> |
| | <i>Mentha x piperita</i> | <i>Callicarpa japonica</i> |
| Algues rouges | <i>Mentha pulegium</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> |
| <i>Cyanidium caldarium</i> | <i>Thymus vulgaris</i> | <i>Catharanthus roseus</i> |
| | <i>Geranium graveolens</i> | <i>Ipomoea parasitica</i> |
| Chrysophyte | <i>Chelidonium majus</i> | <i>Liriodendron tulipifera</i> |
| <i>Ochromonas danica</i> | <i>Populus nigra</i> | <i>Scoparia dulcis</i> |
| | <i>Salix viminalis</i> | <i>Lepidolaena hodsganiae</i> |
| Diatomés | <i>Catharanthus roseus</i> | <i>Cinchona 'Robusta'</i> |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | <i>Matricaria recutita</i> | |
| <i>Nitzschia ovalis</i> | <i>Mentha citrata</i> | |
| | <i>Phaseolus lunatus</i> | |
| Protozoaires | <i>Apium graveolens</i> | |
| <i>Plasmodium spp.</i> | <i>Solidago canadensis</i> | |

Figure 24. Distribution de la voie du MEP

La répartition dans le monde du vivant des deux voies de biosynthèses des isoprénoïdes (Figure 25) permet de proposer la biosynthèse de ces composés comme cible pour la mise au point de nouveaux antibiotiques.^{30,61}

| Voie du MVA | Voie du MEP |
|------------------------|------------------------------|
| Champignons | Algues vertes unicellulaires |
| Végétaux (cytoplastes) | Végétaux (chloroplastes) |
| Quelques Eubactéries | Eubactéries |
| Archéobactéries | <i>Plasmodium</i> spp. |
| Animaux | |

Figure 25. Récapitulatif de la distribution des deux voies chez les êtres vivants

En effet, les enzymes impliquées dans la voie du MEP n'étant pas présentes chez les animaux, elles représentent des cibles potentielles pour le développement de nouveaux médicaments contre les maladies causées par des bactéries pathogènes ou par des parasites comme *Plasmodium falciparum* (malaria) ainsi que pour la conception de nouveaux herbicides.

II.5 Inhibiteurs de la voie du MEP

La voie du MEP a été découverte récemment et jusqu'à présent peu d'articles ont été publiés sur l'utilisation de cette voie comme cible pour le développement de nouveaux agents antibactériens. Toutefois quelques inhibiteurs de cette voie ont été décrits dans la littérature.

a. Inhibiteurs de la DXS

* Les 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* catalysant la synthèse du DXP sont inhibées par le fluoropyruvate **34** (Figure 26) avec respectivement des IC_{50} de 80 μ M et 400 μ M.¹⁰⁶ Le fluoropyruvate est supposé se lier de manière covalente au site actif de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase.

* La 5-kétoclomazone **35** (Figure 26), produit de décomposition de l'herbicide clomazone, inhibe la DXS de l'algue verte *Chlamydomonas* ($IC_{50} \approx 0.1$ mM) alors que la clomazone n'a pas d'effet.¹⁰⁷

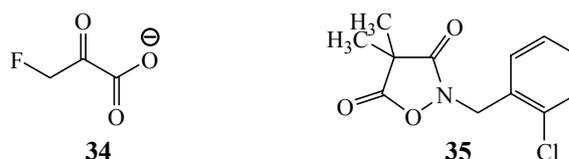


Figure 26. Inhibiteurs de la DXS de la voie du MEP

Cependant, cette enzyme n'est pas une enzyme de choix, car ses substrats sont impliqués dans plusieurs voies de biosynthèse et, les inhibiteurs pourraient également bloquer d'autres enzymes utilisant le diphosphate de thiamine comme cofacteur (exemple : les transcétolases) ce qui n'est pas souhaitable.

b. Inhibiteurs de la DXR

* La fosmidomycine [acide 3-(*N*-formyl-*N*-hydroxyamino)propylphosphonique] **36** (Figure 27) est un antibiotique qui a été découvert par « Fujisawa Research Laboratories ». ¹⁰⁸ Il possède une activité antibactérienne contre beaucoup de bactéries Gram-négatives et quelques bactéries Gram-positives. Sa toxicité envers les animaux est faible, et cet antibiotique est efficace sur des souris infectées. ¹⁰⁹ Il a été montré que des bactéries possédant la voie du mévalonate étaient résistantes à la fosmidomycine et que des traitements à ce composé étaient responsables d'une baisse des quantités d'ubiquinone et de ménaquinone chez *E. coli* et des caroténoïdes chez *Micrococcus luteus*. ¹¹⁰ Cela a permis d'affirmer que la fosmidomycine a un effet sur la biosynthèse des isoprénoïdes et plus particulièrement sur la voie indépendante du mévalonate. Cela a été vérifié lorsque les enzymes ont été disponibles. Il a été montré que la fosmidomycine est un inhibiteur de type mixte de la DXP isoméro-réductase provenant de *E. coli* ($K_i = 38 \text{ nM}$) ¹¹¹ et un inhibiteur compétitif de l'enzyme provenant de *Zymomonas mobilis* ($K_i = 0.6 \text{ }\mu\text{M}$). ¹¹²

De plus, la DXP isoméro-réductase du parasite responsable du paludisme, *Plasmodium falciparum* est inhibée par la fosmidomycine **36** et son analogue FR-900098 **37** (Figure 27) d'une manière dose dépendante. ⁷⁵ Un autre antibiotique, le composé FR-33289 **38** (Figure 27), analogue à la fosmidomycine, est connu mais ses constantes biochimiques n'ont pas été déterminées. ¹¹⁰ La fosmidomycine **36** et le composé FR-900098 **37** sont des agents anti-paludéens potentiels. En effet, des souris infectées par le parasite *Plasmodium vinckei* ont été traitées par injection intrapéritonéale de fosmidomycine **36** ($> 10 \text{ mg/Kg}$) ou de FR-900098

37 (5mg/Kg), et aucun parasite n'a été retrouvé alors que les animaux non traités sont morts 7 jours après l'injection. Après administration par voie orale de fosmidomycine **36** ou de FR-900098 **37** (50 ou 100 mg/Kg), des résultats analogues ont été obtenus. Le composé **39**, prodrogué du FR-900098 a montré une activité supérieure contre *Plasmodium vinckei* après administration orale ou intrapéritonéale.¹¹³ De plus, des tests effectués sur l'homme au Gabon et en Thaïlande ont montré que la fosmidomycine **36** permet de soigner des patients atteints de malaria. Le médicament est bien toléré malgré quelques effets secondaires gastro-intestinaux et une disparition de fièvre et du parasite a été observée en sept jours.¹¹⁴

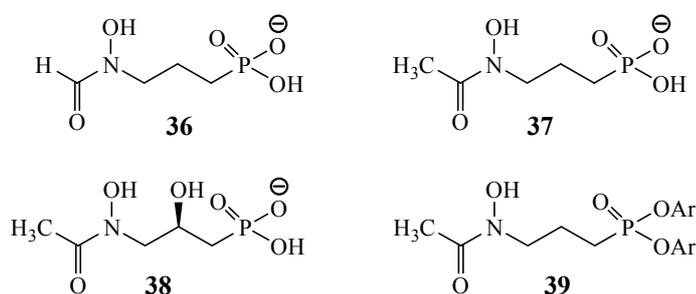


Figure 27. Inhibiteurs de la DXR de la voie du MEP

Chez les plantes, l'émission d'isoprène par des feuilles de *Populus nigra*, *Platanus x acerifolia*, et *Chelidonium majus*, l'accumulation de lycopène dans la tomate et la biosynthèse des caroténoïdes et autres pigments chez des plantes supérieures comme la chlorophylle chez *Lemna gibba* sont également inhibés *in vivo* par la fosmidomycine **36**.¹¹⁵ Ce composé bloque également l'incorporation de [1,2-¹⁴C₂]DXP dans le β -carotène chez *Capsicum annum*, tandis que l'incorporation de MEP ou d'IPP marqué n'est pas affectée, indiquant que la DXP isoméro-réductase est bien la cible de l'antibiotique.¹¹⁶

* Deux analogues du DXP dans lesquels il manque une fonction hydroxyle en position C3 **40** (K_i = 800 μ M) ou C4 **41** (K_i = 120 μ M) ont été synthétisés au laboratoire et ont montré des activités sur la DXR en tant qu'inhibiteur de type mixte et réversible (Figure 28).⁷²

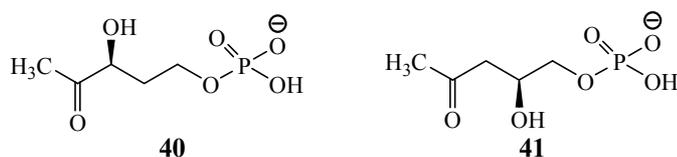


Figure 28. Inhibiteurs de la DXR de la voie du MEP

* Des analogues mono-fluorés du DXP ont été synthétisés (Figure 29) et testés sur une DXR d'*E. coli*.¹¹⁷ Les résultats ont montré que ces analogues agissent comme des inhibiteurs non compétitifs du DXP avec des constantes d'inhibition de 444 μM pour le composé **42** et de 733 μM pour **43**.

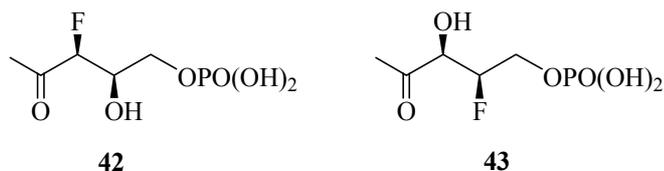


Figure 29. Inhibiteurs de la DXR de la voie du MEP

* Récemment, d'autres analogues contenant un carbone supplémentaire ou une fonction amide et un diastéréoisomère du DXP ont été préparés (Figure 30).¹¹⁸ Ces composés ont été testés sur une DXR de *Synechocystis* PCC6803, et se comportent comme des inhibiteurs compétitifs faibles avec des valeurs de K_i de 30 μM pour **44**, 150 μM pour **45** et 180 μM pour **46**.

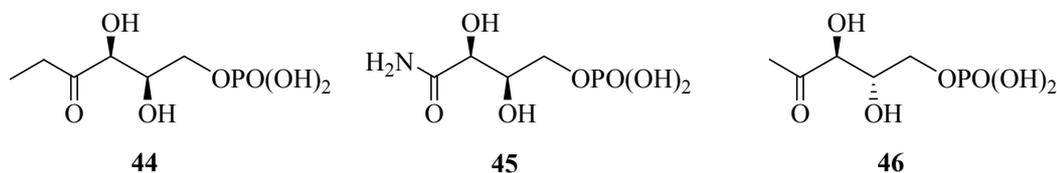


Figure 30. Inhibiteurs de la DXR de la voie du MEP

c. Inhibiteurs des autres enzymes

* Quelques bactéries répondent à un stress oxydatif induit par des molécules telles que les benzyl- et méthylviologènes ou les nitrofuranes en accumulant du 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate.^{119,120,121} De tels composés sont des pièges à radicaux libres et interfèrent avec les réactions de transfert monoélectronique. Leurs cibles sont probablement les protéines GcpE et LytB contenant des clusters Fe/S.^{122,123,124}

Cependant, l'utilisation de ces composés n'est pas judicieuse, car de nombreuses autres voies métaboliques font intervenir de tels transferts monoélectroniques.

Il existe différents types d'inhibiteurs pouvant être classés selon leur mode d'action. Ce sont les analogues de substrats d'enzymes, les analogues de l'intermédiaire ou de l'état de transition des réactions enzymatiques ou les inhibiteurs suicide. Nous avons choisi de synthétiser des analogues de substrat d'enzyme et nous nous sommes par conséquent intéressés aux fonctions mimant certains groupements présents dans de nombreux composés naturels.

III. Analogues de composés naturels

Les intermédiaires de la voie du MEP étant les cibles choisies pour synthétiser des analogues de substrat des enzymes, nous nous sommes intéressés aux analogues des fonctions présentes dans ces composés et plus particulièrement aux groupements phosphates et méthyles.

III.1 Analogues du groupement monophosphate

a. Les phosphonates

Les phosphates sont des composés répandus dans beaucoup de systèmes biologiques. Les analogues phosphonates des phosphates naturels (phosphates glycosidiques, nucléotidiques, phospholipides, phosphates produits par la glycolyse) ont des propriétés chimiques et biologiques différentes, ce qui leur confère des applications biologiques et médicales.^{125,126,127}

Dans ces composés la liaison P-O est remplacée par une liaison P-C plus stable ce qui empêche leur hydrolyse par les phosphatases. Des données cristallographiques ont permis de prédire les positions relatives des atomes d'oxygène du groupement phosphorylé et d'autres positions fixes pour les groupements phosphate et phosphonate (Figure 31).

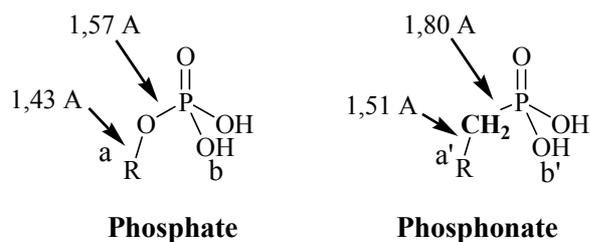


Figure 31. Comparaison phosphate-phosphonate

La variation des distances entre a et b et a' et b' est de 0,8 % seulement, la distance la plus longue étant pour le phosphonate.¹²⁷ Le pourcentage de variation des distances entre d'autres points est encore plus faible. Ces calculs ont été réalisés avec plusieurs types de composés, et des variations similaires ont toujours été trouvées. Ainsi, le terme isostérique peut être utilisé. L'encombrement stérique d'un phosphonate est donc très proche de celui d'un phosphate. Toutefois, il faut noter une différence de pKa entre les deux groupements. En effet, le deuxième pKa d'un phosphonate est en général de 0.5 à 1.5 unités moins acide que celui d'un phosphate, et de ce fait empêche les interactions au niveau du site actif entre l'oxygène du groupement phosphorylé et les sites de liaisons ou d'interaction.

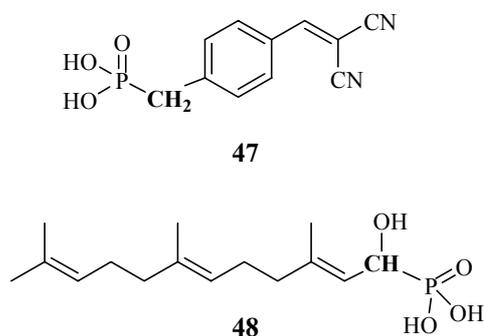


Figure 32. Exemples de phosphonates

Le phosphonate **47** (Figure 32) est un inhibiteur des protéine-kinases spécifiques au niveau de la phosphorylation d'une tyrosine (TPK),^{128,129} enzymes impliquées dans la modulation du développement et de la différenciation cellulaire. Ces enzymes sont donc des cibles pour la préparation de médicaments anticancéreux. Le composé **48** inhibe la farnésyl protéine transférase¹³⁰ qui est responsable de la farnésylation des protéines, première étape d'une série de réactions permettant l'activation de nombreux polypeptides cellulaires.

De plus, les phosphonates ont également une application pour la préparation d'anticorps catalytiques.¹³¹ En effet, ils sont utilisés comme mimes de l'état de transition de réactions chimiques (par exemple les hydrolyses d'esters ou d'amides).¹³² Ces analogues

d'états de transition sont ensuite utilisés pour stimuler une réponse immunitaire et permettent la formation d'anticorps stabilisant ces intermédiaires de réaction. Les anticorps ainsi produits sont utilisés comme catalyseurs en synthèse chimique et par exemple peuvent permettre la réduction stéréosélective de cétones prochirales par du NaBH_3CN .¹³³

b. Les thiophosphates

Les dérivés thiophosphates sont des outils puissants pour les études biochimiques et pharmacologiques, car ces composés sont moins réactifs que les phosphates correspondants et ils présentent une chiralité permettant d'effectuer des études de mécanismes enzymatiques. De plus, ils peuvent être facilement couplés à d'autres fonctions afin de créer des sondes d'affinités ou des marquages de fluorescence.

Il existe trois formes de thiophosphates : les formes thiol, thione, dithioate (Figure 33).

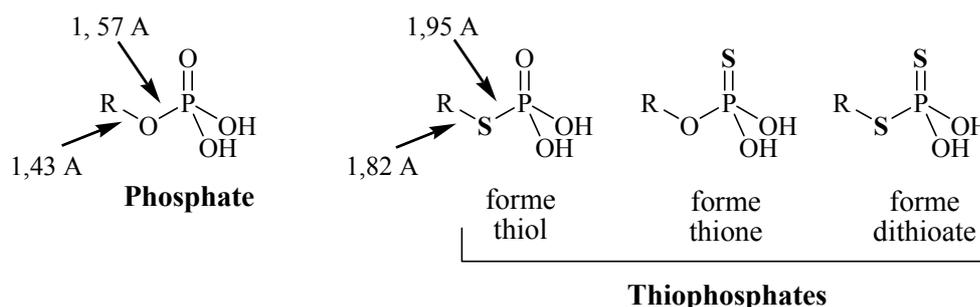


Figure 33. Les différentes formes de thiophosphates

Les thiols phosphorylés sont les analogues isostériques des alcools phosphorylés mais ils sont très labiles en conditions acides ($\text{pH} < 2$) avec des demi-vies de 4 à 90 min à 25°C dans la plupart des cas lorsqu'ils sont monoprotonés. En comparaison, la demi-vie du glucose 6-phosphate monoprotoné est de 12 h à 100°C .¹³⁴ Par contre, ces composés sont stables sous forme de dianions. L'utilisation des thiols phosphorylés est intéressante pour deux raisons. Premièrement, ils sont utilisés comme test de la sensibilité géométrique des sites actifs enzymatiques parce qu'ils sont chargés comme les esters phosphoriques, mais les liaisons sont plus longues. Ils ont cependant les mêmes capacités à faire des liaisons hydrogènes sauf pour l'atome pontant. Deuxièmement, comme des enzymes peuvent catalyser le transfert de groupements phosphorylés à partir de thiols phosphorylés, des informations sur les structures des états de transition peuvent être obtenues pour ce type de réactions. Dans ce but, l'analogue de métabolite intermédiaire **49** a été synthétisé (Figure 34).¹³⁵

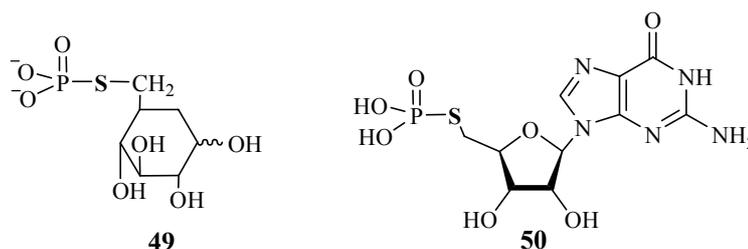


Figure 34. Les différentes formes de thiophosphates

Ces composés peuvent également être utilisés pour introduire un groupement sulfhydryl à l'extrémité 5' d'un ARN. Ainsi, le composé **50** (Figure 34) a été synthétisé et possède des applications potentielles pour l'analyse et la détection des ARN.¹³⁶

Les thiophosphates sous forme thione ont surtout été utilisés pour remplacer les liaisons phosphodiester internucléosidiques (composé **51**, Figure 35).¹³⁷ Ainsi, ces composés ont pu être appliqués à des études des réactions enzymatiques de transfert de nucléotides ou de groupements phosphorylés.

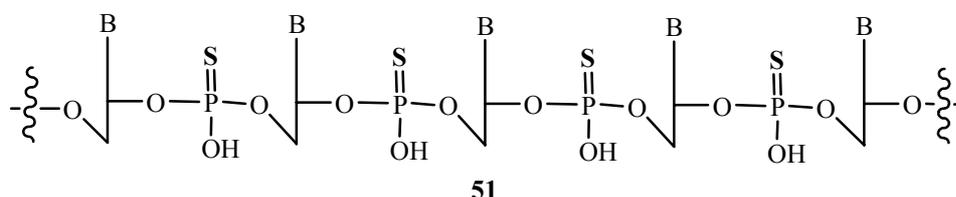
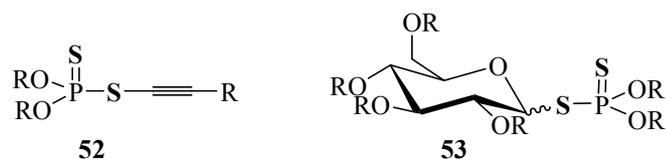


Figure 35. Thiophosphates sous forme de thione

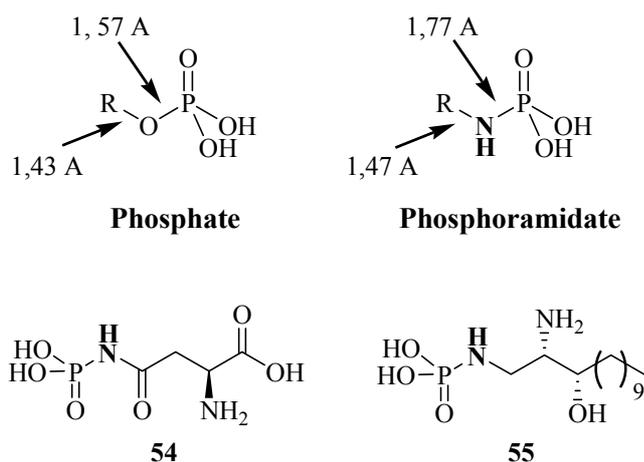
En effet, ces composés isostériques et isopolaires avec les phosphodiester normaux ont des propriétés biochimiques similaires à celles de l'ADN naturel mais ont des propriétés physiques différentes. De plus, comme ces composés sont résistants aux nucléases, ils peuvent servir de sondes anti-sens pour l'inhibition de l'expression de gènes.

Les dithiophosphates ont également des applications biologiques importantes (Figure 36). En effet, certains d'entre eux comme le composé **52** ont des propriétés insecticides fortes et sont peu toxiques pour les mammifères.¹³⁸ D'autres comme le produit **53** sont utilisés comme agents glycosylants pour la préparation d'oligosaccharides.¹³⁹

**Figure 36.** Dithiophosphates

c. Les phosphoramides

Les phosphoramides sont les analogues de phosphates pour lesquels la liaison entre le phosphore et le reste de la molécule est assurée par un atome d'azote (Figure 37). Les changements de géométrie dus au remplacement de l'oxygène pontant par l'azote sont faibles. Il est à noter que les phosphoramidates sont des analogues plus proches des phosphates que les thiophosphates. Du point de vue liaisons hydrogènes, l'azote peut se comporter de deux manières différentes selon qu'il est protoné ou pas. Le doublet non liant peut réaliser une liaison H en tant qu'accepteur et si l'azote pontant est protoné il agit comme donneur. Le second pKa d'un phosphoramidate est plus élevé (6.4) que celui d'un phosphate (5.0), et ils sont moins sensibles à l'hydrolyse. Ces propriétés leur confèrent des applications comme inhibiteurs d'enzymes.¹⁴⁰

**Figure 37.** Phosphoramidates

En effet, le composé **54** est un inhibiteur d'une enzyme bactérienne (aspartate semi-aldéhyde déshydrogénase)¹⁴¹ et le composé **55**, analogue du phosphate de sphinganine

(intermédiaire dans la biosynthèse des sphingolipides), est un inhibiteur réversible de la protéine kinase C et se comporte ainsi comme un modulateur de fonction cellulaire et messenger secondaire.¹⁴²

d. Autres analogues de phosphates

D'autres hétéroatomes comme le sélénium, l'arsenic et le vanadium ont été utilisés pour préparer des groupements analogues aux monophosphates (Figure 38).

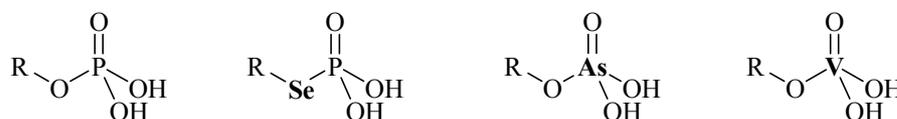


Figure 38. Analogues de phosphates

Les sélénophosphates ont joué un rôle important pour l'insertion spécifique de sélénium dans certaines enzymes dépendantes du sélénium et dans des Se-t-ARN chez les procaryotes.¹⁴³ Les composés contenant de l'arsenic ou du vanadium sont instables et sont généralement préparés *in situ* et directement appliqués aux réactions enzymatiques.¹⁴⁴

III.2 Analogues du groupement méthyle

Trifluorométhyle

Les composés contenant un groupement trifluorométhyle ont été très exploités, car leurs propriétés physico-chimiques leur confèrent des activités biologiques nouvelles. La présence de trois atomes de fluor très électronégatifs (4,0 sur l'échelle de Pauling) rend ce groupement très électro attracteur, ce qui modifie les propriétés des liaisons adjacentes. Sa taille est relativement petite (2,5 fois le volume d'un groupement méthyle), et la présence de ce groupement augmente la lipophilie de la molécule qui le contient ce qui facilite son transport dans l'organisme et donc permet d'utiliser des doses plus faibles.

Les composés contenant un groupe trifluorométhyle en α d'une cétone ont montré des propriétés inhibitrices d'hydrolases car ces composés forment des hydrates stables qui agissent comme des analogues d'états de transition. En effet, le composé **56** inhibe l'acétylcholinestérase et le composé **57** l'enzyme convertissant l'angiotensine I en angiotensine II (Figure 39).¹⁴⁵

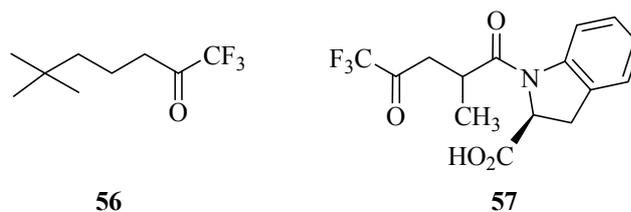


Figure 39. Composés fluorés

IV. Objectifs de la thèse

Afin de développer de nouveaux agents antibactériens potentiels, nous avons choisi comme cible la DXR et plus particulièrement son substrat, le DXP **27** qui est converti en 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate **28** (Figure 40).

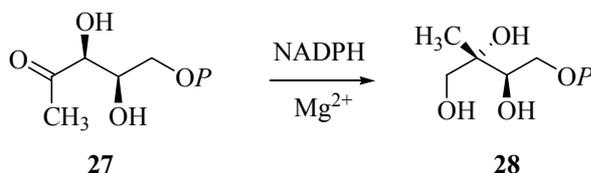


Figure 40. Etape catalysée par la DXR

Cette enzyme, comme toutes les enzymes de la voie du MEP, est une cible potentielle pour la fabrication de nouveaux agents antibactériens. L'objectif est donc de synthétiser des analogues du DXP et de déterminer ensuite leurs caractéristiques biochimiques. Cependant, afin d'étudier l'activité biologique des analogues synthétisés il est nécessaire d'avoir des quantités non négligeables de DXP **27**.

Dans une première partie, notre attention s'est portée sur la mise au point d'une synthèse courte et efficace de DXP **27** à partir d'un composé chiral, un dérivé du thréitol (Figure 41). En s'appuyant sur cette synthèse nous avons préparé les analogues phosphonates **58** et **59** de ce composé. En effet, les phosphonates sont des analogues isostériques non hydrolysables des phosphates. De par leurs propriétés chimiques et biologiques différentes, ces analogues de substrat pourraient être des inhibiteurs potentiels de la voie du MEP. Parallèlement à ces synthèses, nous avons entrepris de préparer les analogues thiophosphorylés **60** et **61** à partir de dérivés du thréitol. Ces composés pourraient également présenter des propriétés antibactériennes.

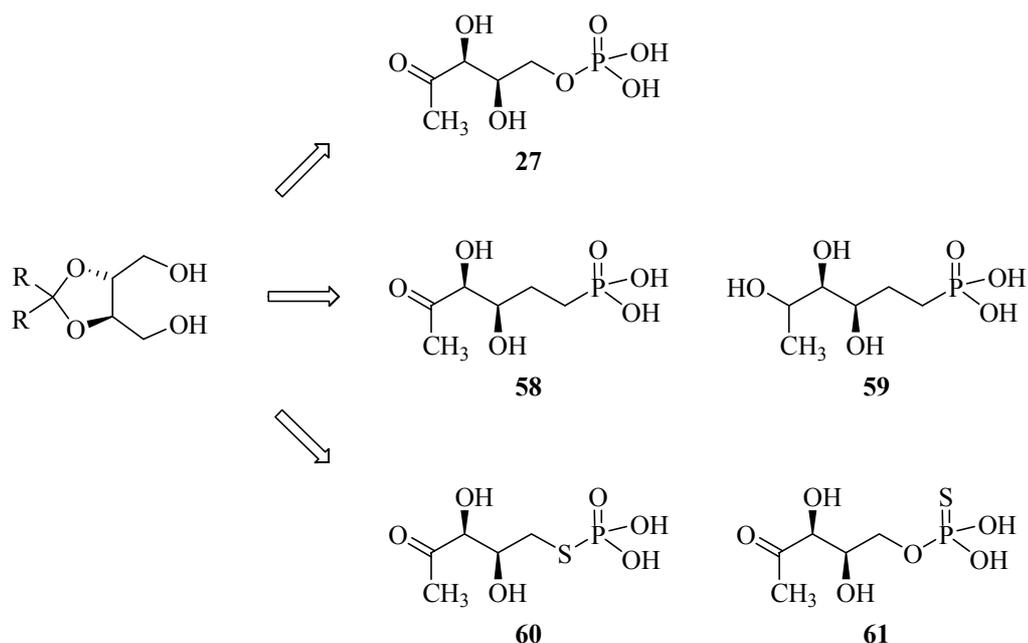


Figure 41. Schéma rétrosynthétique pour la synthèse du DXP et d'analogues

La présence d'atomes de fluor très électronégatifs confère à la molécule qui les contient des propriétés physico-chimiques uniques et de ce fait leur apporte des activités biologiques nouvelles. De plus, le fluor, très électroattracteur, permet de modifier les propriétés des liaisons adjacentes et augmentent la lipophile de la molécule le contenant. C'est pourquoi, nous avons également synthétisé les analogues **62** et **63** du DXP (Figure 42) contenant un groupement trifluorométhyle. Ces composés ont été synthétisés à partir de dérivés du tartrate et le groupement fluoré a été introduit à l'aide du réactif de Ruppert.

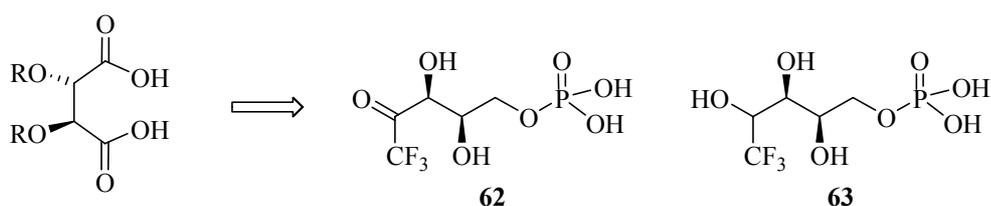


Figure 42. Rétrosynthèse d'analogues fluorés du DXP

Dans une seconde partie, nous avons envisagé une approche différente pour la préparation d'analogue du DXP. Le DXP comprend deux centres asymétriques adjacents contenant deux fonctions hydroxylées. Une méthode synthétique pour obtenir un tel enchaînement est l'utilisation d'une aldolisation asymétrique, comme par exemple

l'aldolisation enzymatique utilisant la **dihydroxyacétone phosphate (DHAP)** comme substrat (Figure 43).

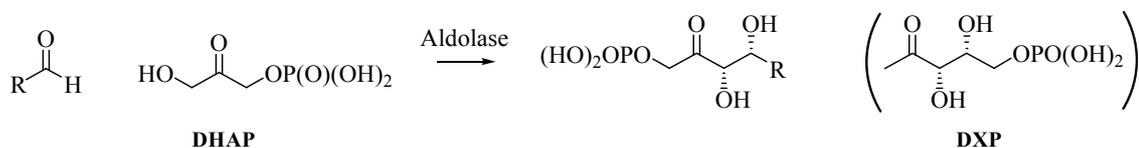


Schéma 43. Exemple d'aldolisation enzymatique

En fonction de l'enzyme choisie, différents diastéréomères peuvent être obtenus. Afin de pouvoir réaliser l'aldolisation, étape clé de la synthèse d'analogues du DXP, il a fallu au préalable synthétiser la DHAP. Au cours de ce travail, nous avons mis au point une nouvelle méthode de synthèse simple et efficace d'un précurseur de la DHAP, le composé **64** à partir du glycidol (Figure 44).

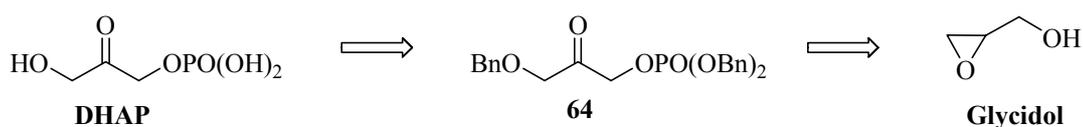


Schéma 44. Rétrosynthèse conduisant à la DHAP

Une fois le précurseur synthétisé, nous avons procédé à l'aldolisation enzymatique et nous avons synthétisé des analogues du DXP en utilisant cette méthode.

La dernière partie de ce travail a consisté en la caractérisation des propriétés biologiques des composés synthétisés. Nous avons donc effectué les tests enzymatiques sur la DXR afin de déterminer si les composés préparés étaient substrats ou inhibiteurs de cette enzyme. L'activité biologique des analogues phosphonates ainsi que ses analogues fluorés a été testée par essais enzymatiques sur la DXR et nous avons pu déterminer si les analogues du DXP étaient substrats ou s'ils possédaient des propriétés inhibitrices de l'enzyme. Le test enzymatique permettant de transformer le DXP en MEP nécessite comme cofacteur du NADPH qui absorbe à 340 nm. L'évolution de la réaction peut alors être suivie en mesurant la variation de la densité optique à cette longueur d'onde.

-
- ¹ <http://www.pasteur.fr/actu/presse/documentation/>
- ² <http://arachosia.univ-lille2.fr/labos/parasito/Internat/courspar/index.html>
- ³ Wiesner J., Ortmann R., Jomaa H., Schlitzer M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5274-5293.
- ⁴ Egan T. J., Marques H. M., *Coord. Chem. Rev* **1999**, *190-192*, 493-517.
- ⁵ Poulin R., Lu L., Ackermann B., Bey P., Peggs E., *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 150-158.
- ⁶ Donkor I. O., Huang T. L., Tao B., Rattendi D., Lane S., Vargas M., Goldberg B., Bacchi C., *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1041-1046.
- ⁷ Kedderis G. L., Argenbright L. S., Miwa G. T., *Chem. Res. Toxicol.* **1989**, *2*, 146-149.
- ⁸ Krogstad D. J., *Epidemiol. Rev.* **1996**, *18*, 77-89.
- ⁹ McKean P., *Microbiology today* **2002**, *29*, 129-131.
- ¹⁰ Vertut-Croquin A., Bolard J., Chabbert M., Gary-Bobo C., *Biochemistry* **1983**, *22*, 2939-2944.
- ¹¹ White T. C., Marr K. A., Bowden R. A., *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11*, 382-402.
- ¹² <http://www.123bio.net/cours/antibio/index.html>
- ¹³ Rando R. R., *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 281-288.
- ¹⁴ Hendlin D., Stapley E. O., Jackson M., Wallick H., Miller A. K., Wolf F. J., Miller T.W., Chaiet L., Kahan F. M., Foltz E. L., Woodruff H. B., Mata J. M., Hernandez S., Mochales S., *Science* **1969**, *166*, 122-123.
- ¹⁵ Osborne M. J., *Annu. Rev. Biochem.* **1969**, *38*, 501-505.
- ¹⁶ Neuhaus F. C., Lynch J. L., *Biochemistry* **1964**, *3*, 471-480.
- ¹⁷ Storm D. R., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 3940 - 3945 .
- ¹⁸ Erlanger B. F., Vratsanos S. M., Wassermann M., Copper A. G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, *23*, 243-249.
- ¹⁹ Blumberg P. M., Strominger J. L., *Bacteriol Rev.* **1974**, *38*, 291-335.
- ²⁰ Page M. I., *Acc. Chem. Res.*, **1984** *17*, 144-151.

-
- ²¹ Perkins H. R., Nieto M., *Pure Appl. Chem.* **1973**, *35*, 371-381.
- ²² Prenner E. J., Lewis R. N. A. H., McElhaney N. R., *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1462*, 201-221.
- ²³ LaPorte D. C., Rosenthal K. S., Storm D. R., *Biochemistry* **1977**, *16*, 1642-1648.
- ²⁴ Lescher G. Y., Froelich E. D., Gruet M. D., Bailey J. H., Brundage R. P., *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, *5*, 1063-1068.
- ²⁵ Chu E. J.-H., *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 2243-2244.
- ²⁶ Boothe J. H., Morton J., Petisi J. P., Wilkinson R. G., Williams J. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 4621-4621.
- ²⁷ Fry M., Israeli-Reches M., Artman M., *Biochemistry* **1972**, *11*, 3054-3059.
- ²⁸ Mao J. C. H., Robishaw E. E., *Biochemistry* **1972**, *11*, 4864-4872.
- ²⁹ Bonfiglio G., Furneri P. M. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2001**, *10*, p185-198.
- ³⁰ Walsh C., *Nature*, **2003**, 65-70.
- ³¹ Connolly J. D., Hill R.A., (1992) *Dictionary of terpenoids*. New York: Chapman and Hall.
- ³² Wallach O., *Liebigs Ann. Chem.* **1887**, *239*, 1-54.
- ³³ Ruzicka L., *Proc. Chem. Soc.* **1959**, 341-360.
- ³⁴ Ruzicka L., Eschenmoser A., Heusser H., *Experientia* **1953**, *9*, 357-396.
- ³⁵ Agranoff B. W., Eggerer H., Hennig U., Lynen F., *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 1254-1255.
- ³⁶ Agranoff B. W., Eggerer H., Hennig U., Lynen, F., *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 326-332.
- ³⁷ Clifford K., Cornforth J. W., Mallaby R., Philipps G.T., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 1599-1600.
- ³⁸ Ramos-Valdivia A. C., van der Heidjen R., Verpoorte R., *Nat. Prod. Rep.* **1997**, 591-603.
- ³⁹ Ogura K., Koyama T., *Chem. Rev.* **1998**, *4*, 1263-1274.
- ⁴⁰ Connolly J. D., Hill R. A., *Dictionary of terpenoids*. New York: Chapman and Hall. **1992**

- ⁴¹ Spurgeon S. L., Porter J. W., *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* (Porter, J.W. and Spurgeon, S.L., Eds.), New York: Wiley **1981**, *1*, 1-46.
- ⁴² Qureshi N., Porter J. W., *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* (Porter, J.W. and Spurgeon, S.L., Eds.), New York: Wiley **1981**, *1*, 47-94.
- ⁴³ Bloch K., *Steroids* **1992**, *57*, 378-383.
- ⁴⁴ Bochar D. A., Friesen J. A., Stauffacher C. V., Rodwell V. W., *Comprehensive Natural Product Chemistry, Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids* (Cane, D.E., Ed.), Oxford: Pergamon **1999**, *2*, 15-44..
- ⁴⁵ Bloch K., Rittenberg D., *J. Biol. Chem.* **1942**, *143*, 625-636.
- ⁴⁶ Ottke R. C., Tatum E. L., Zabin I., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **1951**, *184*, 429-433.
- ⁴⁷ Wright E. L., Cresson H. R., Skeggs H. R., MacRae G. D. E., Hoffman C. H., Wolf D. E. and Folkers K. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *48*, 149-158.
- ⁴⁸ Tavormina M., Gibbs H., Huff J. W., *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 4498-4499.
- ⁴⁹ Lynen F., Eggerer H., Henning U., Kessel I. *Angew. Chem.* **1958**, *70*, 738-742.
- ⁵⁰ Lynen F., Agranof B. W., Eggerer H., Henning U., Möelsin E. M., *Angew. Chem.* **1959**, *71*, 657-684.
- ⁵¹ Bach T. J. *Lipids* **1995**, *30*, 191-202.
- ⁵² Rohmer M. *Comprehensive Natural Product Chemistry, Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids* (Cane, D.E., Ed.) Oxford: Pergamon **1999**, *2*, 45-67.
- ⁵³ Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H. *Biochem. J.* **1993**, *295*, 517-524.
- ⁵⁴ Schwarz M. K., Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: eine überraschende Geschichte, PhD Thesis Nb 10951, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Switzerland, **1994**.
- ⁵⁵ Schwarz M., Arigoni D., *Comprehensive Natural Product Chemistry, Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids* (Cane, D.E., Ed.), Oxford: Pergamon, **1999**, *2*, 367-400.
- ⁵⁶ Rohmer M., *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565-574, et références citées.
- ⁵⁷ Rohdich F., Kis K., Bacher A., Eisenreich W., *Curr. Op. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 535-540, et références citées.

-
- ⁵⁸ Eisenreich W., Rohdich F., Bacher A., *TRENDS in Plant Science* **2001**, 6, 78-84, et références citées.
- ⁵⁹ Rohmer M., Seemann M., Grosdemange-Billiard C., *Biopolymers* **2001**, 2, 49-72, et références citées.
- ⁶⁰ Kuzuyama T., Seto H., *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 171-183, et références citées.
- ⁶¹ Rohmer M., Grosdemange-Billiard C., Seemann M., Tritsch D., *Curr. Op. Investig. Drugs* **2004**, 5, 154-162, et références citées.
- ⁶² Sprenger G. A., Schörken, Wiegert T., Grolle S., de Graaf A., Taylor S. V., Begley T. P., Bringer-Meyer S., Sahm H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 12857-12862.
- ⁶³ Lois L. M., Campos N., Rosa Putra S., Danielsen K., Rohmer M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 2105-2110.
- ⁶⁴ Bouvier F., D'Harlingue A., Suire C., Backhaus R.A., Camara B. *Plant Physiol.* **1998**, 117, 1423-1431.
- ⁶⁵ Lange B. M., Wildung M. R., McCaskill D., Croteau R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 2100-2104.
- ⁶⁶ Miller B., Heuser T., Zimmer W. A., *FEBS Lett.* **1999**, 460, 485-490.
- ⁶⁷ Harker M., Bramley P. M., *FEBS Lett.* **1999**, 448, 115-119.
- ⁶⁸ Kuzuyama T., Takagi M., Takahashi S., Seto H., *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 891-897.
- ⁶⁹ Altincicek B., Hintz M., Sanderbrand S., Wiesner J., Beck E., Jomaa H., *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 190, 329-333.
- ⁷⁰ Takahashi S., Kuzuyama T., Watanabe H., Seto H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 9879-9884.
- ⁷¹ Kuzuyama T., Takahashi S., Watanabe H., Seto H., *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4509-4512.
- ⁷² Hoeffler J-F., Tritsch D., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M., *Eur. J. Biochem* **2002**, 269, 4446-4457.
- ⁷³ Schwender J., Müller C., Zeidler J., Lichtenthaler H. K., *FEBS Lett.* **1999**, 455, 140-144.
- ⁷⁴ Lange B. M., Croteau R., *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, 365, 170-174.

- ⁷⁵ Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S., Altinciek B., Weidemeyer C., Hintz M., Türbachova I., Eberl M., Zeidler J., Lichtenthaler H. K., Soldati D., Beck E., *Science* **1999**, *285*, 1573-1576.
- ⁷⁶ Proteau P. J., Woo Y. H., Williamson T., Phaosiri C., *Org. Lett.* **1999**, *1*, 921-923.
- ⁷⁷ Altincicek B., Hintz M., Sanderbrand S., Wiesner J., Beck E., Jomaa H., *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *190*, 329-333.
- ⁷⁸ Grolle S., Bringer-Meyer S., Sahn H., *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *191*, 131-137.
- ⁷⁹ Cane D. E., Chow C., Lillo A., Kang I., *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1467-1477.
- ⁸⁰ Koppisch A. T., Fox D. T., Blagg B. S. J., Poulter C. D., *Biochemistry* **2002**, *41*, 236-243.
- ⁸¹ Arigoni D., Giner J. L., Sagner S., Wungsintaweekul J., Zenk M. H., Kis K., Bacher A., Eisenreich W., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1999**, 1127-1128.
- ⁸² Disch A., Schwender J., Müller C., Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M. *Biochem. J.* **1998**, *333*, 381-388.
- ⁸³ Proteau P. J., *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 841-843.
- ⁸⁴ Radykewicz T., Rohdich F., Wungsintaweekul J., Herz S., Kis K., Eisenreich W., Bacher A., Zenk M. H., Arigoni, D., *FEBS Lett.* **2000**, *465*, 157-160.
- ⁸⁵ Rohdich F., Wungsintaweekul J., Fellermeier M., Sagner S., Herz S., Kis K., Eisenreich W., Bacher A., Zenk H. K., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11758-11763.
- ⁸⁶ Kuzuyama T., Tagaki M., Kaneda K., Watanabe H., Dairi T., Seto H., *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 703-706
- ⁸⁷ Lüttgen H., Rohdich F., Herz S., Wungsintaweekul J., Hech, S., Schuhr C.A., Fellermeier M., Sagner S., Zenk M. H., Bacher A., Eisenreich W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 1062-1067.
- ⁸⁸ Kuzuyama T., Tagaki M., Kaneda K., Watanabe H., Dairi T., Seto H., *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2925-2928
- ⁸⁹ Herz S., Wungsintaweekul J., Schuhr C. A., Hecht S., Lüttgen H., Sagne, S., Fellermeier M., Eisenreich W., Zenk M. H., Bacher A., Rohdich F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2486-2490.
- ⁹⁰ Tagaki M., Kuzuyama T., Kaneda K., Watanabe H., Dairi T., Seto H., *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3395-3398.

-
- ⁹¹ Campos N., Rodriguez-Conception M., Seemann M., Rohmer M., Boronat A., *FEBS Lett.* **2001**, *488*, 170-173.
- ⁹² Seemann M., Campos N., Rodriguez-Conception M., Hoeffler J-F., Grosdemange-Billiard C., Boronat A., Rohmer M., *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 775-778.
- ⁹³ Seemann M., Campos N., Rodriguez-Conception M., Ibanez E., Duvold T., Tritsch D., Boronat A., Rohmer M., *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1413-1415.
- ⁹⁴ Wolff M., Seemann M., Grosdemange-Billiard C., Tritsch D., Campos N., Rodriguez-Conception M., Boronat A., Rohmer M., *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2555-2559.
- ⁹⁵ Seemann M., Bui B. T., Wolf M., Tritsch D., Campos N., Marquet A., Rohmer M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4337-4339.
- ⁹⁶ Cunningham F. X. Jr, Lafond T. P., Gantt E., *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 5841-5848.
- ⁹⁷ Altincicek B., Kollas A.K., Sanderbrand S., Wiesner J., Hintz M., Beck E., Jomaa H., *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2411-2416.
- ⁹⁸ Rohdich F., Hecht S., Gärtner K., Adam P., Krieger C., Amslinger S., Arigoni D., Bacher A., Eisenreich W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1158-1163.
- ⁹⁹ Adam P., Hecht S., Eisenreich W., Kaiser J., Gräwert T., Arigoni D., Bacher A., Rohdich F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12108-12119.
- ¹⁰⁰ Wolff M., Seemann M., Tse Sum Bui B., Frapart Y., Tritsch D., Estrabot A. G. Rodriguez-Conception M., Boronat A., Marquet A., Rohmer M., *FEBS Lett.* **2003**, *541*, 115-120.
- ¹⁰¹ Rosa Putra S., Disch A., Bravo J.-M., Rohmer M., *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *164*, 169-175.
- ¹⁰² Boucher Y., Doolittle W. F., *Mol. Microbiol.* **2000**, *37*, 703-716.
- ¹⁰³ Seto H., Watanabe H., Furihata K., *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7979-7982.
- ¹⁰⁴ Seto H., Orihara N., Furihata K., *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9497-9500.
- ¹⁰⁵ Disch A., Hemmerlin A., Bach T., Rohmer M., *Biochem. J.* **1998**, *331*, 615-621.
- ¹⁰⁶ Altincicek B., Hintz M., Sanderbrand S., Wiesner J., Beck E., Jomaa H., *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *190*, 329-333.

- ¹⁰⁷ Mueller C., Schwender J., Zeidler J., Lichtenthaler H. K., *Biochem. Soc. Trans* **2000**, *28*, 792-793.
- ¹⁰⁸ Okuhara M., Kuroda Y., Goto T., Okamoto M., Terano H., Kohsaha M., Aoki H., Imanaka H., *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 24-28.
- ¹⁰⁹ Mine Y., Kamimura M., Nonoyama S., Nishida M., Goto S., Kuwahara S., *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 36-43.
- ¹¹⁰ Shigi Y., *Antimicrob Chemother* **1989**, *24*, 131-145.
- ¹¹¹ Kuzuyama T., Shimizu T., Takahashi S., Seto H., *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7913-7916.
- ¹¹² Grolle S., Bringer-Meyer S., Sahm H., *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *191*, 131-137.
- ¹¹³ Reichenberg A., Wiesner J., Weidermeyer C., Dreiseidler E., Sanderbrand S., Altincicek B., Schlitzer M., Jomaa H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 833-835.
- ¹¹⁴ Lell B., Ruangwearayut R., Wiesner J., Missinou M. A., Schindler A., Baranek T., Hintz M., Hutchinson D., Jomaa H., Kreamsner P. G., *Antimicrob. Agents Chemotherap.* **2003**, *47*, 735-738.
- ¹¹⁵ Zeidler J., Schwender J., Müller C., Wiesner J., Weidemeyer C., Beck E., Jomaa H., Lichtenthaler H. K., *Z. Naturforsch.* **1998**, *53c*, 980-936.
- ¹¹⁶ Fellermeier M., Kis K., Sagner S., Maier U., Bacher A., Zenk M., *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2743-2746.
- ¹¹⁷ Wong A., Munos J. W., Devasthali V., Johnson K. A., Liu H-W., *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3625-3628.
- ¹¹⁸ Phaosiri C., Proteau P. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5309-5312.
- ¹¹⁹ Ostrovsky D., Kharatian E., Dubrovsky T., Orgel O., Shipanova I., Sibeldina L., *Biofactors* **1992**, *4*, 63-68.
- ¹²⁰ Ostrovsky D., Kharatian E., Malarova I., Shipanova I., Sibeldina L., Shashkov A., Tantsirev G., *Biofactors* **1992**, *4*, 261-264.
- ¹²¹ Ostrovsky D., Diomina G., Lysak E., Matveeva E., Orgel O., Trutko S., *Arch. Microbiol.* **1998**, *171*, 69-72.
- ¹²² Seemann M., Bui B. T., Wolf M., Tritsch D., Campos N., Marquet A., Rohmer M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4337-4339.

- ¹²³ Kollas A. K., Duin E. C., Eberl M., Altincicek B., Hintz M., Reichenberg A., Henschker D., Henne A., Steinbrecher I., Ostrovsky D. N., Hedderich R., Beck E., Jomaa H., Wiesner J., *FEBS Lett.* **2002**, *532*, 432-436.
- ¹²⁴ Adam P., Hecht S., Eisenreich W., Kaiser J., Gräwert T., Arigoni D., Bacher A., Rohdich F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12108-12119.
- ¹²⁵ Engel R., *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 349-367.
- ¹²⁶ Blackburn G. M., *Chem. Ind. (London)* **1981**, 134-138.
- ¹²⁷ Wiemer D. F., *Tetrahedron* **1997**, *53*, 16609-16644.
- ¹²⁸ Burke T. R. J., Li Z.-H., Bolen J. B., Marquez V. E., *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1577-1581.
- ¹²⁹ Burke T. R. J., Barchi J. J. J., George C., Wolf G., Shoelson S. E., Yan X., *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1386-1396.
- ¹³⁰ Pompliano D. L., Rands E., Schaber M. D., Antony N. J., Gibbs J. B., *Biochemistry* **1992**, *31*, 3800-3807.
- ¹³¹ Lerner R. A., Benkovic S.J., Schultz P. G., *Science* **1991**, *252*, 659-667.
- ¹³² Shokat K. M., Ko M. K., Scanlan T. S., Kochersperger L., Yonkovich S., Thaisrivongs S., Schultz P. G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1296-1303.
- ¹³³ Nakayama G. R., Schulz P. G., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 780-781.
- ¹³⁴ Degani Ch, Halmann M., *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 4075-4082.
- ¹³⁵ Knight W. B., Sem D. S., Smith K., Mizioroko H. M., Rendina A. R., Cleland W. W., *Biochemistry* **1991**, *30*, 4970-4977.
- ¹³⁶ Zhang B., Cui Z., Sun L., *Org. Lett.* **2001**, *3*, 275-278.
- ¹³⁷ Roelen H. C. P. F., Kaner P. C. J., van den Elst H., van der Marel G. A., van Boom J. H., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1991**, *110*, 325-331.
- ¹³⁸ Liu Z.-D., Chen Z.-C., *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1924-1925.
- ¹³⁹ Plante O. J., Palmacci E. R., Andrade R. B., Seeberger P. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9545-9554.
- ¹⁴⁰ Sem D. S., Cleland W. W., *Biochemistry* **1991**, *30*, 4978-4984.

¹⁴¹ Adams L. A., Cox R. J., Gibson J. S., Mayo-Martin M. B., Walter M., Whittingham W., *Chem. Commun.* **2002**, 2004-2005.

¹⁴² Schick A., Kolter T., Giannis A., Sandhoff K., *Tetrahedron* **1996**, 52, 2945-2956.

¹⁴³ Glass R. S., Singh W. P., Jung W., Veres Z., Scholz T. D., Stadtman T. C., *Biochemistry* **1993**, 32, 12555-12559.

¹⁴⁴ Drucekhammer D. G., Durrwachter J. R., Pederson R. L., Crans D. C., *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 70-77.

¹⁴⁵ Gelb M. H., Svaren J. P., Abeles R. H., *Biochemistry* **1985**, 24, 1813-1817.

chapitre 1.

synthèse du substrat naturel de la DXR.

Introduction

Le 1-désoxy-D-xylulose (DX) **65** (Figure 45), analogue non phosphorylé du DXP, a été isolé la première fois dans un moût de fermentation de *Streptomyces hygroscopicus*.^{1,2} Il a été plus tard identifié comme le précurseur de cofacteurs tels que le phosphate de pyridoxol **66**,^{3,4} diphosphate de thiamine **67**.^{5,6,7,8} De plus, il avait été montré que les unités isopréniques étaient formées à partir d'une molécule de phosphate de triose, ce qui est compatible avec la formation de DX(P). Ainsi, le DX est apparu comme pouvant être un candidat en tant que précurseur de l'IPP **12** conduisant aux isoprénoïdes.

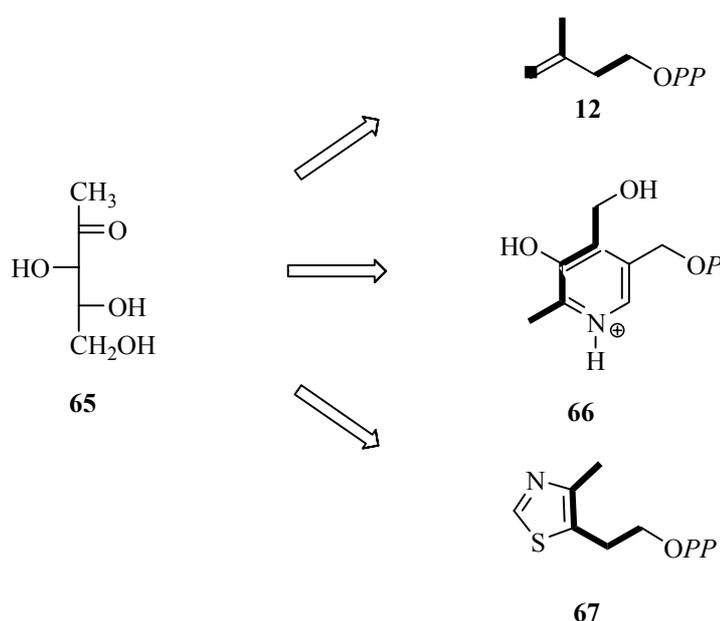


Figure 45. Métabolisme du 1-désoxy-D-xylulose chez les bactéries et les plantes supérieures

Des expériences d'incorporation de [1-²H]- ou de [5,5-²H₂]-1-désoxy-D-xylulose ont montré que le 1-désoxy-D-xylulose intervient dans la biosynthèse des isoprénoïdes puisque des marquages ont été observés dans la chaîne prényle de l'ubiquinone et de la ménaquinone d'*E. coli*.⁹ Des résultats d'incorporation de glucose marqué^{10,11} et de DX marqué¹², ont permis de mettre en évidence que la formation du squelette isoprénique ramifié se fait par une étape de réarrangement intramoléculaire du 1-désoxy-D-xylulose, ou plus probablement du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP). De plus, ces expériences ont montré que le 1-désoxy-D-xylulose (DX) était incorporé dans les isoprénoïdes sans aucune dégradation préliminaire.

Les cinq atomes de carbone du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate correspondent exactement à ceux du diphosphate d'isopentényle (IPP).

Le DXP est converti en 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate par la désoxyxylulose phosphate isoméro-réductase (Figure 46).¹³ En effet, cette enzyme réalise le réarrangement du DXP **27** en aldéhyde **33** suivie d'une réduction concomitante nécessitant comme cofacteur le NADPH pour donner le MEP **28**.

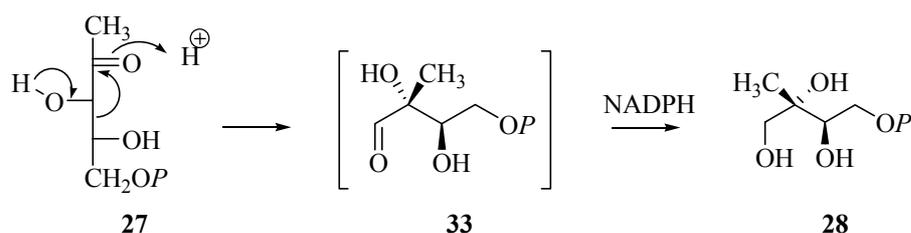


Figure 46. Etape catalysée par la DXR

Cette enzyme, comme toutes les enzymes de la voie du MEP, est une cible potentielle pour la fabrication de nouveaux agents antibactériens. L'objectif est donc de synthétiser des analogues du DXP et de déterminer ensuite leurs caractéristiques biochimiques à savoir s'ils sont substrats ou inhibiteurs de l'enzyme. Mais, avant de synthétiser des analogues du DXP et de tester leur activité, il est nécessaire de disposer du substrat naturel de l'enzyme. Celui-ci peut être obtenu par voie enzymatique ou chimique.

I. Synthèse enzymatique du DXP

Plusieurs méthodes de synthèses enzymatiques de DXP ont été décrites dans la littérature notamment en utilisant la DXP synthase (DXS) d'*Escherichia coli* ou de *Bacillus subtilis*. Toutes ces méthodes permettent de synthétiser du DXP marqué en différentes positions soit par du ¹³C ou du ¹⁴C.^{14,15,16,17,18} Les substrats de la DXS sont le D-glycéraldéhyde 3-phosphate et le pyruvate et, le DXP est le seul produit formé lors de la réaction enzymatique. Toutefois, les quantités de DXP synthétisées par les enzymes n'excèdent pas 3 mmol. De plus, l'extraction du produit de réaction du milieu réactionnel nécessite une purification par précipitation/redissolution¹⁴ ou une chromatographie et un

échange d'ions.¹⁴ Pour ces raisons (quantité produites limitées et purifications fastidieuses), plusieurs synthèses chimiques ont été envisagées.

II. Synthèses chimiques du DXP

Jusqu'à présent cinq synthèses chimiques conduisant au DXP ont été décrites dans la littérature soit à partir de chirons^{14,19,20,21} soit par synthèse asymétrique.²²

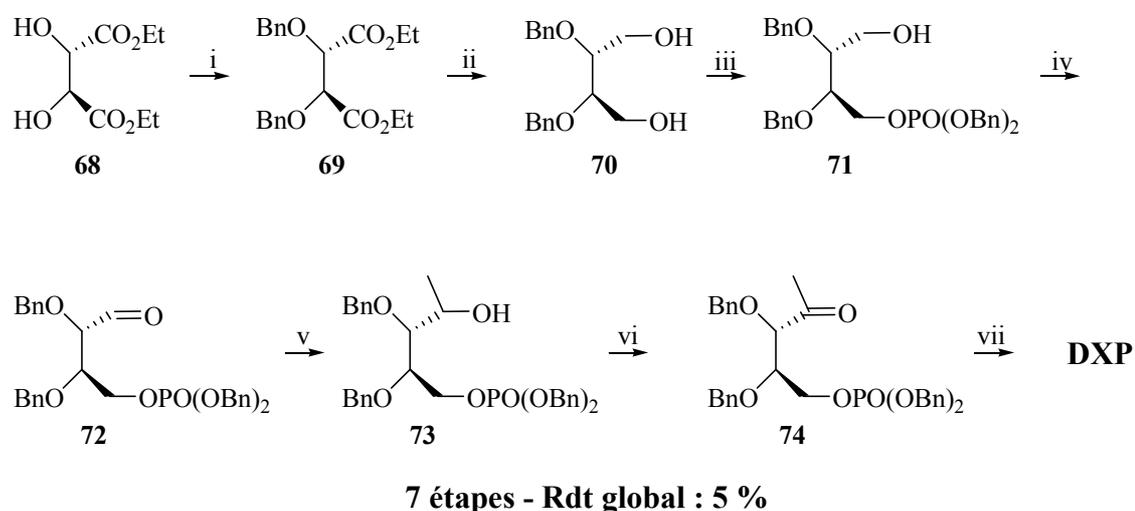
II.1 Synthèses du DXP à partir de molécules chirales

Différentes molécules chirales ont été utilisées comme produit de départ pour préparer le DXP. Ce sont des dérivés du tartrate^{14,19} et du thréitol,²⁰ sucres en C₄ ou du mannitol,²¹ sucre en C₆. En effet, ces composés possèdent des carbones ayant la même configuration que ceux correspondant aux centres stéréogènes du DXP. Le squelette en C₅ du DXP peut être obtenu par alkylation des dérivés en C₄ ou par coupure des composés en C₆.

a. Synthèse à partir de dérivés du tartrate et du thréitol (synthon en C₄)

Les synthèses à partir de dérivés du tartrate et du thréitol mettent en jeu une protection du diol secondaire vicinal soit par des groupements benzyles soit par un groupement isopropylidène.

La synthèse décrite par Taylor *et coll.*¹⁴ (figure 47) utilise le tartrate de diéthyle **68** comme produit de départ et, conduit au DXP en sept étapes avec un rendement global de 5 %. Après protection des alcools secondaires par des groupements benzyles, réduction des fonctions esters, le diol **70** ainsi obtenu est monophosphorylé. Cette réaction de phosphorylation, mettant en jeu le dibenzyle chlorophosphate en présence de pyridine, conduit à un mélange du produit de départ et de produits mono- (40%) et bis-phosphorylés.



J. Org. Chem. **1998**, 63, 2375-2377

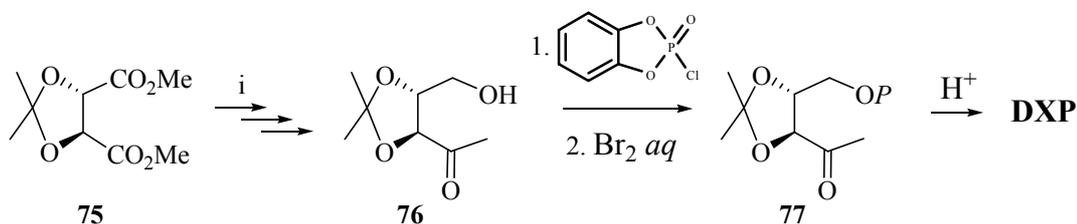
Figure 47. Synthèse du DXP selon Taylor *et coll.*

i : BnBr, TIOEt, CH₃CN, 88% ; ii : LAH, THF, 83% ; iii : (BnO)₂(O)PCl, pyridine, CCl₄, 40% ; iv : (COCl)₂, TEA, DMSO, CH₂Cl₂, 73% ; v : MeLi, CeCl₃, Et₂O, THF, 33% ; vi : Dess-Martin, CH₂Cl₂, 74% ; vii : H₂, Pd(OH)₂, EtOH, 99%.

L'alcool secondaire **73** est obtenu avec un rendement de 33 % par addition de méthylcérien, formé *in situ*, sur l'aldéhyde **72** obtenu par une oxydation de Swern de l'alcool primaire **71**. L'oxydation de la fonction hydroxyle du composé **73** par le réactif de Dess-Martin suivie d'une hydrogénation permet la formation du DXP avec un rendement global de 5 %. Ce faible rendement peut être expliqué par le rendement moyen obtenu pour l'étape de phosphorylation du diol **65** et pour l'addition de l'organocérien sur l'aldéhyde **72**. L'optimisation de ces deux étapes devrait permettre d'obtenir du DXP avec un meilleur rendement global.

Deux autres synthèses ont été décrites et utilisent un groupement isopropylidène comme groupe protecteur du diol vicinal. Dans la synthèse décrite par Thiel et Adam¹⁹ (figure 48) le produit de départ est un dérivé du tartrate de diméthyle alors que dans celle décrite par Blagg et Poulter,²⁰ (figure 49) il s'agit d'un dérivé du thréitol. Pour ces deux méthodes, la déprotection du groupement isopropylidène, dernière étape des synthèses, est difficile et la purification du produit final est laborieuse, ce qui fait chuter le rendement global de ces synthèses.

La synthèse proposée par Thiel et Adam mène au DXP en six étapes avec un rendement global de 45 %.¹⁹



6 étapes - Rdt global : 45 %

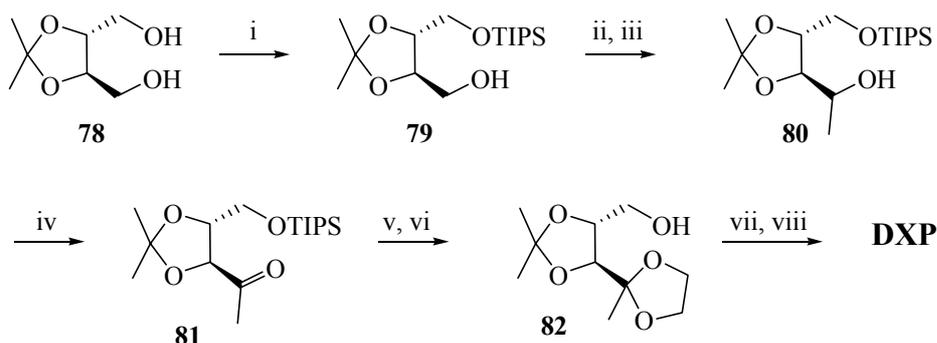
Tetrahedron Lett. **1999**, 40, 5307-5308

Figure 48. Synthèse du DXP selon Thiel et Adam

[i : (a) Pig Liver Esrérase, pH 8, 81% ; (b) LiBEt₃H/THF ; (c) CH₃Li/THF, CO₂, 68%]

L'alcool **76** peut être obtenu en trois étapes selon différentes méthodes.^{23,24,25,26} Celle conduisant au composé **76** avec le meilleur rendement débute par une monohydrolyse enzymatique du diester **75**. Après réduction de l'ester restant par du LiBEt₃H, le méthyle est introduit sur le carboxylate à l'aide de CH₃Li.²⁵ Ainsi le composé **76** est préparé avec 55 % de rendement à partir du diester **75**. La réaction de phosphorylation et de déprotection ont ensuite lieu en un pot. Le groupement phosphate est introduit par utilisation du phosphochloridate de *o*-phénylène puis la déprotection oxydative du phosphate est réalisée à l'aide d'un excès de dibrome dans l'eau. Puis, l'isopropylidène est éliminé en milieu acide en utilisant une colonne échangeuse d'ions (Amberlite®) et enfin le résidu est purifié par chromatographie d'exclusion (Séphadex®). Le rendement de ces deux étapes est de 83 %.

La synthèse décrite par Blagg et Poulter (figure 49) conduit au DXP en huit étapes avec de bons rendements pour chaque étape et un rendement global de 58 %.²⁰



8 étapes - Rdt global : 58 %

J. Org. Chem. **1999**, 64, 1508-1511

Figure 49. Synthèse du DXP selon Blagg et Poulter

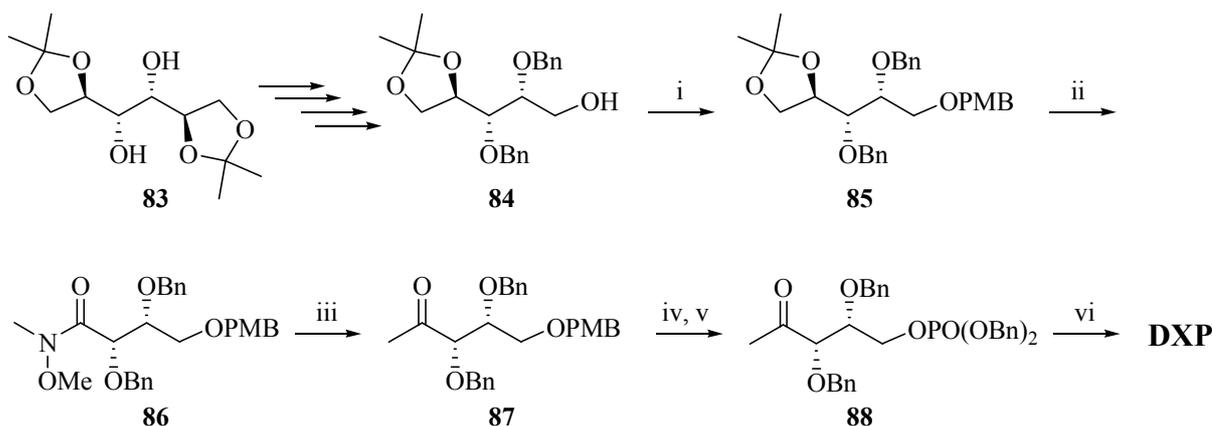
i : NaH, TIPSCl, 96% ; ii : Oxydation de Swern ; iii : MeMgBr, 88% pour ii et iii ; iv : TPAP, NMO, 97% ; v : $\text{HO(CH}_2)_2\text{OH}$, TsOH, 88% ; vi : TBAF, THF, 99% ; vii : P(OMe)_3 , TeCl_4 , 91% ; viii : TMSBr, H_2O , HCl, 90%.

Après une monoprotection du diol **78**, l'alcool primaire résultant **79** est oxydé par une réaction de Swern. Une addition d'un méthyle magnésien sur l'aldéhyde précédemment formé suivie d'une oxydation à l'aide de TPAP conduit à la cétone **81**. Afin d'introduire le groupement phosphate, l'éther de silyle est déprotégé, puis l'alcool est phosphorylé à l'aide de P(OMe)_3 et de TeCl_4 . La dernière étape conduisant au DXP est la déprotection des groupements méthyles du phosphate, des groupements acétonide et du dioxolane. Cette étape est fastidieuse. En effet, les groupements méthyles sont enlevés par utilisation de TMSBr suivie d'une hydrolyse. Afin d'éviter la dégradation du DXP lors de sa concentration par lyophilisation, l'acide chlorhydrique, utilisé pour la déprotection des groupements acétonide et dioxolane, est neutralisé par du NaHCO_3 solide. Après lyophilisation, le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur cellulose en condition acide.

Une autre façon d'obtenir le squelette en C_5 du DXP est de partir d'un sucre en C_6 et de réaliser une rupture de la chaîne carbonée. Dans cette optique, une synthèse partant d'un dérivé du mannitol a été décrite.²¹

b. Synthèse à partir de dérivé du mannitol (synthon en C₆)

L'utilisation du dérivé du mannitol **83** (figure 50) conduit au DXP en dix étapes avec un rendement global de 25 %. L'alcool **84** est préparé en quatre étapes à partir du composé **83** avec un rendement de 84 %.²¹



10 étapes - Rdt global : 25 %

Synlett **2003**, 10, 1521-1523

Figure 50. Synthèse du DXP selon Okumoto et Kato

i : NaH, PMBCl, DMF, 84% ; ii : (1) 5% HCl, dioxane, MeOH ; (2) NaIO₄, MeOH, H₂O ; (3) NaClO₂, *t*-BuOH, H₂O ; (4) MeNHOMe-HCl, DCC, pyridine, CH₂Cl₂, 62% ; iii : CH₃MgI, THF, 84% ; iv : DDQ, CH₂Cl₂, H₂O, 72% ; v : *i*-PrNP(OBn)₂, tétrazole, CH₂Cl₂, 62% ; H₂, Pd/C, acétone, H₂O.

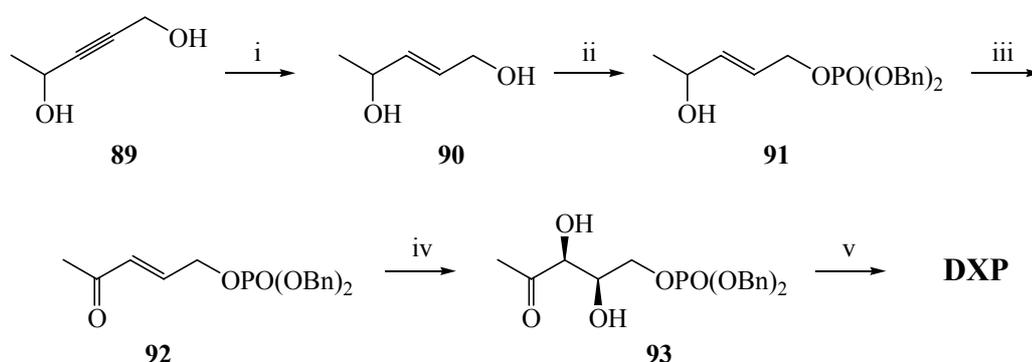
Après protection de la fonction hydroxyle et déprotection de l'acétonide, le diol résultant est coupé par le periodate et l'aldéhyde ainsi formé est oxydé en acide carboxylique. Cet acide est ensuite transformé en l'amide de Weinreb **86**. L'addition d'iodure de méthylmagnésien sur cet amide permet la formation de la cétone **87**. Le groupement phosphate est introduit après déprotection de la fonction hydroxyle et le DXP est finalement obtenu après hydrogénation des groupements benzyles.

Globalement les rendements obtenus sont corrects mais cette méthode nécessite un nombre d'étapes important et l'utilisation de plusieurs groupements protecteurs différents. Le groupement phosphate doit être introduit en fin de synthèse, car celui-ci ne résiste pas aux conditions réactionnelles d'addition du Grignard sur l'amide de Weinreb, ce qui rajoute l'étape de protection de l'alcool primaire par un groupement *p*-méthoxybenzyle.

Une dernière approche afin de synthétiser du DXP est l'application de synthèses asymétriques afin d'introduire les centres stéréogènes voulus.

II.2 Synthèse par synthèse asymétrique

La synthèse la plus récente utilise le diol acétylénique **89** comme produit de départ et permet d'obtenir le DXP en 5 étapes avec 22 % de rendement global (figure 51).²² Après réduction de l'alcyne, l'alcool primaire **90** est sélectivement phosphorylé pour donner le phosphate **91** avec un rendement de 48 %. Ce composé est ensuite transformé en l'intermédiaire avancé **92** par oxydation de l'alcool secondaire à l'aide du réactif de Dess-Martin.



5 étapes - Rdt global : 22 % - ee : 84 %

Org. Biomol. Chem. **2003**, 1, 3173-3177

Figure 51. Synthèse du DXP selon Cox *et coll.*

i : REDAL, THF, 85% ; ii : PCl₃, BnOH, TEA, I₂, 48% ; iii : Dess-Martin, CH₂Cl₂, 83% ; iv : OsO₄, ligand, CH₂Cl₂, 70-90% ; v : H₂, Pd/C, MeOH, quant.

L'introduction des centres stéréogènes est réalisée par une réaction de dihydroxylation asymétrique en utilisant un complexe chiral de tétraoxyde d'osmium. Le rendement obtenu pour cette étape varie de 70 à 90 % selon les conditions réactionnelles utilisées et l'excès énantiomérique maximal est de 84 %. De plus, l'étape de phosphorylation sélective de l'alcool primaire conduit au phosphate **93** avec un rendement très moyen ayant pour conséquences de faire chuter le rendement global de cette synthèse en 5 étapes.

Les synthèses chimiques décrites dans la littérature permettent d'accéder au DXP soit avec un nombre d'étape limité mais une purification du produit final fastidieuse^{19,21} soit avec un nombre d'étape important^{14,20,21} ce qui fait chuter le rendement global. C'est pourquoi nous avons recherché à mettre au point une méthode de synthèse du DXP à grande échelle facile, courte, efficace et permettant l'introduction de marquages.

III. Synthèse du DXP

Nous avons choisi comme produit de départ le benzyldène D-thréitol commercial qui possède déjà les centres stéréogènes requis C-2 et C-3 correspondant aux C-3 et C-4 du DXP. Bien que la présence d'un groupement benzyldène complique les spectres RMN, ce groupement a été préféré à l'isopropylidène, car il peut être éliminé en même temps que les groupements benzyles du groupement phosphate à la dernière étape de la synthèse. Cela peut être réalisé par une simple hydrogénation catalytique ne nécessitant pas de purification ultérieure du produit final. Ces conditions sont appréciables pour la préparation de sucres petits, polaires et solubles dans l'eau comme le DXP.

Notre stratégie est fondée sur l'introduction dès la première étape du groupement phosphate afin d'utiliser celui-ci comme groupe protecteur d'une des deux fonctions hydroxyles du diol. Deux approches ont été envisagées en parallèle (Figure 52) :

- Voie A : introduction directe du phosphate sur le dérivé du thréitol **94**
- Voie B : monoprotection du diol **94**, phosphorylation, déprotection

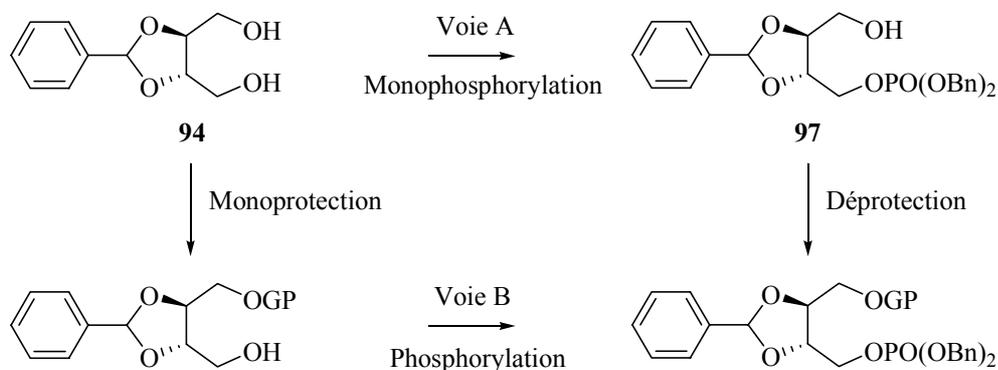


Figure 52. Les deux approches pour introduire le phosphate sur le thréitol (GP : Groupe Protecteur)

La monophosphorylation du diol (Voie A) a été envisagée en utilisant différentes conditions (Figure 53). L'utilisation d'un équivalent de $P(OBn)_3/I_2$ ²⁷ (Figure 53, entrée 1) ou de $ClPO(OBn)_2$ ²⁸ dans la pyridine (Figure 53, entrée 2) conduit à un mélange de mono- et bisphosphate difficilement séparables. En effet, lors de la monoprotection du diol **94**, le composé souhaité est souvent accompagné de l'alcool doublement protégé par un groupement phosphate.

| | Réactif A | Réactif B | mono-phosphate | bis-phosphate | 97 (% à partir 94) |
|---|--------------------------------------|----------------|----------------|---------------|-----------------------|
| 1 | P(OBn) ₃ , I ₂ | Py | 7 | 1 | 68 |
| 2 | ClPO(OBn) ₂ | Py | 5 | 1 | 41 |
| 3 | ClPO(OBn) ₂ | NaH | 1 | 0 | ND* |
| 4 | ClPO(OBn) ₂ | <i>n</i> -BuLi | 6 | 1 | 63 |
| 5 | TBPP | NaH | 7 | 1 | 76 |
| 6 | TBPP | <i>n</i> -BuLi | 6 | 1 | 74 |

Figure 53. Monoprotection du diol **94**

* : 40 % de conversion, ND : rendement Non Déterminé

Des résultats similaires ont été obtenus en faisant réagir le mono-alcoolate formé par utilisation de NaH (Figure 53, entrées 3 et 5) ou de *n*-BuLi (Figure 53, entrées 4 et 6) sur un phosphore électrophile comme du chlorophosphate de dibenzyle (Figure 53, entrées 3 et 4) ou du pyrophosphate de tétrabenzyle (TBPP)^{29,30} (Figure 53, entrées 5 et 6). Les conditions réactionnelles menant au meilleur résultat sont celles mettant en jeu le NaH et le TBPP (Figure 53, entrée 5). Ainsi, un rapport 7/1 de mono-/bis-phosphate a été observé, et le monophosphate souhaité a été isolé après plusieurs chromatographies avec un rendement de 76 %.

Afin d'éviter la purification fastidieuse du mélange obtenu par monophosphorylation du diol, le thréitol a été monoprotégé sous forme d'éther de silyle (Voie B, Figure 52). En effet, le traitement du thréitol **94** par du NaH puis du TBDMSCl dans le DME permet d'obtenir facilement le composé **95** avec un rendement de 96 % (Figure 54). La phosphorylation peut ensuite être effectuée à l'aide de dibenzyl-*N,N*-diéthyl phosphoramidite, de tétrazole et de *m*-CPBA.^{31,32} Ces conditions conduisent au phosphate **96** avec un rendement de 89 %. Le groupement silyle est déprotégé par utilisation de TBAF pour donner l'alcool **97** avec 87 % de rendement. Cette séquence de protection, phosphorylation et déprotection permet d'obtenir l'alcool **97** à partir du thréitol avec un rendement global de 74 %. Ce

rendement est comparable à celui obtenu par monophosphorylation (76 %) et permet d'éviter les purifications fastidieuses.

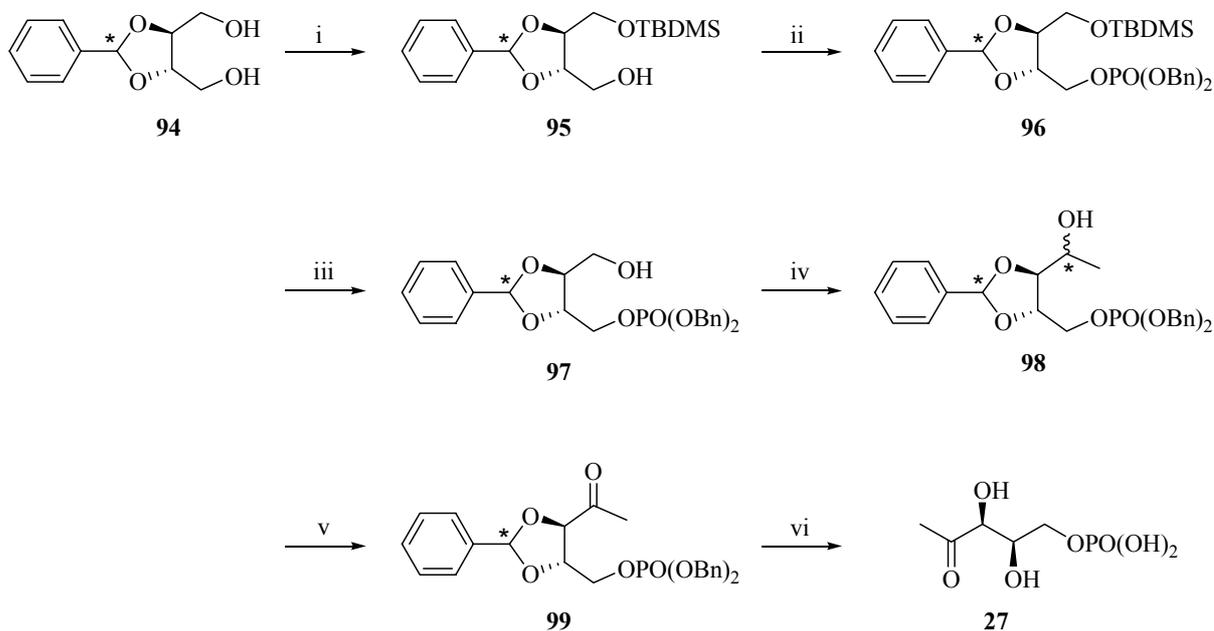


Figure 54. Synthèse du DXP

i : TBDMSCl, NaH, DME, 96% ; ii : (BnO)₂P-NEt₂, tetrazole, *m*CPBA, CH₂Cl₂, 89% ; iii : Bu₄NF, THF, 87% ; iv (COCl)₂, DMSO, NEt₃, MeMgCl, THF, 89% ; v : TPAP, NMO, tamis moléculaire 3 Å, CH₂Cl₂, 92% ; vi H₂, Pd/C, quant.

L'oxydation de l'alcool primaire en utilisant la procédure de Swern modifiée par Ireland³³ permet d'accéder à l'alcool secondaire **98** sous forme d'un mélange de quatre diastéréomères avec un rendement de 88 %. Dans ces conditions, le groupement méthyle est directement introduit par addition de chlorure de méthylmagnésium sans isolation de l'aldéhyde intermédiaire. L'alcool secondaire **98** est ensuite oxydé en utilisant les conditions douces TPAP/NMO³⁴ et conduit à la cétone **99** avec un rendement de 86 %. La dernière étape est la déprotection des groupements benzyles et benzyldène par hydrogénation en présence du catalyseur Pd/C. Ainsi, le DXP est obtenu énantiomériquement pur, sans épimérisation, en six étapes avec un rendement global de 60 % ce qui est supérieur aux rendements obtenus jusqu'à présent.

Nous avons ainsi élaboré une synthèse permettant d'obtenir le DXP avec le meilleur rendement décrit à ce jour. Cette synthèse efficace a été ensuite appliquée à la préparation de

DXP marqué au deutérium en position C-5. Ce composé a été utilisé dans le cadre d'une collaboration avec Eva Świeżewska (Department of Lipid Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, Warsaw, Poland) pour l'étude de la biosynthèse des polyprénols chez des cultures de racines de *Cohuria geoides*. Cet isotopomère de DXP pourra être utilisé dans le cadre de la collaboration existant avec Thomas Bach (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg). En effet, le [1,1,1,4- $^2\text{H}_4$]DX synthétisé préalablement au laboratoire a été utilisé pour les études de cross-talk entre la voie du MVA et du MEP chez des cellules de tabac TBY-2.³⁵

IV. Synthèse du [5,5- $^2\text{H}_2$]DXP

La synthèse du [5,5- $^2\text{H}_2$]DXP a été effectuée à partir du benzylidène diméthyle D-tartrate commercial **100** (figure 55) afin d'introduire les atomes de deutérium par réduction des fonctions esters. En effet, le [1,1,4,4- $^2\text{H}_4$]-2,3-*O*-benzylidène-D-threitol **101** est obtenu par réduction à l'aide de LiAlD_4 avec un rendement de 96 %.

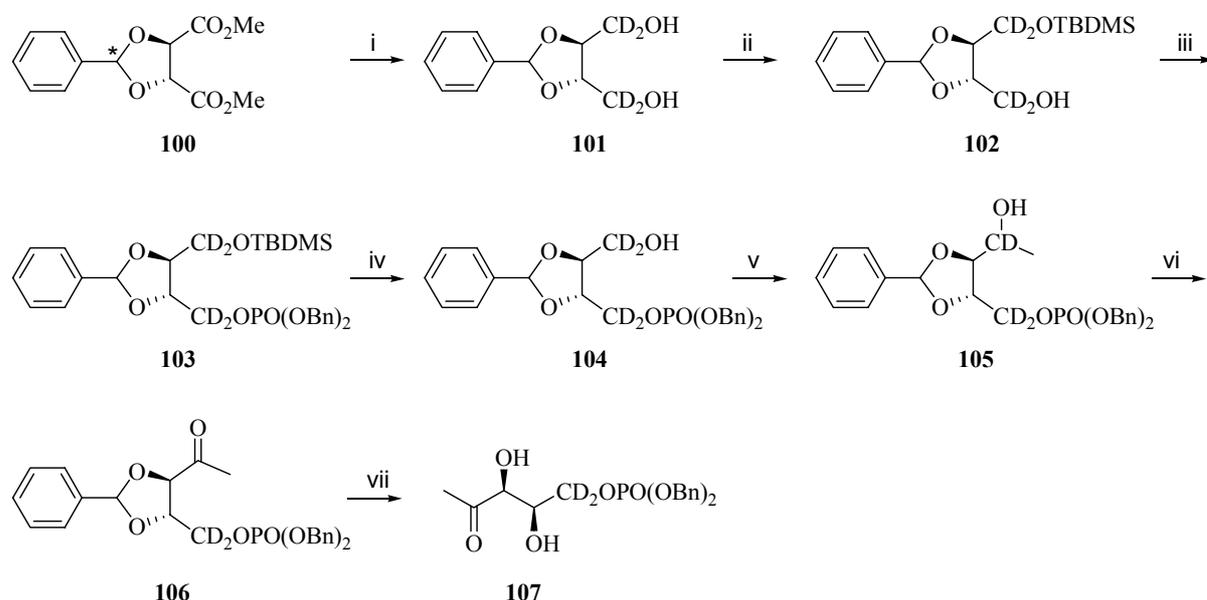


Figure 55. Synthèse du [5,5- $^2\text{H}_2$]DXP

i : LiAlD_4 , THF, 96% ; ii : TBDMS-Cl, NaH, DME, 96% ; iii : $(\text{BnO})_2\text{P-NEt}_2$, tetrazole, *m*CPBA, CH_2Cl_2 , 89% ; iv : Bu_4NF , THF, 87% ; v : $(\text{COCl})_2$, DMSO, NEt_3 , MeMgCl , THF, 86% ; vi : TPAP, NMO, tamis moléculaire 3 Å, CH_2Cl_2 , 93% ; vii H_2 , Pd/C, quant.

Les étapes suivantes menant au [5,5-²H₂]DXP sont identiques à celles décrites pour la synthèse du DXP naturel et les rendements obtenus sont identiques à ceux obtenus pour la synthèse du produit non marqué. Ainsi, le [5,5-²H₂]DXP est préparé énantiomériquement pur, sans épimérisation, en sept étapes avec un rendement global de 57 %.

V. Synthèse du DX

L'analogue non phosphorylé du DXP, le DX est surtout utilisé pour les études *in vivo* concernant la biosynthèse des isoprénoïdes chez les bactéries, chez les plantes entières ou des organes de plantes ainsi que chez des cultures de tissus végétaux. En effet, le DX libre marqué par des isotopes stables est un composé de choix pour ces études car ce pentulose libre est souvent bien incorporé dans les isoprénoïdes après une transformation *in vivo* en DXP par phosphorylation. Chez *Escherichia coli* cette phosphorylation est ATP dépendante et catalysée par une D-xylulokinase.³⁶ De par son importance biologique nous nous sommes également intéressés à la synthèse de ce composé. En effet, dans le cadre d'une autre collaboration avec Lenka Vitova (Institute of Experimental Botany, Praha, République Tchèque), du DX marqué a été nécessaire pour l'étude de la biosynthèse des cytokinines dans les chloroplastes.

Le DX peut être obtenu par voie enzymatique d'une manière analogue au DXP. La DXS n'étant pas totalement « substrat-spécifique », elle peut être utilisée pour la préparation de DX.^{15,17} En effet, l'enzyme accepte le D-glycéraldéhyde libre comme substrat à la place du GAP ce qui permet d'obtenir du DX avec une conversion raisonnable.

Bien que la synthèse enzymatique du DX soit simple à mettre en oeuvre, les quantités produites de DX sont faibles. C'est pourquoi plusieurs synthèses chimiques ont été décrites dans la littérature.

V.1 Synthèses chimiques du DX décrites dans la littérature

Comme pour le DXP, les synthèses chimiques conduisant au DX décrites dans la littérature sont effectuées soit à partir de chirons, soit par synthèse asymétrique.

a. Synthèses du DX à partir de chirons

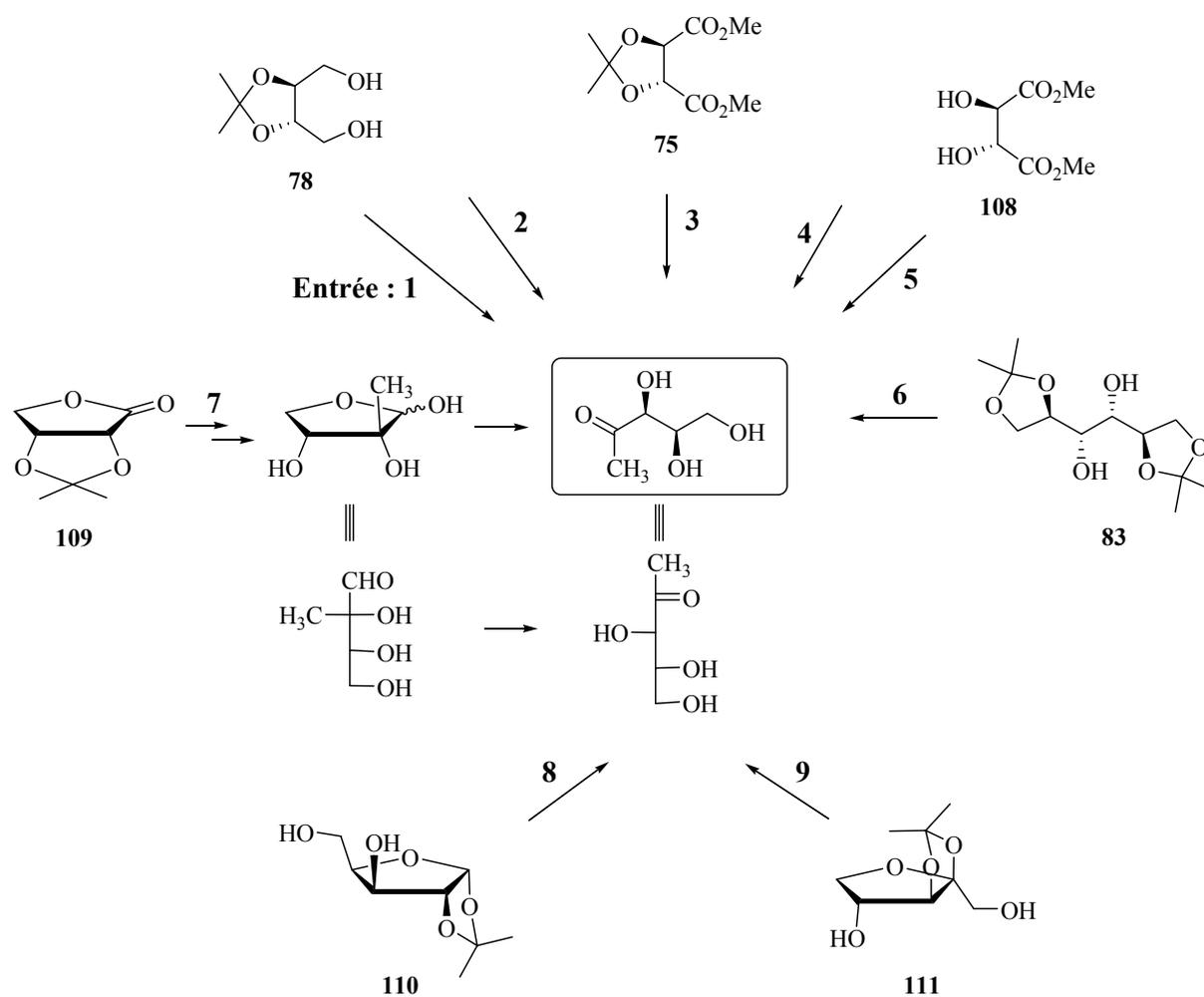
De nombreuses synthèses conduisant au DX ont été décrites à partir de molécules chirales (Figure 56). Blagg et Poulter utilise comme produit de départ le dérivé du thréitol **73** (Figure 56, entrée 1), et la méthodologie proposée pour aboutir au DX est fondée sur celle mise au point pour préparer le DXP (Figure 49). Ainsi, le DX est obtenu en sept étapes avec un rendement global de 69 %.²⁰

Kennedy *et coll.* utilisent également le composé **78** comme produit de départ (Figure 56, entrée 2) et obtient le DX en cinq ou six étapes avec des rendements globaux de 13 et 44 % respectivement.²³ La différence entre ces deux synthèses^{20,23} se situe au niveau de l'utilisation de groupements protecteurs différents.

Plusieurs synthèses décrites dans la littérature utilisent comme produit de départ des dérivés du tartrate, les composés **75** et **108**. Le groupe de Boland a décrit une synthèse à partir du dérivé **75** du tartrate dans lequel le diol vicinal est protégé par un groupement isopropylidène (Figure 56, entrée 3).^{25,26} Les auteurs utilisent une hydrolyse enzymatique à l'aide de PLE (Pig Liver Esterase) pour effectuer une mono-hydrolyse d'une des deux fonctions esters. Après réduction sélective de la fonction ester résultante, alkylation et élimination des groupements protecteurs, le DX est obtenu en quatre étapes avec 36²⁴ ou 44 %²⁵ de rendement global selon les conditions réactionnelles utilisées.

Giner utilise le dérivé du tartrate **108** (Figure 56, entrée 4) pour synthétiser un analogue du thréitol **78** dont les fonctions hydroxyles sont protégés par des groupements benzyles. Ainsi, le DX est obtenu en six étapes avec un rendement global de 52 %.²⁶ Une autre synthèse utilisant le dérivé du tartrate **108** (Figure 56, entrée 5) est proposée par

Backstrom *et coll.*, et permet d'obtenir le DX en six étapes avec un rendement global de 47 %.³⁷



| | Produit de départ | Ref. | Nombre d'étapes | Rdt global (%) |
|---|-------------------|------|-----------------|----------------|
| 1 | 78 | 20 | 7 | 69 |
| 2 | 78 | 23 | 6 | 44 |
| | | | 5 | 13 |
| 3 | 75 | 24 | 4 | 36 |
| | | 25 | 4 | 44 |
| 4 | 108 | 26 | 6 | 52 |
| 5 | 108 | 37 | 6 | 47 |
| 6 | 83 | 21 | 8 | 49 |
| 7 | 109 | 38 | 7 | 23 |
| 8 | 110 | 39 | 7 | 48 |
| 9 | 111 | 40 | 4 | 34 |

Figure 56. Synthèses du DX

L'utilisation du dérivé du mannitol **83** permet d'obtenir le DX (Figure 56, entrée 6) d'une manière analogue à la synthèse décrite pour préparer le DXP (Figure 56, Figure 50). Par cette méthodologie, le DX est obtenu en huit étapes avec un rendement global de 49 %.²¹

L'étape clé de la synthèse de DX décrite par Zhao *et coll.* (Figure 56, entrée 7) repose sur un réarrangement catalysé par du molybdate d'un aldotérose linéaire ramifié obtenu à partir de la lactone **109**. Dans ces conditions, le DX est obtenu en sept étapes avec un rendement global de 23 %.³⁸

Au laboratoire, une synthèse du DX permettant d'introduire des marquages en C1 et/ou C4 a été décrite à partir du xylofuranose **110** (Figure 56, entrée 8). Après rupture oxydante du cycle furane, le DX est obtenu en sept étapes avec 48 % de rendement global.³⁹ Zeidler *et coll.* utilisent le dérivé du xylulofuranose **111** comme produit de départ pour préparer le DX marqué au deutérium (Figure 56, entrée 9). Par cette méthode, le DX est obtenu en quatre étapes avec un rendement global de 34 %.⁴⁰

b. Synthèses du DX par synthèse asymétrique

Deux synthèses asymétriques conduisant au DX ont été décrites dans la littérature.

Giner a décrit une méthode utilisant une dihydroxylation asymétrique de Sharpless afin d'introduire le diol vicinal du DX.²⁶ Cette étape clé est réalisée sur le composé **112** obtenu par une réaction de Wittig (Figure 57). Après élimination du groupement protecteur, le DX est obtenu en 3 étapes avec un rendement global de 70 %. Cette méthodologie permet l'introduction de marquage au ¹³C en position C1.

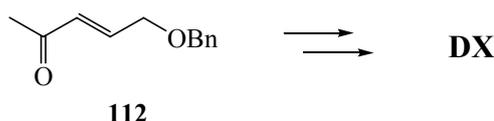


Figure 57. Synthèse asymétrique du DX proposée par Giner

La synthèse la plus récente de DX décrite par Fechter *et coll.* met en jeu la transformation biocatalytique de l'acroléine **113** à l'aide d'une lyase de *Hevea brasiliensis* (Figure 58).⁴¹ Ainsi, le composé **114** est obtenu avec un excès énantiomérique de 90 %. Après une C-élongation réalisée par un réactif de Grignard, une époxydation et une ouverture nucléophile du cycle, le DX est obtenu en six étapes avec un rendement de 47 %.

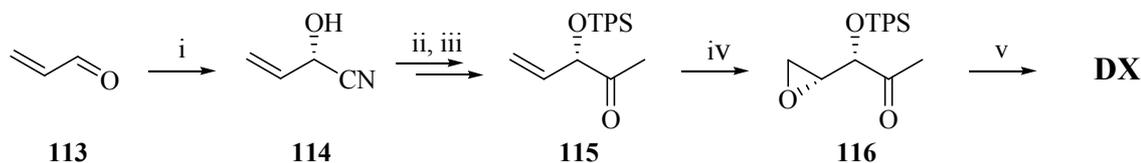


Figure 58. Synthèse asymétrique du DX proposée par Fechter *et coll.*

I : (*S*)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*, 95% ; ii : TPSCl, imidazole, 99% ; iii : MeMgI, 81 % ; iv : *m*CPBA, 87 % ; v : HClO₄, 93 % ou BnOH, BF₃Et₂O et TBAF, 33%

Toutes les synthèses décrites conduisent au DX avec des rendements globaux convenables, mais elles sont souvent longues et fastidieuses. C'est pourquoi nous avons cherché à mettre au point une méthode courte et efficace permettant d'obtenir le DX avec un bon rendement global, et permettant l'introduction de marquages.

V.2 Synthèse du DX

Nous avons choisi comme objectif de mettre au point dans un premier temps une synthèse de DX non marqué qui pourrait dans un second temps être utilisée pour introduire un marquage au deutérium. Nous avons donc cherché une synthèse courte et efficace de DX. Comme les atomes de deutérium peuvent être introduit par réduction d'un ester, nous avons choisi comme produit de départ le diester **100**.

La première approche que nous avons envisagée est l'introduction des deux atomes de deutérium par mono-réduction du diester **100** (Figure 59). Nous avons préalablement testé la synthèse sans marquages.

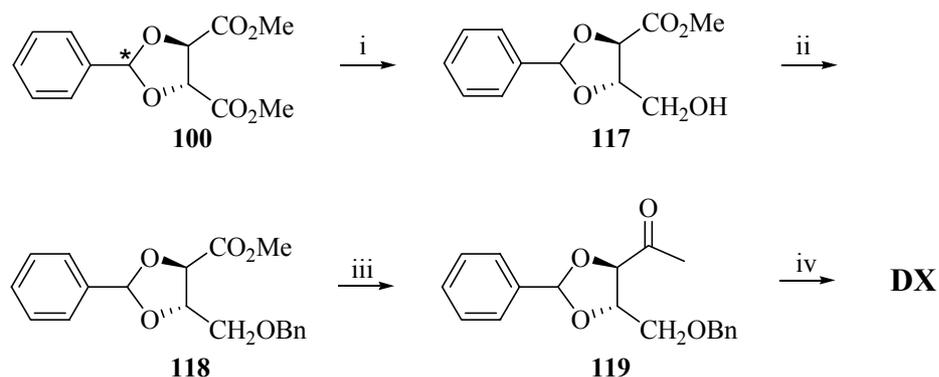


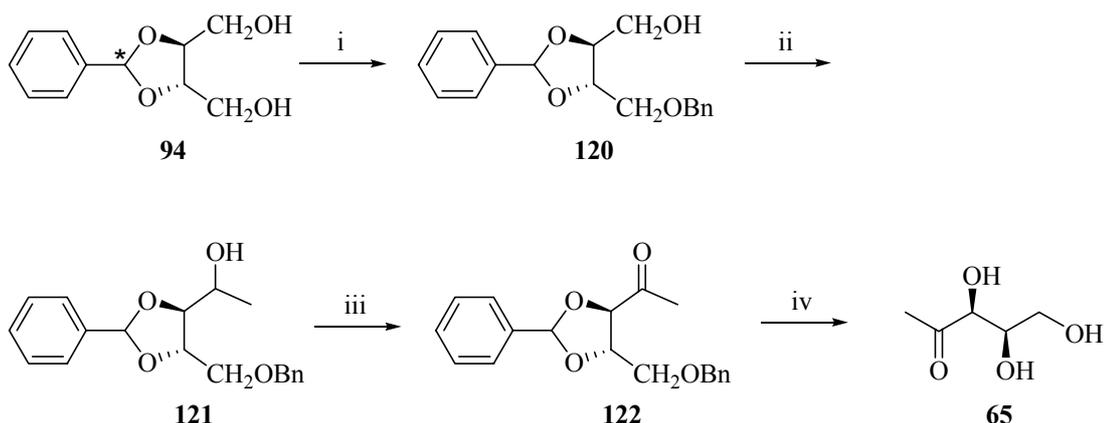
Figure 59 : Synthèse du DX

i : NaBH₄, MeOH, C=55%, 61%; ii : NaH, BnBr, THF, 75 % ; iii : NH(OMe)(Me)-HCl, MeLi, THF, 28 %; iv H₂, Pd/C.

La réduction d'une des fonctions esters en alcool primaire est réalisée à l'aide de NaBH₄ et conduit à l'alcool **117** (Figure 59). Toutefois, la réaction n'étant pas totale, le produit de départ est recyclé. La fonction hydroxyle est ensuite protégée par benzylation en utilisant de l'hydruire de sodium et du bromure de benzyle. L'élongation de la chaîne carbonée est réalisée par addition d'un méthyle lithium sur l'amide de Weinreb préalablement formé à partir de l'ester **117**. Cette méthode ne conduit pas au DX protégé avec un rendement convenable et donc a été abandonnée, car elle ne peut être appliquée pour l'introduction de marquages.

Dans un second temps, nous avons choisi de synthétiser le DX en appliquant la méthodologie utilisée pour la synthèse du DXP précédemment décrite.

Sachant que l'analogue tétradeutérié du thréitol **94** peut facilement être obtenu à partir de tartrate, cette synthèse pourra être appliquée à la préparation de DX marqué au deutérium.

**Figure 60.** Synthèse du DX

i : NaH, BnBr, DME, 85% ; ii : (COCl)₂, DMSO, NEt₃, MeMgCl, THF, 88% ; iii : TPAP, NMO, tamis moléculaire 3 Å, CH₂Cl₂, 86% ; iv H₂, Pd/C, quant.

La monoprotection par benzylation d'une des fonctions hydroxyles du thréitol **94** (Figure 60) est réalisée en utilisant de l'hydruire de sodium et du bromure de benzyle et permet d'obtenir le produit **120** avec un rendement de 85 %. Une réaction de Swern-Ireland³³ permet la préparation de l'alcool secondaire **121** sous forme d'un mélange de quatre diastéréomères avec un rendement de 88 %. Cet alcool est ensuite oxydé en cétone en utilisant comme réactifs le TPAP et la NMO.³⁴ Le DX protégé **122** est ainsi obtenu avec un rendement de 86 %. La déprotection des groupements benzyle et benzylidène par hydrogénation catalytique (Pd/C) fournit quantitativement le DX.

Toutefois il faut noter que le DX en solution aqueuse existe sous trois formes en équilibre, la forme ouverte cétonique et deux formes anomériques d'hémicétal α - et β -furanose qui peuvent éliminer sous certaines conditions l'hydroxyle anomérique (Figure 61).²³ Lorsque l'hydrogénation est réalisée dans le méthanol, un produit secondaire moins polaire que le DX est formé en quantités non négligeables. Son spectre de masse (ionisation chimique avec de l'*i*-butane comme gaz réactant) montre un signal à $m/z = 149$ correspondant à l'ion pseudo-moléculaire (M+H)⁺ et deux autres signaux à $m/z = 131$ et 117 correspondant respectivement à une perte d'eau et de méthanol. Cela suggère une structure comme le méthyle glycoside **124** pour le produit secondaire qui serait formé par addition de méthanol sur l'ion carboxonium **123** (figure 58).

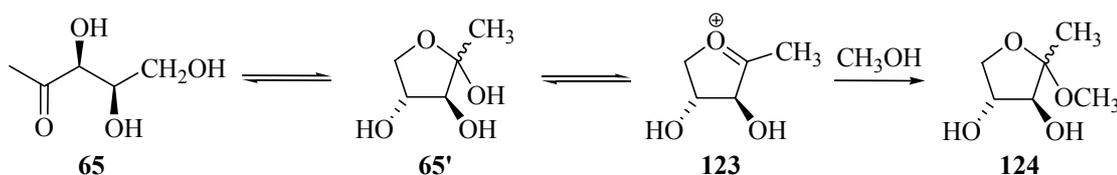


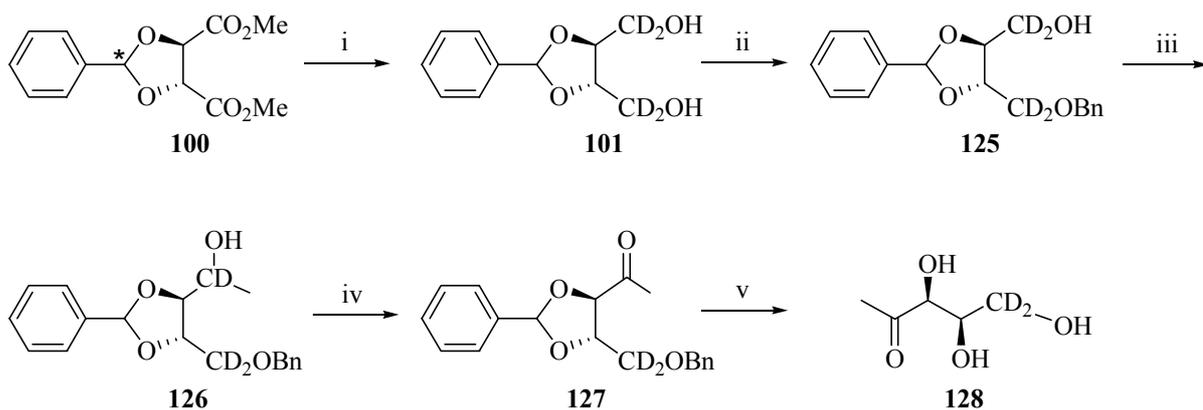
Figure 61. Hydrogénation en présence de méthanol

Afin d'éviter la formation de cette réaction indésirable et obtenir exclusivement du DX, la dernière étape d'hydrogénation nécessite un solvant protique encombré comme par exemple un mélange d'*i*-propanol et d'eau. Ainsi, la double déprotection a été effectuée par hydrogénation catalytique sur Pd/C dans un mélange *i*-propanol/eau (8/2, v/v). Après élimination du catalyseur par filtration sur célite, le DX est obtenu sans purifications ultérieures. Cette séquence réactionnelle permet de préparer du DX en quatre étapes avec un rendement global de 64 %. Ce rendement est comparable avec ceux obtenus dans les synthèses décrites précédemment mais la synthèse est plus courte.

C'est pourquoi nous avons choisi d'appliquer cette méthode pour la préparation de DX marqué au deutérium.

VI. Synthèse du [5,5- $^2\text{H}_2$]DX

Les atomes de deutérium sont introduits à partir du benzylidène diméthyle D-tartrate **100** par une réaction de réduction des fonctions esters à l'aide de NaBD_4 . Cela permet d'obtenir du [1,1,4,4- $^2\text{H}_4$]-2,3-*O*-benzylidene-D-threitol **101** même produit de départ que pour la synthèse du [5,5- $^2\text{H}_2$]DXP (Figure 62).

**Figure 62** : Synthèse du [5,5-²H₂]DX

i : LiAlD₄, THF, 96% ; ii : NaH, BnBr, DME, 84% ; iii : (COCl)₂, DMSO, NEt₃, MeMgCl, THF, 88% ; iv : TPAP, NMO, tamis moléculaire 3 Å, CH₂Cl₂, 86% ; v : H₂, Pd/C, quant.

Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites pour la synthèse du DX et les rendements obtenus sont identiques (Figure 62). Ainsi, le [5,5-²H₂]DX est obtenu en cinq étapes avec un rendement global de 61 %, qui est à ce jour le meilleur rendement décrit dans la littérature.²⁵ Après acétylation du [5,5-²H₂]DX, le produit obtenu est celui correspondant à la forme libre du DX acétylé et non aux anomères furanose. Par conséquent le spectre RMN ¹³C du composé triacétylé est plus simple que celui du DX libre, et cela facilite la localisation du deutérium. En effet, pour chaque carbone C-4, C-3 et C-2 un signal est observé avec des déplacements induits par le deutérium qui correspondent respectivement à des β, γ and δ-shifts. De plus, aucun brouillage du deutérium n'a été observé comme cela a été décrit pour l'hydrogénation menant au [4-²H]DX.⁴²

Conclusion

Les synthèses améliorées du DX et du DXP⁴³ ont été effectuées de l'ordre du gramme mais elles peuvent être appliquées pour la préparation de quantités plus importantes si nécessaire. Les purifications des sucres sont souvent pénibles, longues et donnent de mauvais rendements. Dans cette nouvelle procédure, le DX et le DXP sont obtenus après hydrogénation avec un grand degré de pureté. Ainsi, aucune purification n'est nécessaire et ces composés ont été utilisés tels quels pour les tests enzymatiques utilisant la DXR ou pour les incubations avec des systèmes végétaux. Cette synthèse représente donc une alternative simple et pratique aux synthèses enzymatiques qui nécessitent la séparation et la purification des produits de réaction à partir du tampon réactionnel.

-
- ¹ Slechta L., Johnson L. E., *J. Antibiotics* **1976**, *29*, 685-687.
- ² Hoeksema H., Baczynskyj L., *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 688-690.
- ³ Kennedy I.A., Hill R.E., Paulowsk, R.M., Sayer, B.G., Spenser I.D., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1661-1662.
- ⁴ Cane D. E., Du S. C., Robinson J. K., Hsiung Y.J., Spenser I. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7722-7723.
- ⁵ David S., Estramareix B., Fischer J. C., Thérissod M., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7341-7342.
- ⁶ Himmeldirk K., Kennedy I. A., Hill R. E., Sayer B. G., Spenser I.D., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1996**, 1187-1188.
- ⁷ Himmeldirk K., Saye, B. G., Spenser I. D., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3581-3589.
- ⁸ Spenser I. D., White, R. L., *Angew. Chem. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1032-1046.
- ⁹ Broers S.T.J. I. Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *Escherichia coli*. II. Beitrag zur Aufklärung des Biosynthese von Vitamin B12 in *Propionibacterium shermanii*, PhD Thesis Nb 10978, **1994**, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Switzerland.
- ¹⁰ Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahm H. *Biochem. J.* **1993**, *295*, 517-524.
- ¹¹ Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S., Sahm H., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2564-2566.
- ¹² Arigoni D., Sagner S., Latzel C., Eisenreich W., Bacher A., Zenk M. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10600-10605.
- ¹³ a. Takahashi S., Kuzuyama T., Watanabe H., Seto H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9879-9884. b. Kuzuyama T., Takahashi S., Watanabe H., Seto H., *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4509-4512.
- ¹⁴ Taylor S. V., Vu L. D., Begley T. P., Schörken U., Sprenger G. A., Bringer-Meyer S., Sahm H., *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2375-2377.
- ¹⁵ Rosa-Putra S., Lois L. M., Campos N., Boronat A., Rohmer M., *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 23-26.
- ¹⁶ Hecht S., Kis K., Eisenreich W., Amslinger S., Wungsintaweekul J., Herz S., Rohdich F., Bacher A., *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3948-3952.

-
- ¹⁷ Schürman M, Schürmann M., Sprenger G. A, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **2002**, 19-20, 247-252.
- ¹⁸ Querol J., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M., Boronat A., Imperial S., *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 8265-8268.
- ¹⁹ Thiel R., Adam K.-P., *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 5307-5308.
- ²⁰ Blagg B. S. J., Poulter C. D., *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1508-1511.
- ²¹ Okumoto H., Kato H., *Synlett* **2003**, 10, 1521-1523.
- ²² Cox R. J., de Andrés-Gomez A., Godfrey C. R. A., *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3173-3177.
- ²³ Kennedy I. A., Hemscheidt T., Britten J. F., Spenser I. D., *Can. J. Chem.* **1995**, 73, 1329-1337.
- ²⁴ Piel J., Boland W., *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 6387-6390.
- ²⁵ Jux A., Boland W., *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 6013-6914.
- ²⁶ Giner, J.L. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2479-2482.
- ²⁷ Geffault T., Martin C., Delor S., Besse P., Veschambre H.; Bolte J., *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2296-2301.
- ²⁸ Neidlein R., Li S., *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 97-102.
- ²⁹ Udodong U. E., Turner W. W., Astleford B. A., Brown F. Jr., Clayton M. T. , Dunlap S. E., Frank S. A., Grutsch J. L., La Grandeur L. M., Verral D. E., Werner J. A., *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6115-6118.
- ³⁰ Marecek J.F., Prestwich G. D., *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 5401-5404.
- ³¹ Watanabe Y., Komoda Y., Ebisuya K., Ozaki S., *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 255-256
- ³² de Viguerie N.L., Willson M., Périé J., *New J. Chem.* **1994**, 18, 1183-1195.
- ³³ Ireland R., Norbeck D. W., *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 2198-2000.
- ³⁴ Griffith W. P., Ley S. V., *Aldrichim. Acta*, **1990**, 23, 13-19.

-
- ³⁵ Hemmerlin A., Hoeffler J.-F., Meyer O., Tritsch D., Kagan I. A.; Grosdemange-Billiard C., Rohmer M., Bach T. J., *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 26666-26676.
- ³⁶ Steinbacher, S., Kaiser, J., Eisenreich, W., Huber, R., Bacher, A., Rohdich, F. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 18401-18407.
- ³⁷ Backstrom A. D., McMordie R. A. S., Begley T. P., *J. Carb. Chem.* **1995**, 14, 171-175.
- ³⁸ Zhao S., Petrus L., Serianni A., *Org. Lett.* **2001**, 3, 3819-3822.
- ³⁹ Hoeffler J. F., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M., *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 3065-3067.
- ⁴⁰ Zeidler J. G., Lichtenthaler H. K., May H. U., Lichtenthaler F. W., *Z. Naturforsch.* **1997**, 52c, 15-23.
- ⁴¹ Fechter M. H., Gaisberger R., Griengl H., *J. Carbohydr. Chem.* **2001**, 20, 833-839.
- ⁴² Hoeffler J.-F., Hemmerlin A., Grosdemange-Billiard C., Bach T. J., Rohmer M., *Biochem. J.* **2002**, 366, 573-583.
- ⁴³ Meyer O., Hoeffler J.-F., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M., *Tetrahedron* **2004**, sous presse.

chapitre 2.

synthèse d'analogues du DXP à partir de chiron.

I. Synthèse d'analogues par modification de la fonction phosphate

Nous avons envisagé de synthétiser différents analogues de substrat du DXP en remplaçant la fonction phosphate par un phosphonate ou un thiophosphate.

I.1 Analogues phosphonates

a. Introduction

De nombreux phosphonates, analogues de phosphates naturels, sont des inhibiteurs d'enzymes.¹ Parmi ces molécules, la fosmidomycine **36** et ses dérivés **37** à **39** (Figure 63) ont des propriétés antibactériennes et antipaludéennes.² De plus, il a été montré que ces composés ont une activité inhibitrice de la DXR, enzyme de la voie du MEP.^{2a}

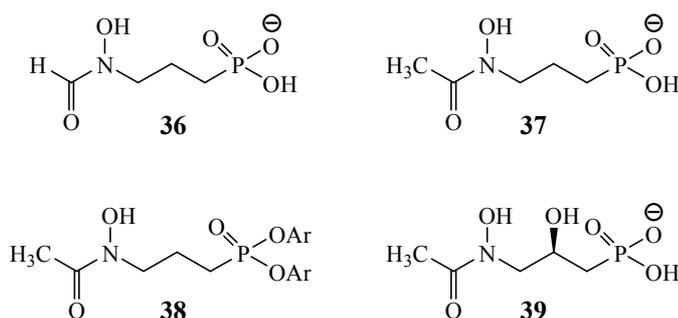


Figure 63. La fosmidomycine **36** et ses dérivés

Ces composés possèdent tous une fonction phosphonate et une fonction hydroxamate. Afin de voir si la présence d'une fonction phosphonate est responsable de l'activité biologique de ces composés, nous avons tout d'abord envisagé de synthétiser les analogues phosphonates **58** et **59** du DXP (Figure 64).

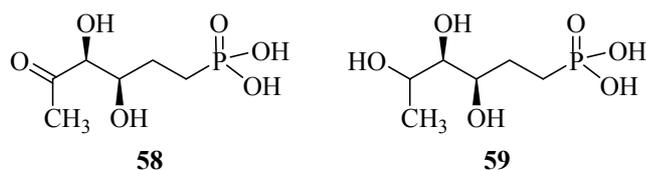


Figure 64. Analogues phosphonate du DXP

Dans la littérature des phosphonates comportant des atomes d'halogènes en α du phosphore ont été décrits et possèdent des propriétés biologiques intéressantes.^{3,4} Les phosphonates α halogénés, en particulier α fluorés, sont en effet des mimes meilleurs de phosphates que les phosphonates non halogénés d'un point de vue isostérique et isopolaire.³ De plus, de tels composés sont préférés par rapport à leurs analogues non halogénés⁵ parce qu'il y a :

- diminution du pK_{a2} ,
- augmentation de l'angle du dièdre C-CX₂-P,
- augmentation de la polarité du groupement pontant,
- possibilité de réaliser des liaisons hydrogènes de type C-F \cdots H-X.⁶

Pour ces différentes raisons, nous avons choisi de préparer les analogues des composés **58** et **59** contenant 1 ou 2 atomes de fluor en α du phosphore (Figure 65).

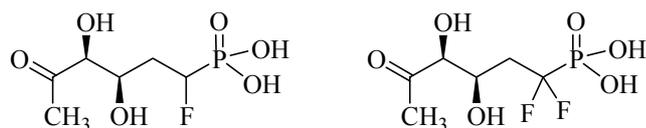


Figure 65. Analogues phosphonate α -fluorés du DXP

Nous avons également envisagé la synthèse d'analogues phosphonates contenant une fonction hydroxamate (Figure 66). Ces composés possèdent une structure située entre celles du DXP et de la fosmidomycine.

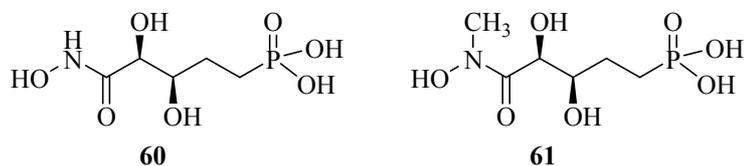


Figure 66. Analogues phosphonate/hydroxamate du DXP

Des calculs « *density functional theory* » *ab initio* ont été réalisés sur le DXP, substrat de la DXR, et sur ses inhibiteurs, la fosmidomycine et le FR-900098 afin de déterminer leur structure et leur distribution de charges. La structure cristalline de la DXR en

présence de la fosmidomycine et du manganèse a montré que l'inhibiteur se comporte comme un analogue du DXP. Les atomes d'oxygène du groupement (*N*-formyl-*N*-hydroxy)amino coordinent le manganèse et le phosphonate lié par un espaceur de trois groupements méthylènes est reconnu par liaisons hydrogènes dans une poche spécifique. Ainsi, les structures proposées devraient également chélater le métal nécessaire au réarrangement catalysé par la DXR et donc se comporter comme des inhibiteurs de la cette enzyme.

b. Synthèse des analogues phosphonates du DXP

La synthèse du phosphonate a été réalisée en appliquant la synthèse mise au point pour synthétiser le DXP (Figure 54, chapitre 1). L'introduction du groupement phosphonate pourrait être effectuée par le déplacement d'un groupement triflate. De plus, afin d'éviter la purification du produit final polaire et hydrophile, nous avons choisi de protéger toutes les fonctions hydroxyles sous forme de benzyles ou benzylidène dans l'objectif de réaliser une hydrogénation catalytique comme dernière étape de la synthèse.

La synthèse de l'analogue phosphonate du DXP, noté DXP_N, est effectuée à partir du dérivé du thréitol **94** (Figure 67). Une monoprotection d'une des deux fonctions hydroxyles est effectuée dans les mêmes conditions réactionnelles mises au point pour la première étape de la synthèse du DXP. L'alcool primaire **95** résultant est ensuite activé sous forme de triflate. Ce groupe nucléofuge est mis en place à l'aide d'anhydride triflique en présence de triéthyle amine. Le composé **129** est ainsi obtenu avec un rendement de 95 %, puis est immédiatement engagé pour la préparation du composé **130** car le groupement triflate se décompose très rapidement en plusieurs produits secondaires.

Le groupement phosphonate a été préparé à partir du méthyle dibenzylphosphonate. Ce composé est obtenu par réaction de l'anion du dibenzyle phosphite préalablement formé par action d'hydrure de sodium sur l'iodure de méthyle.

L'introduction du groupement phosphonate est une étape délicate et l'optimisation des conditions réactionnelles est fastidieuse. Différentes conditions expérimentales ont été testées. Le meilleur résultat a été obtenu par déplacement du groupement triflate par un nucléophile formé par action du *n*-butyllithium sur le méthyle dibenzylphosphonate. Afin d'augmenter le caractère nucléophile du carbanion, cette réaction est réalisée en présence d'hexaméthylephosphoramidate (HMPA). De plus, comme cet intermédiaire est instable et

sensible à l'oxygène, toutes les solutions ont du être dégazées au préalable. La réaction est réalisée à -78°C , et le triflate est canulé sur une solution contenant l'anion. Ces conditions réactionnelles permettent d'obtenir le composé **130** avec un rendement maximum de 70 %.

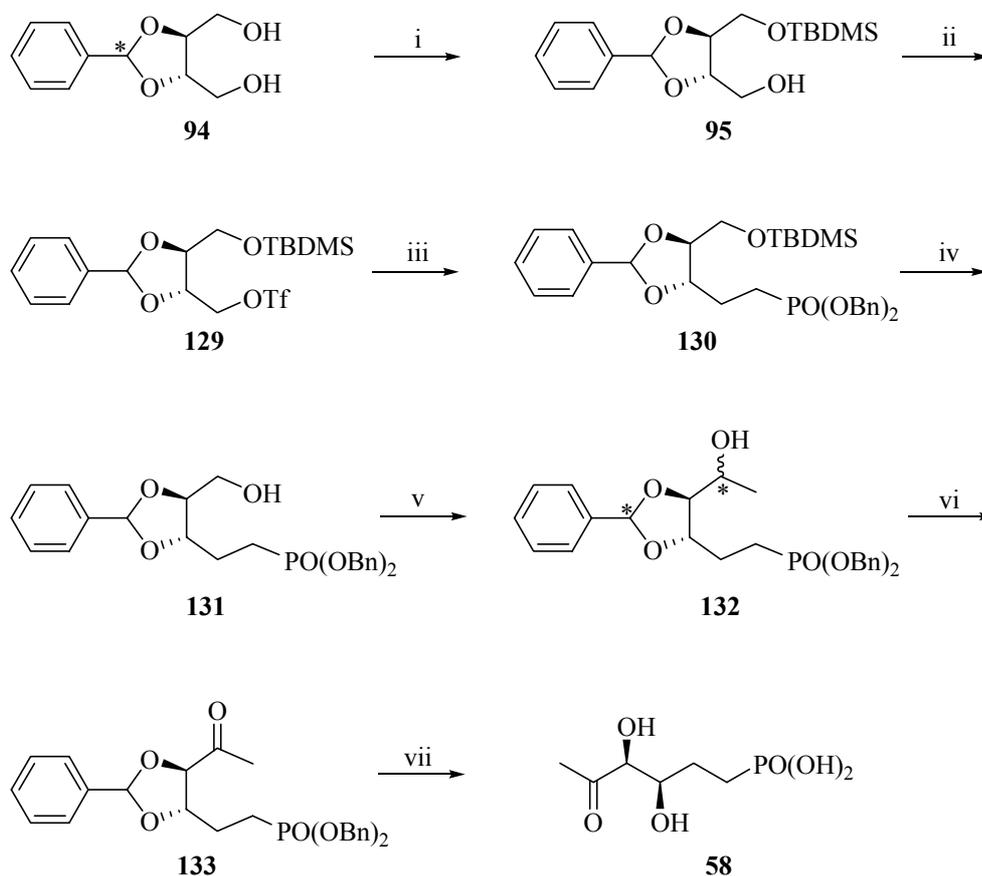


Figure 67. Synthèse d'un analogue phosphonate du DXP

i : TBDMSCl, NaH, DME, 96 % ; ii : Ti_2O , NEt_3 , CH_2Cl_2 , 95 % ; iii : MePO(OBn)_2 , $n\text{-BuLi}$, HMPA, THF, 70 % ; iv : Bu_4NF , THF, 98 % ; v : $(\text{COCl})_2$, DMSO, NEt_3 , MeMgCl , THF, 86 % ; vi : TPAP, NMO, tamis moléculaire 3 Å, CH_2Cl_2 , 80 % ; vii : H_2 , 10% Pd/C, MeOH/ H_2O (9:1), quant.

La déprotection de l'éther de silyle à l'aide de fluorure de tétrabutylamonium, conduit à l'alcool primaire **131** avec 98 % de rendement. L'élongation de la chaîne carbonée est effectuée en utilisant la réaction de Swern-Ireland.⁷ L'alcool secondaire à 6 carbones **132** est ainsi préparé avec un rendement de 85 % puis est ensuite oxydé à l'aide de TPAP⁸ en cétone **133** avec 80 % de rendement. La déprotection des groupements benzyles et benzylidène est réalisée par hydrogénation en présence d'une quantité catalytique de Pd/C dans un mélange méthanol/eau, et permet l'obtention quantitative du composé **58** énantiomériquement pur sans

épipimérisation. L'analogue phosphonate du DXP **58** est obtenu en sept étapes à partir du dérivé du thréitol **89** avec un rendement global de 43 %.

Nous avons également préparé l'analogue phosphonate **59** du DXP dans lequel la fonction carbonyle du DXP est réduite en alcool secondaire. Ce composé est obtenu quantitativement par hydrogénation catalytique en présence de Pd/C de l'alcool secondaire **132** (Figure 68).

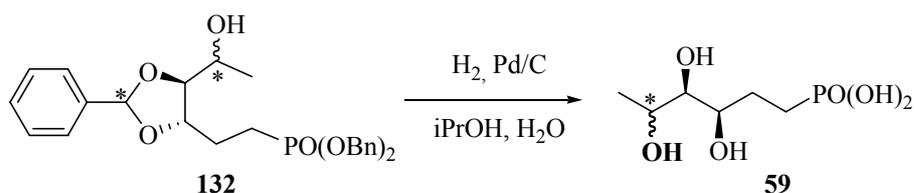


Figure 68. Synthèse d'un analogue phosphonate du DXP

L'analogue phosphonate du DXP **59** est obtenu en six étapes à partir du dérivé du thréitol **89** avec un rendement global de 54 %.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse d'analogues phosphonates du DXP contenant un ou deux atomes de fluor en α du phosphore.

c. Tentatives de synthèse des analogues phosphonate α -fluorés du DXP

Dans un premier temps, nous avons envisagé la synthèse de l'analogue phosphonate α -monofluoré. Différentes méthodes permettent d'accéder à ce type de composés (Figure 69). Une de ces méthodes utilise comme composé de départ un phosphonate (Figure 69, a). La formation d'un anion en α du phosphore suivie de la réaction de celui-ci avec un fluor « électrophile » permet d'obtenir le phosphonate α -mono- ou di- fluoré. Différents donneurs de « F⁺ » sont connus, ce sont le Select-Fluor[®] ou F-TEDA,^{9,10} le NFOBS,¹¹ le NFSi¹² et son analogue trifluorométhyle¹³ (Figure 69, a).

Une autre approche consiste en une condensation de type Wadsworth-Emmons du carbanion lithié formé à partir du tétraéthyle monofluorométhylènediphosphonate sur un

aldéhyde (Figure 69, b).¹⁴ Ainsi, un intermédiaire α -fluorovinylphosphonate est formé et peut être hydrogéné pour conduire au phosphonate α fluoré.

La dernière méthode est fondée sur le déplacement par l'anion phosphonate fluoré d'un bon groupement partant comme un triflate ou un iodure (Figure 69, c). L'anion est formé à partir d'un phosphonate possédant en α du phosphore un fluor et une sulfone¹⁵ ou un groupement triméthylsilyle.¹⁶ Après la réaction de substitution, une élimination de la sulfone ou du TMS peut être envisagée afin d'obtenir le phosphonate α -fluoré.

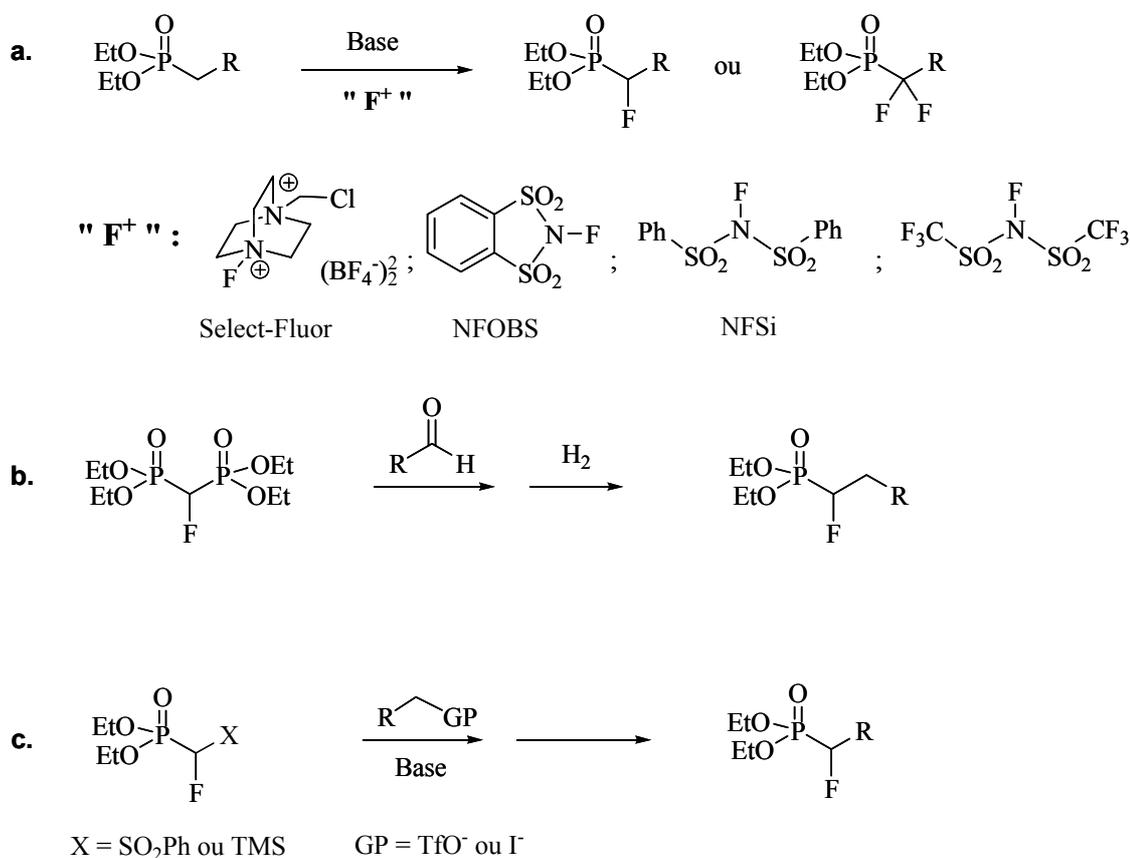


Figure 69. Synthèses de phosphonates α -fluorés

Nous avons choisi d'introduire le groupement fluoré sur l'intermédiaire **130** préparé pour la synthèse du phosphonate **58** (Figure 70) en utilisant la méthode a. En effet, en formant un anion en α du phosphore et en le faisant réagir avec un fluor « électrophile », le composé **134** pourrait être obtenu. Les étapes suivantes de la synthèse seraient identiques à celles utilisées pour la fin de la synthèse de l'analogue phosphonate : déprotection de l'éther de silyle, réaction de Swern-Ireland, oxydation et hydrogénation. Nous avons réalisés différents

essais d'introduction d'un atome de fluor en utilisant le Select-Fluor[®] comme donneur de « F⁺ ». Lorsque l'anion du phosphonate est formé à partir d'hydruure de sodium comme base, le produit récupéré est le produit de départ. L'utilisation de *n*-butyllithium fournit un mélange de plusieurs composés ne contenant pas le produit désiré puisqu'en RMN du ¹⁹F le signal du fluor correspondant au produit désiré est absent.

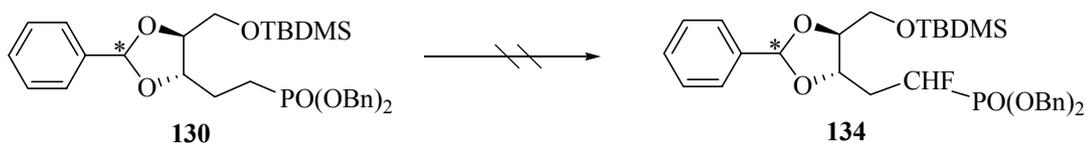


Figure 70. Tentative de synthèse d'un analogue phosphonate α -monofluoré du DXP

Ces essais de monofluoration du phosphonate n'ayant pas aboutis, nous avons envisagé la synthèse de l'analogue phosphonate α -difluoré. Différentes méthodes permettent d'accéder à ce type de composés (Figure 71).¹⁷

La condensation du carbanion lithié α -difluorométhyl phosphonate de diéthyle sur un aldéhyde suivie d'une désoxygénation de Barton (Figure 71 a, X = Li) permet d'obtenir un phosphonate difluoré.^{18,19} De même, un phosphonate silylé peut être additionné sur un aldéhyde en présence de TBAF et conduit après élimination de la fonction hydroxyle au composé souhaité (Figure 71 a, X = TMS).¹⁴ L'addition d'un phosphonate α -difluoré et iodé sur un alcène en présence de palladium ou de cuivre permet d'obtenir le phosphonate α -difluoré après élimination de l'iode (Figure 71 b).²⁰ Une dernière approche met un jeu le déplacement d'un triflate par l'anion α -difluorométhyl phosphonate (Figure 71 c).^{21,22}

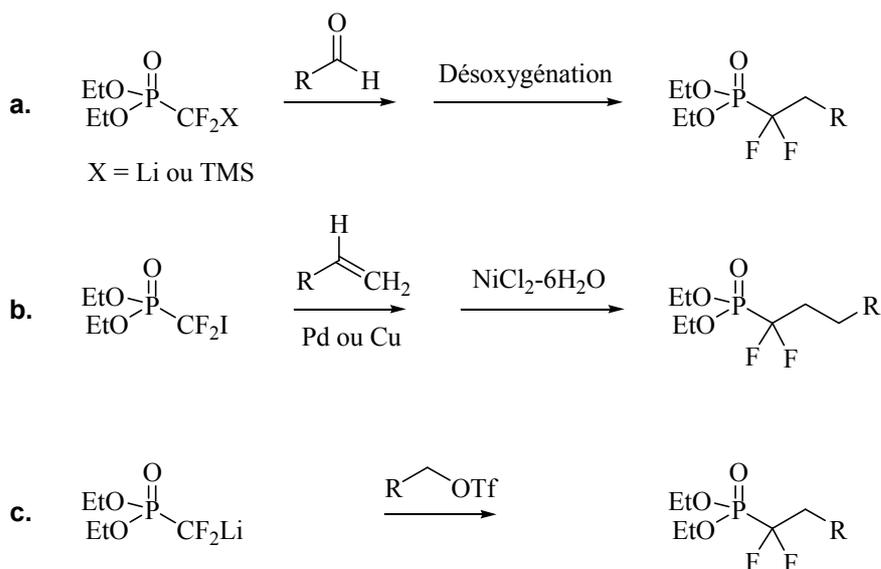
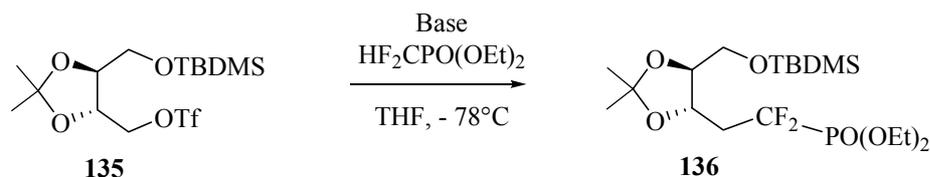


Figure 71. Synthèse de phosphonates α -difluorés

Nous avons choisi d'utiliser cette dernière méthode car celle-ci ne nécessite pas de modifications ultérieures. De plus, le réactif phosphonate dont les fonctions hydroxyles sont protégées sous forme d'éthyle est commercial. Afin d'effectuer une seule étape de déprotection nous avons choisi comme produit de départ un dérivé du thréitol dont les fonctions hydroxyles sont protégées par un groupement isopropylidène (Figure 72). En effet, ce groupement protecteur peut être déplacés en même temps qu'un groupement isopropylidène à l'aide de TMSBr par exemple. L'introduction du groupement phosphonate pourrait être obtenue par déplacement du triflate **135** par l'anion formé à partir de difluorométhyle phosphonate de diéthyle. Différentes conditions réactionnelles ont été testées afin de former le phosphonate **136**.

Différentes conditions réactionnelles ont été réalisées et sont consignées dans le tableau (Figure 72). Nous avons tout d'abord utilisé la même base et nous avons fait varier le mode opératoire. Lorsque l'anion formé à partir de *n*-BuLi est agité pendant 30 min puis le triflate additionné, la réaction n'a pas eu lieu (Figure 72, entrée 1). Nous avons alors ajouté le triflate immédiatement après avoir formé l'anion (Figure 72, entrée 2). Dans ce cas, en RMN, nous observons des traces de produit souhaité. L'ajout de HMPA au milieu réactionnel ne modifie pas la quantité de **136** formé.



| | HF ₂ CPO(OEt) ₂ | Base | HMPA | Conditions | Mode opératoire | 136 |
|---|---------------------------------------|----------------|------|----------------|---|--------|
| 1 | 3.5 eq. | <i>n</i> -BuLi | - | - 78°C, 30 min | Formation de l'anion Addition du triflate après 30 min | - |
| 2 | 3.5 eq. | <i>n</i> -BuLi | - | - 78°C, 30 min | Addition immédiate du triflate sur l'anion | Traces |
| 3 | 4 eq. | <i>n</i> -BuLi | + | - 78°C, 30 min | Idem | Traces |
| 4 | 5 eq. | LiHMDS | - | - 78°C, 60 min | Idem | - |
| 5 | 5 eq. | LDA | + | - 78°C, 60 min | Idem | Traces |
| 6 | 5 eq. | LDA | + | - 78°C, 60 min | Mise en solution de tous les réactifs Addition de la base en dernier | Traces |

Figure 72. Tentatives de synthèse d'un analogue phosphonate α -difluoré du DXP

C'est pourquoi nous avons tenté de tester d'autres bases. L'utilisation de LiHMDS ne permet pas de conduire au phosphonate **136** (Figure 72, entrée 4). La formation de l'anion à l'aide de LDA (Figure 72, entrée 5 et 6) fournit des traces de composé souhaité **136** et ceci quel que soit le mode opératoire utilisé. Il faut noter que l'anion formé (de couleur orange) est peu nucléophile et thermiquement instable.²³ Cela peut expliquer les mauvais résultats obtenus. Le réactif fluoré étant cher, nous avons décidé d'abandonner cette synthèse.

d. Synthèse des analogues phosphonate contenant une fonction hydroxamate

Les synthèses des analogues phosphonates **60** et **61** contenant une fonction hydroxamate ayant une structure située entre celles du DXP et de la fosmidomycine pourraient être synthétisés à partir du dérivé du thréitol **94**. En effet, le précurseur **137** de ces composés pourrait être formé par couplage peptidique de l'amine appropriée avec l'acide carboxylique **138** (Figure 73). Celui-la pourrait être obtenu par oxydation d'un aldéhyde

formé à partir de l'alcool **131**. Ce dernier a été synthétisé lors de la préparation de l'analogue phosphonate du DXP débutant avec le composé **94** (Figure 67).

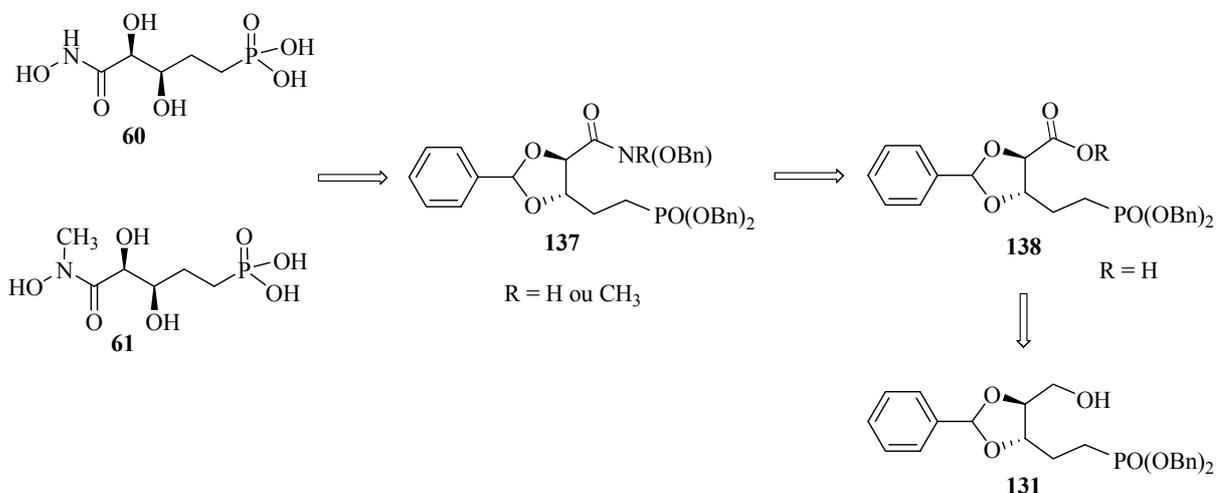


Figure 73. Rétrosynthèse des composés **60** et **61**

La fonction phosphonate est mise en place selon la méthode utilisée précédemment (Figure 67). L'alcool **131** ainsi préparé en quatre étapes est ensuite oxydé en aldéhyde **137** par la méthode de Swern. Ce composé est oxydé en acide carboxylique **138** à l'aide de NaOCl₂²⁴ avec un rendement de 88 %.

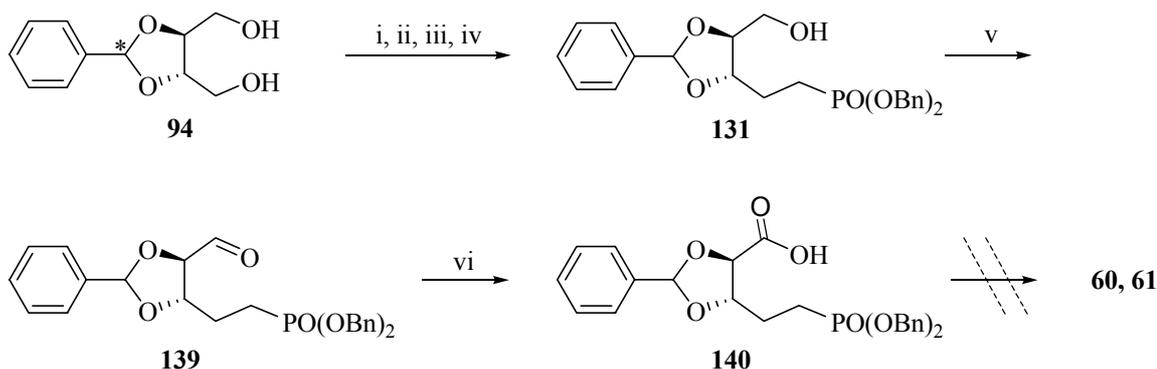


Figure 74. Synthèses d'analogues phosphonate/hydroxamate du DXP

i : TBDMSCl, NaH, DME, 96 % ; ii : Tf₂O, NEt₃, CH₂Cl₂, 95 % ; iii : MePO(OBn)₂, n-BuLi, HMPA, THF, 70 % ; iv : Bu₄NF, THF, 98 % ; v : (COCl)₂, DMSO, NEt₃, THF, 88 % ; vi : NaClO₂, KH₂PO₄, 2-méthyl-2-butène, tBuOH, H₂O, 88 %.

A ce jour, la synthèse n'a pas été terminée. Il reste à réaliser la formation de la fonction amide, la méthylation et la déprotection finale.

I. 2. Synthèse d'analogues thiophosphates du DXP

a. Introduction

Parallèlement à ces synthèses, nous avons envisagé les synthèses de dérivés thiophosphate du DXP. En effet, de nombreux thiophosphates, analogues de composés phosphorylés naturels ont des applications biologiques.^{25,26}

De plus, les thiodiphosphates d'isopentényle et de diméthylallyle, analogues respectivement de l'IPP **12** et du DMAPP **13**, ont été synthétisés et testés.²⁷ Dans les conditions naturelles, les premières étapes de formation des isoprénoïdes correspondent à une condensation de l'IPP **12** sur le DMAPP **13** pour donner le diphosphate de géranyle **14** (GPP) puis une seconde molécule d'IPP réagit avec le GPP pour conduire à un composé en C15, le diphosphate de farnésyle **15** (FPP). Ces réactions sont catalysées par une farnésyl diphosphate synthase (FPPase) (Figure 75, a).

Les analogues thiophosphorylés de l'IPP (ISPP, **140**), du DMAPP (DMASPP, **141**), du GPP (GSPP, **142**) ont été préparés et il a été montré *in vitro* que l'ISPP et le GSPP sont substrats d'une farnésyl diphosphate synthase aviaire (Figure 75, b).

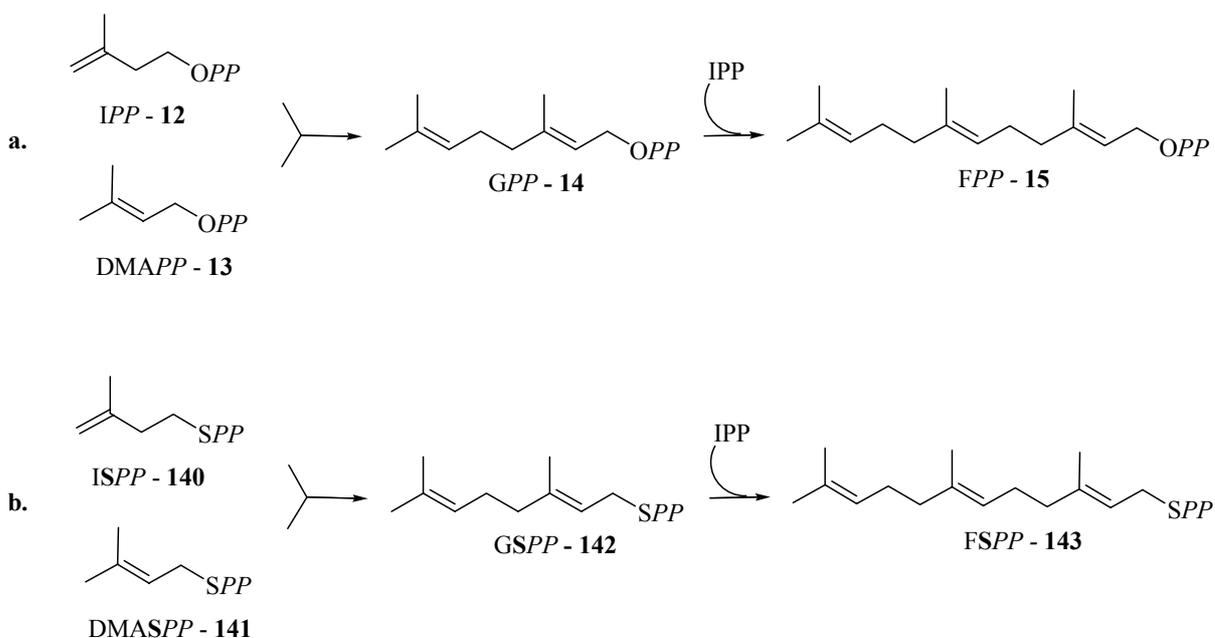


Figure 75. Synthèses du FPP et du FSPP

L'incubation de l'enzyme avec de l'ISPP **141** et du GPP **14** conduit au FSPP **143** alors que l'incubation de l'IPP **12** avec du GSPP **142** donne du FPP **15** (Figure 76). Ces résultats sont en accord avec le mécanisme de condensation de type tête-à-queue de l'IPP sur le GPP proposé pour la formation du diphosphate de farnésyle.²⁸

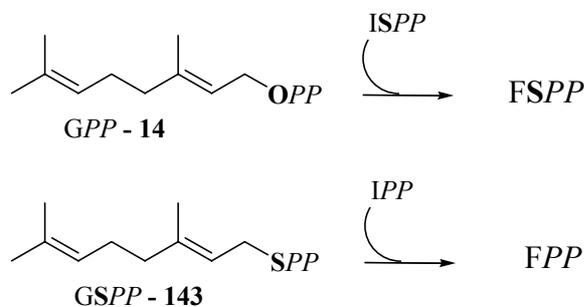


Figure 76. Synthèses du FPP et du FSPP

Lors de la réaction d'élongation de la chaîne isoprénique, le GSPP est moins réactif que le GPP et, est un inhibiteur compétitif de l'enzyme ($K_i = 24.8 \mu\text{M}$). Ainsi, lorsque l'ISPP **140** et le DMAPP **13** ont été incubés en présence de FPPase, le GSPP **142** a été accumulé (Figure 77).

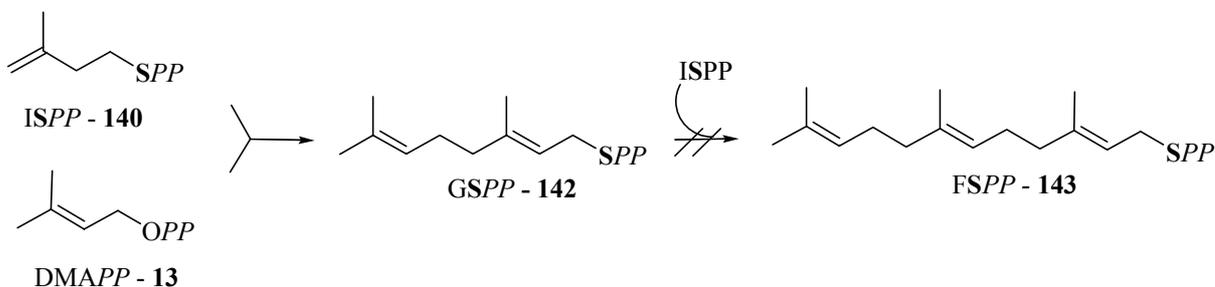


Figure 77. Rôle de l'ISPP dans la synthèse de thiophosphate de farnésyle

L'ISPP pourrait être obtenu enzymatiquement à partir d'analogues thiophosphate du DXP. C'est pourquoi nous avons envisagé la synthèse du thiophosphate sous sa forme thiol **60** et sous sa forme thione **61** (Figure 78).

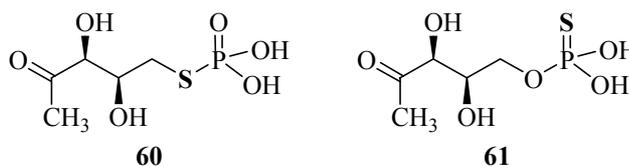


Figure 78. Analogues thiophosphates du DXP

b. Synthèse de l'analogue thiophosphate du DXP sous sa forme thione

Pour synthétiser l'analogue thiophosphate du DXP nous avons utilisé la méthodologie mise au point pour la préparation du DXP c'est-à-dire l'utilisation d'un dérivé du thréitol comme produit de départ.

Sachant que la liaison P=S peut être obtenue par transformation d'une liaison P=O à l'aide du réactif de Lawesson,^{29,30} nous avons testé cette réaction sur l'intermédiaire avancé **99** de la synthèse du DXP (Figure 79).

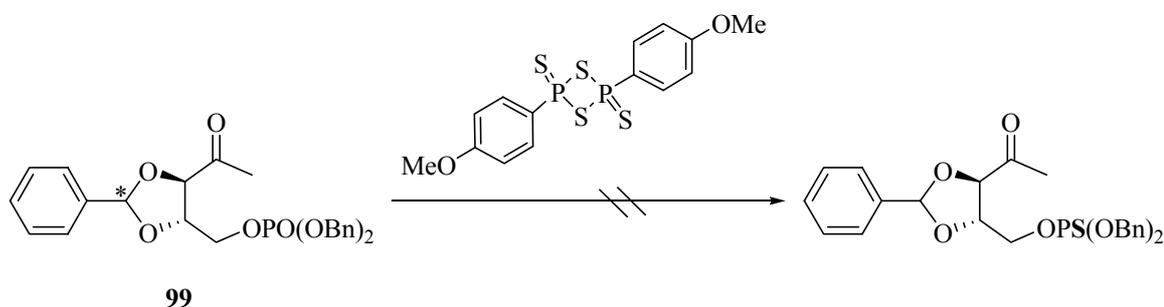
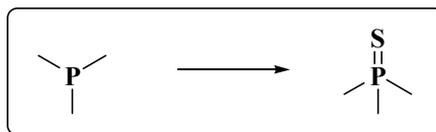


Figure 79. Tentatives de synthèse de l'analogue thiophosphate du DXP sous sa forme thione

Un suivi de la réaction par RMN montre que le produit de départ est transformé en un mélange de plusieurs composés ne contenant pas le produit désiré. En effet, aucun signal n'est obtenu en RMN du ^{31}P , et en RMN du ^{13}C , le carbonyle a disparu. Nous avons donc cherché une autre méthodologie pour introduire le groupement thiophosphate **61**.

La formation d'une liaison P=S peut être envisagée par oxydation d'un phosphore III par différents réactifs soufrés (Figure 80). Ce sont le tétrasulfure de dibenzoyl **145**,³¹ le soufre (S_8),³² le 3-amino-1,2,4-dithiazole-5-thione supporté sur polymère **146**,³³ le 3H-1,2-benzodithiole-3-one 1,1-dioxyde ou réactif de Beaucage **147**,³⁴ le disulfure de diphenylacétyle **148**³⁵ et le disulfure de tétraéthylthiurame **149**.³⁶



Réactifs :

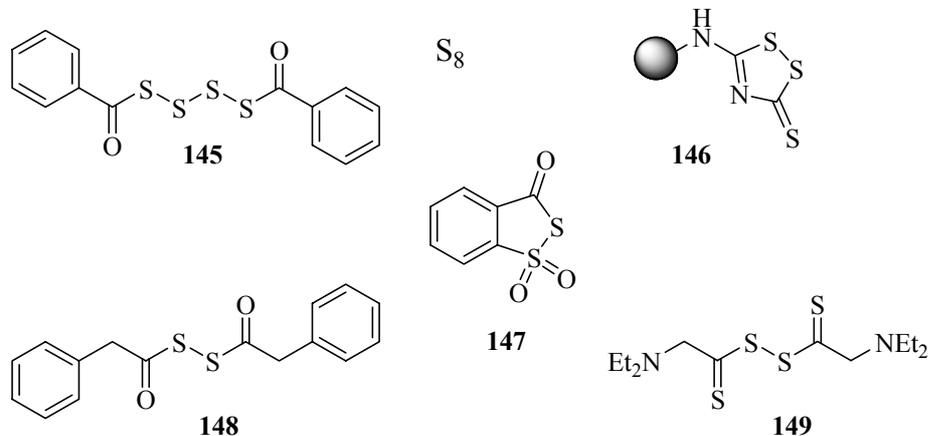


Figure 80. Réactifs permettant la formation d'une liaison P=S

L'introduction du phosphore III a été réalisée en appliquant la méthodologie utilisant un phosphoramidate pour la préparation d'un phosphate. La fonction phosphate est obtenue par oxydation du phosphite à l'aide de *m*CPBA. Ainsi, un thiophosphate pourra être obtenu en remplaçant le *m*CPBA par un des réactifs proposés sur la Figure 80.

La synthèse du composé **61** débute par le dérivé du thréitol **94** (Figure 81). La première étape est la protection du diol par un groupement silylé comme pour les synthèses du DXP ou de son analogue phosphonate. L'alcool primaire est ensuite transformé en phosphite à l'aide de dibenzyl-*N,N*-diéthyl phosphoramidite et de tétrazole. Du soufre solide est ajouté au milieu réactionnel afin de former la liaison P=S. Ainsi, le thiophosphate **150** est obtenu à partir de l'alcool **95** avec un rendement de 91 %. La liaison P=S est mise en évidence en RMN ^{31}P par un signal à 70 ppm.

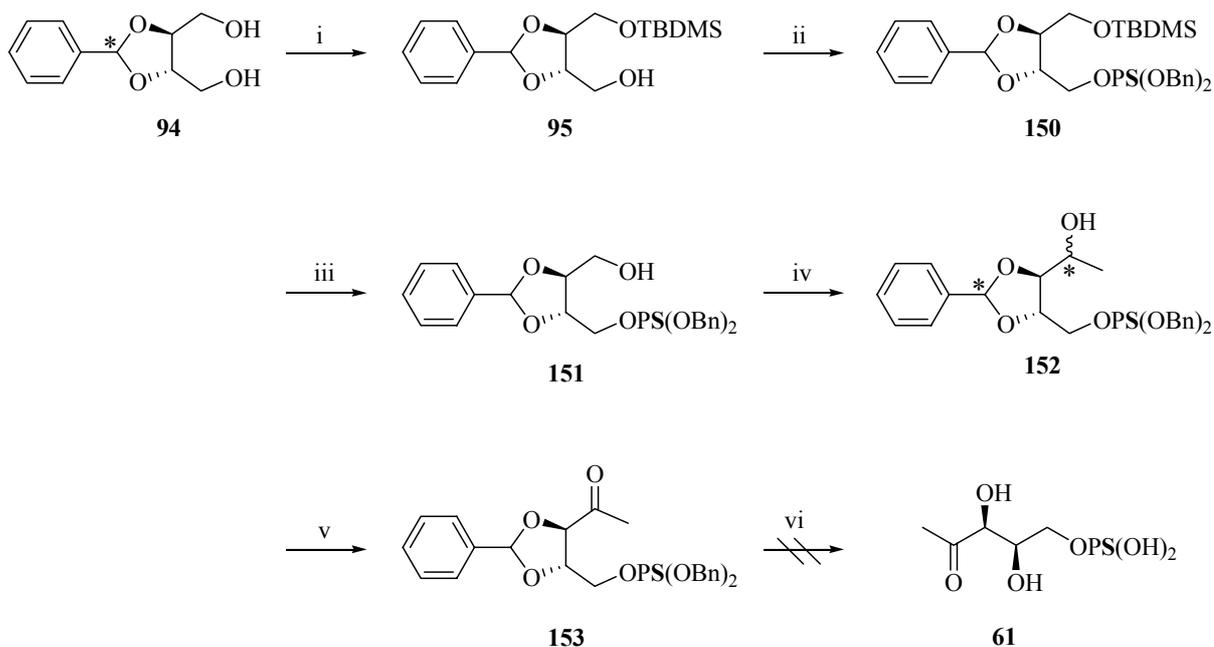


Figure 81. Tentative de synthèse de l'analogue thiophosphate du DXP sous sa forme thione

i : TBDMSCl, NaH, DME, 96% ; ii : (BnO)₂P-NEt₂, tétrazole, S₈, CH₂Cl₂, 91% ; iii : Bu₄NF, THF, 87% ; iv (COCl)₂, DMSO, NEt₃, MeMgCl, THF, 87% ; v : TPAP, NMO, 3 Å tamis moléculaire, CH₂Cl₂, 89% ; vi. déprotection

Le groupement silylé est déprotégé par du TBAF pour donner l'alcool **151** avec 87 % de rendement. L'oxydation de l'alcool primaire en utilisant les conditions de Swern modifiées par Ireland permet d'accéder à l'alcool secondaire **152** sous forme d'un mélange de quatre diastéréomères avec un rendement de 87 %. Le mélange de diastéréomères **152** est ensuite oxydé en utilisant les conditions douces TPAP/NMO et conduit à la cétone **153** avec un rendement de 89 %.

Différents essais de déprotection des groupements benzylidène et benzyles du thiophosphate **153** ont été réalisés. La présence de soufre sur la molécule ne permet pas l'utilisation de palladium et par conséquent l'utilisation des conditions d'hydrogénolyse utilisées pour les synthèses précédemment décrites. Nous avons donc testé d'autres conditions de déprotection comme Na/NH₃ dans du THF ou l'utilisation de TMS-Br. En utilisant les conditions Na/NH₃ à -78°C pendant 3h, le produit de départ se décompose en un mélange de plusieurs produits plus polaires que nous n'avons pas pu identifier par RMN. Nous avons ensuite testé les conditions de déprotection utilisant le TMSBr sur le composé **97**, intermédiaire de la synthèse du DXP (Figure 82). Ce produit a été mis en présence de 10 eq. de TMSBr dans du CH₂Cl₂ à 0°C. Après agitation pendant 3 h et work-up basique, le composé **154** est formé. Nous avons donc appliqué ce mode opératoire pour la déprotection

du composé **153**. Dans les mêmes conditions réactionnelles, le produit de départ **153** se décompose en plusieurs composés non séparables que nous n'avons pas pu identifier par RMN.

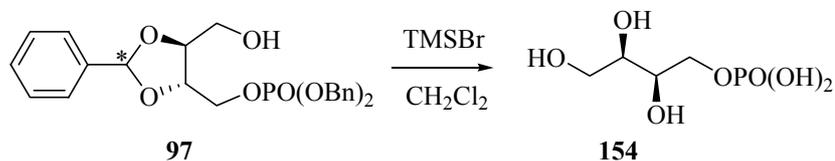


Figure 82. Déprotection avec du TMSBr

Les conditions de déprotection n'ayant pas permis d'obtenir le produit souhaité nous avons envisagé de réaliser la synthèse en utilisant d'autres groupements protecteurs. Nous avons donc choisi de remplacer le groupement benzylidène par un groupement isopropylidène et les groupements benzyles du thiophosphate par des éthyles. Cette synthèse a été réalisée en collaboration avec Antoine Yéquel, un étudiant de DEA. Le produit de départ est l'isopropylidène D-thréitol **78** commercial (Figure 83).

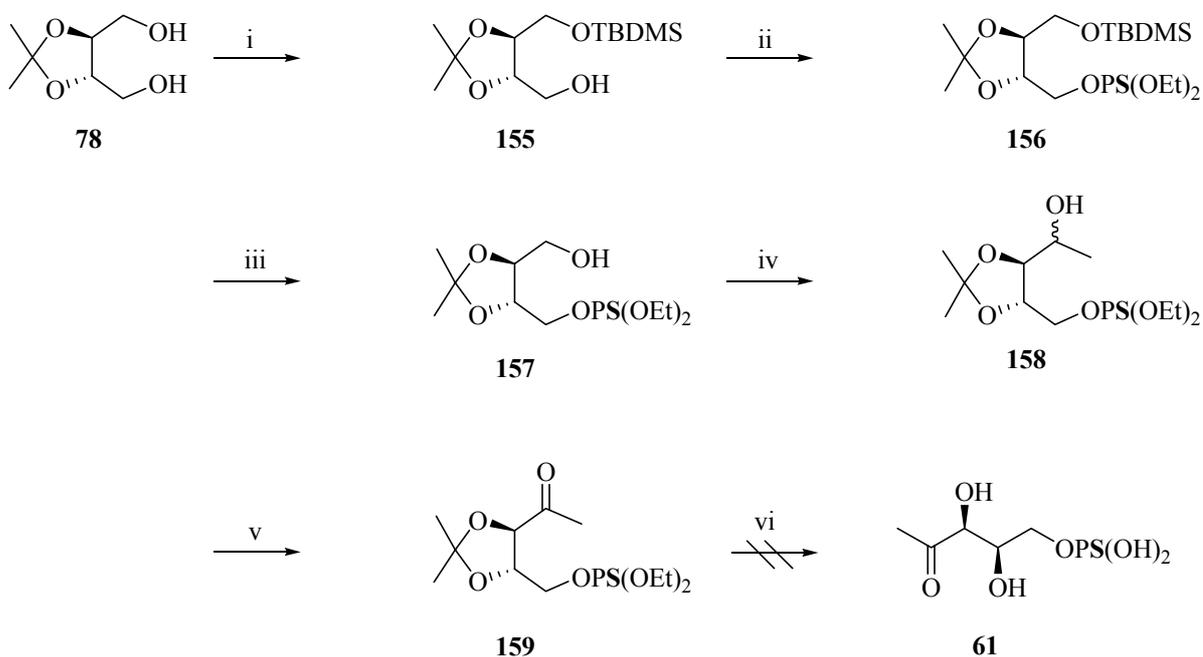


Figure 83. Tentatives de synthèse de l'analogue thiophosphate du DXP sous sa forme thione

i : TBDMSCl, NaH, DME, 96% ; ii : CIP(OEt)₂, NEt₃, DMAP, S₈, CH₂Cl₂, 82% ; iii : Bu₄NF, THF, 81% ; iv (COCl)₂, DMSO, NEt₃, MeMgCl, THF, 85% ; v : TPAP, NMO, 3 Å tamis moléculaire, CH₂Cl₂, 90% ; vi. déprotection

Après monoprotection du diol sous forme d'éther silylé, le groupement thiophosphate est introduit. Les conditions d'introduction du phosphite ont été modifiées car les composés diméthyl et diéthyl-*N,N*-diéthyl phosphoramidite ne sont pas disponibles. Le phosphite a été introduit à l'aide de diéthyle chlorophosphate en présence de triéthylamine et de 2,6-diméthyl-4-aminopyridine. L'oxydation du phosphore à l'aide de soufre conduit au composé **156** avec un rendement de 82 %. Les étapes suivantes, déprotection du groupement silylé, réaction de Swern-Ireland et oxydation à l'aide de TPAP permettent d'obtenir la cétone **159** à partir du composé **156** avec un rendement de 62 % sur 3 étapes.

Différents essais de déprotection ont été testés (Figure 84). L'utilisation d'acide chlorhydrique dans un mélange éthanol/eau (Figure 84, entrée 1) fournit un mélange de plusieurs produits que nous n'avons pas isolés et identifiés. En présence de TMS-I (Figure 84, entrées 2 à 4) dans du CH₂Cl₂³⁷ ou dans un mélange CH₂Cl₂/CH₃CN (1/1),³⁸ le produit de départ se décompose également en un mélange de plusieurs produits. Un essai avec du bromure de triméthylsilyle en présence de thiophénol, *m*-crésol, et acide trifluoroacétique à 0°C a été réalisé (Figure 84, entrée 5).³⁹ Dans ces conditions, la disparition du produit de départ et la formation d'un composé sont observées en CCM. Ce composé possède un phosphore dont le déplacement chimique est de 56 ppm, mais n'a pas pu être clairement identifié en RMN ¹H et ¹³C. Les conditions de déprotection mettant en jeu l'iodure de sodium dans la butanone⁴⁰ (Figure 84, entrée 6) n'ont pas permis de transformer le produit de départ.

| | Réactifs | Solvants | Conditions | Résultats |
|---|------------------------------|--|------------|-----------------|
| 1 | HCl | CH ₃ CN/H ₂ O | t.a., 24 h | Mélange |
| 2 | TMS-I | CH ₂ Cl ₂ | 0°C, 15 h | Mélange |
| 3 | TMS-I | CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ CN | 0°C, 3 h | Mélange |
| 4 | TMSCl, LiI | CH ₂ Cl ₂ / CH ₃ CN | t.a., 16 h | Mélange |
| 5 | TMSBr, TFA, <i>m</i> -crésol | thiophénol | 0°C, 5 h | Un produit |
| 6 | NaI | butanone | t.a., 12 h | Pas de réaction |
| 7 | Dowex 50Wx8 | MeOH/H ₂ O | 75°C, 18 h | Un produit |

Figure 84. Essais de déprotection du composé **159**

t.a. : température ambiante

L'utilisation d'une résine Dowex dans un mélange méthanol/eau à 75°C (Figure 84, entrée 7) a permis la formation du produit **160** (Figure 85) pour lequel le groupement isopropylidène est déprotégé mais le phosphate est toujours présente.

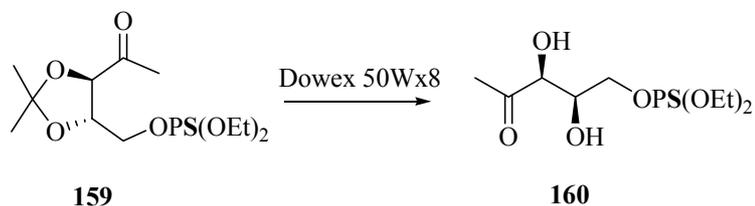


Figure 85. Essais de déprotection du composé **159**

Etant donné que certaines enzymes reconnaissent les groupements phosphates sous forme d'esters, nous avons envisagés de tester ce composé.

c. Synthèse de l'analogue thiophosphate du DXP sous sa forme thiol

Nous avons ensuite envisagé la synthèse de l'analogue thiophosphate du DXP sous sa forme thiol.

Il existe trois méthodes essentielles pour la préparation de thiols phosphorylés (Figure 86). Une méthode utilisée est la rupture d'une liaison S-S d'un disulfure à l'aide d'un phosphite.⁴¹ Cela nécessite la préparation complexe de dérivés disulfures. Les deux autres approches sont fondées sur l'introduction du thiophosphate par déplacement d'un groupe partant : soit, le nucléofuge est un iodure ou un tosylate et le nucléophile est le soufre d'un thiophosphate,⁴² soit, le groupe sortant est un halogénure (Br ou Cl) qui est en présence d'un mélange sans solvants de diéthyl phosphite, d'acétate d'ammonium, de soufre, d'alumine acide. Ainsi, ce composé est formé par une réaction en un pot en soumettant le milieu réactionnel à des irradiations microondes.⁴³

Nous avons choisi d'utiliser la méthode faisant intervenir un soufre nucléophile sur un groupe partant tosylate pour des commodités de mise en oeuvre. De plus, le thiol phosphorylé, groupement sensible, sera introduit en fin de synthèse afin d'éviter une éventuelle élimination

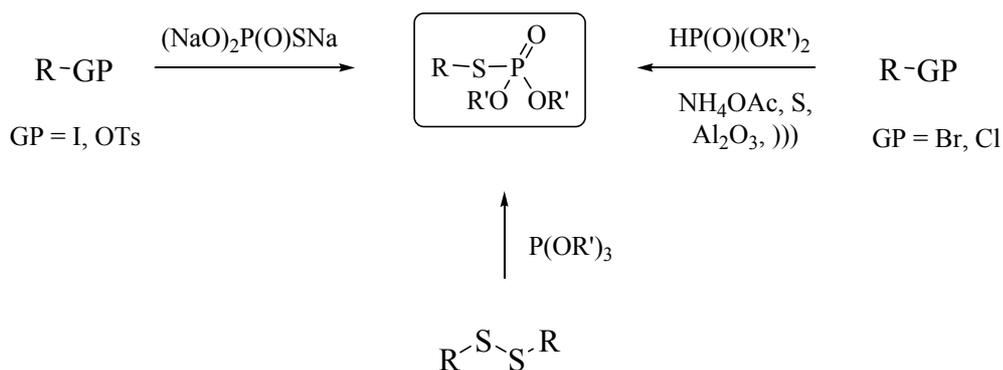


Figure 86. Méthode de formation d'un thiol phosphorylé

La première étape de la synthèse est une monoprotection du diol **94** (Figure 87) suivie d'une élongation de la chaîne carbonée réalisée par une réaction de Swern-Ireland. Après déprotection du groupement silylé, l'alcool primaire est sélectivement activé sous forme de tosylate. Ainsi, le composé **163** est obtenu à partir du composé **94** avec un rendement de 56 %. L'alcool secondaire résultant est oxydé en cétone **164** à l'aide de TPAP avec 92 % de rendement. Afin, d'introduire le thiophosphate à la dernière étape, le groupement benzylidène est déprotégé par hydrogénation catalytique avec du Pd/C. Le diol **165** ainsi obtenu est ensuite traité dans de l'eau par du Na_3PSO_3 dont le déplacement chimique en ^{31}P RMN est de 33 ppm. L'évolution de la réaction est suivie par RMN du ^{31}P . Il y a apparition d'un composé thiophosphorylé ayant un déplacement chimique de 18 ppm qui est instable puisque son signal diminue au cours du temps. De plus, ce produit est accompagné du produit départ ainsi que d'un autre produit secondaire caractérisé par un signal en RMN du ^{31}P par un déplacement chimique de 4 ppm correspondant probablement à une fonction phosphate. Ce dernier provient du déplacement du tosylate par un anion oxygéné du Na_3PSO_3 .

L'introduction du groupement thiophosphate peut être réalisée dans l'acétonitrile en utilisant comme réactif nucléophile, le $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{SK}$, dont le déplacement chimique est de 55 ppm. Après trois jours, il y a apparition de trois composés phosphorylés de déplacements chimiques de -13, 30 et 69 ppm accompagnés du produit de départ. La formation de ces composés peut être expliquée par la faible nucléophilie du réactif. En effet, des études ont montré que, dans l'eau, la charge négative est située sur le soufre alors que dans les solvants organiques elle est délocalisée sur les liaisons S-P-O, ce qui rend le soufre moins nucléophile.⁴⁴ Dans notre cas, pour des raisons de solubilité, la réaction ne peut être effectuée dans l'eau.

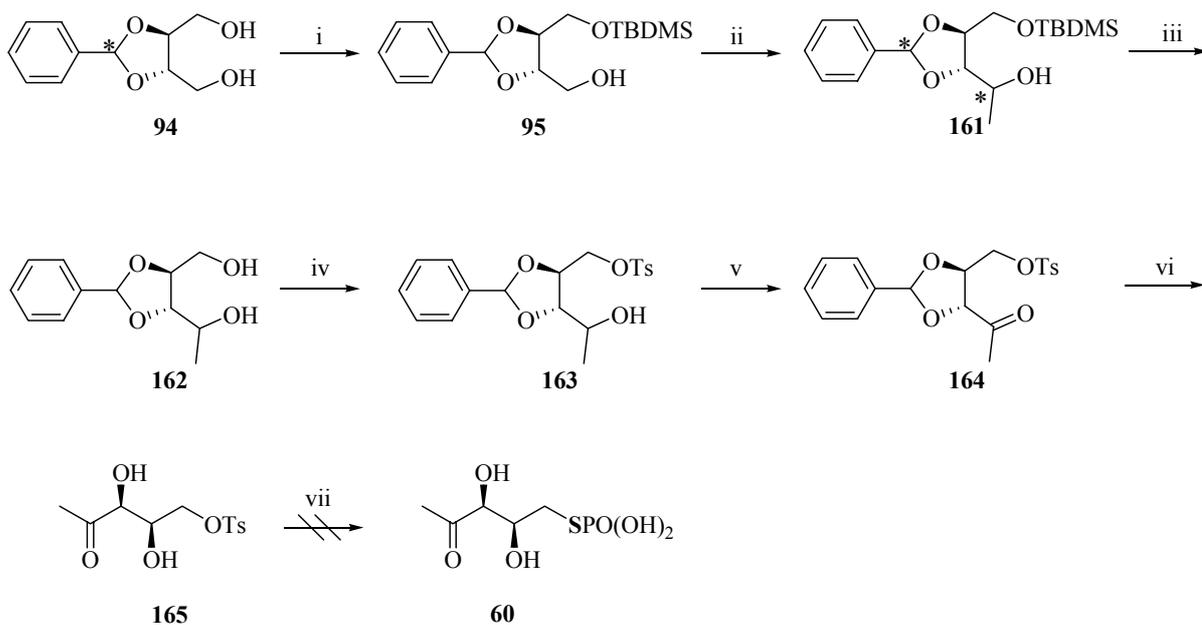


Figure 87. Tentative de synthèse de l'analogue thiophosphate du DXP sous sa forme thiol

i : TBDMSCl, NaH, DME, 96 % ; ii : (COCl)₂, DMSO, NEt₃, MeMgCl, THF, 72 % ; iii : Bu₄NF, THF, 93 % ; iv : TsCl, pyridine, 87 % ; v : TPAP, NMO, 3 Å molecular sieves, CH₂Cl₂, 92 % ; vi. H₂, Pd/C, MeOH, quant. ; vii Na₃PSO₃, H₂O ou (EtO)₂P(O)SK, CH₃CN.

Les essais d'introduction du groupement thiophosphate par déplacement d'un tosylate n'ayant pas aboutis, nous avons envisagé de préparer le composé **60** selon l'approche utilisée pour la synthèse du DXP, à savoir introduction du groupement thiophosphate dès le début de la synthèse pour des raisons d'économie. Cette synthèse a également été réalisée en collaboration avec Antoine Yéquel, un étudiant de DEA. Le produit de départ est l'isopropylidène D-thréitol **78** commercial (Figure 88).

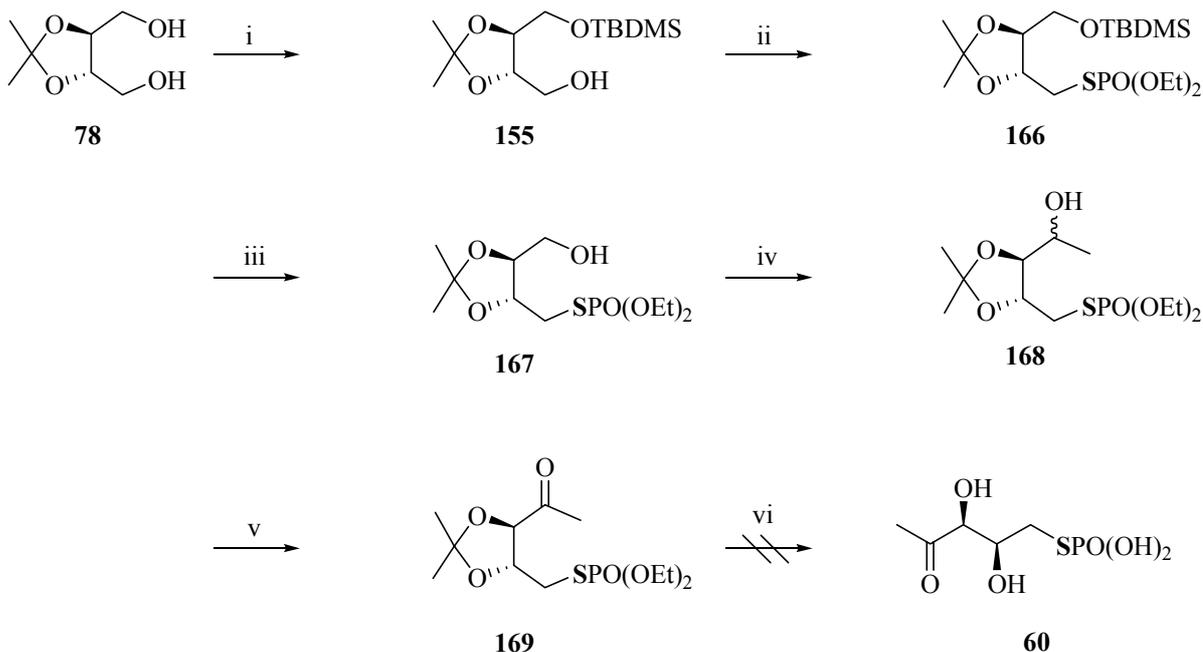


Figure 88. Synthèse de l'analogue thiophosphate du DXP sous sa forme thiol

i : TBDMSCl, NaH, DME, 96% ; ii : Tf₂O, NEt₃, KSP(O)(OEt)₂, THF, 66 % ; iii : TsOH, THF, 84% ; iv (COCl)₂, DMSO, NEt₃, MeMgCl, THF, 56 % ; v : TPAP, NMO, 3 Å tamis moléculaire, CH₂Cl₂, 76 % ; vi. déprotection

Après formation du composé **155**, l'alcool primaire est activé sous forme de triflate afin d'introduire le groupement thiophosphate. En effet, une activation sous forme de tosylate ne permet pas d'obtenir le composé souhaité. Le triflate, meilleur nucléofuge, est formé à l'aide d'anhydride triflique et de triéthylamine. Ce composé étant très instable, le réactif nucléophile est ajouté *in situ* dès que le groupe partant est mis en place. Cela permet l'obtention du composé **166** avec un rendement de 66 %. Après déprotection du groupement silylé, réaction de Swern-Ireland et oxydation à l'aide de TPAP le composé **169** est formé avec 36 % de rendement à partir du dérivé **166**. L'utilisation d'une résine Dowex dans un mélange méthanol/eau pour éliminer les groupements protecteurs n'a pas permis d'obtenir le composé souhaité. Il reste à tester d'autres conditions de déprotection.

La préparation des analogues thiophosphates désiré du DXP n'a pas été possible. En effet, la déprotection des groupements protecteurs n'a pas été possible. Cette étape devrait être améliorée en testant d'autres conditions réactionnelles.

II. Synthèse d'analogues du DXP par modification de la fonction méthyle

II.1 Introduction

Nous avons choisi de remplacer le groupement méthyle par un groupement trifluorométhyle. Les propriétés physiques, chimiques et biologiques des composés contenant un ou plusieurs atomes de fluor sont modifiées. Par exemple, un composé devient lipophile ce qui lui permet de traverser les membranes. De nombreux inhibiteurs d'enzymes sont connus contenant un groupement trifluorométhyle et plus particulièrement lorsque ce groupement est situé en α d'une cétone.⁴⁵

De plus, les sucres fluorés connaissent un intérêt particulier parce que tout en gardant une géométrie, distribution de charges et fonction similaires à celles des sucres naturels, ils empêchent les interactions avec les acides nucléiques et les protéines.⁴⁶ Ceci en font des outils moléculaires utiles pour identifier les interactions clés entre les récepteurs et les ligands de type sucre. Dans ce contexte, Bouvet et O'Hagan ont proposé les composés **170** et **171** (Figure 89) comme inhibiteurs potentiels d'enzymes impliquées dans le métabolisme du 1-désoxy-D-xylulose **65** et de son analogue 5-phosphate **27**.⁴⁷ Un autre groupe a également proposé un synthèse du composé **171**.⁴⁸

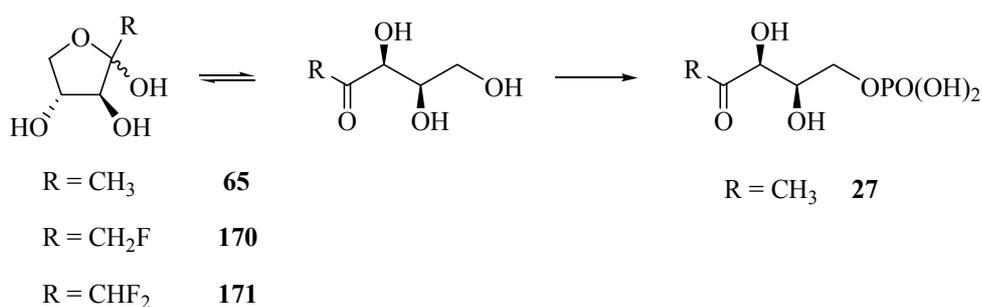


Figure 89. Synthèse d'analogues fluorés du DX

L'activité antibiotique des composés **170** et **171** contre *E. coli* et *S. aureus* a été testée.⁴⁴ Les composés n'ont cependant pas présenté de propriétés antibactériennes. Il faut noter que le DX **65** existe en solution aqueuse majoritairement sous sa forme cétonique ouverte. Les composés fluorés **170** et **171** existent eux sous forme d'hémicétal cyclique. La présence des atomes de fluor dans ces composés doit défavoriser l'ouverture du cycle

nécessaire à l'activation des composés par phosphorylation pour donner *in vivo* les analogues correspondant du DXP.

Il devrait donc être préférable de synthétiser des analogues fluorés du DXP plutôt que du DX. En effet, trois analogues mono-fluorés du DXP ont été synthétisés (Figure 90) et testés sur une DXR d'*E. coli*.⁴⁹ Les résultats ont montré que l'analogue **172** se comporte comme un faible substrat et que les deux autres analogues agissent comme des inhibiteurs non compétitifs du DXP avec des constantes d'inhibition de 444 μM pour le composé **42** et de 733 μM pour **43**.

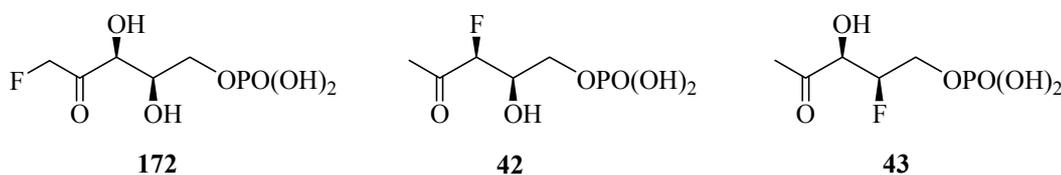


Figure 90. Synthèse d'analogues mono-fluorés du DXP

Nous avons choisi de synthétiser des analogues trifluorés **62** et **63** du DXP (Figure 91) qui pourront être testés sur des enzymes purifiées et des systèmes acellulaires. Ainsi, les problèmes de phosphorylation *in vivo* seront évités et la présence d'un atome de fluor supplémentaire pourrait conférer des propriétés inhibitrices aux composés.

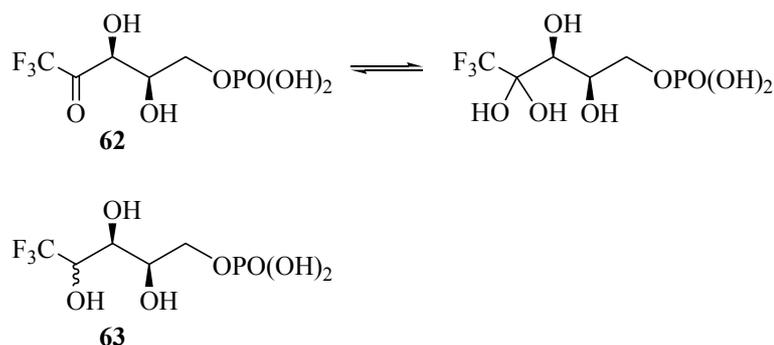


Figure 91. Analogues trifluorés du DXP

En effet, dans la voie du MEP, trois enzymes peuvent être plus particulièrement inhibées par ces composés. Tout d'abord, l'étape catalysée par la DXR (Introduction générale, Figure 15), dont le composé **62** est un analogue de son substrat naturel, devrait être bloquée. En effet, en solution aqueuse, le composé **62** existe essentiellement sous sa forme hydratée.

Ainsi, le réarrangement devrait être inhibé. L'étape catalysée par GcpE (Introduction générale, Figure 20) passerait par un carbocation et un radical cation. De tels intermédiaires sont déstabilisés par la présence d'atomes de fluor en position α . Par conséquent, si le composé **62** ne bloque par la DXR et est transformé en analogue d'intermédiaires de la voie du MEP, la présence d'un groupement trifluorométhyle pourrait empêcher la réaction catalysée par GcpE. De même, l'étape catalysée par LytB devrait être bloquée puisque la réaction passe par un intermédiaire anionique qui serait alors stabilisé par la présence d'atomes de fluor et rendrait la formation d'IPP et de DMAPP impossible.

II.2 Synthèse des analogues 1,1,1 trifluorés du DXP

L'introduction d'un groupement trifluorométhyle pourrait être réalisée par l'utilisation du réactif de Ruppert ou TMS-CF₃ sur un aldéhyde (Figure 92).⁵⁰

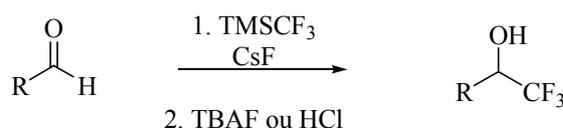


Figure 92. Réaction du réactif de Ruppert sur un aldéhyde

Le composé souhaité **62** peut être obtenu à partir de l'aldéhyde **172** par réaction du réactif de Ruppert puis oxydation de l'alcool ainsi formé et déprotection des groupements protecteurs (Figure 93). Cet aldéhyde pourrait être préparé à partir du composé **97** contenant une fonction hydroxyle et une fonction phosphate. Ce composé a été préalablement préparé pour la synthèse du DXP.

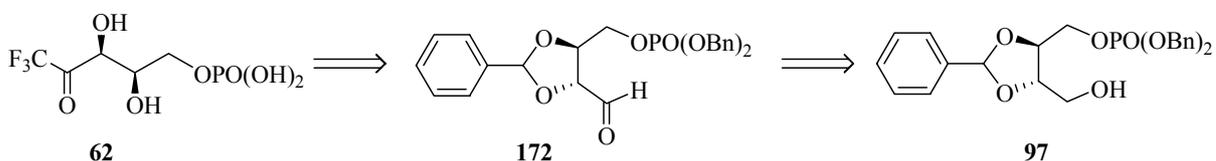
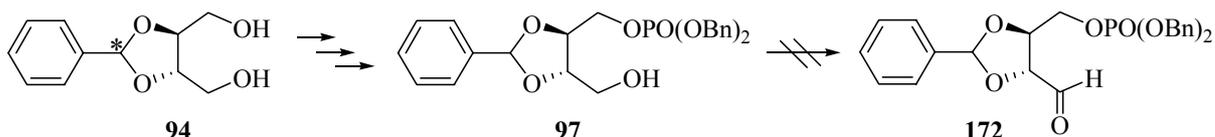


Figure 93. Rétrosynthèse de l'analogue fluoré du DXP

La synthèse de l'aldéhyde **172** (Figure 94) a été effectuée à partir du dérivé du thréitol **94**. Le composé **97** est obtenu en trois étapes (monoprotection, phosphorylation, déprotection) selon les conditions décrites pour la préparation du DXP (Chapitre 1, Figure 54). Différentes méthodes d'oxydation ont ensuite été testées afin d'obtenir l'aldéhyde **172** (Figure 94). Quelle

que soit la méthode utilisée, l'aldéhyde a été obtenu accompagné d'un produit secondaire non identifié. De plus, la réaction est difficile à optimiser, car, comme le produit de départ et l'aldéhyde ont le même Rf, il est difficile de déterminer quand la réaction est terminée. L'aldéhyde formé est également instable et se décompose très rapidement, ce qui complique l'amélioration des conditions réactionnelles. Aucune méthode n'a permis d'isoler le produit pur avec un rendement convenable.



| | Méthodes d'oxydation | Solvants | Conditions |
|---|--|---|--------------------|
| 1 | (COCl) ₂ , DMSO, NEt ₃ ⁵¹ | THF | - 78 → - 35°C, 1 h |
| 2 | TPAP, NMO ⁵² | CH ₂ Cl ₂ | t.a., 3 h |
| 3 | TBACl, TEMPO, NCS ⁵³ | H ₂ O(NaHCO ₃ /K ₂ CO ₃), CH ₂ Cl ₂ | t.a., 2 h |
| 4 | PCC, AcONa ⁵⁴ | CH ₂ Cl ₂ | t.a., 5 h |

Figure 94. Tentatives de synthèse de l'aldéhyde **172**

t.a. : température ambiante

Dans la littérature, l'aldéhyde **72** a été synthétisé et est utilisé pour préparer du DXP (Chapitre 1, Figure 47).⁵⁵ Nous avons donc envisagé la synthèse de l'analogue fluoré du DXP **62** en nous inspirant de la synthèse décrite pour le DXP et en envisageant l'introduction du fluor comme ce qui a été précédemment décrit (Figure 95).

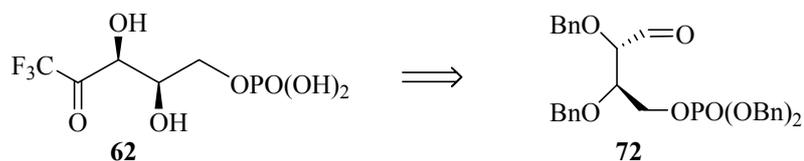


Figure 95. Rétrosynthèse de l'analogue fluoré du DXP

La synthèse utilise le dérivé du tartrate **173** comme produit de départ (Figure 96). L'introduction du phosphate décrite par Taylor met en jeu chlorophosphate de dibenzyle en

présence de pyridine et conduit à un mélange du produit de départ et de produits mono- et bis-phosphorylés. Dans ces conditions le composé monophosphorylé est obtenu avec un rendement moyen (40%). Afin d'améliorer ce rendement, nous avons décidé d'appliquer la méthodologie décrite pour la synthèse du DXP, c'est-à-dire la monoprotection du diol suivie d'une phosphorylation et d'une déprotection.

La protection des deux fonctions hydroxyles du tartrate **173** par des groupements benzyles est réalisée avec un rendement de 95 % en utilisant de l'hydruide de sodium et du bromure de benzyle. La réduction des fonctions esters en présence de LiAlH_4 conduit au composé **70** avec un rendement de 96 %.

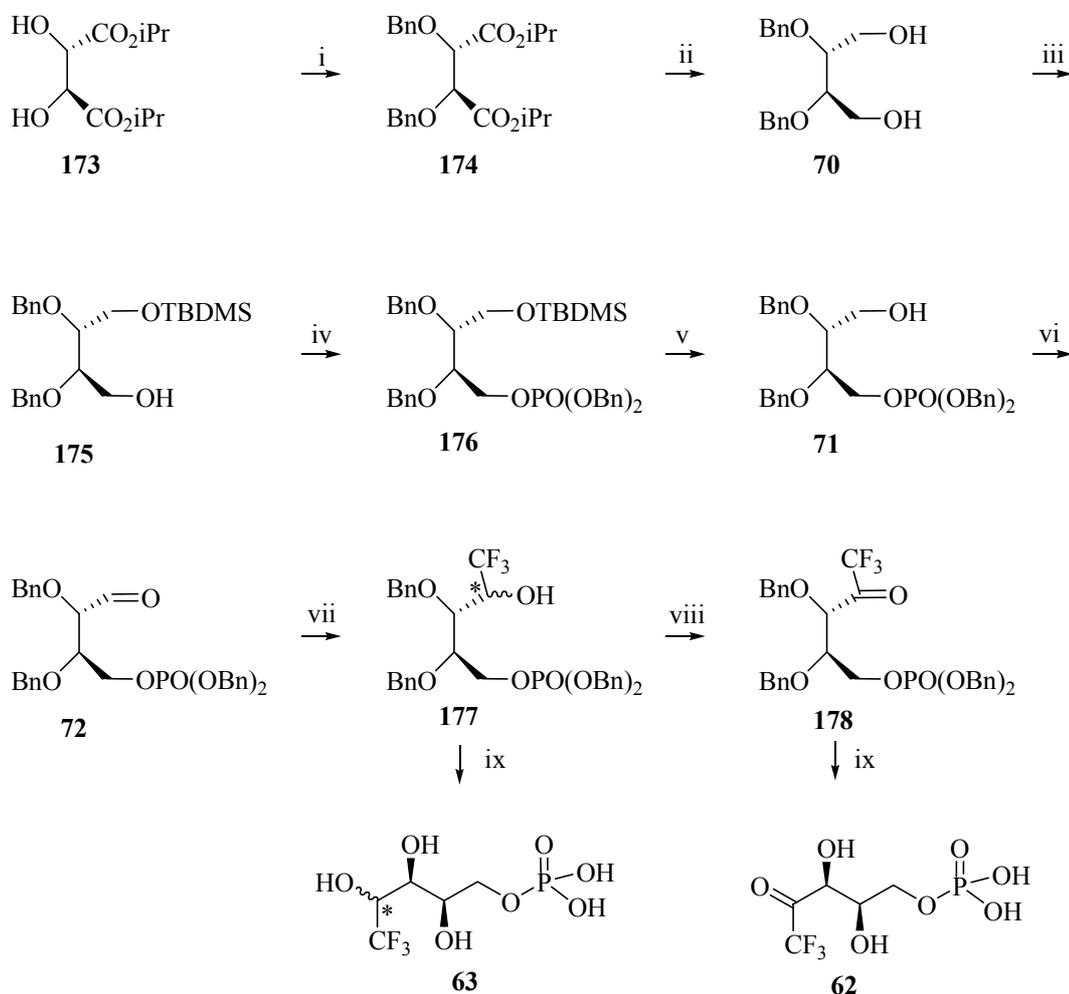


Figure 96. Synthèse des analogues fluorés **57** et **58** du DXP

i : NaH, BnBr, THF, 95 % ; ii : LiAlH_4 , THF, 96 % ; iii : TBDMSCl, NaH, THF, 87 % ; iv : $(\text{BnO})_2\text{P-NEt}_2$, tétrazole, *m*CPBA, CH_2Cl_2 , 85 % ; v : Bu_4NF , THF, 87 % ; vi : PCC, CH_2Cl_2 , 3 Å tamis moléculaire, 82 % ; vii : TMS-CF₃, CsF, TBAF, THF, 72 % ; viii : DMPI, CH_2Cl_2 , 54 % ; ix : H_2 , 10 % Pd/C, MeOH/ H_2O (9:1), quant.

Le diol ainsi obtenu est monoprotégé par un groupement silylé avec 87 % de rendement, et l'alcool primaire résultant est phosphorylé en présence de dibenzyl-*N,N*-diéthyl phosphoramidite, de tétrazole et de *m*CPBA.⁵⁶ Dans ces conditions, le phosphate **176** est obtenu avec un rendement de 85 %, et le groupement protecteur est éliminé à l'aide de TBAF pour conduire à l'alcool primaire **71** avec 87 % de rendement. L'aldéhyde **72** est finalement préparé par oxydation avec le PCC avec un rendement de 82 %.

L'étape clé de la synthèse est l'introduction du groupement trifluorométhyle qui est réalisée à l'aide du réactif de Ruppert. L'aldéhyde **72** est mis en présence de ce réactif et de fluorure de césium.⁵⁷ Lorsque le produit de départ est totalement consommé, l'addition de TBAF permet de former l'alcool secondaire **177** avec un rendement de 72 %. Ce composé peut subir deux transformations : une élimination des groupements protecteurs permet de donner l'analogue fluoré **63** du DXP et l'oxydation de l'alcool suivie d'une déprotection permet d'obtenir l'analogue **62** du DXP. L'hydrogénation catalytique en présence de Pd/C de l'alcool **177** conduit au composé **63** quantitativement sous forme de deux diastéréomères. Différents essais d'oxydation de l'alcool **177** ont été réalisés. L'utilisation de PCC conduit à un mélange de produit de départ et du composé souhaité. L'oxydation en présence de TPAP et de NMO fournit la cétone α -trifluorométhylée **178** avec un mauvais rendement de 28 %. Finalement, le meilleur rendement est obtenu à l'aide du réactif de Dess-Martin⁵⁸ qui conduit au composé **178** avec un rendement de 54 %. Cette étape ne permettant pas d'obtenir le composé souhaité avec un rendement convenable, nous avons envisagé de faire réagir le réactif de Ruppert sur un ester afin d'éviter l'étape d'oxydation (Figure 97).⁵⁹

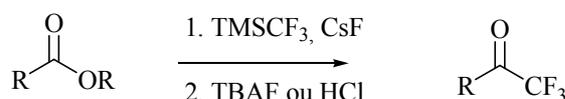


Figure 97. Réaction du réactif de Ruppert sur un ester

La synthèse du dérivé **62** peut alors être envisagée à partir d'un diester dérivé du tartrate (Figure 98). Une réduction sélective de ce diester suivie de l'introduction d'un groupement phosphate permettrait d'obtenir un intermédiaire contenant une fonction ester. Celle-ci pourrait être transformé en cétone α -trifluorométhylée à l'aide du réactif de Ruppert. Une déprotection finale conduirait à l'analogue du DXP souhaité.

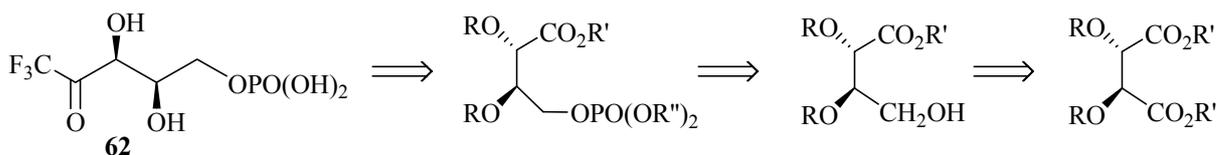


Figure 98. Rétrosynthèse de l'analogue fluoré **57** du DXP

Les deux étapes clé de cette synthèse sont la monoréduction du diester afin de pouvoir introduire le groupement phosphate et l'introduction du groupement trifluorométhyle.

Nous avons choisi d'utiliser des benzyles comme groupement protecteur du diol. Ainsi, les premières étapes de la synthèse sont celles utilisées précédemment (Figure 95). Pour préparer l'alcool **179**, nous avons dans un premier temps essayé de réduire sélectivement le diester **174** à l'aide de NaBH_4 (Figure 99).⁴⁶ Ce réactif ne nous a pas permis d'obtenir l'alcool **179** avec un rendement convenable (19 %). Dans un second temps, nous avons alors envisagé d'hydrolyser sélectivement une des deux fonctions esters puis de réduire sélectivement l'acide carboxylique **180** ainsi formé.

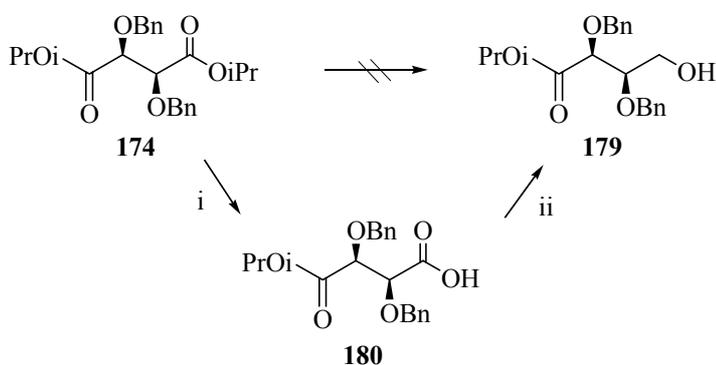
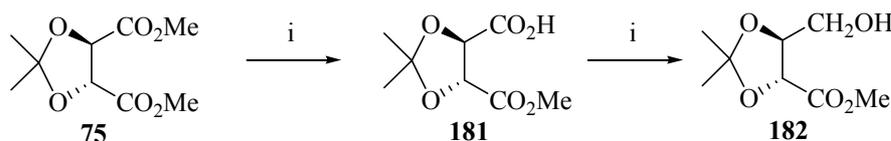


Figure 99. Synthèse de l'alcool **167**

i : PLE, pH 8, NaOH, 65 % ; ii : BH_3 -THF, 48 %.

Une méthode pour transformer sélectivement un diester en acide carboxylique est l'hydrolyse enzymatique par une estérase.⁶⁰ L'utilisation de PLE (Pig Liver Estérase) dans un tampon phosphate en maintenant le pH du milieu à 8 par addition d'une solution de soude permet d'effectuer cette réaction avec de bons rendements.⁶¹ Cependant, la réaction du composé **174** dans ces conditions ne fournit l'acide **180** qu'avec un rendement de 65 %. Ce rendement moyen est expliqué par l'insolubilité du diester **174** dans le tampon phosphate. Il faut noter que l'ajout d'acétone ou d'acétonitrile,⁶² n'a pas permis d'améliorer le rendement de la réaction. L'acide ainsi formé a ensuite été sélectivement réduit à l'aide du complexe

borane-THF et conduit à l'alcool **179** avec un rendement de 48 %.⁶³ Les rendements moyens obtenus pour ces deux étapes nous ont amenés à choisir un autre produit de départ. En effet, il est connu que le dérivé commercial du tartrate **75** (Figure 100) peut être hydrolysé en acide **181** avec un rendement convenable (81 %).⁶⁴ Nous avons donc effectué cette réaction à l'aide de PLE et l'acide **181** a été obtenu avec un rendement de 86 %. Différentes conditions réactionnelles ont ensuite été envisagées afin de préparer l'alcool **182** (Figure 100). L'utilisation de complexes borane comme BH₃-THF⁶² (Figure 100, entrée 1) ou BH₃-Me₂S⁶⁵ (Figure 100, entrée 2) permet d'obtenir le composé souhaité avec un rendement maximum de 25 %. En modifiant l'acide en anhydride mixte et en le réduisant par du NaBH₄ (Figure 100, entrée 3),⁶⁶ l'alcool **182** est obtenu avec 31 % de rendement. Par contre, le passage par un chlorure d'acide (Figure 100, entrée 4)⁶⁷ ne permet pas d'obtenir le composé désiré. Ainsi, quelles que soient les conditions utilisées, l'alcool **182** n'a pas été obtenu avec un rendement convenable.



| | ii | Solvant | Conditions | Rdt (%) |
|----------|---|---------|------------|---------|
| 1 | BH ₃ -THF | THF | 0°C, 4 h | 25 |
| 2 | BH ₃ -Me ₂ S | THF | 0°C, 4 h | 12 |
| 3 | ClCO ₂ Et, NaBH ₄ | THF | 0°C, 2 h | 31 |
| 4 | SOCl ₂ , NaBH ₄ | THF | 0°C, 6 h | 0 |

Figure 100. Synthèse de l'alcool **182** : i : PLE, pH 8, NaOH, 86 %.

Nous avons donc envisagée une autre synthèse du composé **62** à partir du dérivé commercial du tartrate **100** (Figure 101). La synthèse débute par une monoréduction du diester à l'aide de NaBH₄ en présence de méthanol à 0°C (Chapitre 1, Figure 56).⁴⁴ Cette réaction n'est pas totale, mais le produit de départ est recyclé. Ainsi, avec une conversion de 55 %, l'alcool est obtenu avec un rendement de 88 %. Le groupement phosphate est ensuite introduit en utilisant le dibenzyl-*N,N*-diéthyl phosphoramidite, le tétrazole et le *m*CPBA. Ces conditions fournissent l'ester **183** avec 81 % de rendement. L'introduction du groupement

fluoré est ensuite réalisée en appliquant la méthode précédemment décrite. Ainsi l'utilisation du réactif de Ruppert conduit à la cétone α trifluorométhylée avec un rendement de 70 %.

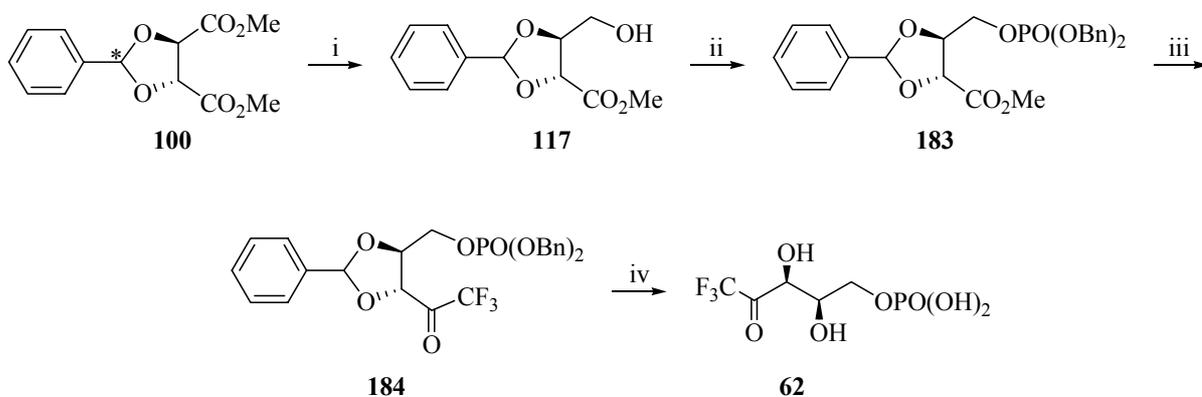


Figure 101. Synthèse de l'analogue fluoré du DXP

i : NaBH₄, MeOH, C = 55 %, 88 % ; ii : (BnO)₂P-NEt₂, Tétrazole, *m*CPBA, CH₂Cl₂, 81 % ; iii : TMS-CF₃, CsF, TBAF, THF, 70 % ; iv : H₂, 10% Pd/C, MeOH/H₂O (9:1), quant.

La dernière étape de la synthèse est la déprotection des groupements benzyldène et benzyles par hydrogénation en présence de Pd/C. L'analogue fluoré **62** est obtenu énantiomériquement pur quantitativement à partir du dérivé **184**.

Nous avons synthétisé deux analogues fluorés du DXP énantiomériquement pur. L'analogue 1,1,1-trifluoré du DXP **62** est obtenu, sans épimérisation, soit en 9 étapes avec un rendement global de 19 % à partir d'un dérivé du tartrate (Figure 96), soit en quatre étapes avec un rendement global de 50 % à partir d'un dérivé du thréitol (Figure 101). Le composé pour lequel le carbonyle est réduit (**63**) est obtenu en huit étapes avec un rendement global de 35 % (Figure 96).

Conclusion

Nous avons réalisé les synthèses de différents analogues du DXP. Nous avons tout d'abord préparé l'analogue phosphonate du DXP⁶⁸ **58** ainsi que ce même composé ayant la fonction carbonyle réduite **59** (Figure 102). Ces deux composés ont été préparés énantiomériquement purs en sept et six étapes avec des rendements globaux de 43 et 54 % respectivement. Nous avons ensuite synthétisé deux analogues fluorés à savoir le 1,1,1 trifluoro-DXP **62** ainsi que sa forme réduite **63** (Figure 102). Ces composés ont été également préparés énantiomériquement purs en 4 et 8 étapes avec des rendements globaux de 50 et 35 % respectivement. Ces quatre analogues ont été obtenus après hydrogénation avec un grand degré de pureté. Ainsi, aucune purification n'est nécessaire et ces composés ont été utilisés tels quels pour les tests enzymatiques utilisant la DXR. En effet, ces composés seront testés sur cette enzyme afin de déterminer s'ils se comportent comme substrats ou inhibiteurs.

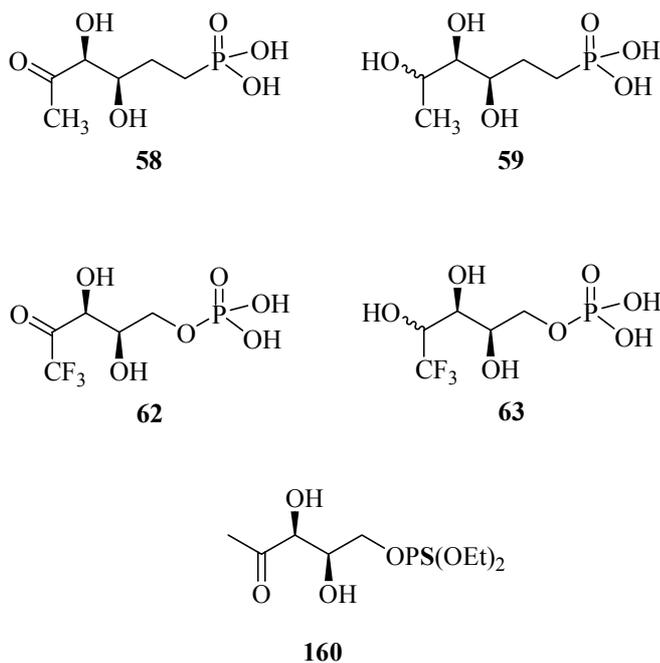


Figure 102. Analogues du DXP synthétisés

D'autre part en ce qui concerne les analogues thiophosphates du DXP, il reste à trouver une méthode adéquate pour déprotéger les composés **153**, **159** et **169** (Figure 103). Cependant, nous avons tout de même envisagé de tester le composé pour lequel le groupement phosphate est toujours protégé (composé **160**, Figure 102).

Une dernière partie consiste en la préparation des analogues du DXP sous forme phosphonate/hydroxamate. Dans ce but, il reste à terminer les synthèses des composés **60** et **61** (Figure 103) et à tester les composés synthétisés.

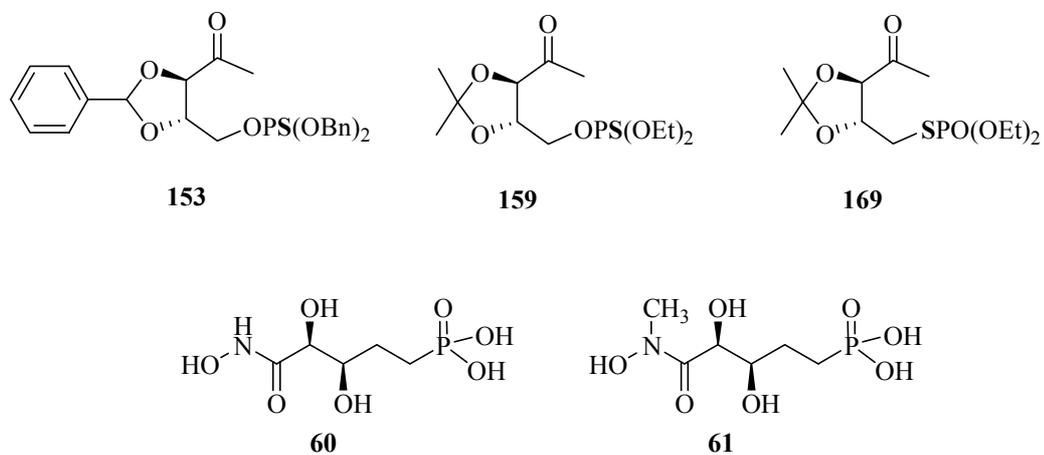


Figure 103. Synthèses à finir

- ¹ Hilderbrand R. L. et Henderson T. O., in *The Role of Phosphonates in Living Systems*, ed. Hilderbrand R. L., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1983, pp. 5-29.
- ² a. Kuzuyama T., Shimizu T., Takahashi S., Seto H., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 7913-7916. b. Zeidler J., Schwender J., Müller C., Wiesner J., Weidemeyer C., Beck E., Jomaa H., Lichtenthaler H. K., *Z. Naturforsch.*, **1998**, *53c*, 980-986. c. Fellermeier M., Kis K., Sagner S., Maier U., Bacher A., Zenk M., *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 2743-2746. d. Reichenberg A., Wiesner J., Weidemeyer C., Dreiseidler E., Sanderbrand S., Altincicek B., Beck E., Schlitzer M., Jomaa H., *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **2001**, *11*, 833-835. e. Steinbacher S., Kaiser J., Eisenreich W., Huber R., Bacher A., Rohdich F., *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 18401-18407.
- ³ Blackburn G. M., Kent D.E., Kolkman F., *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **1984**, 1149.
- ⁴ Chambers R.D., Jaouhari R., O'Hagan D., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 1169-1170.
- ⁵ O'Hagan D., Rzepa H. S., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1997**, 645-652.
- ⁶ Howard J. A. K., Hoy V. J., O'Hagan D., Smith G.T., *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 12613-12622.
- ⁷ Ireland R., Norbeck D. W., *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 2198-2000.
- ⁸ Griffith W. P., Ley S. V., *Aldrichim. Acta*, **1990**, *23*, 13-19.
- ⁹ Lal G. S., *J. Org. Chem.*, **1993**, *57*, 4676-4683. Lal G. S., Pez G. P., Syvret, R. G., *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 1737-1755.
- ¹⁰ Ladame S., Willson M., Périé J., *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 2640-2648.
- ¹¹ Davis F. A., Han W., Murphy C. K., *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 4730-4737.
- ¹² Differding E., Ofner H., *Synlett*, **1991**, *32*, 187.
- ¹³ Singh S., DesMarteau D. D., Zuberi S. S., Witz M., Huang H. N., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7194-7196.
- ¹⁴ Xu Y., Qian L., Prestwich G. D., *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 2267-2270.
- ¹⁵ Berkowitz D. B., Bose M., Asher N. G., *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 2009-2012.
- ¹⁶ Nieschalk J., Batsanov A. S., O'Hagan D., Howard J. A. K., *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 165-176.

- ¹⁷ Berkowitz D. B., Eggen M., Shen Q., Shoemaker R. K., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4666-4675.
- ¹⁸ Martin S. F., Dean D. W., Wagman A. S. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1839-1842.
- ¹⁹ Obayashi M., Kondo K., *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 2327-2328.
- ²⁰ Yang Z.-Y., Burton D. J., *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4676-4683.
- ²¹ Berkowitz D. B., Eggen M., Shen Q., Sloss D. G., *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6174-6176.
- ²² Berkowitz D. B., Bose M., Pfannenstiel T. J., Doukov T., *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4498-4508.
- ²³ Burton D. J., Sprague L. G., *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 613-617.
- ²⁴ a. Bal B. S., Childers W. E., Pinnick H. W., *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2091-2096. b. Nicolaou K.C., Yue E. W., La Greca S., Nadin A., Yang Z., Leresche J. E., Tsuru T., Naniwa Y., De Riccardis F., *Chem. Eur. J.* **1995**, *1*, 467-494.
- ²⁵ Zhang B., Cui Z., Sun L., *Org. Lett.* **2001**, *3*, 275-278.
- ²⁶ Roelen H. C. P. F., Kaner P. C. J., van den Elst H., van der Marel G. A., van Boom J. H., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1991**, *110*, 325-331.
- ²⁷ Phan R. M., Poulter C. D., *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6705-6710.
- ²⁸ Wallach O., *Liebigs Ann. Chem.* **1887**, *239*, 1-54.
- ²⁹ a. Piettre S. R., Raboisson P., *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2229-2232. b. Piettre S., *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4707-4710.
- ³⁰ Cava M. P., Levinson M. I., *Tetrahedron* **1985**, *41*, 5061-5087.
- ³¹ Rao M. V., Reese C. B., Zhengyun Z., *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4839-4842.
- ³² Stec W. J., Zon G., Egan W., Stec B., *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6077-6079.
- ³³ Zhang Z., Han Y., Tang J. X., Tang J.-Y., *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4347-4349.
- ³⁴ Iyer R. P., Egan W., Regan J. B., Beaucage S. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1253-1254.
- ³⁵ Kamer P. C. J., Roelen H. C. P. F., van der Elst H., van der Marel G. A., van Boom J. H., *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6757-6760.

- ³⁶ Vu H., Hirschbein B. L., *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 3005-3008.
- ³⁷ Zhu Q., Huang X., Chen G. Y. J., Yao S. Q., *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 2669-2672.
- ³⁸ Cox R. J., Gibson J. S., Martin M. B. M., *ChemBioChem* **2002**, 3, 874-886.
- ³⁹ De Bont D. B. A., Moree W. J., Van Boom J. H., Liskamp R. M. J., *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 1309-1317.
- ⁴⁰ Kaur K., Adediran S. A., Lan M. J. K., Pratt R. F., *Biochemistry* **2003**, 42, 1529-1536.
- ⁴¹ Bushnev A. S., Shvets V. I., Hendrickson H. S., *Chem. Phys. Lip.* **1996**, 82, 85-88.
- ⁴² Shuman D. A., Miller J. P., Scholten M. B., Simon L. N., Robins R. K., *Biochemistry* **1973**, 12, 2781-2786
- ⁴³ Kaboudin B., *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 8713-8714.
- ⁴⁴ Baraniak J., Frey P. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4059-4060.
- ⁴⁵ Gelb M. H., Svaren J. P., Abeles R. H., *Biochemistry* **1985**, 24, 1813-1917.
- ⁴⁶ Dax K., Albert M., Ortner J., Paul B. J., *Carbohydr. Res.* **2000**, 327, 47.
- ⁴⁷ Bouvet D., O'Hagan D., *Tetrahedron*, **1999**, 55, 10481-10486.
- ⁴⁸ Cox L. R., DeBoos G. A., Fullbrook J. J., Percy J. M., Spencer N. S., Tolley M., *Org. Lett.* **2003**, 5, 337-339.
- ⁴⁹ Wong A., Munos J. W., Devasthali V., Johnson K. A., Liu H-W., *Org. Lett.* **2004**, 6, 3625-3628.
- ⁵⁰ a. Prakash G. K. S., Yudin A. K., *Chem. Rev.* **1997**, 97, 757-786. b. Singh R. P., Shreeve J. M., *Tetrahedron* **2000**, 56, 7613-7633.
- ⁵¹ Mancuso A. J., Brownfain D. S., Swern D., *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 4148-4150.
- ⁵² Griffith W. P., Ley S. V., *Aldrichim. Acta*, **1990**, 23, 13-19.
- ⁵³ Einhorn J., Einhorn C., Ratajczak F., Pierre J-L., *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7452-7454.
- ⁵⁴ Corey E. J., Suggs J. W., *Tetrahedron Lett.* **1975**, 31, 2647-2650.
- ⁵⁵ Taylor S. V., Vu L. D., Begley T. P., Schörken U., Sprenger G. A., Bringer-Meyer S., Sahn H., *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2375-2377.

- ⁵⁶ de Viguerie N.L., Willson M., Périé J., *New J. Chem.* **1994**, *18*, 1183-1195.
- ⁵⁷ Walter M. W., Adlington R. M., Baldwin J. E., Chuhan J., Schofield C. J., *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7761-7764.
- ⁵⁸ Dess D.B., Martin J.C., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7277-7287.
- ⁵⁹ a. Wiedemann J., Heiner T., Mloston G., Prakash G. K. S., Olah G. A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 820-821. b. Singh R. P., Cao G., Kirchmeier R. L., Shreeve J. M., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2873-2876.
- ⁶⁰ a. Chen C-S., Sih C. J., *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 711-724. b. Boland W., Fröbl C., Lorenz M., *Synthesis* **1992**, *22*, 895-910.
- ⁶¹ a. Sabbioni G., Shea M.L., Jones J.B., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 236-238. b. Zemlicka J., Craine L.E., Heeg M. J., Oliver J. P., *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 937-942. c. Hill J. M., Hutchinson E. J., Le Grand D. M., Roberts S. M., Thorpe A. J., Turner N. J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1994**, 1483-1487.
- ⁶² Carrea G., Riva S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2226-2254.
- ⁶³ Yoon N. M., Pak C. S., Brown H. C., Krishnamurthy S., Stocky T. P., *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2786 – 2792.
- ⁶⁴ Piel J., Boland W., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6387-6390.
- ⁶⁵ Tashiro T., Mori K., *Eur. J. Org. Chem* **1999**, 2167-2173.
- ⁶⁶ a. Weitz I. S., Pellegrini M. Mierke D. F., Chorev M. *J. Org. Chem* **1997**, *62*, 2527-2534. b. Monache G. D., Misiti D., Salvatore P., Zappia G., *Tetrahedron Asymm.* **2000**, *11*, 1137-1149.
- ⁶⁷ Ornstein P. L., Schaus J. M., Chambers J. W., Huser D. L., Leander J. D., Wong D. T., Paschal J. W., Jones N. D., Deeter J B., *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 827-833.
- ⁶⁸ Meyer O., Grosdemange-Billiard C., Tritsch D., Rohmer M., *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 4367-4372.

chapitre 3.

synthèse d'analogues du DXP par synthèse
asymétrique.

Introduction

La synthèse d'analogues du DXP peut également être envisagée en utilisant la synthèse asymétrique enzymatique. En effet, le DXP **27** possède un diol vicinal en α d'un carbonyle et, cet enchaînement pourrait être obtenu par une réaction d'aldolisation entre un aldéhyde et une α hydroxycétone (Figure 104).

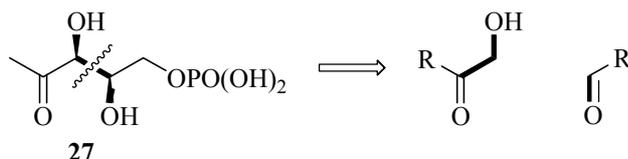


Figure 104. Rétrosynthèse possible pour former le DXP

Une des méthodes pour former des liaisons C-C stéréospécifiques est la condensation aldolique catalysée par des enzymes comme par exemple les aldolases.¹ Il existe plus d'une vingtaine d'aldolases catalysant la condensation stéréospécifique d'un aldéhyde avec un donneur de type cétonique, la DHAP.

Parmi les aldolases connues, les plus utilisées sont la D-fructose 1,6-biphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) ou FruA,² la D-tagatose 1,6-biphosphate aldolase (EC 4.1.2.-) ou TagA, la L-fucose 1-phosphate aldolase (EC 4.1.2.17) ou FucA³ et la L-rhamnulose 1-phosphate aldolase (EC 4.1.2.19) ou RhuA.⁴ Ces enzymes sont capables de catalyser chacune l'addition asymétrique de la dihydroxyacétone phosphate **185** (DHAP) sur différents substrats aldéhydiques (Figure 105).⁵ Ces enzymes permettent d'obtenir ainsi d'obtenir chacune un seul composé parmi les quatre configurations diastéréomériques possibles.⁶

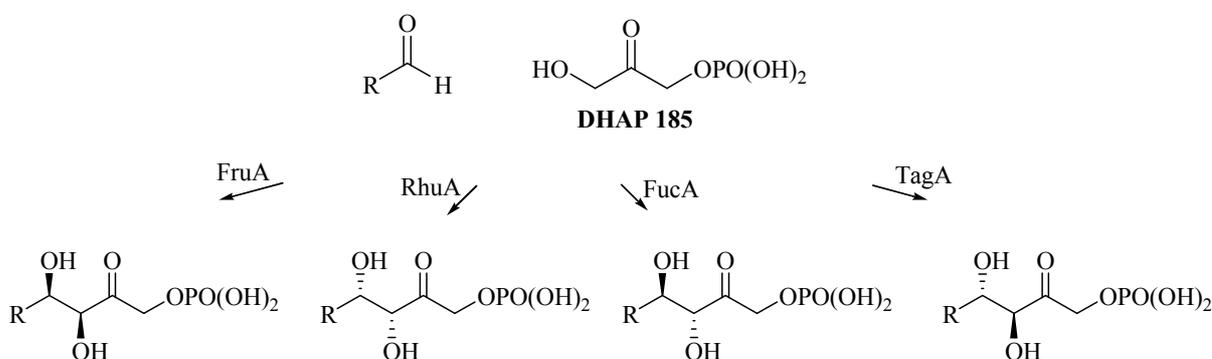
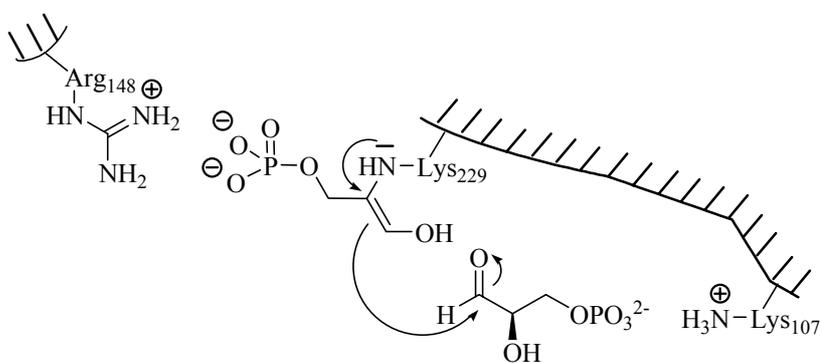


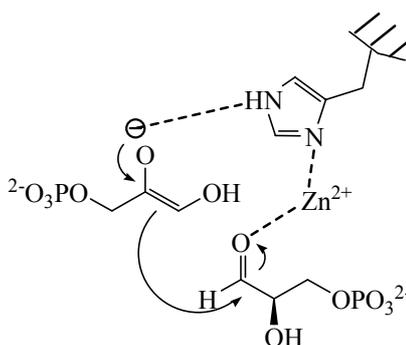
Figure 105. Aldolisation enzymatique asymétrique utilisant :

D-fructose 1,6-biphosphate aldolase = FruA, L-rhamnulose 1-phosphate aldolase = RhuA, L-fucose 1-phosphate aldolase = FucA, D-tagatose 1,6-biphosphate aldolase = TagA.

L'activité catalytique des ces enzymes dépend de deux mécanismes selon que l'aldolase est de type I ou II. Pour illustrer les mécanismes, l'exemple choisi est la réaction de la DHAP avec le D-glycéraldéhyde 3-phosphate catalysée par la D-fructose 1,6-biphosphate aldolase (Figure 106). Pour les aldolases de type I, un résidu lysine du site actif forme une base de Schiff avec le donneur qui s'additionne ensuite stéréospécifiquement sur l'accepteur. Les aldolases de type I, qui sont trouvées chez les animaux⁷ et les plantes supérieures,⁸ ne nécessitent pas de cofacteurs métalliques. Par contre, les aldolases de type II, présentes principalement chez les microorganismes⁹ comme *E. coli*, utilisent du Zn^{2+} qui agit comme un acide de Lewis dans le site actif. Ces deux types d'aldolases acceptent une grande variété de substrats naturels, et la stéréosélectivité de la réaction est prévisible.



Aldolase de Type I



Aldolase de Type II

Figure 106. Mécanisme de la FruA

En général, les FruA de type I se présentent sous forme de tétramères (M.M. env. 160 KDa) et celles de type II sous forme de dimères (M.M. env. 80 KDa). Les enzymes de type I ne sont pas sensibles à l'air, et leur demi-vie est d'environ 2 jours,^{10,11} ce qui peut être augmenté par immobilisation ou fixation sur une membrane. Les aldolases de type II ont une

de demi-vie bien plus importante (env. 60 jours dans 0.3 mM Zn^{2+} à pH 7). En ce qui concerne les autres aldolases, les FucA et RhuA sont de type II^{12,13} et la TagA de type I.^{14,15}

L'enzyme la plus fréquemment utilisée en synthèse organique est la RAMA (rabbit muscle aldolase) qui est une FruA. Ces biocatalyseurs ont surtout été exploités pour la synthèse *in vitro* de sucres, selon un processus biomimétique. Pourtant, ces enzymes présentent un grand intérêt en synthèse asymétrique puisque, suivant l'aldolase utilisée, la configuration absolue de deux centres stéréogènes adjacents pourrait être contrôlée. En effet, d'un point de vue synthétique, chacune des aldolases dépendante de la DHAP permet d'obtenir un produit dont la stéréochimie en C3 et C4 est fixée. Ainsi, en fonction de l'aldolase choisie, quatre diastéréomères peuvent être obtenus (Figure 105).^{6,16} De plus, une réduction asymétrique de la fonction carbonylée permettrait le contrôle d'un troisième centre stéréogène.

Ces enzymes acceptent un grand nombre d'aldéhyde comme substrat accepteur incluant des aldéhydes aliphatiques peu encombrés, des aldéhydes substitué en α par un hétéroatome, des monosaccharides et leur dérivés.^{10,17} Cependant, le substrat donneur doit être la DHAP. Trois analogues de la DHAP peuvent également jouer ce rôle mais leur conversion est faible car ce sont de mauvais substrats (Figure 107).^{10,18}

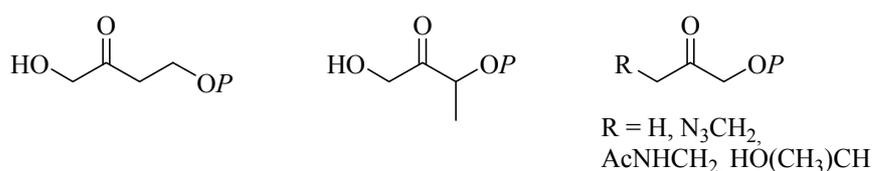


Figure 107. Analogues de la DHAP

L'utilisation de la DHAP en synthèse asymétrique est limitée par son coût commercial très élevé (3 456 €/g, Fluka). Il est donc utile de pouvoir préparer aisément la DHAP et de ce fait sa synthèse est toujours un sujet d'intérêt.

I. Synthèses de la DHAP

Plusieurs synthèses enzymatiques et chimiques de la DHAP ont été décrites dans la littérature.

I.1 Synthèses enzymatiques de la DHAP

La méthode enzymatique la plus simple à mettre en œuvre est la formation *in situ* de DHAP à partir de fructose 1,6-biphosphate (FBP) (Figure 108). *In vivo*, la fructose 1,6-biphosphate aldolase (FruA) catalyse la condensation réversible de deux molécules de triose phosphate, le phosphate de glycéraldéhyde (G3P) et la DHAP. Du fait de la réversibilité de cette réaction, cette enzyme peut aussi catalyser la rétroaldolisation du FBP en G3P et DHAP. Le G3P peut être converti en DHAP à condition d'ajouter une seconde enzyme, la triose phosphate isomérase (TPI).^{17,19} Cette méthode de préparation de la DHAP est simple et permet de réaliser l'aldolisation *in situ*. Toutefois la réaction d'aldolisation est limitée à l'utilisation de la fructose aldolase et le G3P peut entrer en compétition avec l'aldéhyde non naturel, cela ayant pour conséquence de diminuer le rendement. De plus lorsque la réaction est incomplète, la présence d'un excès de fructose complique l'isolement des produits.

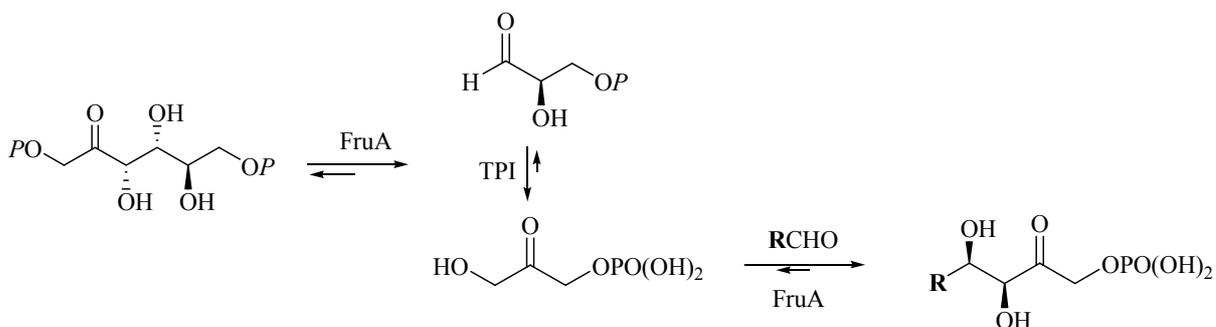


Figure 108. Synthèse enzymatique de la DHAP

Une approche enzymatique fondée sur la phosphorylation de la dihydroxyacétone (DHA) utilise la glycéról kinase (GK) et de l'ATP qui est régénéré grâce au phosphoénolpyruvate (PEP) dans une réaction catalysée par la pyruvate kinase (PK) (Figure 109, A.).^{20,21} La DHAP est obtenue en une seule étape, mais suivant la source de glycérólkinase cette méthode n'est pas reproductible.

Une autre approche enzymatique permettant d'obtenir la DHAP est l'utilisation du glycérol qui après phosphorylation par la GK conduit au L-glycérol 1-phosphate (Figure 109, B.). Celui-ci est oxydé en DHAP par l'oxygène en présence de la glycérophosphate oxydase (GPO).²² Le DL-glycérol 3-phosphate formé *in situ* à partir du glycérol, de pyrophosphate inorganique et d'une phytase d'*Aspergillus ficuum* peut être oxydé de façon analogue à la précédente.²³

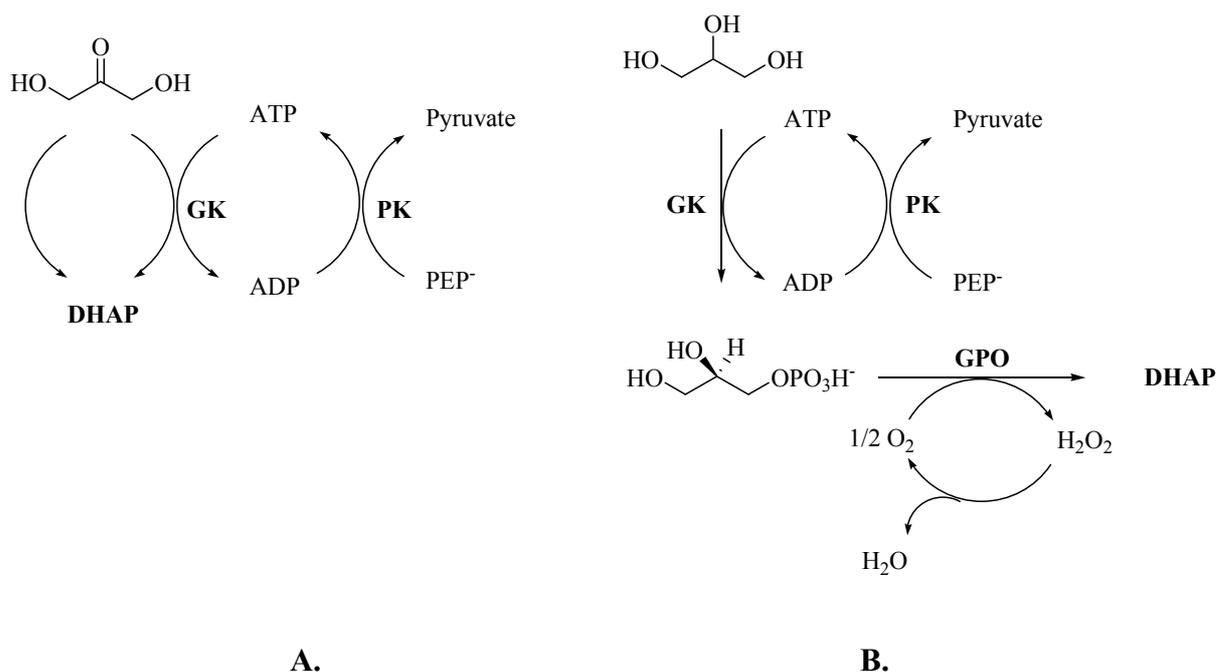


Figure 109. Synthèses enzymatiques de la DHAP

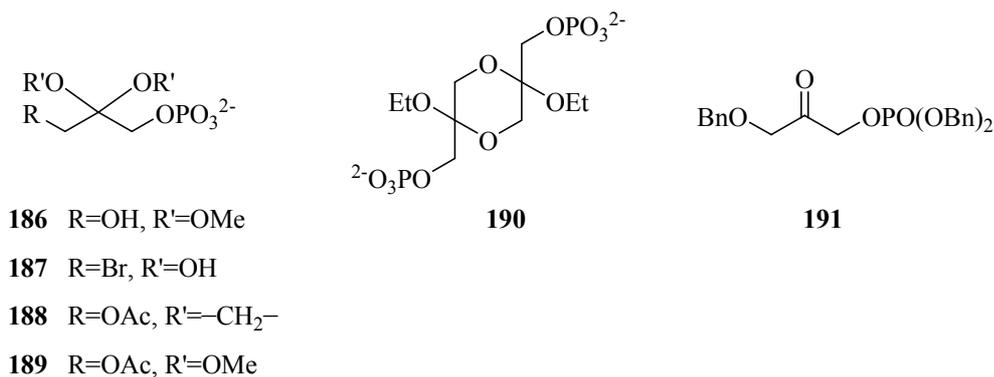
A : à partir de dihydroxyacétone

B : à partir de glycérol

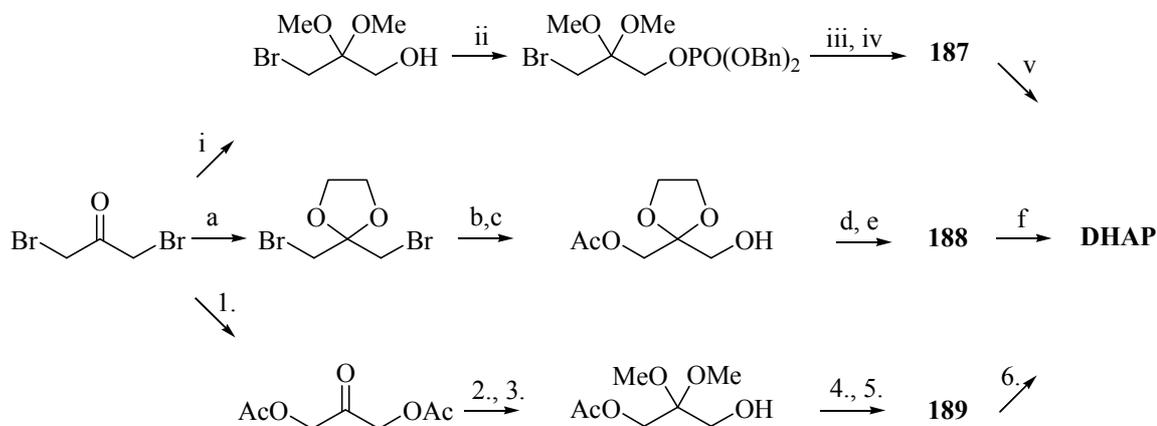
La préparation de DHAP utilisant ces synthèses enzymatiques est trop onéreuse pour pouvoir les utiliser à grande échelle, c'est pourquoi les méthodes chimiques sont préférées.

I.2 Synthèses chimiques de la DHAP

Différents précurseurs de la DHAP ont été synthétisés (Figure 110). Le premier précurseur de la DHAP **186** a été synthétisé par Ballou et Fischer.²⁴ Ce composé, le diméthyle acétal de la dihydroxyacétone phosphate, permet d'obtenir la DHAP à partir de l'isopropylidène glycérol monochlorohydrine en huit étapes avec un rendement global de 13 %.

**Figure 110.** Précurseurs de la DHAP

D'autres approches chimiques conduisant à des précurseurs de la DHAP sous forme cétal ont été développées et ont abouti aux précurseurs **187**, **188** et **189** (Figure 111).^{25,26} Ces composés sont synthétisés à partir de la dibromoacétone dont la fonction carbonyle est protégée sous forme d'acétal. Dans une première approche, un des deux atomes de brome est remplacé par un alcool et, après introduction du groupement phosphate et déprotection, la DHAP est obtenue via le précurseur **187** en 5 étapes avec un rendement global de 56 %.²⁵

**Figure 111.** Synthèses des précurseurs de la DHAP sous forme cétal

i : MeONa, MeOH, 85 % ; ii : P(OBn)₃, I₂, pyridine, CH₂Cl₂, 91 % ; iii : H₂, Pd/C, MeOH, 99 % ; iv : H₂O, 65°C ; v : NaOH, 73%.

a : HOCH₂CH₂OH, benzène, pTsOH, 92 % ; b : CH₃(C₈H₁₇)₃NCl, AcOK, 44 % ; c : lipase, NaOH, MeOH, tampon phosphate pH 7, 85 % ; d : ClPO(OPh)₂, pyridine, 86 % ; e : H₂, PtO₂, MeOH, 98 % ; f : H₂SO₄, H₂O, 50 %.

1. : AcOK, (C₄H₉)₄NBr, benzène, 92 % ; 2. : CH(OCH₃)₃, ZnCl₂, MeOH, 39 % ; 3. : lipase, NaOH, MeOH, tampon phosphate pH 7, 85 % ; 4. ClPO(OPh)₂, pyridine, 90 % ; 5. : H₂, PtO₂, MeOH, 99 % ; 6. H₂O, dowex 50 H⁺, 95 %.

Les deux autres approches sont fondées sur la substitution des bromures par des acétates (Figure 111). Après une réduction sélective d'une des deux fonction esters, le

groupement phosphate est introduit et les groupements protecteurs éliminés. Ainsi, la DHAP est obtenue en six étapes à partir de dibromoacétone via les précurseurs **188** et **189** avec des rendements globaux de 37 et 48 % respectivement.²⁶

Les synthèses les plus courantes fournissent la DHAP en utilisant comme précurseur le dimère phosphorylé **190**. Ce précurseur stock a été décrit pour la première fois par Colbran *et coll.*²⁷ La DHAP est obtenue après déprotection des acétals en milieu acide. Les différentes synthèses proposées du dérivé **190** utilisent la même approche. La première étape est la formation du composé **190** dimère de dihydroxyacétone dans lequel les hémicétals sont protégés sous forme d'acétal éthylique. L'introduction du groupement phosphate suivie de l'élimination des groupements protecteurs permet la préparation de DHAP. La synthèse décrite par Effenberger et Straub²⁸ (Figure 112) fournit la DHAP sous forme de sels de baryum en trois étapes avec un rendement global de 34 %. L'optimisation de la synthèse, en particulier de l'étape de phosphorylation, par Wong *et coll.* conduit à la DHAP en quatre étapes avec 55 %²⁹ et 61 %³⁰ selon la méthode de phosphorylation utilisée.

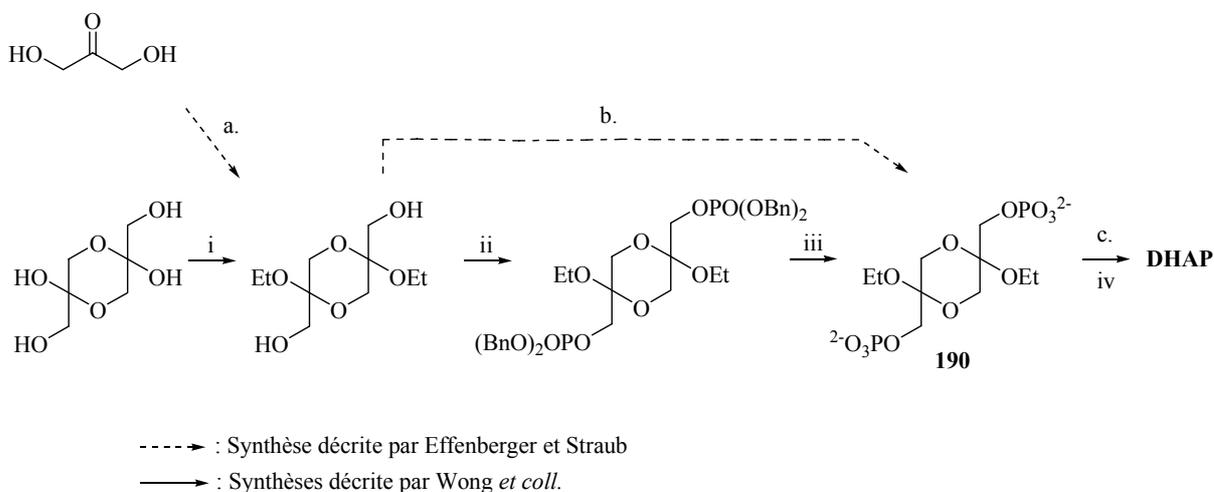


Figure 112. Synthèses du précurseur x de la DHAP

a. : $(\text{EtO})_3\text{CH}$, 50 % ; b. : POCl_3/py , $\text{H}_2\text{O}/\text{HCO}_3^-/\text{OH}^-$, $\text{MgCl}_2/\text{NH}_4\text{Cl}$, $\text{BaCl}_2/\text{EtOH}$, 85 % ; c. Dowex 50 X8 H^+ , 80 %.

i : : $(\text{EtO})_3\text{CH}$, H_2SO_4 , 97 % ; ii : $(\text{EtN})_2\text{P}(\text{OBn})_2$, triazole, H_2O_2 , 98 % ou $\text{ClPO}(\text{OBn})_2$, pyridine, 96 % ; iii : H_2 , Pd/C, 84 % ; iv : H^+ , H_2O , 65°C, 66 %

Récemment, de la DHAP marquée a été synthétisée via le précurseur **191** dans lequel la fonction alcool et les hydroxyles du phosphate sont protégés par des groupements benzyles (Figure 113).^{31,32} Ces deux synthèses utilisent comme produit de départ de l'acide acétique

marqué. Un atome de brome est introduit en α du carbonyle et après déplacement par un alcoolate, l'élongation de la chaîne carbonée est réalisée par addition de diazométhane sur un chlorure d'acide³¹ ou un anhydride mixte.³² Après introduction du groupement phosphate et élimination des groupements benzyles par hydrogénolyse, la DHAP est obtenue en cinq étapes avec un rendement global de 62³¹ et 50 %.³²

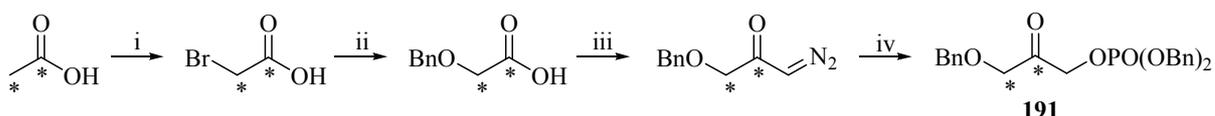


Figure 113. Synthèse du précurseur x de la DHAP

* : ¹³C

i : TFAA/Br₂, 98 % ; ii : BzlOH/NaH/THF, 97 % ; iii : 1. SOCl₂ 2. CH₂N₂, 75 % **ou** 1. s-butyl chloroformate, NEt₃ 2. CH₂N₂, 68 % ; iv : (BzlO)₂PO(OH), 93 %.

Les synthèses chimiques décrites dans la littérature conduisent à la formation de la DHAP avec des rendements moyens et font intervenir des purifications longues et fastidieuses. Dans certains cas, elles impliquent la synthèse des intermédiaires instables et/ou chers et des réactifs toxiques. Nous avons cherché une méthode pratique et efficace pour la synthèse à grande échelle du précurseur **191** de la DHAP.

I.3 Nouvelle synthèse de la DHAP

a. Synthèse de la DHAP à partir du benzylglycérol

Notre approche pour la synthèse du précurseur **191** de la DHAP est fondée sur les modifications chimiques du (\pm)-1-*O*-benzylglycérol **192** qui possède le même squelette carboné et oxygéné (Figure 114).

Deux méthodes ont été envisagées : une oxydation sélective de l'alcool secondaire suivie par une phosphorylation de la fonction hydroxyle primaire ou alternativement une phosphorylation sélective de l'alcool primaire suivie d'une oxydation de la fonction hydroxyle secondaire.

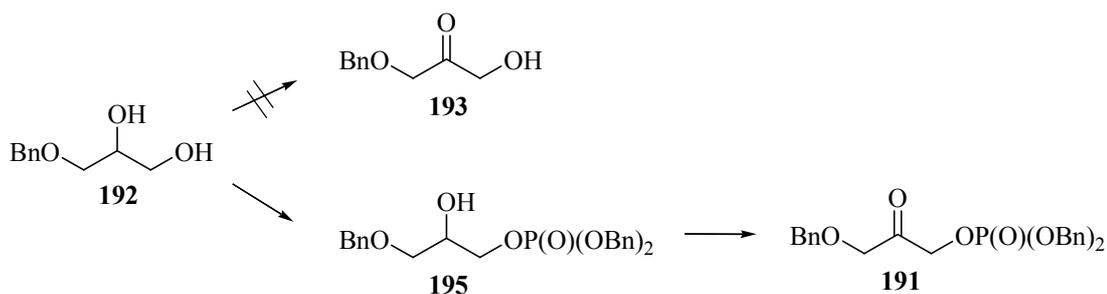
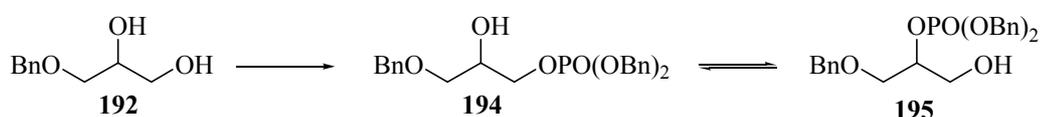


Figure 114. Synthèse de la DHPA à partir du benzylglycérol

Afin d'oxyder sélectivement l'alcool secondaire, différentes conditions ont été testées. L'utilisation d'un mélange NBS/DME/H₂O³³ fournit, après 4 h d'agitation, un mélange de produits contenant celui pour lequel l'alcool primaire a été oxydé en acide carboxylique accompagné de la cétone désirée **193**. Le mélange réactionnel étant difficilement séparable et contenant seulement 10 % du produit **193**, nous avons utilisé un autre oxydant, FeBr₃/H₂O₂³⁴ dans l'acétonitrile. Dans ces conditions le produit de départ n'est pas oxydé, et cela même après agitation plusieurs jours à température ambiante. Nous avons donc envisagé l'autre alternative à savoir la phosphorylation sélective de l'alcool primaire. Pour cela, nous avons testés différentes méthodes de phosphorylation (Figure 115).



| | Réactifs | Solvants | Temp. | Durée | 194/195 |
|---|--|---------------------------------|-------|-------|---------|
| 1 | HPO(OBn) ₂ /NCS/pyridine | CH ₂ Cl ₂ | 0°C | 16 h | 3/1 |
| | | | -40°C | 2 h | 2.5/1 |
| 2 | P(OBn) ₃ /I ₂ /pyridine | CH ₂ Cl ₂ | -30°C | 3 h | 3/1 |
| 3 | HPO(OBn) ₂ /NEt ₃ /CCl ₄ /ultrasons | Toluène | 25°C | 2 h | 1.5/1 |

Figure 115. Essais de phosphorylation du benzylglycérol

L'utilisation de chlorophosphate de dibenzyle comme agent phosphorylant en présence de pyridine conduit au phosphate voulu **195** (Figure 115, entrée 1).³⁵ Avec cette méthode le produit diphosphorylé n'a pas été formé mais nous avons observé une migration du phosphate de l'alcool primaire sur l'alcool secondaire. Les deux composés migrant presque de la même façon sur silice, l'isolement du produit désiré est très fastidieux. D'autres

conditions réactionnelles comme $P(OBn)_3/I_2/pyridine$ ³⁶ (Figure 115, entrée 2) ou $HPO(OBn)_2/NEt_3/CCl_4$ ³⁷ sous ultrasons (Figure 115, entrée 3) conduisent à des résultats similaires.

Nous avons donc décidé d'oxyder le mélange des deux composés phosphorylés en utilisant du TPAP en présence NMO.³⁸ Ainsi le précurseur de la DHAP **191** est obtenu à partir du dérivé du glycérol **192** en deux étapes avec un rendement global de 24 %.

b. Synthèse de la DHAP à partir du benzylglycidol

Afin d'optimiser la synthèse du précurseur **191**, nous avons décidé de partir du benzylglycidol **196** commercial. En effet, après ouverture de l'époxyde par un phosphate le composé **194** pourrait être obtenu. Une oxydation de ce composé conduirait au précurseur **191** de la DHAP.

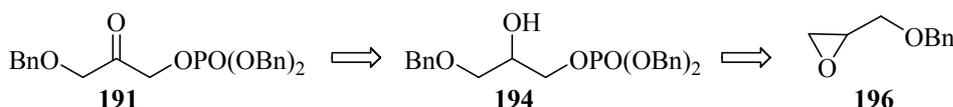


Figure 116. Rétrosynthèse du précurseur **191**

Nous nous sommes ainsi intéressés à mettre au point une méthode d'ouverture d'époxyde par un phosphate.

Dans la littérature, cinq exemples de ce type de réaction ont été décrits (Figure 117). L'époxyde est mis en présence d'un phosphate qui joue le rôle du nucléophile. Dans les exemples **a**,³⁹ **b**,⁴⁰ **c**,⁴¹ (Figure 117) deux fonctions hydroxyles du phosphate sont protégées par des groupements benzyles, éthyles ou butyles, et la réaction a lieu dans le benzène, le THF ou le dichlorométhane. L'ouverture de l'époxyde peut également être réalisée par un phosphate de potassium ou de sodium (**d**⁴² et **e**⁴³, Figure 117) en milieu aqueux.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux exemples **a**, **b**, **c** (Figure 117), puisque nous souhaitons former un phosphate protégé sous forme de benzyloxy.

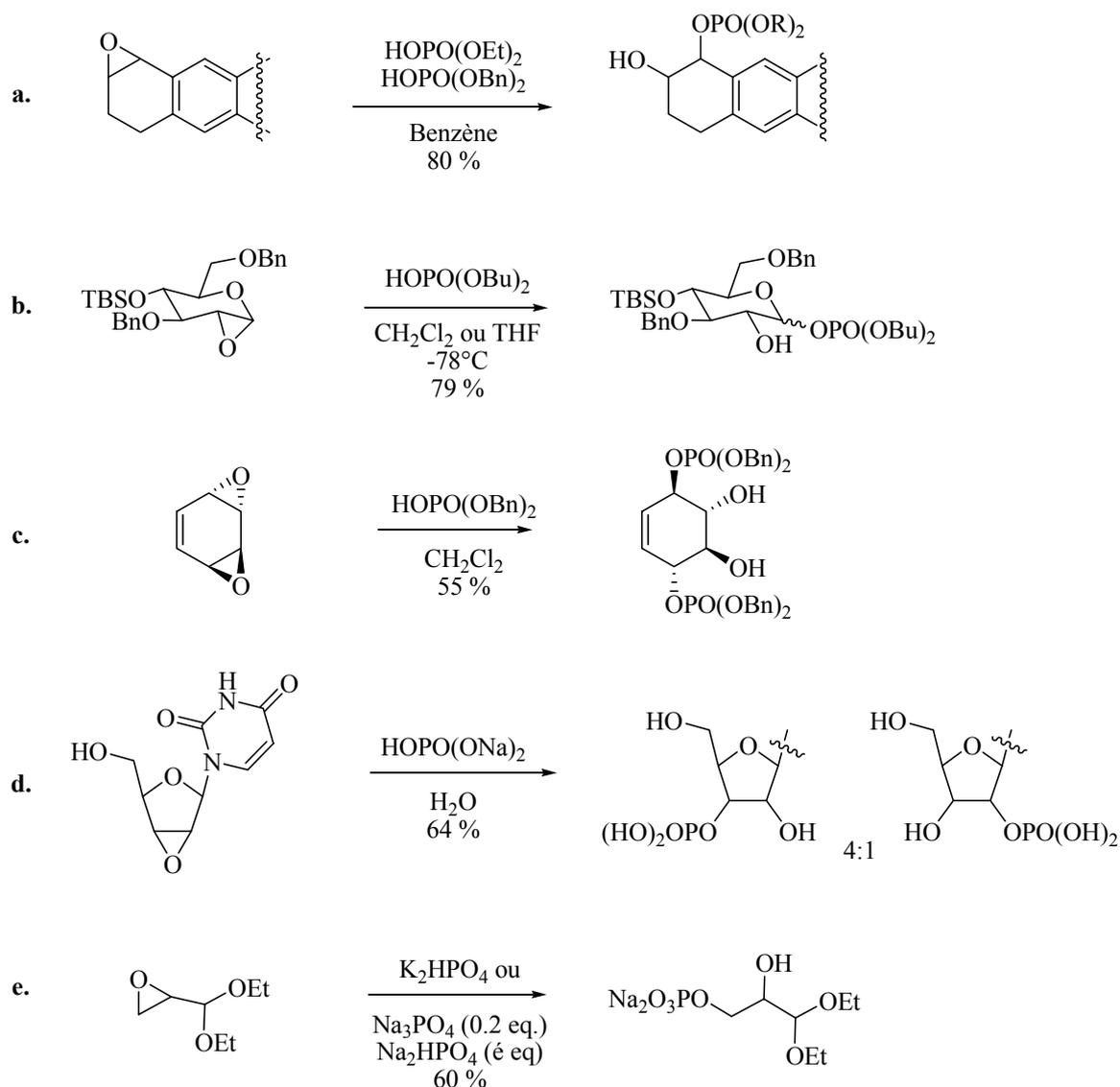
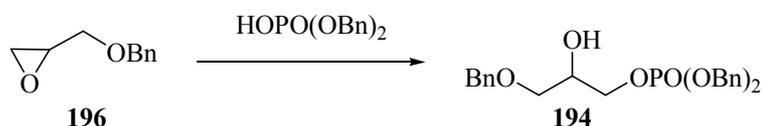


Figure 117. Formation de phosphates par ouverture d'époxyde

Le précurseur **191** de la DHAP peut être obtenu par ouverture du benzylglycidol **196** par du phosphate de dibenzyle (2 éq.). Nous avons testé différentes conditions réactionnelles (Figure 118). En effectuant la réaction dans le benzène à température ambiante (Figure 118, entrée 1), le phosphate **194** est formé en 96 h avec un rendement de 13 %. Afin d'améliorer le rendement nous avons réalisé la réaction dans d'autres solvants comme le toluène (Figure 118, entrée 2) et le THF (Figure 118, entrée 6). Dans le THF, la réaction est encore plus lente (120 h) et le rendement plus mauvais (9 %). Dans le toluène, le produit est formé en 48 h avec 20 % de rendement. Nous avons donc choisi ce solvant pour tester l'effet de la température. A 0°C (Figure 118, entrée 2), la réaction est lente (120 h), et le fait de chauffer le milieu réactionnel (Figure 118, entrée 4 et 5) permet de diminuer le temps de réaction tout en augmentant le rendement. Toutes ces conditions conduisent, après transformation totale du

produit de départ, à un mélange contenant le produit désiré **194** ainsi que deux autres produits secondaires que nous n'ont pas pu identifier. Dans le meilleur cas, c'est-à-dire chauffage à reflux de toluène, le phosphate n'est formé au bout de 5 h qu'avec le faible rendement de 33 %.



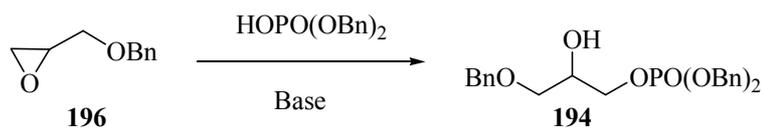
| | Solvant | Température (°C) | Temps (h) | Rdt (%) |
|---|---------|------------------|-----------|---------|
| 1 | Benzène | t.a. | 96 | 13 |
| 2 | Toluène | 0 | 120 | 12 |
| 3 | Toluène | t.a. | 48 | 20 |
| 4 | Toluène | 55 | 5 | 29 |
| 5 | Toluène | reflux | 2.5 | 33 |
| 6 | THF | t.a. | 120 | 9 |

Figure 118. Formation du composé **194**

t.a. : température ambiante

Ces résultats sont moins bons que ceux décrits dans la littérature pour les ouvertures d'époxydes par un phosphate. Il faut cependant noter que les réactions décrites (Figure 117), excepté l'exemple e, font intervenir des époxydes liés à un cycle. Dans ces cas, la tension de cycle est supérieure à celle d'un époxyde sur chaîne linéaire et donc l'ouverture est favorisée d'un point de vue énergétique.

Pour optimiser le rendement de cette réaction nous avons tenté de former un anion à partir du phosphate de dibenzyle dans le but d'augmenter la nucléophilie du phosphate. Différentes conditions réactionnelles ont donc été envisagées (Figure 119). Nous avons utilisé différentes bases pour former l'anion mais, dans chaque cas, il n'y a pas de réaction. Nous en avons déduit que l'anion formé est moins nucléophile que le phosphate. Cela peut être expliqué par la délocalisation du doublet sur la liaison $\text{P}=\text{O}$. De plus, le phosphate de dibenzyle étant un acide il pourrait protoner l'époxyde favorisant ainsi son ouverture (Figure 118). En milieu basique, cela n'est plus possible.



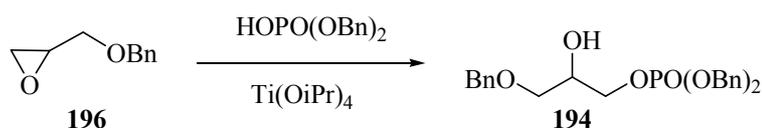
| | Solvant | Base | Température | Temps (h) | Rdt (%) |
|---|---------|---------------------------------|-------------|-----------|---------|
| 1 | Toluène | NaH | t.a. | 24 | 0 |
| 2 | THF | NaH | t.a. | 48 | 0 |
| 3 | THF | NEt ₃ | t.a. | 24 | 0 |
| 4 | THF | Collidine | t.a. | 24 | 0 |
| 5 | THF | Na ₂ CO ₃ | t.a. | 72 | 0 |
| 6 | Toluène | Na ₂ CO ₃ | t.a. | 48 | 0 |
| 7 | Ether | CS ₂ CO ₃ | t.a. | 24 | 0 |

Figure 119. Formation du composé **194**

t.a. : température ambiante

L'addition de quantité catalytique d'acide de Lewis devrait permettre de faciliter l'ouverture d'époxydes. En effet, l'utilisation d'un acide de Lewis chélatant les deux oxygènes devrait catalyser l'ouverture de l'époxyde par le phosphate. Sachant que le titane IV oxophile catalyse l'ouverture d'époxyalcools par des nucléophiles avec de bons rendements,⁴⁴ nous avons testé cet acide de Lewis. Dans les conditions décrites dans la littérature utilisent 1.5 eq. de titane IV. Lorsque nous avons testé les mêmes conditions réactionnelles dans le CH₂Cl₂ (Figure 120, entrée 8) ou le THF (Figure 120, entrée 10), le produit de départ est récupéré. En chauffant le milieu réactionnel (Figure 120, entrée 9), le même résultat a été obtenu. Nous avons alors testé l'influence de la quantité de titane IV sur l'évolution de la réaction (Figure 120, entrées 1 à 7). Les résultats montrent que plus la quantité d'acide de Lewis est importante plus le rendement en composé souhaité est mauvais. Lorsque celui-ci est additionné en quantité stoechiométrique, il n'y a pas de réaction. Le meilleur rendement a été obtenu en ajoutant une quantité catalytique de titane IV (0.05 eq.). Ces conditions ont permis de former le phosphate **194** à partir du benzylglycidol avec un rendement de 52 %. Une autre tentative a été effectuée en réalisant la réaction dans le toluène et en chauffant le milieu réactionnel à reflux (Figure 120, entrée 11). Cependant, le produit est formé avec 36 % de rendement. Ce résultat n'est pas meilleur que celui observé lors de l'utilisation de la même quantité de titane IV dans le CH₂Cl₂ à température ambiante (34 %, Figure 120, entrée 3) ou en effectuant la réaction sans titane IV (33 %, Figure 120, entrée 5).

Lors d'ouvertures classiques d'époxydes par un nucléophile en présence de titane IV, les quantités d'acide de Lewis utilisées sont comprises de 1.5 équivalent. Nous avons observé que plus la quantité de titane IV augmente moins le rendement est bon. Ce résultat inattendu pourrait être expliqué par la chélation du titane IV non seulement avec l'époxyde mais encore avec le phosphate. Lorsque des quantités stoechiométriques de titane sont utilisées, le phosphate serait totalement complexé et il ne pourrait pas réagir.



| | Solvant | Ti(OiPr) ₄ | Température | Temps (h) | Rdt (%) |
|----|---------------------------------|-----------------------|-------------|-----------|---------|
| 1 | CH ₂ Cl ₂ | 0.05 | t.a. | 17 | 52 |
| 2 | CH ₂ Cl ₂ | 0.1 | t.a. | 17 | 41 |
| 3 | CH ₂ Cl ₂ | 0.25 | t.a. | 24 | 34 |
| 4 | CH ₂ Cl ₂ | 0.3 | t.a. | 48 | 22 |
| 5 | CH ₂ Cl ₂ | 0.5 | t.a. | 17 | 16 |
| 6 | CH ₂ Cl ₂ | 0.75 | t.a. | 17 | 11 |
| 7 | CH ₂ Cl ₂ | 1 | t.a. | 17 | 0 |
| 8 | CH ₂ Cl ₂ | 1.5 | t.a. | 24 | 0 |
| 9 | CH ₂ Cl ₂ | 1.5 | reflux | 8 | 0 |
| 10 | THF | 1.5 | t.a. | 17 | 0 |
| 11 | Toluène | 0.25 | reflux | 8 | 36 |

Figure 120. Essais de formation du composé **194**

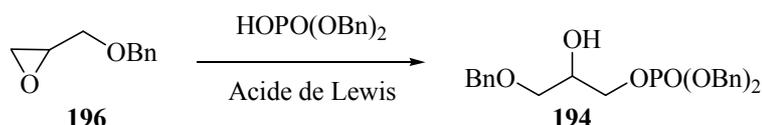
t.a. : température ambiante

Afin d'améliorer les rendements, nous avons ensuite testé d'autres acides de Lewis. Dans un premier temps nous avons utilisé du bromure de lithium en quantité catalytique (Figure 121, entrée 1) et stoechiométrique (Figure 121, entrée 2). Une analyse par RMN du produit formé montre que le phosphate n'est pas obtenu et que le bromure a joué le rôle du nucléophile et ouvert l'époxyde. L'utilisation de chlorure de zinc conduit à un résultat similaire (Figure 121, entrée 3), le chlorure ouvre l'époxyde à la place du phosphate. Nous

avons alors cherché à utiliser des acides de Lewis dont le contre ion ne possède pas des propriétés nucléophiles.

L'utilisation du $\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}$ (Figure 121, entrée 4) conduit à la formation du phosphate **194** avec un rendement de 51 % en 18 h à température ambiante.⁴⁵

Nous avons ensuite testé l'iodure de cuivre (Figure 121, entrée 5 à 7).⁴⁶ Lorsque la réaction est effectuée à -20°C ou à température ambiante, la réaction est très lente et un mélange de produits est obtenu. En chauffant le milieu réactionnel, le phosphate **194** est formé avec un rendement de 22 %.



| | Solvant | Acide de Lewis | Eq. | Température | Temps (h) | Rdt (%) |
|-----------|--------------------------|-----------------------------------|-----|---|-----------|---------|
| 1 | CH_2Cl_2 | LiBr | 0.2 | t.a. | 24 | 0 |
| 2 | CH_2Cl_2 | LiBr | 1 | t.a. | 17 | 0 |
| 3 | CH_2Cl_2 | ZnCl_2 | 0.3 | t.a. | 24 | 0 |
| 4 | CH_2Cl_2 | $\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}$ | 1 | t.a. | 18 | 51 |
| 5 | THF | CuI | 1 | $-20^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ | 15 | nd |
| 6 | THF | CuI | 1 | t.a. | 4 | nd |
| 7 | THF | CuI | 1 | reflux | 2.5 | 22 |
| 8 | DMF | CsF | 0.2 | t.a. | 24 | nd |
| 9 | DMF | CsF | 0.4 | reflux | 24 | 19 |
| 10 | CH_2Cl_2 | Cu(OTf)_2 | 0.2 | t.a. | 18 | 18 |
| 11 | CH_2Cl_2 | Cu(OTf)_2 | 0.2 | reflux | 4 | nd |
| 12 | CH_2Cl_2 | Cu(OTf)_2 | 1 | t.a. | 17 | 28 |
| 13 | CH_2Cl_2 | AgPF_6 | 0.2 | t.a. | 17 | 22 |
| 14 | CH_2Cl_2 | AgPF_6 | 1 | t.a. | 4 | 66 |

Figure 121. Formation du composé **194**

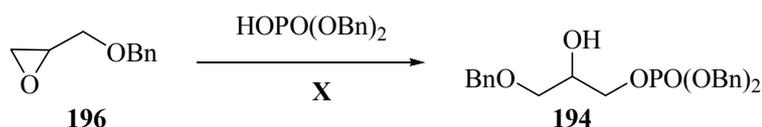
t.a. : température ambiante
 nd : rendement non déterminé

L'utilisation de fluorure de césium à température ambiante ou à reflux (Figure 121, entrée 8 et 9), ne permet pas d'optimiser le rendement.⁴⁷

L'utilisation de triflate de cuivre (Figure 121, entrée 10 à 12) en quantité stoechiométrique ne permet pas non plus d'améliorer le rendement.

L'hexafluorophosphore d'argent a ensuite été testé (Figure 121, entrée 13 et 14). L'utilisation de quantité stoechiométrique permet d'obtenir le meilleur résultat puisque le phosphate est obtenu avec un rendement de 66 % en 4 h à température ambiante.

Les différents essais d'ouverture d'époxyde par le phosphate de dibenzyle ont montré qu'en conditions basiques il n'y avait pas d'ouverture de l'époxyde. En présence du phosphate, l'ouverture a lieu avec un rendement de 33 %. Ce rendement est doublé en utilisant comme acide de Lewis, l'hexafluorophosphore d'argent (Figure 122).



| | X | Meilleur résultat | Rdt (%) |
|---|----------------|-------------------------|---------|
| 1 | - | Toluène à reflux | 33 |
| 2 | Base | Pas de réaction | 0 |
| 3 | Acide de Lewis | 1 eq. AgPF ₆ | 66 |

Figure 122. Récapitulatif des essais d'ouverture de l'époxyde

L'alcool secondaire ainsi obtenu est oxydé à de TPAP/NMO³⁸ et la cétone **191** est obtenue avec un rendement de 82 % (Figure 123). Cette méthode permet d'obtenir le précurseur de la DHAP en deux étapes avec un rendement global de 54 %. Il peut être stocké pendant plusieurs mois sans qu'il ne se décompose. La dernière étape est l'élimination de tous les groupements benzyles par une hydrogénation catalytique. Cette réaction a été réalisée à pression atmosphérique dans un mélange méthanol/eau (9/1) en présence de Pd/C (11 %). Après 1 h, la DHAP est obtenue quantitativement. Il faut aussi noter que cette étape ne nécessite aucune purification, le catalyseur est simplement éliminé par filtration sur célite, puis le filtrat est concentré. Le résidu ainsi obtenu est dissous dans l'eau, et la solution est neutralisée par ajout de soude (1M).

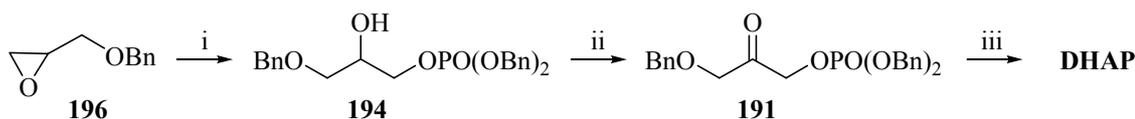


Figure 123. Synthèse de la DHAP

i : HOPO(OBn)₂, AgPF₆, CH₂Cl₂ (66 %) ; ii : TPAP, NMO, tamis moléculaire 4 Å, CH₂Cl₂ (82 %) ; iii : H₂, Pd/C, MeOH/H₂O - 9/1, quant.

Parallèlement à cette méthode de synthèse, la préparation du précurseur de la DHAP **191** a été envisagée par une autre approche partant du glycidol **197** (Figure 124). En effet, le groupement phosphate pourrait être introduit dès la première étape et, une ouverture de l'époxyde par de l'alcool benzylique⁴⁸ pourrait conduire à l'intermédiaire **194** qui pourrait ensuite être oxydé pour donner le précurseur **191** de la DHAP.

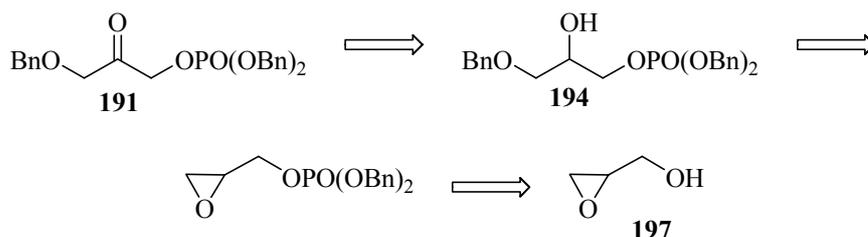
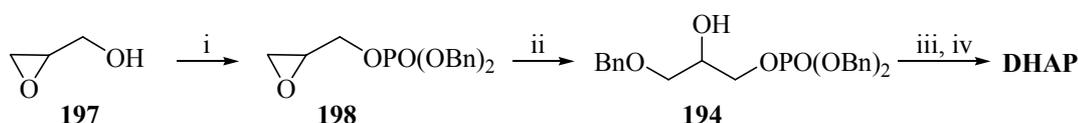


Figure 124. Rétrosynthèse du précurseur **191**

Afin d'introduire le groupement phosphate, le glycidol a été traité avec du *N,N*-diéthyl phosphoramidite de dibenzyle en présence de tétrazole (Figure 125).⁴⁹ L'intermédiaire phosphite ainsi obtenu est immédiatement oxydé en phosphate à l'aide de *m*CPBA. L'ouverture de l'époxyde par de l'alcool benzylique a ensuite été réalisée. La formation de l'alcoolate à l'aide de NaH fournit un mélange de plusieurs produits difficilement séparables (Figure 125, entrée 1).⁵⁰ L'ouverture de l'oxirane en milieu acide (Figure 125, entrée 2 et 3) permet d'obtenir le composé **194** avec un rendement de 43 % en utilisant de l'acide sulfurique en quantité catalytique. Finalement, le meilleur résultat est obtenu en utilisant le BF₃/Et₂O comme catalyseur (Figure 125, entrée 4).⁵¹ Dans ces conditions, l'alcool résultant de l'ouverture de l'époxyde du côté le moins encombré est obtenu uniquement. Ainsi, le composé **194** est formé à partir du phosphate **198** avec un rendement de 88 %. Après

oxydation de l'alcool secondaire à l'aide de TPAP,³⁸ le précurseur de la DHAP est obtenu en 3 étapes avec un rendement global de 61 %.



| ii | BnOH | Réactif | Conditions | Rdt (%) |
|----|---------|--|--|---------|
| 1 | 1.5 eq. | NaH | THF, 0°C, 4 h | nd |
| 2 | solvant | H ₂ SO ₄ cat. | t.a., 2h | 43 |
| 3 | 3 eq. | H ₂ SO ₄ stoech. | CH ₂ Cl ₂ , t.a., 1 h | 18 |
| 4 | 3 eq. | BF ₃ /Et ₂ O (0.4 eq.) | CH ₂ Cl ₂ , t.a., 16 h | 88 |

Figure 125. Synthèse de la DHAP

t.a. : température ambiante
nd : rendement Non Déterminé

i : (BnO)₂P-NEt₂, Tetrazole, mCPBA, CH₂Cl₂, 85 % ; ii : BnOH, BF₃/Et₂O, tamis moléculaire 4 Å, CH₂Cl₂, 88 % ; iii : TPAP, NMO, tamis moléculaire 4 Å, CH₂Cl₂, 82 % ; iii : H₂, Pd/C, MeOH/H₂O - 9/1, quant.

Cette nouvelle synthèse de DHAP s'effectue à partir de (±)-glycidol **197** en quatre étapes avec un rendement global de 61 %. Le rendement obtenu est de l'ordre de ceux des synthèses les plus récentes (56 % pour la synthèse de Bolte *et coll.*, 62 % ou 50 % pour celles de Raap *et coll.*). Cependant, cette méthode offre l'avantage de pouvoir préparer la DHAP à partir d'une séquence de réaction courte et facile à mettre ne œuvre à partir de glycidol racémique peu coûteux et à l'aide de réactifs non toxiques. En effet, la méthode proposée par Raap nécessite l'utilisation de diazométhane. De plus, la DHAP est formée par hydrogénation du précurseur **191** dans un mélange dioxane/propan-2-ol/eau (4/2/1) à pression atmosphérique en présence de 42 % de Pd/C pendant une nuit alors que nous obtenons la DHAP, sans formation de produits secondaires, après 1h en utilisant seulement 11 % de catalyseur dans un mélange méthanol/eau (9/1) également à pression atmosphérique.

La méthode de Raap a été proposée dans le but d'obtenir de la DHAP marquée au ¹³C et l'intermédiaire **191** a été obtenu dans un premier temps avec un rendement global de 66 %. Cependant, deux ans plus tard, les mêmes auteurs ont publié une synthèse modifiée pour la préparation du composé **191** avec un rendement global de 52 %. Cette nouvelle méthode a été

réalisée afin de réduire les réactions secondaires observées dans leurs expériences précédentes.

La méthode courte et efficace proposée figure 125 représente une synthèse nouvelle pour la préparation du précurseur de la DHAP **191**, composé stable qui peut être stocké pendant plusieurs mois à -18°C . Il peut être hydrogéné afin de donner la DHAP juste avant de réaliser la réaction d'aldolisation enzymatique.

II. Synthèse d'analogues du DXP

Afin de synthétiser des analogues du DXP, nous avons dans un premier temps testé la DHAP **185** synthétisée comme précédemment décrit. Afin de synthétiser des analogues du DXP, nous avons choisi d'utiliser comme enzyme la RAMA, une fructose 1,6-biphosphate aldolase, car elle permet d'obtenir les configurations des carbones du DXP (Figure 105).

Les conditions utilisées sont les mêmes que celles décrites par Schoevaart *et coll.*⁵² Ainsi, le 1,3,4-tri-*O*-acétyl-5-déoxy-5-éthyl-D-xylulose **200** a été préparé (Figure 126) à partir du butanal **199** et de DHAP **185**.

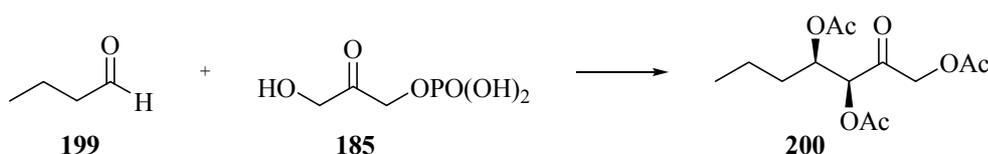


Figure 126. Couplage du butanal avec la DHAP en présence de RAMA

Après le couplage par l'aldolase réalisé dans un tampon TRIS, une seconde enzyme, une phosphatase (WGAP), est ajoutée au brut réactionnel afin d'éliminer le groupement phosphate. La réaction est suivie par CCM et, lorsque le produit est formé, le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le résidu obtenu est acétylé à l'aide d'anhydride acétique dans la pyridine, ce qui permet l'obtention du composé **200** après purification par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 35% à partir de la DHAP (28% obtenu par Schoevaart⁵²). Nous avons caractérisé le produit obtenu et nous l'avons comparé avec celui

décrit par Schoevaart *et coll.* Le composé synthétisé présente bien les mêmes caractéristiques que celui décrit.

Dans un second temps, nous avons appliqué cette synthèse à la préparation d'analogues du DXP. Nous avons choisi de coupler l'acétaldéhyde **201** et le propionaldéhyde **202** avec la DHAP **185**. La synthèse de ces composés nous permettra de mettre au point les conditions de réaction et de purification des phosphates obtenus (Figure 127).

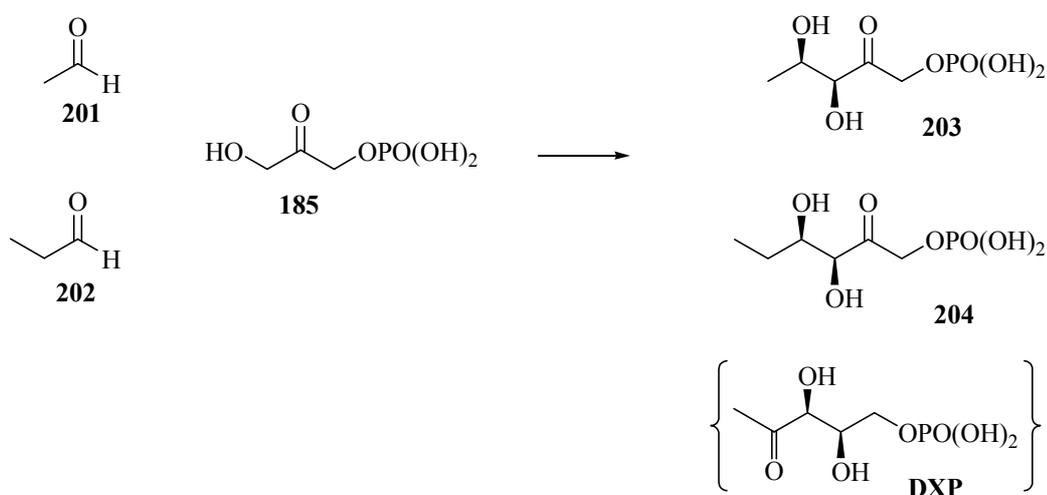


Figure 127. Synthèse d'analogue du DXP

L'aldolase utilisée pour réaliser le couplage est la RAMA. Après réaction dans un tampon TRIS, le brut réactionnel est purifié par passage sur une résine échangeuse d'ions AG 1-X8 (sous forme HCO_3^-) et AG 50W-X8 (sous forme Na^+),⁵³ ce qui permet d'obtenir après lyophilisation les phosphates **203** et **204**.

Ces composés seront testés sur la DXR afin de déterminer leurs caractéristiques biochimiques sur cette enzyme.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons préparé des analogues du DXP en utilisant la synthèse asymétrique. Dans ce but, nous avons choisi d'utiliser l'aldolisation enzymatique permettant le couplage de la dihydroxyacétone phosphate avec un aldéhyde. Afin de réaliser cette réaction, nous avons développé une nouvelle synthèse d'un précurseur de la DHAP. Cette synthèse nous a permis d'étudier la réaction d'ouverture d'un époxyde par un phosphate, réaction très peu décrite dans la littérature. De plus, nous avons mis au point une nouvelle synthèse de la DHAP en quatre étapes avec un rendement global de 61 % à partir de (\pm)-glycidol.⁵⁴ Le rendement obtenu est de l'ordre de ceux des synthèses les plus récentes et, cette méthode offre l'avantage de pouvoir préparer la DHAP à partir d'une séquence de réaction courte et facile à mettre en œuvre à partir de glycidol racémique peu coûteux et à l'aide de réactifs non toxiques. Nous avons montré que le précurseur préparé est un composé stable qui peut être stocké pendant plusieurs mois à -18°C et, qu'il peut être hydrogénéolysé afin de donner la DHAP juste avant de réaliser les réactions catalysées par les enzymes. Ce composé est ainsi un matériau stock approprié pour obtenir la DHAP.

Nous avons également préparé deux analogues du DXP en utilisant la réaction d'aldolisation enzymatique. Cela nous a permis de mettre au point des conditions réactionnelles qui pourront être appliquées à la synthèse d'autres analogues du DXP.

- ¹ Gijsen H. J. M., Qiao L., Fitz W., Wong C.-H., *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 443-473 et références citées.
- ² Fessner W.-D., Schneider A., Eyrisch O., Sinerius G., Badia J., *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1183-1992.
- ³ Fessner W.-D., Sinerius G., Schneider A., Dreyer M., Schulz G. E., Nadia J., Aguilar J., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 555-569.
- ⁴ Alajarin R., Garcia-Junceda E., Wong C.-H., *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 4294-4295.
- ⁵ a. Lees, W. J.; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 1887-1894. b. Toone, E. J.; Simon, E. S.; Bednarski, M. D.; Whitesides, G. M. *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 5365-5422.
- ⁶ Henderson, I.; Sharpless, K. B.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 558-561.
- ⁷ a. Tolan D. R., Amsden A. B., Putney S. D., Urdea M. S., Penhoet E. E., *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 1127-1131. b. Leberherz H. G., *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 1650-1659.
- ⁸ Valentin M.-L., Bolte J., *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8103-8106.
- ⁹ a. Baldwin S.A., Perham R. N., Stribling D., *Biochem. J.*, **1978**, *169*, 633-636.
b. Hill H. A. O., Lobb R. R., Sharp S. L., Stokes A. M., Harris J. I., Jack R. S., *Biochem. J.* **1976**, *153*, 551-555.
c. von der Osten C. H., Barbas C. F. III, Wong C.-H., Sinskey A. J., *J. Mol. Microbiol.* **1989**, *3*, 1625-1632.
- ¹⁰ Bednarski M. D., Simon E. S., Bischofberger N., Fessner W.-D., Kim M.-J., Lees W., Saito T., Waldmann H., Whitesides G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 627-635.
- ¹¹ von der Osten C. H., Sinskey A. J., Barbas C. F. III, Pederson R. L. Wang Y.-F., Wong C.-H., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3924-3927.
- ¹² Chiu T.-H., Feingold D. S., *Biochemistry* **1969**, *8*, 98-108.
- ¹³ Fessner W.-D., Sinerius G., Schneider A., Dreyer M., Schulz G. E., Nadia J., Aguilar J., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 555-559.
- ¹⁴ Crow V. L., Thomas T. D., *J. Bacteriol.* **1982**, *151*, 600-604.
- ¹⁵ Eyrisch O., Sinerius G., Fessner W.-D., *Carbohydr. Res.* **1993**, *238*, 287-295.
- ¹⁶ Toone E. J., Simon E. S., Bednarski M. D., Whitesides G. M., *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 5365-5422.

-
- ¹⁷ Wong C.-H., Whitesides G. M., *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3199-3205.
- ¹⁸ Bischofberger N., Waldmann H., Saito T., Simon E. S., Lees W., Bednarski M. D., Whitesides G. M., *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3457-3465.
- ¹⁹ Fessner W.-D., Walter C., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 614-617.
- ²⁰ Crans D.C., Whitesides G. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7019-7027.
- ²¹ Simons E. T., Grabowski S., Whitesides G. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8920-8921.
- ²² Fessner W. D., Sinerius G., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 209-211.
- ²³ Schoevaart R., van Rantwijk F., Sheldon R. A., *Chem. Com.* **1999**, 2465-2466.
- ²⁴ Ballou C. E., L. Fischer H. O., *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, *78*, 1659-1661.
- ²⁵ Valentin M.-L., Bolte J., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1995**, *132*, 1167-1171.
- ²⁶ Gefflaut T., Lemaire M., Valentin M.-L., Bolte J., *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 5920-5922.
- ²⁷ Colbran R. L., Jones J. K. N., Matheson N. K., Rozema I., *Carbohydr. Res.*, **1967**, *4*, 355-358.
- ²⁸ Effenberger F., Straub A., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 1641-1644.
- ²⁹ Pederson R. L., Esker J., Wong C.-H., *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 2643-2648.
- ³⁰ Jung S.-H., Jeong J.-H., Miller P., Wong C.-H., *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 7182-7184.
- ³¹ Ouwerkerk, N.; van Boom, J. H.; Lugtenburg, J.; Raap, J. *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 861-866.
- ³² Ouwerkerk, N.; Steenweg, M.; de Ruijter, M.; van Boom, J. H.; Lugtenburg, J.; Raap, J. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 1480-1489.
- ³³ Sugimura T., Paquette L. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 3017-3024.
- ³⁴ Martin S. E., Garrone A., *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 549-552.
- ³⁵ Neidlein R., Li S., *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 97-102.
- ³⁶ Gefflaut T., Martin C., Delor S., Besse P., Veschambre H.; Bolte J., *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2296-2301.

- ³⁷ Oussaid B., Soufiaoui M., Garrigues B., *Synt. Comm.* **1995**, *25*, 871-875.
- ³⁸ Griffith W. P., Ley S. V., *Aldrichimica Acta*, **1990**, *23*, 13-19.
- ³⁹ Di Raddo P., Chan T.-Hang, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 16-17.
- ⁴⁰ a. Plante O. J., Palmacci E. R., Andrade R. B., Seeberger P.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 9545-9554. b. Hunt D. K., Seeberger H., *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2751-2754.
- ⁴¹ a. Adelt S., Plettenburg O., Stricker R., Reiser G., Altenbach H.-J., Vogel G., *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1262-1273. b. Plettenburg O., Adelt S., Vogel G., Altenbach H.-J., *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1057-1061.
- ⁴² Roussev C. D., Simeonov M. F., Petkov D. D., *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 5238-5240.
- ⁴³ a. Pederson R. L., Liu K.-C., Rutan J. F., Chen L., Wong C.-H., *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 4897-4901. b. Ghérard C., Alphand V., Archelas A., Demuyneck C., Hecquet L., Furtoss R., Bolte J., *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 3399-3402.
- ⁴⁴ Caron M., Sharpless K. B., *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1557-1560.
- ⁴⁵ Guivisdalsky P. N., Bittman R., *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4637-4642.
- ⁴⁶ Bonini C., Chiummiento L., Lopardo M. T., Pullez M., Colobert F., Solladié G., *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2695-2697.
- ⁴⁷ Kitaori K., Furukawa Y., Yoshimoto H., Otera J., *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 14381-14390.
- ⁴⁸ Lindberg J., Ekeröth J., Konradsson P., *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 194-199.
- ⁴⁹ de Viguerie N. L., Willson M., Périé J., *New J. Chem.*, **1994**, *18*, 1183-1195.
- ⁵⁰ Lee J., Kang J.-H., Lee S.-Y., Han K.-C., Torres C. M., Bhattacharyya D. K., Blumberg P. M., Marquez V. E., *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4129-4139.
- ⁵¹ Byun H.-S., Bittman R., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 2751-2754.
- ⁵² Schoevaart R., van Rantwijk F., Sheldon R. A., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 705-711.
- ⁵³ Turner N. J., Whitesides G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 624-627.
- ⁵⁴ Meyer O., Rohmer M., Grosdemange-Billiard C., *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7921-7923.

chapitre 4.

études biochimiques des analogues du DXP.

Introduction

Après avoir réalisé les synthèses de différents analogues du DXP, nous avons envisagé de déterminer leurs caractéristiques biochimiques sur la DXR. Cette partie du travail a été effectuée en collaboration avec Denis Tritsch (chargé de recherche) et Audrey Willem (étudiante de magistère).

La DXR catalyse la transformation du DXP en MEP en deux étapes, un réarrangement en 2-C-méthyl-D-érythrose 4-phosphate **33** suivie d'une réduction de la fonction aldéhydique pour donner le MEP **28**. La production de MEP nécessite la présence d'ions divalents comme le magnésium et de NADPH comme cofacteurs (Figure 128 et Introduction p. 25).

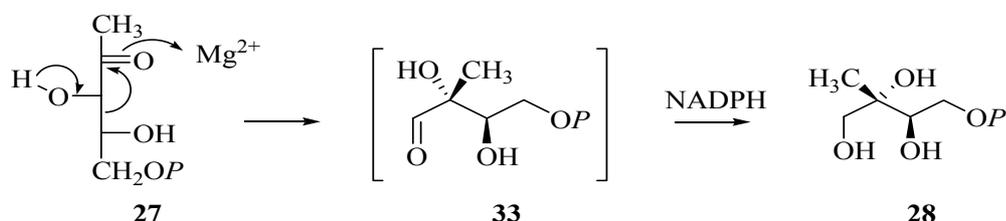


Figure 128. Etape catalysée par la DXR

Comme cette enzyme utilise un réducteur, le NADPH (Figure 129) qui est oxydé en $NADP^+$ lors de la transformation, l'activité enzymatique sera déterminée en suivant la diminution de l'absorbance à 340 nm, longueur d'onde à laquelle absorbe le NADPH.

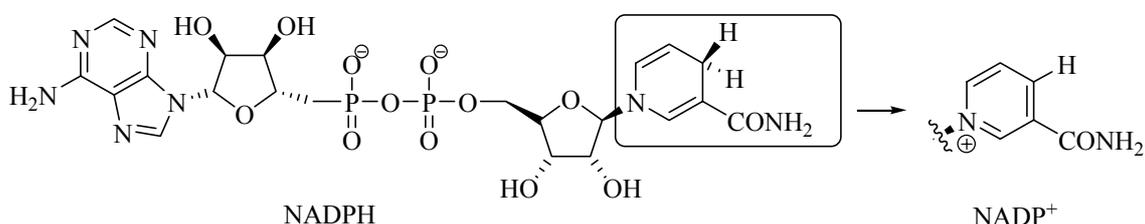


Figure 129. Structures du NADPH et du $NADP^+$

Si les analogues synthétisés sont substrats de la DXR, leur transformation pourra aisément être mise en évidence en suivant l'absorbance à 340 nm. Une diminution de l'absorbance correspondrait à une consommation de NADPH avec la formation possible des

analogues du MEP correspondants. La détermination des constantes cinétiques, le K_m (affinité de l'enzyme pour le substrat), le k_{cat} (activité de l'enzyme pour le substrat) permettra de comparer l'efficacité de la catalyse (k_{cat}/K_m) à celle de la transformation du DXP en MEP.

Si les analogues synthétisés se comportent comme des inhibiteurs de la DXR, c'est à dire qu'ils se fixent à l'enzyme et diminuent la vitesse de transformation du DXP en MEP, leur activité inhibitrice pourra être mise en évidence en comparant la vitesse de la réaction enzymatique mesurée en leur présence et en leur absence. Si un composé inhibe l'activité enzymatique, il sera intéressant de déterminer dans un premier temps la concentration en inhibiteur qui diminue de 50 % l'activité de l'enzyme (IC_{50}). La valeur de l' IC_{50} permet très rapidement de déterminer l'efficacité d'inhibition d'un composé par rapport à d'autres à condition d'utiliser les mêmes conditions expérimentales. En effet, les valeurs d' IC_{50} dépendent entre autre de la concentration en substrat utilisée pour mesurer l'activité enzymatique. Dans un second temps, la constante d'inhibition (K_i) pourra être déterminée ainsi que le mode d'inhibition du composé testé.

Les enzymes peuvent être désactivées de manière réversible ou irréversible. Parmi les inhibitions réversibles, il y a les inhibitions compétitives, incompétitives et non compétitives (Figure 130).

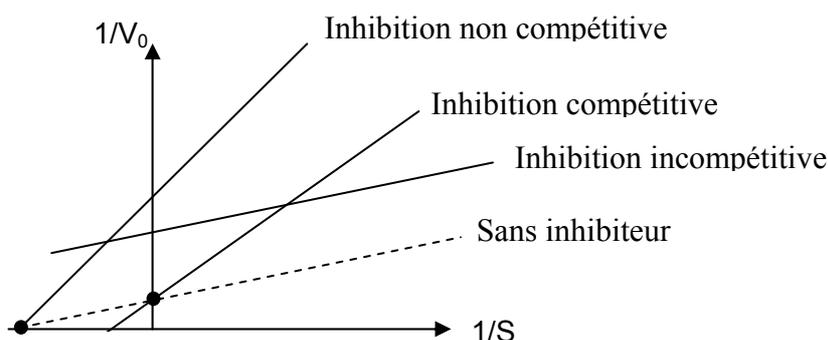


Figure 130. Représentation de Lineweaver et Burk.

Différences entre inhibition compétitive, incompétitive et non-compétitive.

En effet, si un inhibiteur se lie à une enzyme au site actif et empêche le substrat de s'y lier, on dit que le substrat et l'inhibiteur sont en compétition pour le site actif. Cela est souvent le cas lorsque l'inhibiteur possède une structure semblable à celle du substrat.

L'addition d'un inhibiteur compétitif conduit à une augmentation du K_m alors que la V_{max} ne change pas. Lorsqu'un inhibiteur se lie au complexe enzyme-substrat, mais pas à l'enzyme libre, il y a inhibition incompétitive. Graphiquement, pour une concentration donnée en inhibiteur, cela se traduit par l'obtention d'une droite parallèle à celle obtenue en l'absence d'inhibiteur. Par contre, un inhibiteur est dit de type non compétitif s'il se lie à la fois à l'enzyme et au complexe enzyme-substrat. Ce type d'inhibition dépend de la concentration en inhibiteur et de l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur. Dans ce cas, le K_m n'est pas modifié alors que la V_{max} est diminuée.

Les différents composés préalablement synthétisés (Figure 131) à savoir le DXP **27**, substrat de la DXR, les analogues phosphonates **58** et **59**, ainsi que les analogues trifluorés **62** et **63** du DXP ont été testés sur la DXR.

Dans un premier temps, nous avons déterminé si les composés se comportaient comme substrats de la DXR. Si tel était le cas, nous avons déterminé les constantes cinétiques de transformation et la nature du produit de la réaction. Pour les composés qui n'étaient pas transformés par l'enzyme, nous avons étudié leurs propriétés inhibitrices. Nous avons dans ce cas déterminé les IC_{50} , les constantes d'inhibition et leurs effets sur des cultures d'*E. coli*.

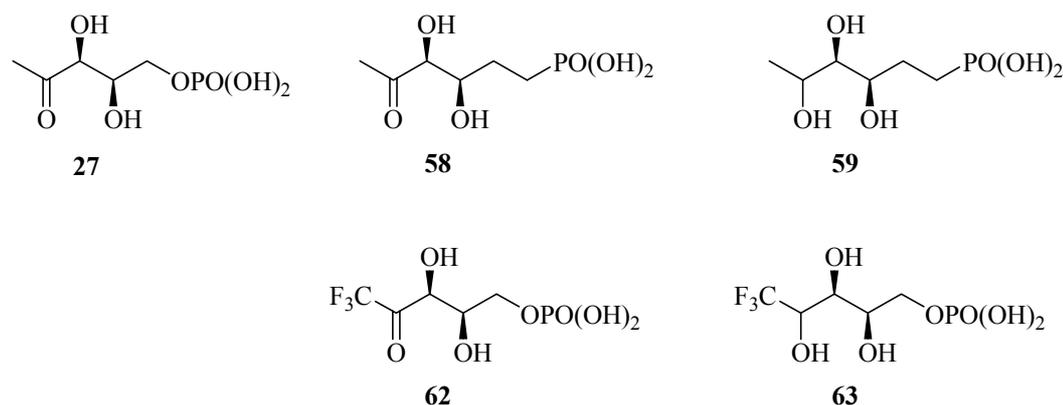


Figure 131. Analogues du DXP testés.

I. Test des composés en tant que substrats de la DXR

Parmi les composés testés seul l'analogue **58** (DXP_N) a conduit à une diminution de l'absorbance à 340 nm. Ainsi, l'enzyme pourrait transformer le DXP_N **58** en MEP_N **205**, l'analogue phosphonate du MEP (Figure 132).

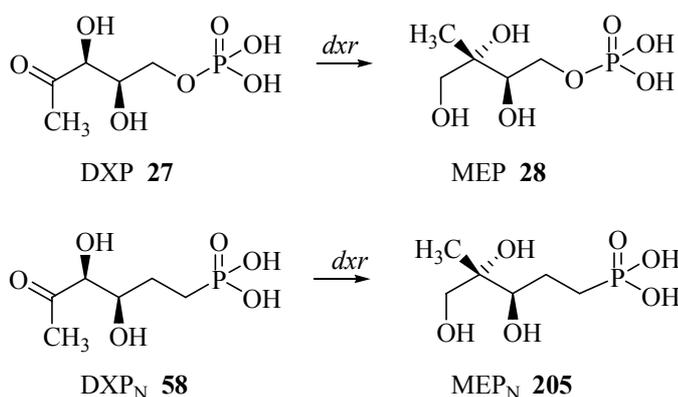


Figure 132. Transformation du DXP et du DXP_N par la DXR

Afin de confirmer ce résultat, nous avons décidé de suivre l'évolution de la réaction par RMN du phosphore.¹ Par rapport au test spectrophotométrique nous avons ajouté au milieu réactionnel du Na₂HPO₄ comme référence interne, de l'albumine de sérum de boeuf pour stabiliser l'enzyme car la réaction dure plusieurs heures. Un système de régénération du NADPH, de l'acide glutamique et de la glutamate déshydrogénase, a été additionné afin d'éviter l'inhibition de l'enzyme par un excès de NADPH et l'instabilité du NADPH en solution ainsi que son coût élevé.

Le spectre ³¹P RMN du DXP_N, dans les conditions de l'essai enzymatique montre un signal à 24.7 ppm (Figure 133, a, t = 0). Après addition de la DXR et incubation pendant 12 h à 37°C, nous avons noté une baisse de l'intensité du signal du DXP_N **58** concomitante à l'apparition d'un nouveau signal à 25.8 ppm, correspondant très certainement au MEP_N **205** (Figure 133, a, t = 12 h). En effet l'addition dans le tube RMN, de MEP_N **205** synthétisé chimiquement² a conduit à une augmentation de l'intensité du signal à 25.8 ppm (Figure 133, b). Par conséquent, la DXR catalyse non seulement le réarrangement du DXP_N mais encore la réduction ultérieure de l'aldéhyde intermédiaire.

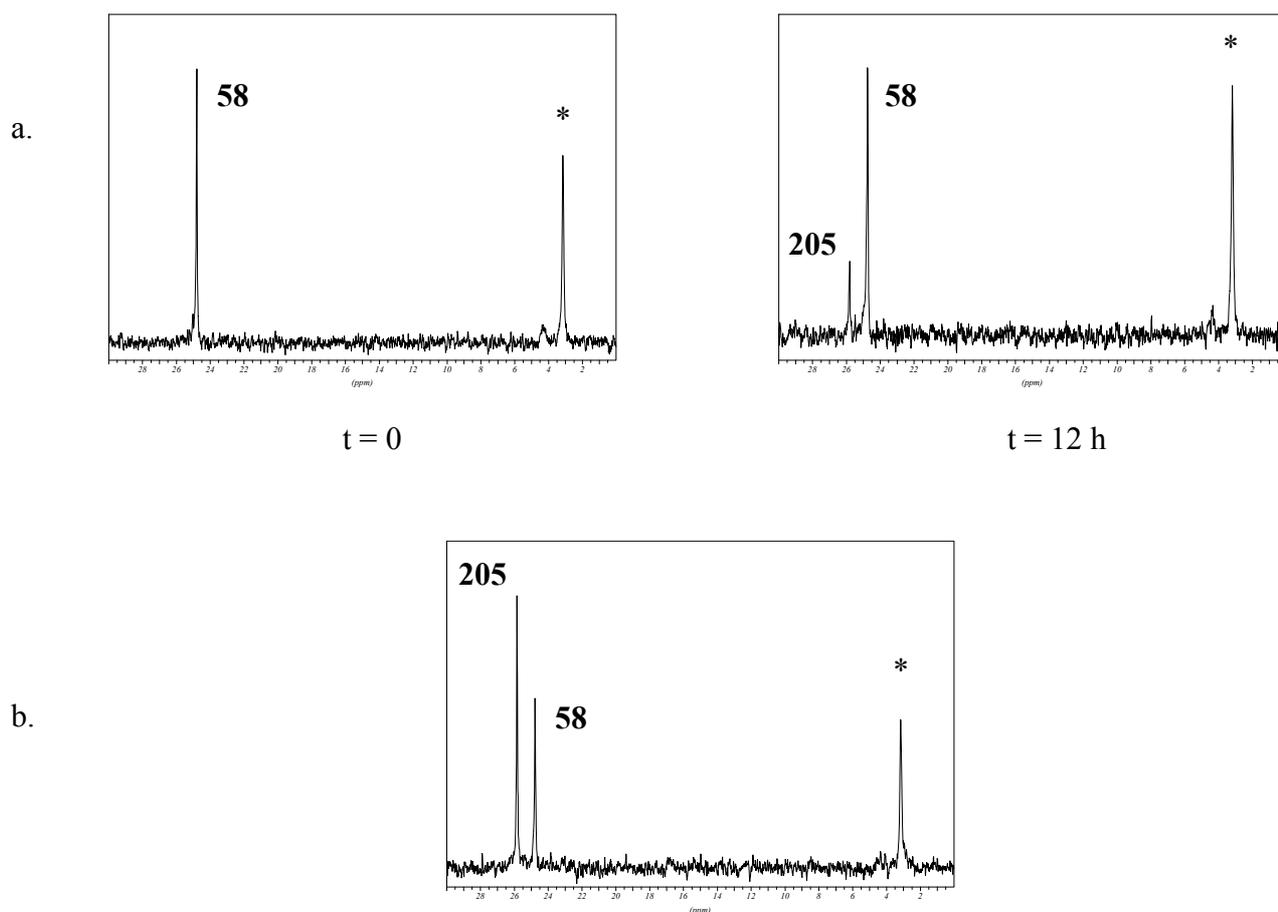


Figure 133. Spectres RMN du ^{31}P des essais enzymatiques

a) essais enzymatiques
 b) essais enzymatiques + MEP_N **205**
 * : Na₂HPO₄; **58** : DXP_N; **205** : MEP_N

Nous avons déterminé les constantes cinétiques du DXP et du DXP_N selon la méthode de Lineweaver-Burk dont l'équation est :

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

Ainsi, nous avons mesuré les vitesses initiales V_0 de transformation (pente de la partie linéaire de la courbe, Figure 134, A.) pour des concentrations variables en DXP ou DXP_N. La concentration en NADPH, deuxième substrat de la réaction enzymatique, a été maintenue constante et saturante. Nous avons ensuite tracé la droite de Lineweaver-Burk, c'est-à-dire $1/V_0$ en fonction de $1/S$ (Figure 134, B.). L'intersection de cette droite avec l'axe des

abscisses permet de déterminer le K_m et celle avec l'axe des ordonnées la V_{max} (k_{cat}). De plus la pente de la droite permet d'accéder au rapport k_{cat}/K_m qui est une constante de spécificité.

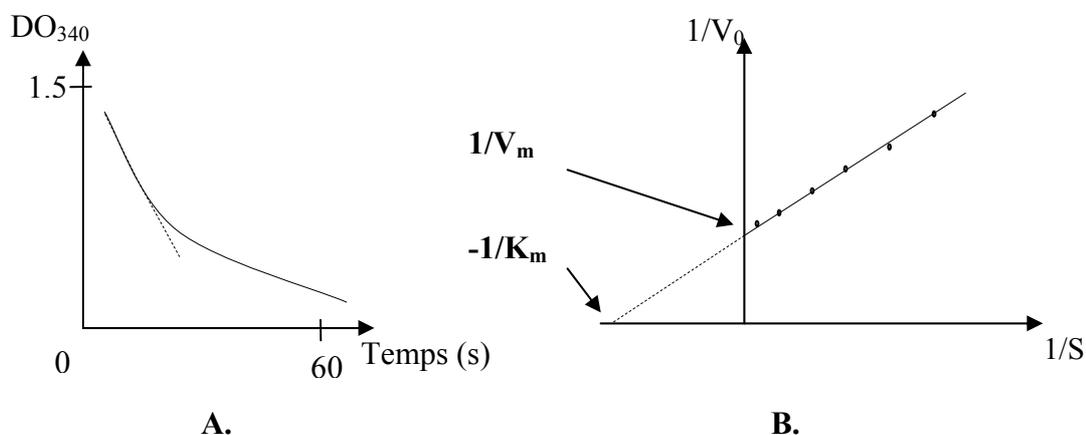


Figure 134. Détermination des constantes cinétiques

Les constantes cinétiques pour le DXP **27** et le DXP_N **58** sont résumées dans le tableau ci-dessous (Figure 135).

| | Substrat | K_m (μM) | k_{cat} (min^{-1}) | k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$) |
|----------|---------------------------|-------------------------|---------------------------------|---|
| 1 | DXP 27 | 30 | 740 | 24.7 |
| 2 | DXP_N 58 | 120 | 74 | 0.6 |

Figure 135. Valeurs de constantes cinétiques du DXP et du DXP_N

Nous avons noté une forte augmentation du K_m pour le DPX_N (4x) et une baisse de la vitesse de la réaction (10x) conduisant ainsi à une diminution de l'efficacité (40x) de la transformation du DPX_N **58** par la DXR par rapport au DXP.

Certains composés contenant une liaison C-P sont connus pour leurs propriétés antibactériennes, anti-virales et herbicides.³ Cela est essentiellement observé dans le cas d'enzymes catalysant l'hydrolyse d'un groupement phosphate. Les analogues phosphonates, isostériques des substrats naturels phosphates, sont souvent des inhibiteurs potentiels à cause

de la stabilité de ce groupement vis-à-vis de l'hydrolyse.⁴ Lorsque le groupement phosphonate n'est pas directement impliqué dans la réaction enzymatique, les analogues mimant les substrats naturels sont souvent transformés par l'enzyme.^{5,6,7} Comme le DXP_N mime le DXP, il n'a pas été surprenant qu'il soit reconnu et transformé par la DXR. Comme cela a été montré dans d'autres études, l'efficacité de la conversion est plus faible avec les analogues phosphonates qu'avec les substrats naturels. Il existe cependant quelques exemples pour lesquels les analogues ne sont pas transformés par les enzymes et notamment dans le cas de l'isomérisation de l'analogue phosphonate du phosphate de glycéraldéhyde et de DHAP catalysée par la triose phosphate isomérase.⁶

Plusieurs facteurs peuvent jouer un rôle quant aux différences observées au niveau des propriétés cinétiques pour le substrat naturel phosphate et son analogue phosphonate. Parmi ceux-ci, la perturbation des propriétés électroniques dues à l'introduction d'un groupement CH₂ électrodonneur à la place d'un atome d'oxygène électronégatif. La perte d'électronégativité est évaluée par la valeur du pK_a de la seconde déprotonation du groupement phosphonate qui est plus acide d'une unité de pK_a.⁴ La non-reconnaissance de l'analogue phosphonate de la DHAP par la triose phosphate isomérase a été attribuée au fait que l'enzyme se lie au substrat sous sa forme doublement ionisée et que l'analogue phosphonate est plutôt sous sa forme monoionisée de par l'augmentation du second pK_a.⁵ Ainsi, pour pallier à ce problème, le groupement CH₂ peut être remplacé par un groupement mono ou di-fluoré afin de rendre les analogues non seulement isostériques mais aussi isopolaires. Cependant, jusqu'à présent, nous n'avons pas pu synthétiser ces composés. Pourtant, si des améliorations de l'activité enzymatique (K_m et/ou V_{max}) ont été décrites, ce n'est pas souvent le cas.⁶ Ainsi d'autres facteurs que l'état d'ionisation du phosphonate jouent un rôle dans la fixation des analogues aux enzymes. Par exemple l'oxygène pontant du groupement phosphate peut être impliqué dans des interactions avec des acides aminés du site liant du substrat. De ce fait, son remplacement par un groupement CH₂ pourrait entraîner de légères modifications au niveau de la fixation de l'analogue par rapport au substrat naturel, mais suffisantes pour entraîner une diminution de la vitesse de transformation. Ainsi, le DXP_N n'est peut être pas idéalement placé dans le site actif de l'enzyme pour une catalyse optimale de la réaction.

Cependant, le DXP_N a d'une part une affinité plus faible, car le K_m est plus élevé et, d'autre part une vitesse beaucoup plus faible. Pour certaines enzymes il a été observé des augmentations de la vitesse de réaction avec des substrats ayant des affinités plus faibles. Cela est dû au fait que le produit de la réaction a une affinité plus faible et est relargué plus rapidement dans le milieu.

En ce qui concerne l'analogue trifluoré **62**, les analyses RMN montrent qu'en solution dans l'eau la fonction carbonyle est sous forme hydratée. Cela peut expliquer pourquoi ce composé n'est pas substrat de la DXR.

II. Détermination des constantes d'inhibition

Les propriétés inhibitrices des composés ne se comportant pas comme des substrats de la DXR ont été évaluées. Ils sont représentés sur la Figure 136.

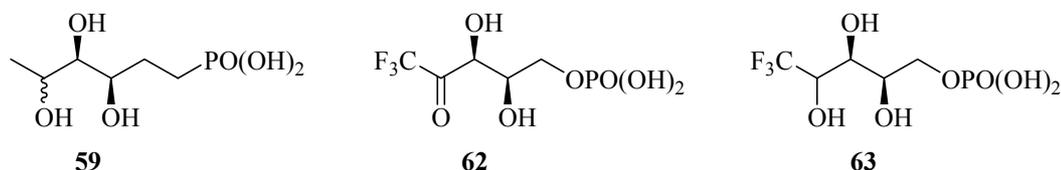


Figure 136. Composés inhibant la DXR

Nous avons d'abord déterminé l' IC_{50} de ces composés (Figure 137). Pour cela nous avons mesuré la vitesse de transformation du DXP en MEP en absence (Figure 137, A. droite en pointillé) et en présence d'inhibiteurs en concentrations croissantes (Figure 137, A). Ceci nous a permis de calculer le pourcentage d'activité à chaque concentration utilisée (activité = $V_{\text{inhibiteur}}/V_{\text{DXP}}$). L' IC_{50} a été déterminée en traçant le pourcentage d'activité en fonction du Log de la concentration en inhibiteur (Figure 137, B.)

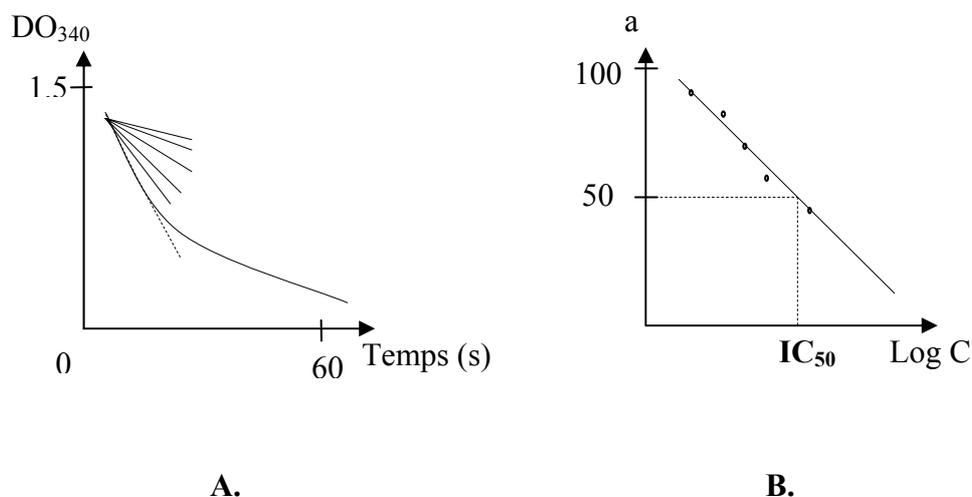


Figure 137. Détermination de l'IC₅₀

Les valeurs calculées pour les composés inhibant la DXR sont indiquées dans le tableau suivant (Figure 138) :

| | Composés | IC ₅₀ (mM) |
|---|----------|-----------------------|
| 1 | 59 | 2.3 |
| 2 | 62 | 1.7 |
| 3 | 63 | 0.6 |

Figure 138. IC₅₀ des analogues du DXP

La DXR reconnaît les trois analogues, mais l'affinité de l'enzyme pour les composés **59** et **62** est très faible. En ce qui concerne les composés fluorés, le groupement trifluorométhyle ne devrait pas provoquer une gêne stérique, car il a la même taille qu'un groupement méthyle. Par contre, la présence de deux fonctions hydroxyles vicinales du composé **62**, due à l'hydratation du carbonyle, semble empêcher une fixation optimale dans le site actif puisque le composé **63** avec une fonction hydroxyle en position C4 est un inhibiteur plus efficace.

Nous avons déterminé la constante d'inhibition K_i et le mode d'inhibition pour le mélange de diastéréomères **63**. Nous avons mesuré les vitesses de réaction pour des concentrations variables de DXP en présence du composé **63** à des concentrations croissantes. Nous avons ensuite reporté sur un même graphe $1/V_0$ en fonction de $1/[DXP]$ (Figure 139).

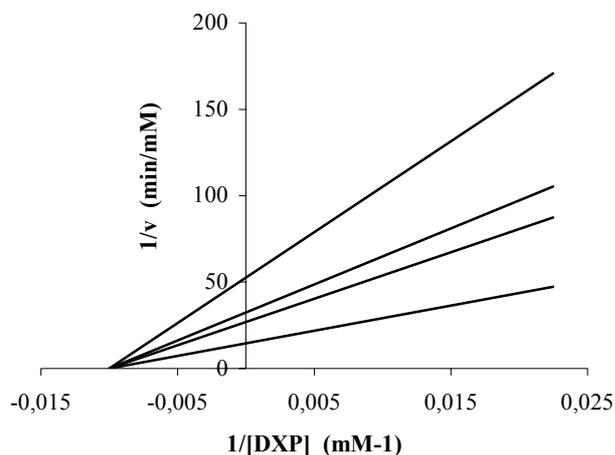


Figure 139. Détermination du type d'inhibition pour le composé **63**

Comme les différentes droites se coupent en un même point sur l'axe des abscisses et que les V_{max} diminuent pour des concentrations croissantes en inhibiteur, le composé **63** peut être considéré comme un inhibiteur non compétitif de la DXR. La constante d'inhibition est calculée en traçant la pente des droites obtenues dans la représentation de Lineweaver-Burk (Figure 139) en fonction de la concentration en inhibiteur. La droite obtenue coupe l'axe des abscisses au point d'abscisse $-K_i$.

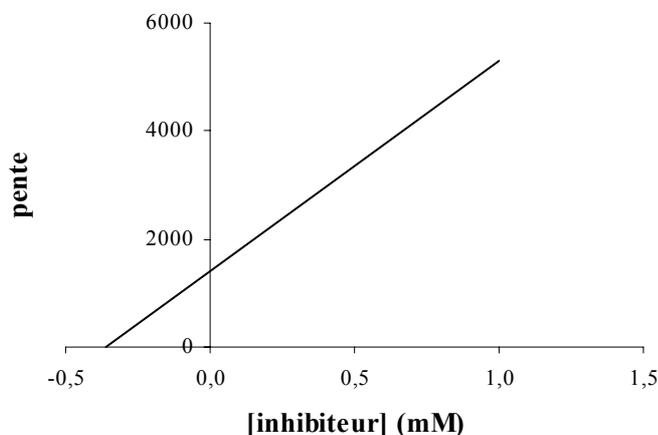


Figure 140. Détermination du K_i du composé **63**

Le K_i pour le composé **63** est de 0,36 mM. Comme c'est un mélange de deux diastéréomères, la valeur donnée pour le K_i devrait être plus faible pour l'un des deux diastéréomères si l'enzyme les reconnaît différemment. Bien que l'affinité pour le composé **63** soit plus faible que pour le DXP, il est cependant important de noter que ce composé se comporte comme un inhibiteur réversible non compétitif. Ainsi l'inhibition ne devrait pas être levée par une augmentation de la concentration en substrat comme c'est le cas pour une inhibition compétitive.

Le composé **59** qui est beaucoup moins efficace que le composé **63** a également un groupe hydroxyle en α du méthyle. Il n'est pas possible de conclure sur l'influence du groupe trifluorométhyle par rapport au groupe méthyle au niveau de la reconnaissance par l'enzyme. En effet le composé **59** est en série phosphonate alors que le composé **63** est en série phosphate. Comme dans le cas du DXP et DXP_N, la DXR devrait avoir une meilleure affinité pour l'analogue du composé **59** en série phosphate.

III. Test sur la croissance des bactéries

L'effet des composés synthétisés sur des cultures d'*E. coli* a été également testé en utilisant la méthode par diffusion. Des disques de papier imprégnés d'une quantité définie des différents composés sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec la suspension bactérienne. Les composés diffusent dans la gélose, y créant un gradient de concentration. Après incubation, chaque disque apparaît entouré d'une zone d'inhibition de croissance. L'efficacité du composé est estimée à partir de la mesure du diamètre de la zone d'inhibition. Plus il est grand, plus le composé est efficace.

Nous testés les analogues **58**, **59**, **62** et **63** du DXP (Figure 141) ainsi que deux antibiotiques, la fosmidomycine **36** et la fosfomycine **206**, connus pour empêcher la croissance d'*E. coli in vitro* (Figure 141).

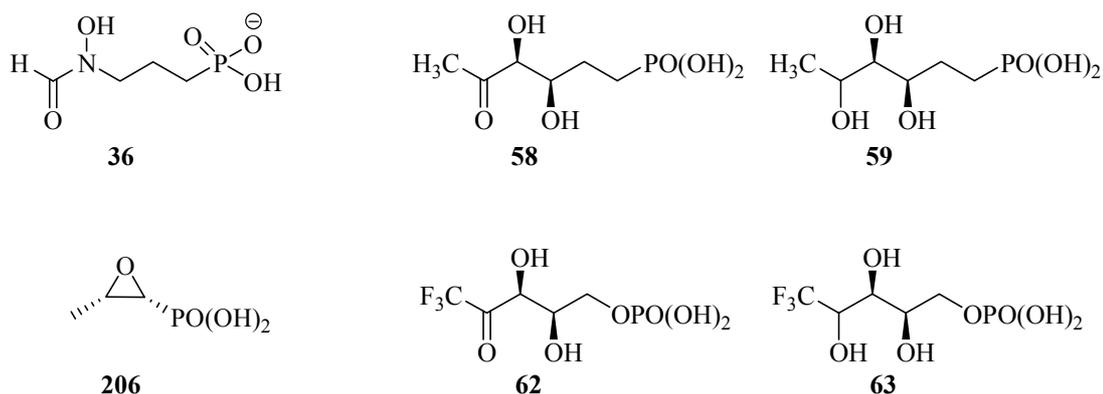
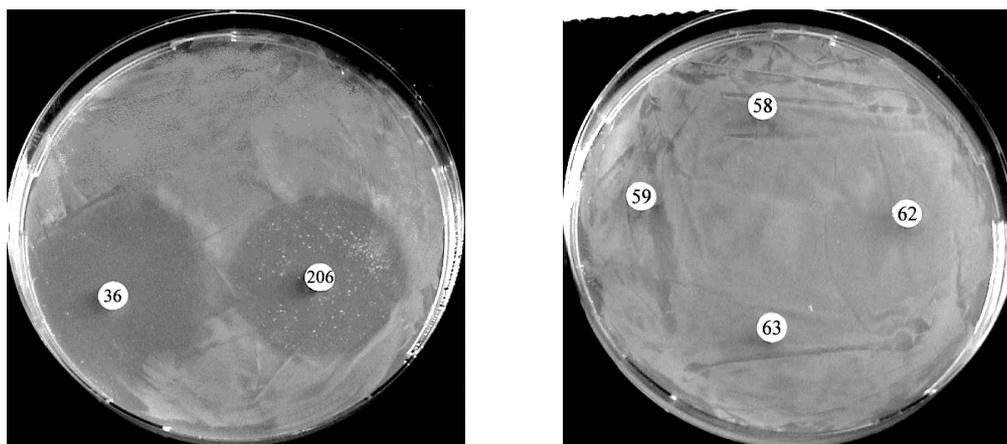


Figure 141. Composés testés sur les cultures d'*E. coli*

La multiplication des bactéries n'a pas été empêchée même avec une forte quantité (100 µg/disque) de produits (Figure 142, B). En effet, il n'y a pas apparition de disques d'inhibition. Par contre, en présence de la fosmidomycine **36** et de la fosfomycine **206** (Figure 142, A), la multiplication des bactéries est fortement inhibée avec des faibles quantités d'antibiotiques (10 µg/disque).



A. (10 µg/disque)

B. (100 µg/disque)

Figure 142. Test des analogues du DXP sur la croissance d'*E. coli*

De tels résultats n'étaient pas tellement inattendus. En effet, dans le cas du DXP_N, même s'il est incorporé dans les cellules, la DXR ayant moins d'affinité pour le DXP_N que pour le DXP, une forte concentration de phosphonate serait nécessaire pour influencer l'activité de l'enzyme. Du fait de la vitesse de transformation beaucoup plus faible que celle du DXP, le DXP_N se comporterait comme un inhibiteur compétitif. Une telle inhibition serait aisément levée par une augmentation de la concentration en DXP. Le MEP_N, obtenu lors de la transformation du DXP_N par la DXR, n'est pas non plus en mesure d'inhiber la croissance bactérienne.

De plus, il a été montré que les 1-fluoro- et 1,1 difluoro-DX n'ont pas d'activité sur des cultures d'*E. coli*.⁸ Cela a été attribué au fait que ces deux composés ne sont pas phosphorylés *in vivo* en analogues fluorés correspondant du DXP. Les résultats que nous avons obtenus avec les composés **57** et **58** suggèrent que même phosphorylés ces deux composés ne devraient pas inhiber la DXR de manière assez efficace pour empêcher la croissance des bactéries. C'est ce qui a été effectivement observé.

Pour ce qui est des composés en série phosphate, l'inefficacité à inhiber la croissance bactérienne est due au fait qu'ils sont incapables de traverser la membrane plasmique du fait de leur trop grande hydrophilie.

Conclusion

Nous avons montré que l'analogue phosphonate du DXP est substrat de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase et que ce composé est transformé en l'analogue phosphonate du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate. Les autres composés testés à savoir le phosphonate avec la fonction carbonyle réduite et les deux analogues fluorés se comportent comme des inhibiteurs de la DXR. Nous avons calculé les IC_{50} de ces composés et nous avons montré qu'elles sont de l'ordre du milli-molaire. De plus, nous avons déterminé le type d'inhibition pour l'analogue 1,1,1-trifluorométhyle ayant le carbonyle réduit. Nous avons montré que ce composé se comporte comme un inhibiteur réversible non compétitif.

Les analogues du DXP synthétisés sont des inhibiteurs faibles de la DXR. Afin d'améliorer l'efficacité des composés il faudrait préparer des analogues du DXP contenant une charge négative ainsi qu'une pince chélatante du cation divalent nécessaire à la transformation.

Des essais d'inhibition de croissance d'*E. coli* par les analogues du DXP ont été effectués, mais ils se sont révélés négatifs. Ce résultat peut être lié à une faible diffusion des composés à travers la paroi bactérienne où à une inhibition trop faible de la voie du MEP par ces composés. Des essais d'inhibition de croissance avec des molécules marquées radioactivement devraient permettre de déterminer si les composés sont incorporés dans l'organisme visé. Si les analogues du DXP ne diffusent pas à travers les membranes, des modifications chimiques pour les rendre plus lipophiles sont envisageables.

Il reste à tester l'analogue thiophosphate protégé **160** ainsi que les deux composés préparés par aldolisation enzymatique **203** et **204** (Figure 143).

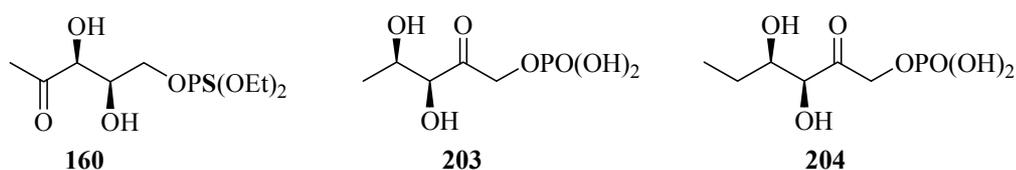


Figure 143. Composés à tester sur la DXR

- ¹ Meyer O., Grosdemange-Billiard C., Tritsch D., Rohmer M., *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 4367-4372.
- ² Hirsch G., Grosdemange-Billiard C., Tritsch D., Rohmer M., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 519-521.
- ³ Hilderbrand R. L., Henderson T. O., *The Role of Phosphonates in Living Systems*, ed. R. L. Hilderbrand, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, **1983**, pp. 5-29.
- ⁴ Engel R., *Chem. Rev.*, **1977**, *77*, 349-367.
- ⁵ Nieschalk J., Batsanov A. S., O'Hagan D., Howard J. A. K., *Tetrahedron*, **1995**, *52*, 165-176.
- ⁶ Berkowitz D. B., Bose M., *J. Fluorine Chem.*, **2001**, *112*, 13-33.
- ⁷ Arth H.-L., Sinerius G., Fessner W.-D., *Liebigs Ann.*, **1995**, 2037-2042.
- ⁸ Bouvet D., O'Hagan D., *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 10481-10486.

conclusion.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la recherche d'inhibiteur de la voie du MEP et plus particulièrement de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase (DXR), une cible potentielle pour le développement d'agents anti-bactérien.

Dans une première partie, nous avons mis au point une nouvelle synthèse du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP), substrat naturel de la DXR. Cette synthèse a permis d'accéder au DXP énantiomériquement pur en six étapes avec un rendement global de 60 %. De plus, cette synthèse a pu également être appliquée à la préparation de 1-désoxy-D-xylulose (DX) et d'isotopomères du DXP et du DX marqués par des deutériums en position 5. En effet, nous avons également synthétisé le $[5,5\text{-}^2\text{H}_2]\text{DXP}$, le DX et le $[5,5\text{-}^2\text{H}_2]\text{DX}$ énantiomériquement purs avec de bons rendements globaux. Les composés marqués ont été utilisés dans le cadre de différentes collaborations avec E. Świeżewska pour l'étude de la biosynthèse des polyprénols chez des cultures de racines de *Coluria geoides*, avec T. Bach pour les études de cross-talk entre la voie du MVA et du MEP chez des cellules de tabac et avec L. Vitova pour l'étude de la biosynthèse des cytokinines dans les chloroplastes.

Dans une seconde partie, nous avons synthétisé des analogues du DXP énantiomériquement purs à partir de chiron. En effet, l'analogue phosphonate et 1,1,1-trifluorométhyle ainsi que leurs dérivés pour lesquels le carbonyle est sous forme réduite ont été préparés.

Nous avons montré que l'analogue phosphonate du DXP est substrat de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase et que ce composé est transformé en l'analogue phosphonate du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate. Les autres composés testés à savoir le phosphonate avec la fonction carbonyle réduite et les deux analogues fluorés se comportent comme des inhibiteurs de la DXR. Nous avons calculé les IC_{50} de ces composés et nous avons montré qu'elles sont de l'ordre du milli-molaire. De plus, nous avons déterminé le type d'inhibition pour l'analogue 1,1,1-trifluorométhyle ayant le carbonyle réduit. Nous avons montré que ce composé se comporte comme un inhibiteur réversible non compétitif.

Des essais d'inhibition de croissance d'*E. coli* par les analogues du DXP ont été effectués, mais ils se sont révélés négatifs. Ce résultat peut être lié à une faible diffusion des

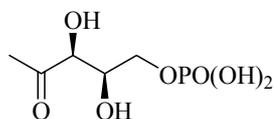
composés à travers la paroi bactérienne où à une inhibition trop faible de la voie du MEP par ces composés. Des essais d'inhibition de croissance avec des molécules marquées radioactivement devraient permettre de déterminer si les composés sont incorporés dans l'organisme visé. Si les analogues du DXP ne diffusent pas à travers les membranes, des modifications chimiques pour les rendre plus lipophiles sont envisageables.

Nous avons également cherché à préparer des analogues du DXP en utilisant la synthèse asymétrique. Pour cela, nous avons utilisé l'aldolisation enzymatique mettant en jeu la dihydroxyacétone phosphate et un aldéhyde. Afin de réaliser cette réaction, nous avons développé une nouvelle synthèse d'un précurseur de la DHAP. Cette synthèse nous a permis d'étudier la réaction d'ouverture d'un époxyde par un phosphate, réaction très peu décrite dans la littérature.

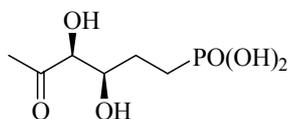
Les différentes approches utilisées ne nous ont pas permis de synthétiser des inhibiteurs efficaces de la DXR. La synthèse d'analogues du DXP contenant une charge négative ainsi qu'une pince chélatante du cation divalent nécessaire à la transformation pourrait être envisagée. De telles molécules pourraient être utilisées comme agents antibactériens ou antipaludéens.

partie expérimentale.

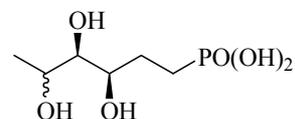
Produits synthétisés



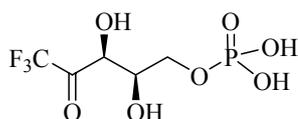
27



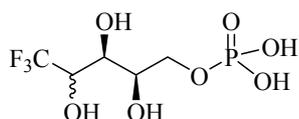
58



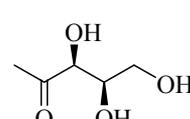
59



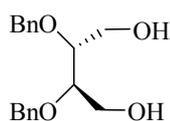
62



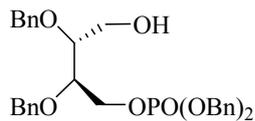
63



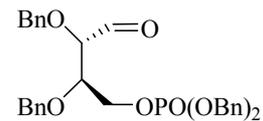
65



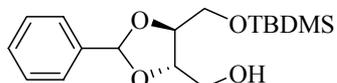
70



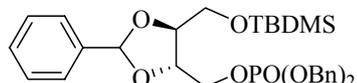
71



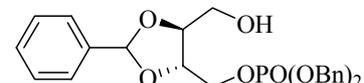
72



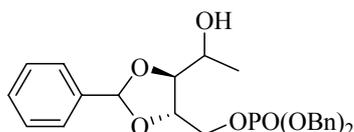
95



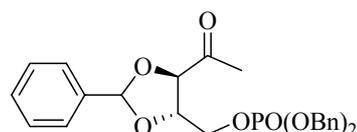
96



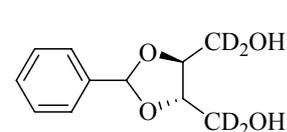
97



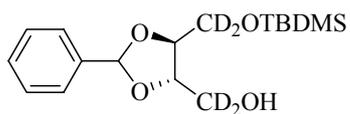
98



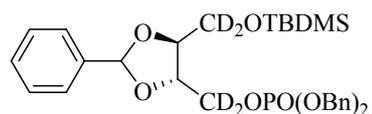
99



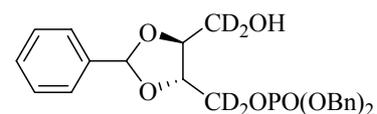
101



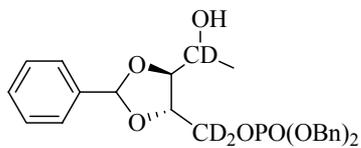
102



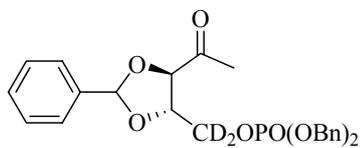
103



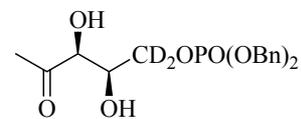
104



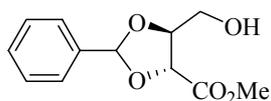
105



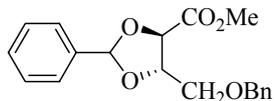
106



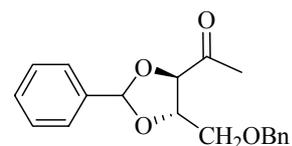
107



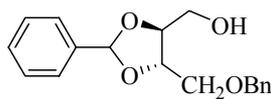
117



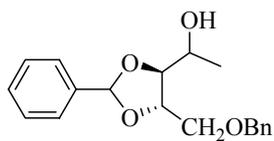
118



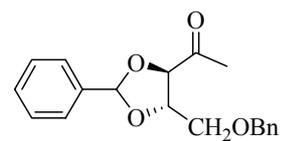
119



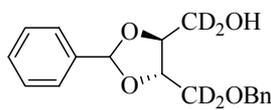
120



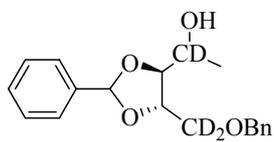
121



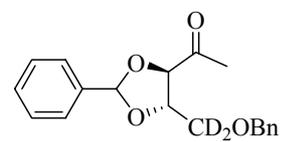
122



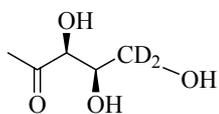
125



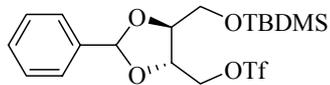
126



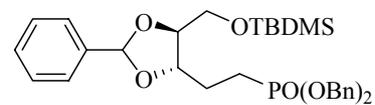
127



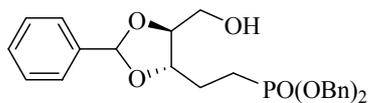
128



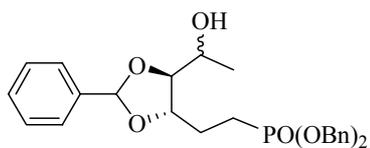
129



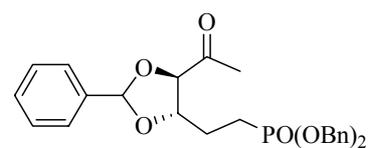
130



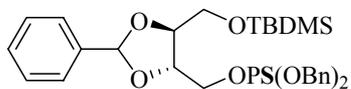
131



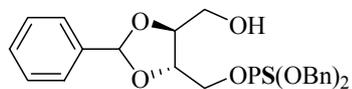
132



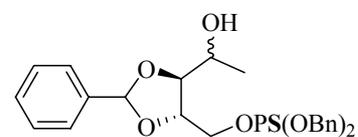
133



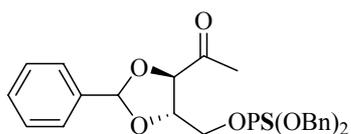
150



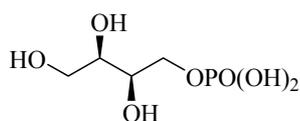
151



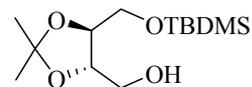
152



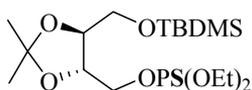
153



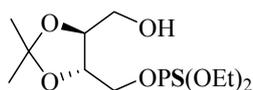
154



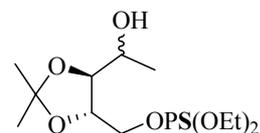
155



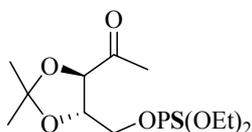
156



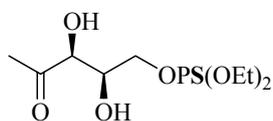
157



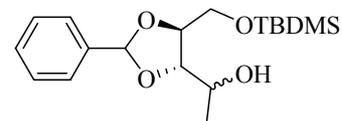
158



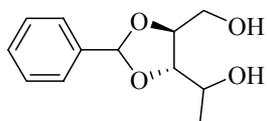
159



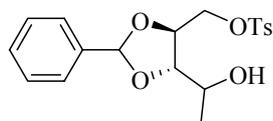
160



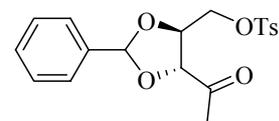
161



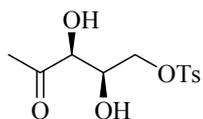
162



163



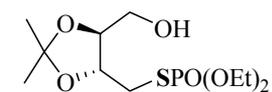
164



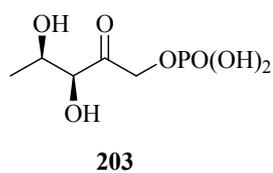
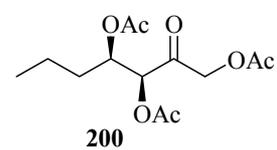
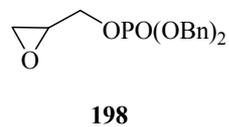
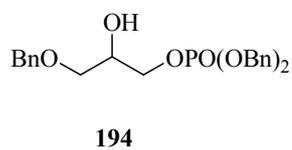
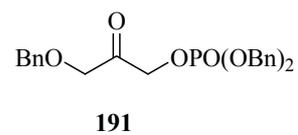
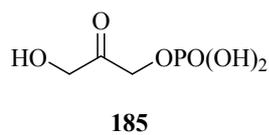
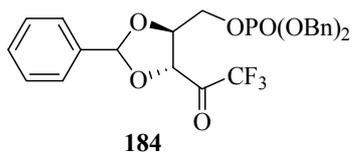
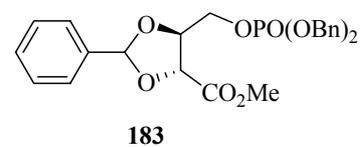
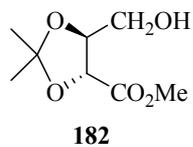
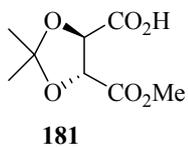
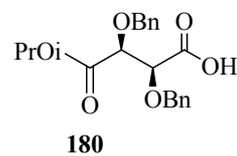
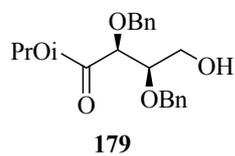
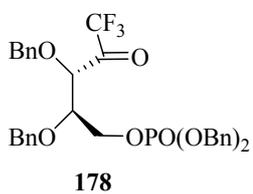
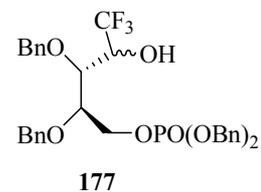
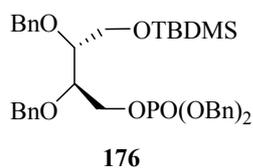
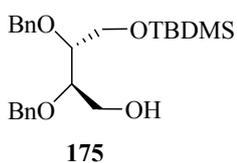
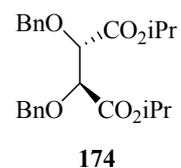
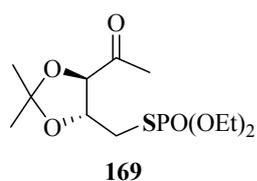
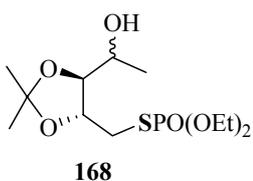
165



166



167



Généralités

Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince a été effectuée sur des plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ Merck. Les isoprénoïdes sont révélés sous lumières ultraviolettes à 360 nm après aspersion par une solution de chlorhydrate de berbérine à 0.1 % dans l'éthanol. Cette méthode de révélation est non destructrice. Les dérivés de glucide ont été révélés par chauffage supérieur à 100°C soit à l'aide d'une solution éthanolique contenant du *p*-anisaldéhyde (2.5 %), H₂SO₄ (3.5%), AcOH (1.6%) ou par un traitement avec une solution éthanolique d'acide phosphomolybdique (20%, Aldrich).

Les plaques analytiques sont de plaques commerciales Merck en aluminium de 0.2 mm d'épaisseur. Les plaques préparatives sont soit des plaques commerciales Merck 60 F₂₅₄ en verre (épaisseur de silice 0.25 mm) pour des quantités de produits inférieures à 10 mg, soit des plaques en verre préparées manuellement (épaisseur de silice 0.5 mm) pour des quantités de produits comprises entre 10 et 50 mg. Pour ces dernières, la silice Merck 60 PF₂₅₄ (200 g) est mise en suspension dans de l'eau distillée (485 mL) par agitation. Le gel est laissé au repos pendant 30 min, puis étalé sur les plaques de verre. Les plaques sont séchées pendant une nuit à température ambiante, puis activées dans une étuve à 120°C pendant 30 min.

Chromatographie sur colonne

La chromatographie éclair est réalisée sur du gel de silice Merck 60 de granulométrie 40-63 µm sous une pression d'azote. Le diamètre de la colonne est choisi en fonction de la quantité de produit à séparer. Généralement, la hauteur de silice est de 15 cm et le débit est fixé à 5 cm/min.

Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ou du carbone ont été enregistrés à 300 K, soit sur un appareil BRUKER WP-200 SY (RMN ^1H : 200 MHz, RMN ^{13}C : 50 MHz), soit sur des appareils BRUKER AC 300 ou AV300 (RMN ^1H : 300 MHz, RMN ^{13}C : 75 MHz, RMN ^{31}P : 121.5 MHz), soit sur un appareil BRUKER AM 400 (RMN ^2H : 61 MHz) en utilisant des solutions dans le chloroforme deutérié, de l'eau lourde ou du méthanol deutérié. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm en prenant comme référence le signal du CHCl_3 ($\delta = 7.26$ ppm) en RMN ^1H et celui de CDCl_3 ($\delta = 77.0$ ppm) en RMN ^{13}C pour des spectres enregistrés en solution dans CDCl_3 , le signal de DHO ($\delta = 4.56$ ppm) en RMN ^1H pour des spectres enregistrés en solution dans D_2O , le signal du MeOH ($\delta = 3.30$ ppm) en RMN ^1H et celui de CD_3OD ($\delta = 49.0$ ppm) en RMN ^{13}C pour des spectres enregistrés en solution dans CD_3OD .

Les abréviations s, d, t, q, hept et m désignent respectivement la multiplicité du signal : singulet, doublet, triplet, quadruplet, heptuplet et multiplet. Les constantes de couplages sont exprimées en Hertz. Lors de la description de spectres correspondant à un mélange de diastéréomères, les signaux des différents diastéréomères sont distingués par les signes *, § et # ajoutés aux attributions. De plus, si un seul signal est décrit, il est commun à tous les diastéréomères.

Spectrométrie de masse

Les spectres de masse ont été obtenus en impact électronique (énergie d'ionisation : 70 eV) en introduction directe ou par couplage CG-SM, soit sur un appareil FINNINGAN INCOS 50 couplé à un chromatographe en phase gazeuse VARIAN équipé d'un injecteur « on column » et d'un ordinateur DATA GENERAL DG-10, soit un appareil FINNINGAN MAT TSQ 700 couplé à un chromatographe en phase gazeuse VARIAN 3400 également équipé d'un injecteur « on column » et d'un ordinateur US DESIGN 11-73. La température de la source pour l'appareil de FINNINGAN MAT INCOS 50 est 150°C , alors que pour l'appareil de FINNINGAN MATS Q 700 est de 200°C .

Les colonnes capillaire en silice fondue (30 m x 0.25 mm) contiennent une phase stationnaire apolaire de type DB 5, DB 5 HT ou DB 5 MS. L'épaisseur du film est de 0.1 μm . Les programmes de montée en température sont adaptés aux produits analysés.

Le gaz utilisé pour l'ionisation chimique est l'isobutane.

La spectrométrie de masse FAB a été réalisée sur un appareil ZAB-HF avec un potentiel d'accélération de 8 KeV en utilisant comme matrice de l'alcool *m*-nitrobenzyle ou le glycérol en présence d'iodure de sodium et le xénon comme gaz ionisant. La spectrométrie de masse FAB à haute résolution est réalisée sur le même appareil en utilisant un mélange de polyéthylèneglycol et d'iodure de sodium dans le glycérol.

Les spectres de masse des composés ioniques ont été enregistrés en mode électrospray sur un spectromètre de masse MSD (Agilent).

Remarque : Les analyses de masse exacte n'ont été effectuées que pour les composés n'ayant jamais été décrits précédemment dans la littérature.

Infrarouge

Les spectres infrarouge ont été enregistrés sur un spectromètre Nicolet Avatar 320 FT-IR en utilisant des disques de KBr pour les composés solides et des cellules de NaCl d'épaisseur de 0.2 mm pour les composés sous forme d'huiles mises en solution du chloroforme.

Spectrophotométrie UV/Visible

Les spectres d'absorption en ultraviolet/visible ont été enregistrés sur un appareil Uvikon 933 (Kontron Instruments), à partir de produits en solution dans l'hexane, utilisant des cuves en quartz. Les réactions enzymatiques sont réalisées dans des tampons et suivies en mesurant la variation de l'absorbance à 340 nm de NADPH ou de NADP⁺.

Pouvoir rotatoire

L'activité optique des composés a été mesurée sur un polarimètre Perkin Elmer 341 en utilisant solubilisant les produits dans du chloroforme, de l'éthanol ou de l'eau.

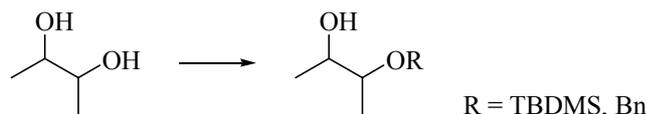
Point de fusion

Les points de fusion de fusion ont été mesurés avec un microscope à platine chauffante Reichert.

Modes opératoires

1. Protections

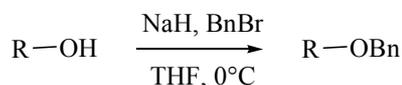
* 1A. Monoprotection d'un diol



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **95**, **102**, **120**, **125**, **155**, **175**

A une solution portée à 0 °C de diol (1 éq.) dans du 1,2-diméthoxyethane (2.5 mL/mmol), est ajouté par petites portions de l'hydrure de sodium (1.1 éq.). Le mélange réactionnel est agité pendant 15 minutes à 0 °C puis du chlorure de *t*-butyldiméthylsilyléther (1.1 éq.) ou de bromure de benzyle (1.1 éq.) est ajouté. Lorsque le produit de départ est entièrement consommé, la réaction est arrêtée par addition d'une solution saturée de chlorure d'ammonium. La phase aqueuse est extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

* 1B. Benzylation



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **118**, **174**

A une solution portée à 0 °C de diol (1 éq.) dans du THF (2 mL/mmol), est ajouté par petites portions de l'hydrure de sodium (1.5 éq.). Le mélange réactionnel est agité pendant 30 minutes à 0 °C puis du bromure de benzyle (1.5 éq.) est ajouté. Lorsque le produit de départ est entièrement consommé, la réaction est arrêtée par addition d'une solution saturée de

chlorure d'ammonium. La phase aqueuse est extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

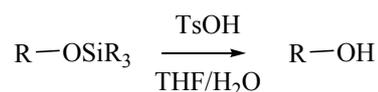
2. Déprotections

* 2A. Déprotection d'un groupement silylé



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **71**, **97**, **104**, **131**, **151**, **157**, **162**

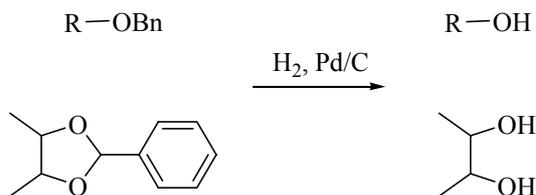
A une solution d'alcool protégé (1 éq.) dans du THF (10 mL/mmol) est ajouté du Bu_4NF (1.5 éq.). Lorsqu'il ne reste plus de produit de départ, le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie-éclair.



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **167**

A une solution d'alcool protégé (1 éq.) dans du THF/ H_2O (20/1, 5 mL/mmol) est ajouté le TsOH (1.5 éq.). Lorsqu'il ne reste plus de produit de départ, une solution saturée de Na_2CO_3 est ajoutée ainsi que du diéthyléther. La phase aqueuse est extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

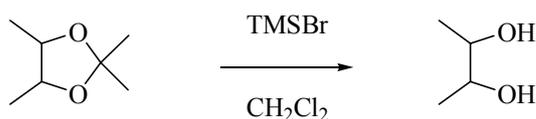
× **2B. Hydrogénation**



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **27, 58, 59, 62, 63, 65, 107, 128, 165, 185**

Le composé est déprotégé par hydrogénation catalytique sur 10 à 15 % de Pd/C dans un mélange MeOH/H₂O (9:1) ou de *i*PrOH/H₂O (9:1) (20 mL/mmol) pendant 1 h à température ambiante et à pression atmosphérique. Le brut réactionnel est filtré sur célite et le filtrat est évaporé. Le résidu est dissous dans de l'eau et la solution neutralisée par addition d'une solution de soude 1M. La solution du sel mono sodique est lyophilisée et donne une solide incolore.

× **2C. Déprotection d'un isopropylidène**

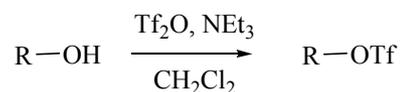


⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **154**

A une solution d'alcool protégé (1 éq.) dans du CH₂Cl₂ (10 mL/mmol) à 0 °C est ajouté gouttes à gouttes le TMSBr (10 éq.). Le mélange réactionnel est agité pendant 3 h puis une solution de soude 1M est ajoutée. Après 30 min d'agitation, les deux phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

3. Activation d'alcool

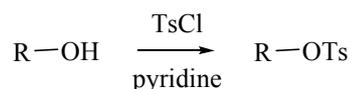
* 3A. Formation d'un triflate



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **129**

A une solution d'alcool (1 éq.) et de triéthylamine (2.9 éq.) dans du CH₂Cl₂ (7 mL/mmol) à - 50 °C est ajouté gouttes à gouttes de l'anhydride triflique (2 éq.). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h à - 40 °C, puis la solution est portée à 0°C et traitée par une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. La phase organique est lavée avec de l'eau et une solution saturée de NaCl. Chaque phase aqueuse est ensuite extraite avec du chloroforme. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

* 3B. Formation d'un tosylate

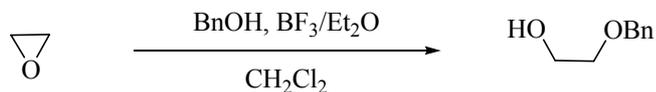


⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **163**

A une solution d'alcool (1 éq.) dans de la pyridine (10 mL/mmol) est ajouté le chlorure de tosyloxy (1.1 éq.). Lorsqu'il ne reste plus de produit de départ, la solution est diluée avec de l'eau et du diéthyléther. La phase organique est lavée avec une solution à 0.2 M d'HCl, de l'eau, une solution saturée de NaHCO₃, une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

4. Ouverture d'époxyde

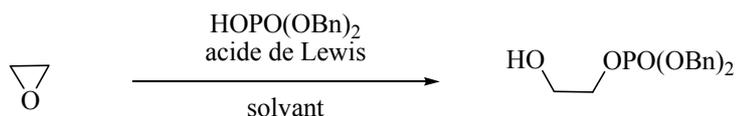
* 4A. Ouverture par BnOH



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **194**

A une solution d'époxyde (1 éq.) dans du CH_2Cl_2 (6 mL/mmol) est ajouté l'alcool benzylique (3 éq.) et le $\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}$ (0.3 éq.). Lorsqu'il ne reste plus de produit de départ, la solution est filtrée sur un fritté et le filtrat est lavé avec une solution saturée de NaHCO_3 et de NaCl . Les phases aqueuses sont extraites avec de l'acétate d'éthyle et les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

* 4B. Ouverture par un phosphate

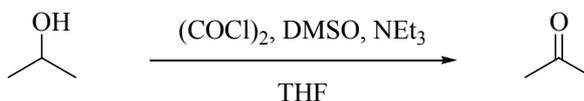


⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **191**

A une solution d'époxyde (1 éq.) dans du solvant (10 mL/mmol) est ajouté le phosphate de dibenzyle (2 éq.) et l'acide de Lewis. Lorsqu'il ne reste plus de produit de départ, la solution est lavée avec une solution saturée de NaHCO_3 , de NaCl et d'eau. Les phases aqueuses sont extraites avec du CH_2Cl_2 et les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

5. Oxydations

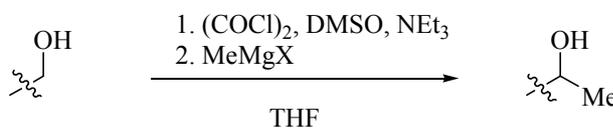
✖ 5A. Swern



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **172**

A une solution de chlorure d'oxalyle (3,3 éq.) dans du THF (5 mL/mmol) à -78°C est ajouté du diméthyl sulfoxyde (3,5 éq.). La solution est portée à -35°C pendant 5 min puis est refroidie à nouveau à -78°C . Une solution de l'alcool (1 éq.) dans du THF (5 mL/mmol) est ajoutée au milieu par canulation. Le brut réactionnel est porté à -35°C et après 15 min d'agitation de la triéthylamine (5 éq.) est additionnée. Lorsqu'il ne reste plus de produit de départ, la solution est diluée avec une solution saturée de chlorure d'ammonium, de l'eau et du diéthyléther. La phase aqueuse est extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu jaune est purifié par chromatographie-éclair.

✖ 5B. Swern-Ireland

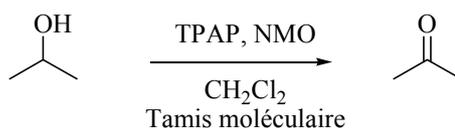


⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **98, 105, 121, 126, 132, 152, 158, 161, 168**

A une solution de chlorure d'oxalyle (3,3 éq.) dans du THF (5 mL/mmol) à -78°C est ajouté du diméthyl sulfoxyde (3,5 éq.). La solution est portée à -35°C pendant 5 min puis est refroidie à nouveau à -78°C . Une solution de l'alcool (1 éq.) dans du THF (5 mL/mmol) est

ajoutée au milieu par canulation. Le brut réactionnel est porté à -35°C et après 15 min d'agitation de la triéthylamine (5 éq.) est additionnée. La solution est agitée pendant 1 h à température ambiante puis refroidie à -78°C . Une solution de chlorure de méthyl magnesium à 3M dans du diéthyléther (4 éq.) est ensuite ajoutée goutte à goutte. L'évolution de la réaction est suivie par CCM jusqu'à disparition de l'aldéhyde. La solution est ensuite diluée avec de l'éthanol, une solution saturée de chlorure d'ammonium, de l'eau et du diéthyléther. La phase aqueuse est extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu jaune est purifié par chromatographie-éclair.

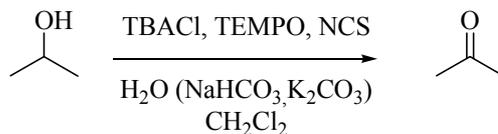
× **5C. TPAP/NMO**



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **99, 106, 122, 127, 133, 153, 159, 163, 169, 172, 191**

A une solution de l'alcool (1 éq.) dans du dichlorométhane (2 mL/mmol) sont ajoutés du tamis moléculaire (4 Å) activé, de la *N*-méthylmorpholine-*N*-oxyde (3,5 éq.) et du TPAP (0.1 éq.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante et l'évolution de la réaction est suivi par CCM jusqu'à disparition du produit de départ. Le brut réactionnel est ensuite filtré sur un fritté contenant de la célite. Le solide est lavé à l'acétate d'éthyle et le filtrat est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

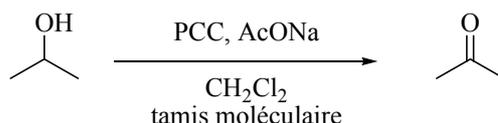
× **5D. TBACl, TEMPO, NCS**



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **172**

A un mélange 1/1 de CH_2Cl_2 (10 mL/mmol) et de tampon carbonate (10 mL/mmol, $[\text{NaHCO}_3]=0.5\text{M}$, $[\text{K}_2\text{CO}_3]=0.05\text{M}$) sont ajoutés l'alcool (1 éq.), le TEMPO (0.1 éq.) et le TBACl (0.1 éq.). La solution est agitée vigoureusement puis la NCS est ajoutée (1.4 éq.). a nouveau, le milieu réactionnel est agité très fortement. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont regroupées, lavées avec une solution de NaCl saturée, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

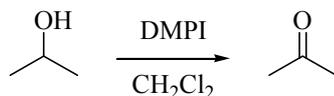
× **5E. PCC**



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **72, 172**

A une solution de l'alcool (1 éq.) dans du dichlorométhane (20 mL/mmol) sont ajoutés du tamis moléculaire (4 Å) activé, le PCC (3 éq.) et de l'acétate de sodium (1.3 éq.). L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Lorsque le produit de départ est consommé, de l'éther est ajouté (30 mL/mmol) et la solution est agitée pendant 30 min. Le brut réactionnel est ensuite filtré sur un fritté contenant de la célite. Le solide est lavé à l'éther et le filtrat est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

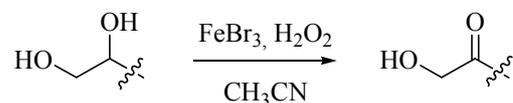
× **5F. Dess-Martin**



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **178**

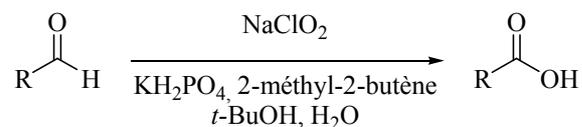
A une solution de l'alcool (1 éq.) dans du dichlorométhane (15 mL/mmol) est ajouté le DMPI (3.5 éq.). L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Lorsque le produit de départ est consommé, le brut réactionnel est ajouté à une solution saturée de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{Na}_2\text{CO}_3$ et la solution est agitée pendant 10 min. La phase organique est ensuite lavée avec une solution saturée de NaHCO_3 et avec de l'eau. Les phases aqueuses sont extraites avec de l'éther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

× **5G. $\text{FeBr}_3/\text{H}_2\text{O}_2$**



A une solution de l'alcool (1 éq.) dans de l'acétonitrile (1.5 mL/mmol) est ajouté le FeBr_3 (0.3 éq.) et l'eau oxygénée (5 éq.). L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Lorsque le produit de départ est consommé, du CH_2Cl_2 est ajouté et les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

✖ **5G. NaClO₂**

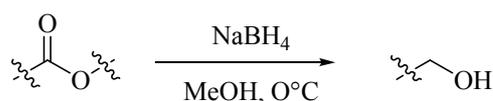


⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **140**

A une solution de l'aldéhyde (1 éq.) dans du *t*-butanol (8 mL/mmol) sont ajoutés le 2-méthyl-2-butène (4 éq.), le phosphate (1 éq.) et le NaClO₂ dans de l'eau (2 mL/mmol). L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Lorsque le produit de départ est consommé, de l'eau et de l'acétate d'éthyle sont ajoutés et, les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est acidifiée à pH 1 puis extraite avec du CH₂Cl₂. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

6. Réductions

✖ **6A. NaBH₄**



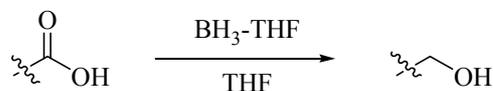
⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **117**

A une solution de l'ester (1 éq.) dans du méthanol (1 mL/mmol) à 0°C est ajouté le NaBH₄ par petites portions en 1 h. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Le brut réactionnel est ensuite évaporé et, au résidu ainsi obtenu sont ajoutés de l'eau et de l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

* **6B. LiAlH₄**

⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **70, 101**

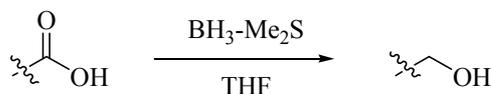
A une solution de l'ester (1 éq.) dans du THF (8 mL/mmol) à 0°C est ajouté le LiAlH₄ par petites portions. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Une solution saturée de tartrate de sodium et de potassium est ensuite ajoutée lentement à la solution grise, ainsi que de l'éther. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

* **6C. BH₃-THF**

⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **179, 182**

A une solution de l'acide (1 éq.) dans du THF (15 mL/mmol) à 0°C est ajouté le borane (1 éq.). L'évolution de la réaction est suivie par CCM. La solution est ensuite acidifiée par ajout d'une solution à 50 % d'acide acétique. Les solvants sont évaporés et le résidu ainsi obtenu est mis en solution dans une solution saturée de NaHCO₃. Cette phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

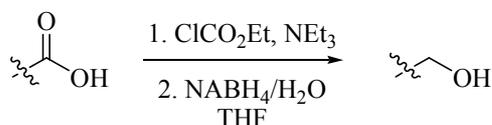
✕ **6D. BH₃-Me₂S**



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **182**

A une solution de l'acide (1 éq.) dans du THF (7 mL/mmol) est ajouté le borane (1.1 éq.). L'évolution de la réaction est suivie par CCM. La solution est ensuite diluée par ajout d'eau puis neutralisée à pH 7 avec du Na₂CO₃. De l'éther est ajouté et la phase aqueuse est extraite avec de l'éther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

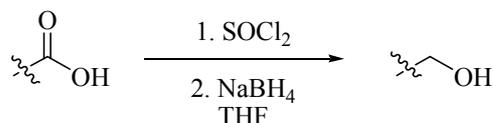
✕ **6E. Passage par un anhydride mixte**



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **182**

A une solution de l'acide (1 éq.) dans du THF (4 mL/mmol) à 0°C sont ajoutés la NEt₃ (1.05 éq.) et le ClCO₂Et (1.02 éq.). Lorsque tout l'acide est consommé, le précipité formé est éliminé par filtration et le filtrat est additionné lentement à une solution à 0°C de NaBH₄ (2éq.) dans de l'eau (3 mL/mmol). L'évolution de la réaction est suivie par CCM. La solution est ensuite acidifiée à pH 3 avec une solution d'HCl. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées, lavées deux fois avec une solution de NaOH 1 M et de NaCl_{sat.}, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

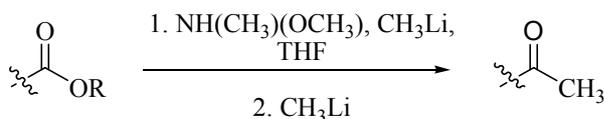
✕ **6F. Passage par un chlorure d'acide**



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **182**

L'acide (1 éq.) est mis en solution dans du SOCl_2 (4 mL/mmol) et le mélange est chauffé à reflux. Lorsque tout l'acide a réagi, du THF est ajouté et les solvants sont évaporés. Cette opération est répétée plusieurs fois. Le résidu jaune est ensuite mis en solution dans du THF (4 mL/mmol) et du NaBH_4 (1.2 éq.) est ajouté à 0°C . La réaction est suivie par CCM. De l'eau et du CH_2Cl_2 sont ajoutés et la phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

7. Transformation d'un ester en cétone via l'amide de Weinreb

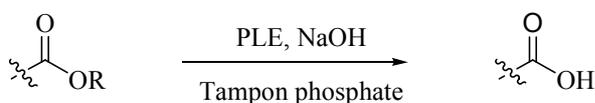


⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **119**

A une suspension du sel d'amine (1.6 éq.) dans du THF (1 mL/mmol) à 0°C est ajouté le méthyllithien (3.2 éq.). Après 10 min. d'agitation, l'ester (1 éq.) dans du THF (3 mL/mmol) est ajouté. Lorsque tout l'ester est consommé, du méthyllithien (2.6 éq.) est à nouveau ajouté. L'évolution de la réaction est suivie par CCM jusqu'à disparition de l'amide de Weinreb. La solution est ensuite diluée avec une solution saturée de chlorure d'ammonium, de l'eau et du

diéthyléther. La phase aqueuse est extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu jaune est purifié par chromatographie-éclair.

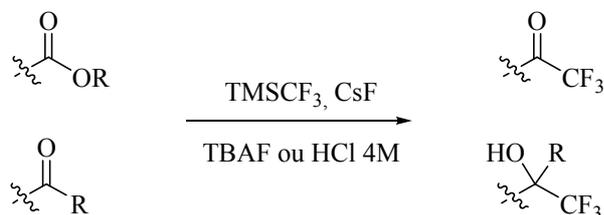
8. Hydrolyse d'un ester



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **180, 181**

A une suspension de l'ester (1 éq.) dans du tampon phosphate 100 mM pH 8 (10 mL/mmol) à 30°C est ajouté la PLE (300U/mmol). Le pH de la solution est maintenu à 8 par addition, à l'aide d'un pHstat, d'une solution de soude à 0.2M. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. La solution est ensuite extraite avec de l'éther (deux fois). La phase aqueuse est acidifiée à pH 3.4 à l'aide d'une solution d'HCl 4M puis extraite à l'acétate d'éthyle plusieurs fois en ajustant si nécessaire le pH de la phase aqueuse à 3.4 entre chaque extraction. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie.

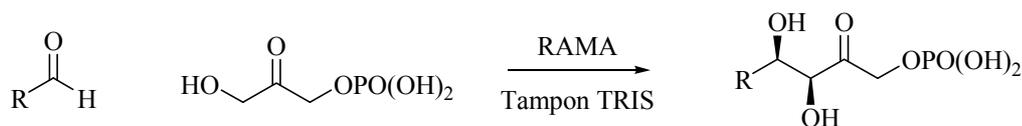
9. Fluoruration



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **177**, **184**

Au composé carbonylé (1 éq.) sont ajoutés la solution de TMSCF_3 dans du THF (C = 2M, 4 éq.) et le fluorure de césium (0.1 éq.). Lorsque tout le produit de départ est consommé, du TBAF (1.5 éq.) ou une solution d'HCl 4M est ajouté. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. La solution est ensuite diluée avec de l'eau et du diéthyléther. La phase aqueuse est extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu jaune est purifié par chromatographie-éclair.

10. Aldolisation



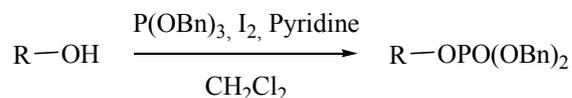
⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **200**, **203**

A une solution de DHAP (50 mM) dans du tampon TRIS 50 mM à pH 7.6 sont ajoutés l'aldéhyde (100 mM) et la RAMA (75U). L'évolution de la réaction est suivie par CCM. La solution est ensuite diluée avec de l'eau et déposée sur une résine AG 1-X8 (sous forme HCO_3^-). L'élution est réalisée avec des volumes identiques de concentrations suivantes en triéthylammonium bicarbonate : 150, 200, 300, 350 mM. Les fractions contenant le produit désiré sont ensuite congelées et lyophilisées. L'excès de tampon est éliminé par addition

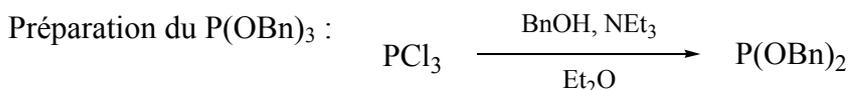
d'eau et re-évaporation. Le solide obtenu est dissout dans de l'eau et passé sur une résine AG 50W-X8 (sous forme Na^+). Les éluants sont rassemblés et évaporés.

11. Formation de phosphate

* 11A. Utilisation de $\text{P}(\text{OBn})_3$, I_2



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **97**, **191**

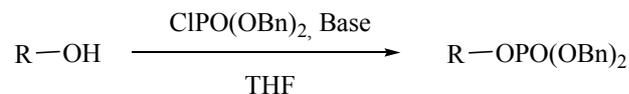


A une solution de PCl_3 (1 éq.) dans de l'éther (5mL/mmol) à -15°C sont ajoutés la NEt_3 (3 éq.) puis l'alcool benzylique (3 éq.). La solution est agitée pendant 24 h. la suspension obtenue est ensuite filtrée par gravité et le résidu lavé à l'éther. Le filtrat est évaporé et le résidu purifié par chromatographie-éclair (cyclohexane/éther/ NEt_3 , 49.5/49.5/1).

A une solution de tribenzyle phosphite fraîchement préparé (1.4 éq.) dans du CH_2Cl_2 (4 mL/mmol) à -25°C est ajouté l'iode (1.4 éq.). La solution violette est agitée pendant 25 min. puis du tribenzyle phosphite est ajouté jusqu'à ce que la solution se décolore.

A une solution d'alcool (1 éq.) dans du CH_2Cl_2 (2 mL/mmol) sont ajoutés à -40°C la pyridine (2.5 éq.) puis, en 1 h, la solution de réactif phosphorylé précédemment préparé. La solution jaune obtenue est ensuite filtrée et diluée à l'éther. La phase organique est lavée avec de l'eau, une solution saturée de KHSO_4 , une solution saturée de NaHCO_3 et une solution saturée de NaCl . La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et concentrée. Le résidu jaune est purifié par chromatographie-éclair.

✖ **11B. Utilisation de HPO(OBn)₂, NCS**



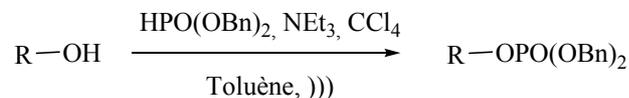
⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **97**, **176**, **191**



A une solution de dibenzyl phosphite (1 éq.) dans du toluène (3 mL/mmol) à 0°C est ajouté la NCS (1 éq.). Après 2 h d'agitation, la solution est filtrée et le résidu lavé au toluène. Le filtrat est évaporé et l'huile jaune est analysée par RMN afin de déterminer le pourcentage de réactif contenu dans le mélange.

A une solution d'alcool (1 éq.) dans du THF (3 mL/mmol) à 0°C sont ajoutés la base (NaH, *n*-BuLi, Pyridine) et le réactif phosphorylé (1.5 éq.). L'évolution de la réaction est suivie par CCM jusqu'à disparition de l'alcool. La solution est ensuite diluée avec une solution saturée de chlorure d'ammonium, de l'eau et du diéthyléther. La phase aqueuse est extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

✖ **11C. Utilisation de HPO(OBn)₂, NEt₃, CCl₄**

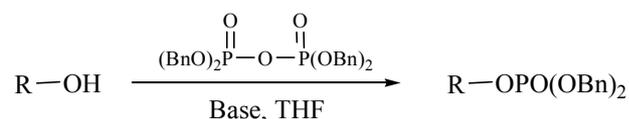


⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **191**

A une solution d'alcool (1 éq.) dans du toluène (1 mL/mmol) sont ajoutés le dibenzyle phosphite (1 éq.), le tétrachlorure de carbone (1 éq.) et la NEt₃ (1 éq.). La solution est placée dans un bain à ultrasons. L'évolution de la réaction est suivie par CCM jusqu'à disparition du

produit de départ. Le brut réactionnel est ensuite évaporé et le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

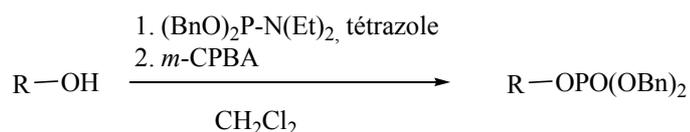
✖ **11D. Utilisation de TBPP**



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **97**

A une solution d'alcool (1 éq.) dans du THF (10 mL/mmol) sont ajoutés la base (NaH, *n*-BuLi, 1.1 éq.) et le tétrabenzyle pyrophosphate (1.1 éq.). Lorsque le produit de départ est consommé, la solution est diluée avec une solution saturée de chlorure d'ammonium, de l'eau et du diéthyléther. La phase aqueuse est extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

✖ **11E. Passage par un phosphoramidate**

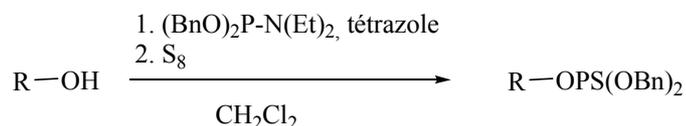


⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation des composés **96, 97, 103, 176, 183, 198**

A une solution d'alcool (1 éq.) dans du CH₂Cl₂ (15 mL/mmol) sont ajoutés le dibenzyl-*N,N*-diéthyl phosphoramidite (2.5 éq.) et le tétrazole (2.5 éq.). Après agitation pendant 1 h à température ambiante, le phosphite formé est oxydé en phosphate par addition de *m*-CPBA (2.5 éq.). Lorsque le phosphite est consommé, la solution est diluée avec du diéthyléther. Le milieu réactionnel est ensuite lavé avec une solution à 10 % de Na₂S₂O₅, une solution saturée de NaHCO₃, de l'eau et une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

12. Formation de thiophosphate

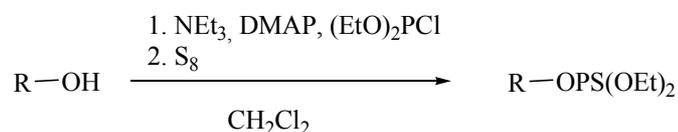
* 12A. Passage par un phosphoramidate



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **150**

Le mode opératoire est le même que le **6E** en remplaçant le *m*-CPBA par du soufre.

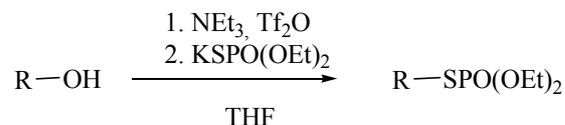
* 12B. Passage par un phosphite



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **156**

A une solution d'alcool (1 éq.) dans du dichlorométhane (6 mL/mmol) sont ajoutées la triéthylamine (1,3 éq.), la DMAP (1 éq.), puis le diéthylchlorophosphite (1,3 éq.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h et le soufre est ajouté (1,1 éq.). Lorsque le produit de départ est totalement consommé, et la réaction est diluée par l'addition d'une solution saturée de NH_4Cl . La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane, les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

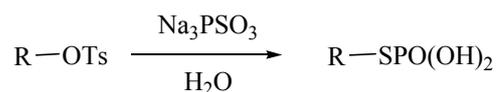
✖ **12C. Formation d'un thiophosphate via un triflate**



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **166**

A une solution d'alcool (1 éq.) et de triéthylamine (2,9 éq.) dans le THF (10 mL/mmol) à -40°C est ajouté de l'anhydride triflique (2 éq.). Après 30 min d'agitation, la formation du triflate est observée par CCM. Une solution de KSP(O)(OEt)₂ (1éq.) dans le THF (15 mL/mmol) obtenue par dissolution aux ultrasons, est ajoutée au milieu réactionnel à -40°C. La réaction est amenée à température ambiante. Lorsque le triflate a totalement disparu, une solution saturée de Na₂CO₃ est ajoutée au milieu réactionnel ainsi que du diéthyléther. La phase aqueuse est extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

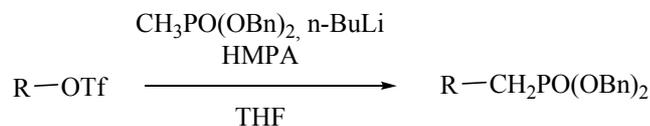
✖ **12D. Formation d'un thiophosphate via un tosylate**



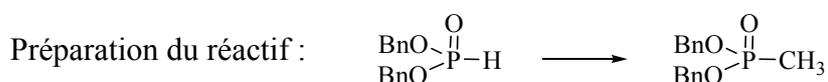
⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **60**

A une solution de tosylate (1 éq.) dans de l'eau (6 mL/mmol) est ajouté le thiophosphate de sodium (1 éq.). Lorsque le tosylate a totalement disparu la solution est purifiée par passage sur une colonne DEAE sous forme HCO₃⁻ (élution avec un gradient de triéthylammonium bicarbonate) puis sur une résine Dowex 5-x8 sous forme HCO₃⁻ (élution avec de l'eau).

13. Formation de phosphonate



⇒ Mode opératoire appliqué à la préparation du composé **130**



A une suspension d'hydruure de sodium (1.3 éq.) dans du THF (2 mL/mmol) à 0°C, est ajouté lentement le dibenzyl phosphite (1 éq.). Le milieu réactionnel est agité pendant 1 h puis de l'iodométhane (1.3 éq.) est ajouté. La solution est encore agitée pendant 2 h supplémentaires, puis la réaction est arrêtée par addition d'eau. Le milieu réactionnel est dilué par du diéthyléther. La phase aqueuse est ensuite extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

Une solution de dibenzyl methylphosphonate sec (2.6 éq.) et de HMPA (2.6 éq.) dans du THF (3.5 mL/mmol) est désoxygénée par bullage d'argon – 78°C pendant 30 min. Une solution de *n*-butyllithium (2.6 éq.) est ensuite ajoutée et le milieu réactionnel devient rapidement orange. Après agitation pendant 30 min à – 78 °C, une solution de triflate sec (1 éq.) dans du THF (3.5 mL/mmol), préalablement désoxygénée, est ajoutée par canulation à – 78°C. Lorsqu'il ne reste plus de produit de départ, la réaction est arrêtée par ajout d'une solution saturée de chlorure d'ammonium et le milieu réactionnel est dilué avec du diéthyléther. La phase aqueuse est ensuite extraite avec du diéthyléther. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair.

14. Tests enzymatiques

* Purification de la DXR

Des cellules d'*E. coli* transformées avec un plasmide portant le gène *dxr* ont été mise en cultures dans un milieu LB contenant de l'ampicilline (0.1 mg/mL). L'expression de la DXS a été induite par addition de IPTG à une concentration finale de 0.4 mM à une DO_{600nm} de 0.6. Les cellules ont encore été mises en cultures pour 3 h à 37°C et récoltées par centrifugation (4.2 g, à partir de 1.5 L de culture). Les cellules ont été lysées par sonication à 0 °C by (40 W, 8×30 s, 30 s) dans un tampon Tris/HCl 50 mM à pH 7.5 contenant 2 mM DTT et 0.5 mM PMSF. Après centrifugation (20 000 rpm, 20 min), le surnageant a été appliqué sur une colonne Sepharose Q (Amersham Biosciences) (2×10 cm) pré-équilibrée avec le tampon de lyse. Après lavage avec un tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5 contenant 50 mM NaCl, 2 mM DTT et 0.5 mM PMSF jusqu'à ce que la DO_{280nm} atteigne 0.1, l'enzyme a été éluée en utilisant un gradient linéaire de NaCl (50 to 500 mM) dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5 contenant 2 mM DTT et 0.5 mM PMSF (volume total 200 mL). Les fractions contenant l'activité de la DXR ont été rassemblées et dialysées avec 2×1 L 25 mM imidazole, tampon 2 mM DTT pH 7.2. Après centrifugation pour éliminer les protéines précipitées, la solution enzymatique a été appliquée sur une colonne PBE94 (2×11 cm) équilibrée avec le tampon de dialyse. Après lavage avec le même tampon, (50 mL), le gradient de pH a été commencé en utilisant une solution de Polybuffer 74 (1/8 dilution, pH 4.0, volume 450 mL). Les fractions contenant l'activité de la DXR (pH fractions 4.8 – 5.0) ont été pure >90% comme cela a été montré par PAGE/SDS et coloration au Bleu de Coomassie. Ces fractions ont été rassemblées et dialysées avec un tampon 50 mM Tris/HCl, 2 mM DTT pH 8.0 par ultrafiltration sur des unités Centricon 30. La solution enzymatique a été diluée 4-fois avec le tampon avant la centrifugation pour assurer une élimination efficace du Polybuffer. La solution enzymatique a ensuite été appliquée sur une colonne 2'5' ADP Sepharose 4B (0.8×2.5 cm) équilibrée avec un tampon 25 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, DTT 2 mM pH 8.0. Après lavage avec le tampon d'équilibration (8 mL), l'enzyme a été éluée en utilisant gradient de NADPH (0 to 3 mM, volume total 16 mL). Les fractions contenant l'activité de la DXR ont été rassemblées, concentrées et dialysées avec un tampon 50 mM Tris/HCl, 2 mM DTT pH 7.5 par ultrafiltration sur des unités Centricon 30. Comme cela a été montré par PAGE/SDS et coloration au Bleu de Coomassie Blue, l'enzyme était pure à cette étape.

✖ **Détermination de l'activité de la DXR**

Les essais enzymatiques ont été réalisés à 37°C dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5 contenant 1 mM MgCl₂ et 2 mM DTT (volume total 1 mL) en présence de NADPH 0.2 mM et de DXP 3 mM. L'activité enzymatique a été déterminée en suivant la diminution de l'absorbance à 340 nm due à l'oxydation du cofacteur. La réaction est initialisée par ajout de l'enzyme.

Afin de déterminer les constantes cinétiques (K_m and V_{max}) pour les composés testés, les essais ont été réalisés à six concentrations différentes de substrats, DXP (40 to 200 μ M) et DXP_N (100 to 500 μ M). La réaction est initialisée par ajout de l'enzyme, 4 μ g pour DXP comme substrat ou 6 μ g avec le DXP_N. La représentation graphique de Lineweaver Burk a été utilisée pour déterminer les constantes cinétiques.

✖ **Identification of the reaction product of DXP_N with DXR by ³¹P NMR**

La réaction a été réalisée dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5 contenant 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT en présence de 3 mM DXP_N et 0.4 mM NADPH. Le volume réactionnel était de 600 μ L. Le milieu contient une BSA (600 μ g) pour augmenter la stabilité de la DXR, et comme référence interne du Na₂HPO₄ 3 mM, de la D₂O (150 μ L). Le recyclage du NADPH a été réalisé en ajoutant du L-glutamate et de la glutamate déshydrogenase 3 mM. La DXR (30 μ g) a été ajoutée pour initialiser la réaction enzymatique. Un spectre ³¹P NMR a été effectué à 12 h à 37°C. Un échantillon de MEP_N (3 mM final concentration) a été ajouté dans le tube RMN. Des expériences de référence ont été réalisées avec le DXP_N et le MEP_N dans le même milieu mais sans enzyme.

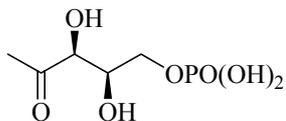
*** Influence sur des cultures d'*E. coli***

L'activité des produits synthétisés a été testée sur des cultures d'*E. coli* par diffusion agar. Des boîtes de milieu LB agar (5 cm diameter) ont été inoculées avec les bactéries (100 μL , $\text{OD}_{600} = 0.68$, 5×10^7 cells). Des disques de papier Whatman No. 1 de diameter de 6 mm ont été imprégnés avec les produits (50 and 100 μg). Les disques séchés ont été placés sur la surface des boîtes qui ont été incubées pendant une nuit à 30°C. Des essais avec la fosmidomycine et la fosfomycine (10 to 50 μg) ont également été réalisés. L'activité antibactérienne a été mise en évidence par la présence de zone d'inhibition autour des disques.

*** Détermination des constantes d'inhibition**

Les essais enzymatiques ont été réalisés dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 contenant 3 mM MgCl_2 et 2 mM DTT à 37°C. Les concentrations de NADPH et de DXP étaient de 0.15 et de 0.11 mM respectivement. Les vitesses initiales ont été déterminées en suivant la baisse de l'absorbance à 340 nm (Uvikon 933, Kontron Instruments). L'influence de produits testés sur l'activité enzymatique a été étudiée par leur ajout à des concentrations différentes dans le milieu réactionnel. Les IC_{50} ont été calculées à partir d'une droite semi-log de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en inhibiteur.

Le K_i a été calculé par une droite réciproque double de la vitesse enzymatique en fonction de l'inverse de la concentration en DXP (0.05 to 0.5 mM) en absence et en présence des composés à différentes (0.3 to 1 mM). La réaction a été initialisée par ajout de la DXR (2 μg).

1-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate - 27

Le composé **27** est obtenu à partir de **99** en utilisant la méthode **2B** avec un rendement **quantitativement**.

Solide vitreux

Décomposition à 90°C.

$R_f = 0.39$ (*i*-propanol/eau/acétate d'éthyle, 6/3/1).

$[\alpha]_D^{20} = +6.9$ (c 1.0, MeOH), lit.²⁹ $[\alpha]_D = +7.0$ (c 1.0, MeOH).

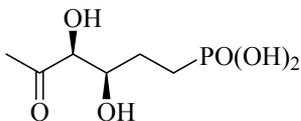
RMN, δ_H (300 MHz, D_2O) : $\delta = 2.31$ (3H, s, 1-H), 3.96 (2H, m, 5-H), 4.39 (1H, ddd, $J_{3-4} = 2$ Hz, $J_{4-5a} = 1$ Hz, $J_{4-5b} = 2$ Hz, 4-H), 4.50 (1H, d, $J_{3-4} = 2$ Hz, 3-H).

δ_C (75 MHz, D_2O) : 25.7 (CH₃, C-1), 65.3 (CH₂, d, $J_{C-P} = 5$ Hz, C-5), 70.0 (CH, d, $J_{C-D} = 6.0$ Hz, C-4), 76.7 (CH, C-3), 212.8 (C quaternaire, C-2).

δ_P (121.5 MHz, D_2O) : 1.5 (s).

IR (KBr) ν_{max} (cm⁻¹) : 3428, 1723, 1230, 1130, 1047, 972.

MS (ES⁻) : (M-H⁺) 213.

(3R,4S)-3,4-Dihydroxy-5-oxohexylphosphonic acid - 58

Le composé **58** est obtenu à partir de **133** en utilisant la méthode **2B** avec un rendement **quantitatif**.

Solide vitreux

mp : 120°C

$[\alpha]_D^{20} = + 37$ (c 1.8, H₂O).

R_f = 0.26 (*i*-propanol/eau/acétate d'éthyle, 6/3/1).

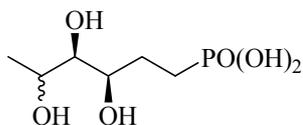
RMN, δ_H (300 MHz, D₂O) : 1.51-1.89 (4H, m, 1- et 2-H), 2.26 (3H, s, 6-H), 4.08-4.18 (1H, m, 4-H), 4.31-4.37 (1H, m, 3-H).

δ_C (75 MHz, D₂O) : 24.8 (CH₂, d, $^1J_{C-P} = 137$ Hz, C-1), 25.7 (CH₃, C-6), 27.3 (CH₂, s, C-2), 71.9 (CH, d, $^3J_{C-P} = 18$ Hz, C-3), 78.9 (CH, s, C-4), 213.2 (C quaternaire, C-5).

δ_P (121.5 MHz, D₂O) : 25.9 (s).

IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3409, 1714, 1651, 1417, 1354, 1146, 1118, 1064.

MS (ES⁻) m/z : 211 (M-H⁺).

(3R,4S)-3,4-Dihydroxy-5-hydroxyhexylphosphonic acid - 59

Le composé **59** est obtenu sous forme d'un mélange 1:3 de deux diastéréomères à partir de **128** en utilisant la méthode **2B** avec un rendement **quantitatif**.

Solide vitreux

mp : 110°C

R_f = 0.23 (*i*-propanol/eau/acétate d'éthyle, 6/3/1).

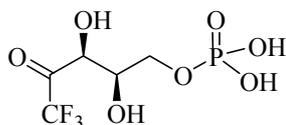
RMN, δ_H (300 MHz, D₂O) : 1.05 (1/4 de 3H, d, $J_{5-6} = 6.4$ Hz, 6-H), 1.13 (3/4 de 3H, d, $J_{5-6} = 6.4$ Hz, 6-H*), 1.65 (4H, m, 1- et 2-H), 3.25 (1H, m, 3-H), 3.57 (1H, m, 4-H), 3.80 (1H, m, 5-H).

δ_C (75 MHz, D₂O) : 19.3 (CH₃, C-6), 19.7 (CH₃, C-6*), 22.9 (CH₂, d, $^1J_{C-P} = 142$ Hz, C-1), 23.5 (CH₂, d, $^1J_{C-P} = 142$ Hz, C-1*), 27.3 (CH₂, s, C-2), 27.7 (CH₂, s, C-2*), 67.7 (CH, C-5), 68.0 (CH, C-5*), 71.9 (CH, d, $^3J_{C-P} = 18$ Hz, C-3), 72.3 (CH, d, $^3J_{C-P} = 18$ Hz, C-3*), 78.9 (CH, s, C-4), 79.4 (CH, s, C-4*).

δ_P (121.5 MHz, D₂O) : 26.7 (s).

IR (KBr) ν_{max}/cm⁻¹ : 3435, 1636, 1453, 1382, 1283, 1131, 1060.

MS (ES⁻) m/z : 213 (M-H⁺).

(1,1,1-trifluoro) 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate - 62

Le composé **62** est obtenu à partir de **178** en utilisant la méthode **2B** avec un rendement **quantitatif**.

Solide vitreux

Décomposition à 85°C

Rf = 0.50 (*i*-propanol/eau/acétate d'éthyle, 6/3/1).

$[\alpha]_D^{20} = -8$ (c 1, H₂O).

RMN, δ_H (300 MHz, D₂O) : 3.76 (2H, m, 5-H), 3.80 (1H, m, 4-H), 4.20 (1H, d, $J_{3-4} = 5.6$ Hz, 3-H).

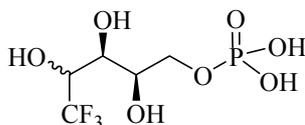
δ_C (75 MHz, D₂O) : 65.4 (CH₂, d, $J_{C-P} = 3.0$ Hz, C-5), 67.9 (CH, C-3), 68.8 (CH, , $J_{C-P} = 6.1$ Hz, C-4), 94.1 (C quaternaire, q, $J_{C-F} = 30$ Hz, C-2), 122.8 (C quaternaire, q, $J_{C-F} = 288$ Hz, C-1).

δ_P (121.5 MHz, D₂O) : 2.0 (s).

δ_F (282 MHz, D₂O) : -82.77 (s, CF₃).

IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3420, 1651, 1397, 1189, 1141, 1081, 929.

MS (ES⁻) m/z : 267 (M-H⁺) et 285 (M-H⁺) forme hydratée.

(2*R*, 3*R*) 2,3,4-trihydroxy-5,5,5-trifluoropentyl-1-phosphate - 63

Le composé **63** est obtenu sous forme d'un mélange 1:2 de deux diastéréomères à partir de **177** en utilisant la méthode **2B** avec un rendement **quantitatif**.

Solide vitreux

Décomposition à 88°C

R_f = 0.28 (*i*-propanol/eau/acétate d'éthyle, 6/3/1).

RMN, δ_{H} (300 MHz, D₂O) : 3.67 (2H, m, 1-H), 3.75 (1H, m, 3-H), 3.87 (1H, m, 1-H), 4.04 (1H, d, J_{3-4} = 6.6 Hz, 4-H).

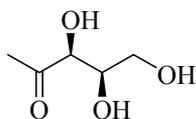
δ_{C} (75 MHz, D₂O) : 65.6 (CH₂, d, $J_{\text{C-P}}$ = 5.0 Hz, C-1), 65.8 (CH₂, d, $J_{\text{C-P}}$ = 5.0 Hz, C-1*), 68.1 (CH, d, $J_{\text{C-P}}$ = 6.0 Hz, C-2), 68.5 (CH, d, $J_{\text{C-P}}$ = 6.0 Hz, C-2*), 68.8 (CH, C-3), 68.9 (CH, C-3*), 71.0 (CH, q, $J_{\text{C-F}}$ = 10 Hz, C-4), 124.6 (C quaternaire, q, $J_{\text{C-F}}$ = 282 Hz, C-5), 125.3 (C quaternaire, q, $J_{\text{C-F}}$ = 282 Hz, C-5*).

δ_{P} (121.5 MHz, D₂O) : 2.0 (s).

δ_{F} (282 MHz, D₂O) : -76.56 (d, $J_{\text{H-F}}$ = 6.2 Hz, CF₃), -75.51 (d, $J_{\text{H-F}}$ = 6.2 Hz, CF₃*).

IR (KBr) ν_{max} /cm⁻¹ : 3382, 1648, 1393, 1273, 1177, 1141, 1070, 925.

MS (ES⁻) m/z : 269 (M-H⁺).

1-Désoxy-D-xylulose - 65

Le composé **65** est obtenu **quantitativement** sous forme d'un mélange 1:1:4 des anomères α - et β -cycles et de la forme ouverte à partir de **122** en utilisant la méthode **2B**.

Huile incolore

$R_f = 0.19$ (chloroforme/méthanol, 90/10).

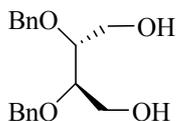
$[\alpha]_D^{20} = +34.9$ (c 1.0, H₂O), lit.¹⁸ $[\alpha]_D = +33.6$ (c 1.0, H₂O).

RMN, δ_H (300 MHz, CD₃OD) : 1.38 (s, CH₃, anomère furanose) 1.42 (s, CH₃, anomère furanose), 2.24 (s, 1-H, forme ouverte), 3.52 (m, anomère furanose), 3.58 (dd, $J_{5a-5b} = 11.0$ Hz, $J_{4-5a} = 6.6$ Hz, 5-Ha, forme ouverte), 3.64 (m, anomère furanose), 3.65 (dd, $J_{5a-5b} = 11.0$ Hz, $J_{4-5a} = 6.6$ Hz, 5-Hb, forme ouverte), 3.78 (m, anomère furanose), 3.99 (ddd, $J_{3-4} = 2.2$ Hz, $J_{4-5a} = J_{4-5b} = 6.6$ Hz, 4-H, forme ouverte), 4.08 (m, anomère furanose), 4.21 (dd, $J_{3-4} = 2.2$ Hz, 3-H-open chain).

δ_C (75 MHz, CD₃OD) : 21.8 (CH₃, C-1), 25.1 (CH₃, C-1), 26.6 (CH₃, C-1), 63.7 (CH₂, C-5), 71.4 (CH₂, C-5), 73.3 (CH₂, C-5), 73.5 (CH, C-4), 77.4 (CH, C-4), 78.4 (CH, C-4), 78.1 (CH, C-3), 82.7 (CH, C-3), 83.0 (CH, C-3), 103.8 (C quaternaire, C-2), 107.5 (C quaternaire, C-2), 212.4 (C quaternaire, C-2).

IR (KBr) ν_{max} (cm⁻¹) : 3428, 3104, 1792, 1716, 1240, 1202, 1176, 991.

MS (ES⁻) : (M-H⁺) 133.

(2R,3R)-2,3-Dibenzyloxybutane-1,4-diol* - 70

Le composé **70** est obtenu à partir de **174** en utilisant la méthode **6B** avec un rendement de **96** %.

Solide

mp : 45-46 °C

Rf = 0.17 (hexane/acétate d'éthyle, 40/60)

[α]_D²⁰ = - 22 (c 1, CHCl₃), lit.* [α]_D = - 22.5 (c 0.5, EtOH).

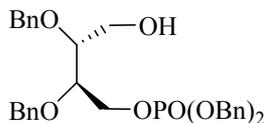
RMN, δ _H (300 MHz, CDCl₃) : 2.36 (2H, s, OH), 3.68-3.83 (6H, m, 2-, 3-H, 2xCH₂Ph), 4.64 (2H, m, 1-, 4-H), 7.25-7.38 (10H, m, Ph).

δ _C (75 MHz, CDCl₃) : 60.8 (CH₂, C-1,-4), 72.6 (CH₂, CH₂Ph), 78.9 (CH, C-2,-3), 127.8, 127.9, 128.5, 137.9 (C aromatiques), .

IR (CHCl₃) ν _{max}/cm-1 : 3581, 3411, 1602, 1496, 1454, 1273, 1221, 1099, 1070, 1027.

MS (FAB⁺) m/z : 303.4 (M + H)⁺.

* *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1995, 2849.

2R, 3R) 2,3-O,O-Dibenzyl-4-hydroxybutyl-1-dibenzylphosphate* - 71

Le composé **71** est obtenu à partir de **176** en utilisant la méthode **2A** avec un rendement de **87** %.

Huile incolore

R_f = 0.44 (acétate d'éthyle /hexane, 9/1)

[α]_D²⁰ = - 13 (c 1, CHCl₃).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 3.61 (2H, m, 1-H), 3.77 (2H, m, 4-H), 4.16 (1H, m, 3-H), 4.29 (1H, m, 4-H), 4.61 (4H, m, 2×CH₂Ph-phosphate), 5.04 (4H, m, 2×CH₂Ph), 7.32 (20H, m, Ph).

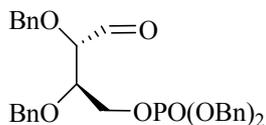
δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 61.4 (CH₂, C-4), 67.0 (CH₂, d, J_{C-P} = 6.2 Hz, C-1), 69.5 (CH₂, d, J_{C-P} = 5.6 Hz, CH₂Ph-phosphate), 73.0 (CH₂, CH₂Ph), 73.3 (CH₂, CH₂Ph), 77.8 (CH, d, J_{C-P} = 7.4 Hz, C-2), 78.4 (CH, C-3), 128.0, 128.1, 128.2, 128.5, 128.6, 128.7, 128.8, 135.9, 137.9, 138.1 (C aromatiques), .

δ_P (121.5 MHz, CDCl₃) : 0.4 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max}/cm⁻¹ : 3595, 3445, 1602, 1497, 1455, 1382, 1266, 1221, 1078, 1019.

MS (FAB⁺) m/z: 563.5 (M + H)⁺.

**J. Org. Chem.*, 1998, 2375

(2R, 3R) 2,3-O,O-Dibenzyl-4-formylbutyl-1-dibenzylphosphate* - 72

Le composé **72** est obtenu à partir de **71** en utilisant la méthode **5E** avec un rendement de **82** %.

Huile incolore

R_f = 0.39 (acétate d'éthyle /hexane, 6/4).

[α]_D²⁰ = - 14 (c 1, CHCl₃).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 3.84 (1H, dd, J = 3.8 Hz, J = 1 Hz, 3-H), 3.92 (1H, m, 2-H), 4.15 (2H, m, 1-H), 4.55 (4H, m, 2×CH₂Ph-phosphate), 5.01 (4H, m, 2xCH₂Ph), 7.31 (20H, m, Ph), 9.60 (1H, d, J = 1 Hz, 4-H).

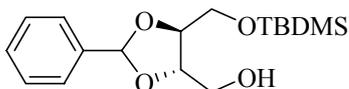
δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 65.0 (CH₂, d, J_{C-P} = 6.2 Hz, C-1), 69.6 (CH₂, d, J_{C-P} = 5.6 Hz, CH₂Ph-phosphate), 73.3 (CH₂, CH₂Ph), 73.7 (CH₂, CH₂Ph), 77.3 (CH, d, J_{C-P} = 7.4 Hz, C-2), 82.1 (CH, C-3), 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 128.8, 135.8, 136.9, 137.2 (C aromatiques), , 202.4 (CH, C-4).

δ_P (121.5 MHz, CDCl₃) : 0.3 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max}/cm⁻¹ : 1730, 1602, 1497, 1455, 1379, 1270, 1085, 1034, 1221.

MS (FAB⁺) m/z: 561.5 (M + H)⁺.

**J. Org. Chem.*, 1998, 2375

(2*R*, 3*S*)-*O*-Benzylidène-4-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-D-thréitol - 95

Le composé **95** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **94** en utilisant la méthode **1A** avec un rendement de **96%**.

Huile incolore

R_f : 0.20 (acétate d'éthyle/hexane, 20/80).

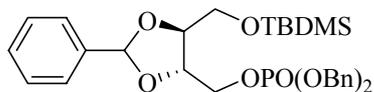
RMN, δ_{H} (200 MHz, CDCl₃) : 0.08 (1/2 de 6H, s, 2×CH₃), 0.10 (1/2 de 6H, s, 2×CH₃*); 0.90 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.92 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu*), 2.25 (1/2 de 1H, dd, $J_{1\text{a-OH}} = 5.4$ Hz, $J_{1\text{b-OH}} = 7.3$ Hz, OH), 2.32 (1/2 de 1H, t, $J_{1\text{-OH}} = 6.1$ Hz, OH*), 3.69-4.18 (6H, m, 1-, 2-, 3- et 4-H), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.34-7.51 (5H, m, Ph).

δ_{C} (50 MHz, CDCl₃) : -5.3 (2×CH₃), 18.4 (C quaternaire, *t*-Bu), 26.0 (3×CH₃, *t*-Bu), 62.6 (CH₂, C-1), 63.0 (CH₂, C-1*), 63.6 (CH₂, C-4), 63.7 (CH₂, C-4*), 78.2 (CH, C-2), 79.3 (CH, C-2*), 80.4 (CH, C-3), 80.7 (CH, C-3*), 103.9 (CH, CH-Ph), 104.3 (CH, CH-Ph*), 126.1, 126.7, 128.5, 128.6, 129.1, 129.5, 137.6 et 137.8 (C aromatiques), .

IR (CHCl₃) ν_{max} /cm⁻¹ : 3591, 3447, 1602, 1462, 1381, 1256, 1225, 1093, 839.

MS (FAB⁺) m/z : 325.3 (M + H)⁺.

HRMS (FAB⁺) m/z calculée pour C₁₇H₂₉O₄Si : 325.1835, trouvée : 325.1822.

(2*R*,3*S*)-*O*-Benzylidène-4-*O*-*t*-butyldiméthylsilyl butyl 1-dibenzylphosphate - 96

Le composé **96** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **95** en utilisant la méthode **11E** avec un rendement de **89 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.39$ (acétate d'éthyle /hexane, 5/5)

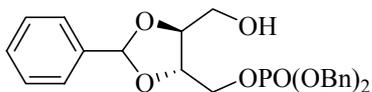
RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 0.09 (1/2 de 6H, s, $2 \times CH_3$), 0.10 (1/2 de 6H, s, $2 \times CH_3^*$); 0.89 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.92 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu*), 3.78 (2H, m, 1-H), 4.04 (1H, m, 3-H), 4.27 (3H, m, 2-H et 4-H), 5.03 (1/2 de 4H, d, $J_{P-H} = 8.1$ Hz, $2 \times CH_2-Ph$), 5.08 (1/2 de 4H, d, $J_{P-H} = 8.1$ Hz, $2 \times CH_2-Ph^*$), 5.88 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.32-7.48 (15H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : -5.4 ($2 \times CH_3$), 18.2 (C quaternaire, *t*-Bu), 25.8 ($3 \times CH_3$, *t*-Bu), 25.9 ($3 \times CH_3$, *t*-Bu*), 63.3 (CH_2 , s, C-4), 63.4 (CH_2 , s, C-4*), 67.3 (CH_2 , d, $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1), 67.4 (CH_2 , d, $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1*), 69.3 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2-Ph), 69.4 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2-Ph^*), 77.3 (CH, d, $J_{C2-P} = 8.6$ Hz, C-2), 77.4 (CH, d, $J_{C2-P} = 8.0$ Hz, C-2*), 78.0 (CH, C-3), 78.3 (CH, C-3*), 104.0 (CH, CH-Ph), 104.6 (CH, CH-Ph*), 126.6, 126.7, 127.9, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 129.4, 135.7, 135.8, 137.2 et 137.3 (C aromatiques), .

δ_P (121.5 MHz, $CDCl_3$) : 0.2 (s), 0.4 (s).

IR ($CHCl_3$) ν_{max}/cm^{-1} : 1602, 1496, 1457, 1409, 1381, 1272, 1261, 1092, 1013, 839. MS (**FAB⁺**) : (M+H)⁺ 585.2.

HRMS (FAB⁺**) :** (M+H)⁺ calculée pour $C_{31}H_{42}O_7PSi$: 585.2437, trouvée : 585.2467.

(2*R*,3*S*)-*O*-Benzylidène-4-hydroxybutyl 1-dibenzylphosphate - 97

Le composé **97** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **96** en utilisant la méthode **2A** avec un rendement de **87 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.25$ (acétate d'éthyle /hexane, 8/2)

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 2.36 (1H, s, OH), 3.74 (1H, m, 1-H), 4.16 (3H, m, 2-, 3- et 4-H), 5.02 (1/2 de 2H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH_2 -Ph), 5.03 (1/2 de 2H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH_2 -Ph), 5.06 (1/2 de 2H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH_2 -Ph*), 5.08 (1/2 de 2H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH_2 -Ph*), 5.87 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.32-7.48 (15H, m, Ph).

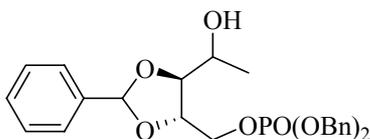
δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 62.1 (CH_2 , s, C-4), 62.2 (CH_2 , s, C-4*), 66.7 (CH_2 , d, $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1), 66.8 (CH_2 , d, $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1*), 69.5 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2 -Ph), 69.6 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2 -Ph*), 76.1 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2), 76.9 (CH, d, $J_{C2-P} = 8.0$ Hz, C-2*), 78.4 (CH, C-3), 78.9 (CH, C-3*), 104.0 (CH, CH-Ph), 104.1 (CH, CH-Ph*), 126.6, 127.9, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.4, 129.6, 135.4, 135.5, 137.2 et 137.3 (C aromatiques), .

δ_P (121.5 MHz, $CDCl_3$) : 0.2 (s), 0.4 (s).

IR ($CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}) : 3376, 1602, 1496, 1456, 1409, 1380, 1272, 1104, 1016.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 471.1.

HRMS (FAB⁺) : (M+H)⁺ calculée pour $C_{25}H_{28}O_7P$: 471.1573, trouvée : 471.1567.

(2*R*,3*S*)-*O*-Benzylidène-4-hydroxypentyl 1-dibenzylphosphate - 98

Le composé **98** est obtenu sous forme d'un mélange de 4 diastéréomères à partir de **97** en utilisant la méthode **5B** avec un rendement de **89 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.31$ (acétate d'éthyle /hexane, 8/2)

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 1.21 (14/22 de 3H, d, $J_{5-4} = 6.4$ Hz, 5-H), 1.26 (8/22 de 3H, d, $J_{5-4} = 6.4$ Hz, 5-H*), 2.40 (10/22 de 1H, s, OH), 2.54 (6/22 de 1H, s, OH*), 2.71 (6/22 de 1H, s, OH[§]), 3.88 (2H, m, 3-H et 4-H), 4.16 (3H, m, 1- et 2-H), 5.02 (6/22 de 4H, d, $J_{H-P} = 8.2$ Hz, CH_2-Ph), 5.03 (6/22 de 4H, d, $J_{H-P} = 8.2$ Hz, CH_2-Ph^*), 5.07 (1/22 de 4H, d, $J_{H-P} = 8.2$ Hz, CH_2-Ph^{\S}), 5.08 (9/22 de 4H, d, $J_{H-P} = 8.2$ Hz, $CH_2-Ph^{\#}$), 5.86 (1/22 de 1H, s, CH-Ph), 5.87 (9/22 de 1H, s, CH-Ph*), 5.95 (6/22 de 1H, s, CH-Ph[§]), 5.96 (6/22 de 1H, s, CH-Ph[#]), 7.32-7.49 (15H, m, Ph).

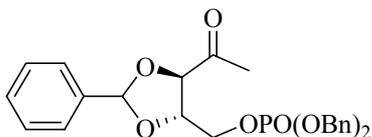
δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 18.7 (CH_3 , C-5), 19.1 (CH_3 , C-5*), 19.2 (CH_3 , C-5[§]), 19.9 (CH_3 , C-5[#]), 66.9 (CH_2 , $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1), 67.1 (CH, C-4), 67.4 (CH, C-4*), 67.5 (CH, C-4[§]), 67.6 (CH_2 , $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1*), 67.7 (CH_2 , $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1[§]), 67.9 (CH, C-4[#]), 69.1 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2-Ph), 69.5 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2-Ph^*), 76.2 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2), 76.4 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2*), 77.9 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2[§]), 80.9 (CH, C-3), 81.5 (CH, C-3*), 81.9 (CH, C-3[§]), 82.1 (CH, C-3[#]), 103.7 (CH, CH-Ph), 103.9 (CH, CH-Ph*), 104.0 (CH, CH-Ph[§]), 104.1 (CH, CH-Ph[#]), 126.5, 126.6, 126.7, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.4, 129.5, 129.6, 135.5, 135.6, 135.7, 136.7, 136.8 et 137.3 (C aromatiques), .

δ_P (121.5 MHz, $CDCl_3$) : 0.2 (s), 0.4 (s), 0.5 (s), 0.6 (s).

IR ($CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}) : 3376, 1602, 1496, 1456, 1409, 1380, 1272, 1104, 1016.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 485.1.

HRMS (FAB⁺) : calculée pour $C_{26}H_{30}O_7P$: 485.1729, trouvée : 485.1733.

(2*R*,3*S*)-*O*-Benzylidène-4-oxopentyl 1-dibenzylphosphate - 99

Le composé **99** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **98** en utilisant la méthode **5C** avec un rendement de **92 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.53$ (acétate d'éthyle /hexane, 8/2)

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 2.26 (1/2 de 3H, s, 5-H), 2.30 (1/2 de 3H, s, 5-H*), 4.26 (3H, m, 1-, 2- et 3-H), 5.03 (1/2 de 4H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH_2-Ph), 5.08 (1/2 de 2H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH_2-Ph^*), 5.09 (1/2 de 2H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz CH_2-Ph^*), 5.90 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.32-7.50 (15H, m, Ph).

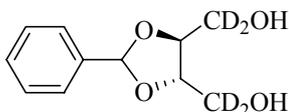
δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 26.6 (CH_3 , C-5), 26.7 (CH_3 , C-5*), 66.6 (CH_2 , d, $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1), 66.9 (CH_2 , d, $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1*), 69.4 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2-Ph), 69.5 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2-Ph^*), 76.8 (CH, d, $J_{C2-P} = 8.0$ Hz, C-2), 76.9 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2*), 81.4 (CH, C-3), 81.6 (CH, C-3*), 105.0 (CH, CH-Ph), 105.1 (CH, CH-Ph*), 126.6, 126.7, 127.9, 128.0, 128.4, 128.5, 128.6, 129.7, 129.8, 135.5, 135.6, 135.9 et 136.2 (C aromatique), , 206.8 (C quaternaire, C-4), 207.7 (C quaternaire, C-4*).

δ_P (121.5 MHz, $CDCl_3$) : 0.2 (s), 0.3 (s).

IR ($CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}) : 1722, 1602, 1497, 1455, 1406, 1380, 1269, 1090, 1017.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 483.1.

HRMS (FAB⁺) : calculée pour $C_{26}H_{28}O_7P$: 483.1573, trouvée : 483.1573.

(+)-[1,1,4,4-²H₄]-2,3-*O*-Benzylidène-*D*-thréitol - 101

Le composé **101** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **100** en utilisant la méthode **6B** avec un rendement de **96 %**.

Solide incolore

Mp : 70-71 °C

R_f = 0.31 (acétate d'éthyle).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 2.82 (1/2 de 2H, s, OH), 2.89 (1/2 de 2H, s, OH*), 4.08 (4H, s, 2- et 3-H), 5.92 (1H, s, CH-Ph), 7.37 to 7.48 (5H, m, Ph).

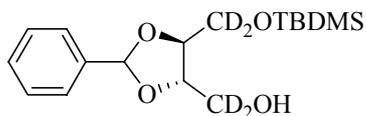
δ_C (75 MHz, CDCl₃) : signal large centré à 61.5 (CD₂, quint, J_{C-D}=21.7 Hz, C-1 et C-4), 78.3 et 79.3 (CH, C-2 et C-3), 103.8 (CH, CH-Ph), 126.5, 128.4, 129.6, et 137.1 (C aromatiques).

δ_D (61.4 MHz, CHCl₃) : 3.79 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max} (cm⁻¹) : 3387, 2191, 2079, 1602, 1487, 1461, 1403, 1377, 1288, 1096, 1068.

MS (EI) : M⁺ 214.2.

HRMS (EI) : M⁺ calculée pour C₁₁H₁₀D₄O₄ : 214.1143, trouvée : 214.1130.

(2*R*,3*S*)-[1,1,4,4-²H₄]-*O*-Benzylidène-4-*O*-*t*-butyldiméthylsilyl-D-thréitol - 102

Le composé **102** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **101** en utilisant la méthode **1A** avec un rendement de **96 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.52$ (acétate d'éthyle /cyclohexane, 10/90)

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 0.10 (1/2 de 6H, s, 2×CH₃), 0.12 (1/2 de 6H, s, 2×CH₃*); 0.91 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.93 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu*), 2.27 (1H, m, OH), 4.05 (1/2 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.8$ Hz, 3-H), 4.08 (1/2 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.8$ Hz, 3-H*), 4.14 (1/2 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.8$ Hz, 2-H), 4.24 (1/2 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.8$ Hz, 2-H*), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.35-7.51 (5H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, CDCl₃) : -5.5 (2×CH₃), -5.4 (2×CH₃*), 18.2 (C quaternaire, *t*-Bu), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu*), 25.8 (3×CH₃, *t*-Bu), 25.9 (3×CH₃, *t*-Bu*), signal large centré à 62.4 (2 × CD₂, m, C-1 et C-4), 77.8 (CH, C-2, $\beta + \gamma$ shifts: -351 ppb), 78.9 (CH, C-2*, $\beta + \gamma$ shifts: -303 ppb), 80.1 (CH, C-3, $\beta + \gamma$ shifts: -302 ppb), 80.4 (CH, C-3*, $\beta + \gamma$ shifts: -347 ppb), 103.7 (CH, CH-Ph), 104.1 (CH, CH-Ph*), 125.9, 126.4, 126.5, 126.6, 128.2, 128.3, 128.4, 128.9, 137.4 et 137.6 (C aromatiques).

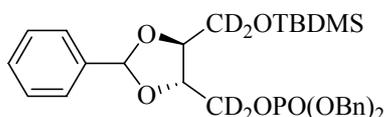
δ_D (61.4 MHz, CHCl₃) : 4.05 (s), 4.20 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max} (cm⁻¹) : 3438, 2194, 2089, 1602, 1492, 1462, 1406, 1382, 1288, 1098, 1069.

MS (FAB⁺) : (M+Na)⁺ 350.9.

HRMS (FAB⁺) : (M+Na)⁺ calculée pour C₁₇H₂₄D₄O₄NaSi : 351.1906, trouvée : 351.1904.

(2*R*,3*S*)-[1,1,4,4-²H₄]-*O*-Benzylidène-4-*O*-*t*-butyldiméthylsilyl butyl 1-dibenzylphosphate
- 103



Le composé **103** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **102** en utilisant la méthode **11E** avec un rendement de **89 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.18$ (acétate d'éthyle /cyclohexane, 20/80)

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 0.09 (1/2 de 6H, s, 2×CH₃), 0.10 (1/2 de 6H, s, 2×CH₃*); 0.89 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.92 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu*), 4.04 (1/2 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.4$ Hz, 3-H), 4.05 (1/2 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.4$ Hz, 3-H*), 4.25 (1/2 de 1H, dd, $J_{2-3} = 6.4$ Hz, $J_{H-P} = 1.1$ Hz, 2-H), 4.34 (1/2 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.4$ Hz, 2-H*), 5.04 (1/2 de 4H, d, $J_{P-H} = 8.1$ Hz, 2×CH₂-Ph), 5.08 (1/2 de 4H, d, $J_{P-H} = 8.1$ Hz, 2×CH₂-Ph*), 5.88 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.32-7.48 (15H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, CDCl₃) : -5.5 (2×CH₃), -5.4 (2×CH₃*), 18.2 (C quaternaire, *t*-Bu), 25.8 (3×CH₃, *t*-Bu), 25.9 (3×CH₃, *t*-Bu*), 62.8 (CD₂, m, C-4, α shift: ca. -510 et-490 ppb), 66.7 (CD₂, m, C-1, α shift: ca. -610 et-690 ppb), 69.3 (CH₂, d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₂-Ph), 69.4 (CH₂, d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₂-Ph*), 77.1 (CH, d, $J_{C2-P} = 8.6$ Hz, C-2, $\beta + \gamma$ shifts: -156 ppb), 77.3 (CH, d, $J_{C2-P} = 8.0$ Hz, C-2*, $\beta + \gamma$ shifts: -172 ppb), 77.8 (CH, C-3, $\beta + \gamma$ shifts: -189 ppb), 78.1 (CH, C-3*, $\beta + \gamma$ shifts: -181 ppb), 104.0 (CH, CH-Ph), 104.6 (CH, CH-Ph*), 126.6, 126.7, 127.9, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 129.4, 135.7, 135.8, 137.2 et 137.3 (C aromatiques).

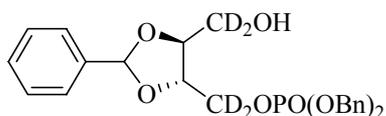
δ_P (121.5 MHz, CDCl₃) : 0.2 (s), 0.4 (s).

δ_D (61.4 MHz, CHCl₃) : 4.08 (s), 4.13 (s), 4.50 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max} (cm⁻¹) : 2192, 2090, 1602, 1497, 1461, 1407, 1377, 1275, 1260, 1090, 1035, 1020, 836.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 589.0.

HRMS (FAB⁺) : (M+H)⁺ calculée pour C₃₁H₃₈D₄O₇SiP : 589.2689, trouvée : 589.2683.

(2*R*,3*S*)-[1,1,4,4-²H₄]-*O*-Benzylidène-4-hydroxybutyl 1-dibenzylphosphate - 104

Le composé **104** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **105** en utilisant la méthode **2A** avec un rendement de **87 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.22$ (acétate d'éthyle /cyclohexane, 60/40)

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 2.52 (1H, s, OH), 4.07 (1H, d, $J_{2-3} = 6.5$ Hz 3-H), 4.23 (1H, d, $J_{2-3} = 6.5$ Hz 2-H), 5.02 (1/2 de 2H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH₂-Ph), 5.03 (1/2 de 2H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH₂-Ph), 5.06 (1/2 de 2H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH₂-Ph*), 5.08 (1/2 de 2H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH₂-Ph*), 5.86 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.30-7.48 (15H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 61.4 (CD₂, m, C-4, α shift: ca. -750 et-710 ppb), 66.2 (CD₂, m, C-1, α shift: ca. -610 et-530 ppb), 69.4 (CH₂, d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₂-Ph), 69.5 (CH₂, d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₂-Ph*), 75.9 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2, $\beta + \gamma$ shifts: -140 ppb), 76.7 (CH, d, $J_{C2-P} = 8.0$ Hz, C-2*, $\beta + \gamma$ shifts: -144 ppb), 78.2 (CH, C-3, $\beta + \gamma$ shifts: -197 ppb), 78.7 (CH, C-3*, $\beta + \gamma$ shifts: -173 ppb), 104.0 (CH, CH-Ph), 104.1 (CH, CH-Ph*), 126.6, 127.9, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.4, 129.6, 135.4, 135.5, 137.2 et 137.3 (C aromatiques).

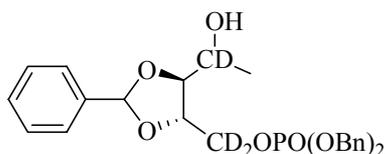
δ_P (121.5 MHz, CDCl₃) : 0.4 (s), 0.5 (s).

δ_D (61.4 MHz, CHCl₃) : 3.98 (s), 4.40 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max} (cm⁻¹) : 3397, 2198, 2100, 1602, 1497, 1457, 1406, 1377, 1273, 1215, 1093, 1019.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 474.9.

HRMS (FAB⁺) : (M+H)⁺ calculée pour C₂₅H₂₄D₄O₇P : 475.1824, trouvée : 475.1826.

(2*R*,3*S*)-[2,5,5-²H₃]-*O*-Benzylidène-4-hydroxypentyl 1-dibenzylphosphate - 105

Le composé **105** est obtenu sous forme d'un mélange 1:5:3:7 de quatre diastéréomères à partir de **104** en utilisant la méthode **5B** avec un rendement de **86 %**.

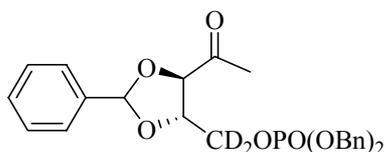
Huile incolore

$R_f = 0.21$ (acétate d'éthyle /cyclohexane, 60/40).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 1.23 (3/16 de 3H, s, C-5), 1.25 (7/16 de 3H, s, C-5), 1.26 (5/16 de 3H, s, C-5), 1.27 (1/16 de 3H, s, C-5), 2.58 (1H, s, OH), 3.79 (5/16 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.6$ Hz, C-3), 3.84 (1/16 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.6$ Hz, C-3*), 3.85 (7/16 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.6$ Hz, C-3[§]), 3.88 (3/16 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.6$ Hz, C-3[#]), 4.23 (4/16 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.6$ Hz, C-2), 4.35 (5/16 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.6$ Hz, C-2*), 4.38 (7/16 de 1H, d, $J_{2-3} = 6.6$ Hz, C-2[§]), 5.01 (3/16 de 4H, d, $J_{H-P} = 8.2$ Hz, CH₂-Ph), 5.03 (5/16 de 4H, d, $J_{H-P} = 8.2$ Hz, CH₂-Ph*), 5.07 (1/16 de 4H, d, $J_{H-P} = 8.2$ Hz, CH₂-Ph[§]), 5.08 (7/16 de 4H, d, $J_{H-P} = 8.2$ Hz, CH₂-Ph[#]), 5.86 (7/16 de 1H, s, CH-Ph), 5.87 (3/16 de 1H, s, CH-Ph*), 5.95 (5/16 de 1H, s, CH-Ph[§]), 5.96 (1/16 de 1H, s, CH-Ph[#]), 7.32-7.48 (15H, m, Ph). **δ_C (75 MHz, CDCl₃)** : 18.6 (CH₃, C-5, β shift: -115 ppb), 18.9 (CH₃, C-5*, β shift: -123 ppb), 19.1 (CH₃, C-5[§], β shift: -115 ppb), 19.8 (CH₃, C-5[#], β shift: -139 ppb), signal large centré à 67.2 (CD et CD₂, m, C-1 et C-4), 69.3 (CH₂, d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₂-Ph), 69.5 (CH₂, d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₂-Ph*), 75.9 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2, $\beta + \gamma$ shifts: -172 ppb), 76.2 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2*, $\beta + \gamma$ shifts: -135 ppb), 77.8 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2[§], $\beta + \gamma$ shifts: -156 ppb), 80.8 (CH, C-3, $\beta + \gamma$ shifts: -115 ppb), 81.4 (CH, C-3*, $\beta + \gamma$ shifts: -107 ppb), 81.8 (CH, C-3[§], $\beta + \gamma$ shifts: -107 ppb), 82.0 (CH, C-3[#], $\beta + \gamma$ shifts: -123 ppb), 103.7 (CH, CH-Ph), 103.9 (CH, CH-Ph*), 104.1 (CH, CH-Ph[§]), 126.5, 126.6, 126.7, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.4, 129.5, 129.6, 135.5, 135.6, 135.7, 136.7, 136.8 et 137.3 (C aromatiques). **δ_P (121.5 MHz, CDCl₃)** : 0.2 (s), 0.3 (s), 0.5 (s), 0.6 (s). **δ_D (61.4 MHz, CHCl₃)** : 4.17 (s), 4.40 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max} (cm⁻¹) : 3390, 2201, 2099, 1602, 1497, 1457, 1406, 1377, 1273, 1093, 1018.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 487.9. **HRMS (FAB⁺)** : calculée pour C₂₆H₂₇D₃O₇P : 488.1917, trouvée : 488.1929.

(2*R*,3*S*)-[5,5-²H₂]-*O*-Benzylidène-4-oxopentyl 1-dibenzylphosphate - 106

Le composé **106** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **105** en utilisant la méthode **5C** avec un rendement de **93 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.38$ (acétate d'éthyle /hexane, 60/40)

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 2.26 (1/2 de 3H, s, 5-H), 2.30 (1/2 de 3H, s, 5-H*), 4.35 (2H, m, 2- et 3-H), 5.04 (1/2 de 4H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH₂-Ph), 5.08 (1/2 de 2H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH₂-Ph*), 5.09 (1/2 de 2H, d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, CH₂-Ph*), 5.90 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.32-7.50 (15H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 26.5 (CH₃, C-5), 26.7 (CH₃, C-5*), signal large centré à 66.4 (CD₂, C-1, m), 69.4 (CH₂, d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₂-Ph), 69.5 (CH₂, d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₂-Ph*), 76.7 (CH, d, $J_{C-P} = 8.0$ Hz, C-2, β shift: -148 ppb), 76.9 (CH, d, $J_{C-P} = 7.4$ Hz, C-2*, β shift: -156 ppb), 81.3 (CH, C-3, γ shift: -58 ppb), 81.6 (CH, C-3*, γ shift: -66 ppb), 104.9 (CH, CH-Ph), 105.0 (CH, CH-Ph*), 126.6, 126.7, 127.9, 128.0, 128.4, 128.5, 128.6, 129.7, 129.8, 135.5, 135.6, 135.9 et 136.2 (C aromatiques), 206.8 (C quaternaire, C-4, δ shift: -25 ppb), 207.7 (C quaternaire, C-4*, δ shift: -17 ppb).

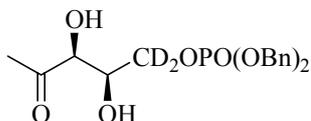
δ_P (121.5 MHz, CDCl₃) : 0.2 (s), 0.4 (s).

δ_D (61.4 MHz, CHCl₃) : 4.43 (s), 4.50 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max} (cm⁻¹) : 2204, 2101, 1720, 1602, 1497, 1457, 1406, 1380, 1275, 1097, 1021.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 484.9.

HRMS (FAB⁺) : calculée pour C₂₆H₂₆D₂O₇P : 485.1698, trouvée : 485.1705.

[5,5-²H₂]-1-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate - 107

Le composé **107** est obtenu **quantitativement** à partir de **106** en utilisant la méthode **2B**.

Solide vitreux

Decomposition à 90°C,

$R_f = 0.41$ (*i*-propanol/eau/acétate d'éthyle, 6/3/1).

$[\alpha]_D^{20} = + 7.0$ (c 1, MeOH), lit.²³ $[\alpha]_D = + 24.0$ (c 1.1, H₂O).

RMN, δ_H (300 MHz, D₂O) : 2.12 (3H, s, 1-H), 4.16 (1H, d, J = 1.5 Hz, 3-H), 4.33 (1H, d, J = 1.5 Hz, 4-H).

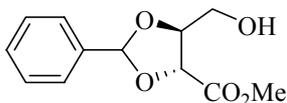
δ_C (75 MHz, D₂O) : 25.9 (CH₃, C-1), 67.2 (CD₂, m, C-5, α shift: -1879 ppb), 70.4 (CH, d, $J_{C-p} = 6.8$ Hz, C-4, β shift: -441 ppb), 76.9 (CH, C-3, γ shift: -273 ppb), 213.2 (C quaternaire, C-2, δ shift: -370 ppb).

δ_P (121.5 MHz, D₂O) : 1.4 (s).

δ_D (61.4 MHz, D₂O) : 4.14 (s).

IR (KBr) ν_{max} (cm⁻¹) : 3391, 3238, 2223, 2102, 1716, 1243, 1125, 1077, 982.

MS (ES⁻) : (M-H⁺) 215.

(2*R*, 3*R*) 2,3-Benzylidène-4-hydroxy-butanoate de méthyle - 117

Le composé **117** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **100** en utilisant la méthode **6A** avec un rendement de **88 %**.

Huile incolore

R_f = 0.28 (acétate d'éthyle /cyclohexane, 5/5).

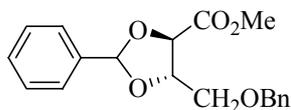
RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) : 2.28 (1/2 de 1H, s, OH), 2.37 (1/2 de 1H, s, OH*), 3.78 (1/2 de 3H, s, OCH₃), 3.80 (1/2 de 3H, s, OCH₃*), 3.83 (1/2 de 1H, m, 4-H), 3.95 (1/2 de 1H, m, 4-H*), 4.34 (1H, m, 3-H), 4.63 (1/2 de 1H, d, $J_{\text{H-P}} = 6.3$ Hz, 2-H), 4.64 (1/2 de 1H, d, $J_{\text{H-P}} = 6.3$ Hz 2-H*), 6.03 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 6.08 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.46 (15H, m, Ph).

δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) : 52.4 (CH₃, OCH₃), 52.5 (CH₃, OCH₃*), 62.0 (CH₂, C-4), 62.1 (CH₂, C-4*), 75.0 (CH, C-2), 75.6 (CH, C-2*), 79.7 (CH, C-3), 80.6 (CH, C-3*), 105.1 (CH, CH-Ph), 105.2 (CH, CH-Ph*), 126.7 126.8, 128.3, 128.4, 129.6, 129.8, 135.7, 136.6 (C aromatiques), 170.0 (C quaternaire, C-1), 171.4 (C quaternaire, C-1*).

IR (CHCl₃) ν_{max} /cm⁻¹ : 3596, 3418, 3019, 1758, 1602, 1459, 1405, 1220, 1110, 1046.

MS (FAB⁺) m/z : 239.3 (M + H)⁺.

HRMS (FAB⁺) m/z calculée pour C₁₂H₁₅O₅ : 239.0919, trouvée : 239.0909.

(2*R*, 3*R*) 2,3-Benzylidène-4-*O*-benzyl-butanoate de méthyle - 118

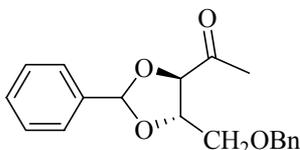
Le composé **118** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **117** en utilisant la méthode **1B** avec un rendement de **75 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.35$ (acétate d'éthyle /cyclohexane, 40/60).

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 3.79 (1/2 de 3H, s, OCH_3), 3.83 (1/2 de 3H, s, OCH_3^*), 3.76 (2H, m, 4-H), 4.55 (2H, m, 2- et 3-H), 5.28 (2H, s, CH_2Ph), 6.07 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 6.13 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.33 to 7.50 (10H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 52.4 (CH_3 , OCH_3), 52.5 (CH_3 , OCH_3^*), 69.9 (CH_2 , C-4), 73.5 (CH_2 , CH_2-Ph), 75.8 (CH, C-3), 75.9 (CH, C-3*), 78.7 (CH, C-2), 79.4 (CH, C-2*) 105.3 (CH, CH-Ph), 105.6 (CH, CH-Ph*), 126.8, 126.9, 127.5, 127.6, 127.7, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, , 129.6, 129.8, 136.0, 136.6, 137.7, et 137.8 (C aromatiques), 170.3 (C quaternaire, C-1), 171.3 (C quaternaire, C-1*).

(3*S*,4*R*)-3,4-*O*-benzylidène-5-(benzyloxy)-pentan-2-one - 119

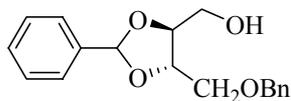
Le composé **119** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **118** en utilisant la méthode **7** avec un rendement de **28 %**.

Huile incolore

$R_f = 0,31$ (acétate d'éthyle/hexane, 30/70).

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 2.29 (1/2 de 3H, s, 1-H), 2.34 (1/2 de 3H, s, 1-H*), 3.79 (2H, m, 5-H), 4.38 (1H, m, 4-H), 4.44 (1/2 de 1H, d, J=6 Hz, 3-H), 4.51 (1/2 de 1H, d, J=6 Hz, 3-H*), 4.64 (1/2 de 2H, s, CH_2Ph), 4.65 (1/2 de 2H, s, CH_2Ph^*), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 6.10 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.36 à 7.53 (10H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 26.5 (CH_3 , C-1), 26.7 (CH_3 , C-1*), 70.0 (CH_2 , C-5), 70.4 (CH_2 , C-5*), 73.5 (CH_2 , CH_2Ph), 73.6 (CH_2 , CH_2Ph^*), 78.2 (CH, C-4), 78.3 (CH, C-4*), 82.1 (CH, C-3), 82.3 (CH, C-3*), 105.1 (CH, CH-Ph), 126.7, 126.8, 127.6, 127.7, 127.8, 128.4, 129.4, 129.6, 129.8, 136.4, 136.6 et 137.8 (C aromatiques), 207.8 (C quaternaire, C-2); 208.3 (C quaternaire, C-2*).

(2*R*,3*S*)-*O*-Benzylidène-4-*O*-benzyl-D-thréitol – 120

Le composé **120** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **94** en utilisant la méthode **1A** avec un rendement de **85 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.37$ (acétate d'éthyle/cyclohexane, 60/40).

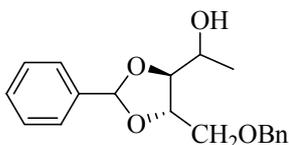
RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 2.19 (1H, s, OH), 3.76 (4H, m, 1- et 4-H), 4.36 (2H, m, 2- et 3-H), 4.61 (1/2 de 2H, s, CH_2Ph), 4.62 (1/2 de 2H, s, CH_2Ph^*), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.99 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.33 to 7.50 (10H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 62.6 (CH_2 , C-1), 70.0 (CH_2 , C-4), 73.6 (CH_2 , CH_2-Ph), 76.7 (CH, C-3), 77.8 (CH, C-3*), 79.8 (CH, C-2), 80.4 (CH, C-2*) 103.8 (CH, CH-Ph), 103.9 (CH, CH-Ph*), 125.9, 126.6, 126.7, 127.7, 127.8, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 129.4, 129.5, 137.3, 137.4, 137.5, et 137.6 (aromatic C).

IR ($CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}) : 3387, 1602, 1495, 1454, 1400, 1361, 1275, 1096, 1071.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 301.1.

HRMS (FAB⁺) : calculée pour $C_{18}H_{21}O_4$ 301.1440, trouvée 301.1439.

(3*R*,4*S*)-*O*-Benzylidène-5-*O*-benzylpentan-2-ol -121

Le composé **121** est obtenu sous forme d'un mélange 6:5:2:1 de quatre diastéréomères à partir de **120** en utilisant la méthode **5B** avec un rendement de **88 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.41$ (acétate d'éthyle /cyclohexane, 50/50).

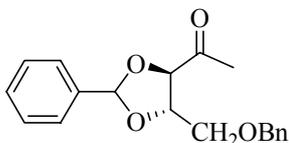
RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 1.25 (6/14 de 3H, d, $J_{1-2} = 6.4$ Hz, 1-H), 1.29 (5/14 de 3H, d, $J_{1-2} = 6.4$ Hz, 1-H*), 2.32 (2/14 de 1H, d, $J_{OH-2} = 5.5$ Hz, OH), 2.36 (1/14 de 1H, s, OH*), 2.49 (5/14 de 1H, s, OH[§]), 2.54 (3/14 de 1H, s, OH[#]), 3.71 (2H, m, 5-H), 3.78 (1H, m, 2-H), 3.97 (1H, m, 3-H), 4.30 (1H, m, 4-H), 4.62 (6/14 de 2H, s, CH_2 -Ph), 4.64 (5/14 de 2H, s, CH_2 -Ph*), 5.96 (2/14 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/14 de 1H, s, CH-Ph*), 5.98 (3/14 de 1H, s, CH-Ph[§]), 5.99 (5/14 de 1H, s, CH-Ph[#]), 7.33-7.51 (10H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 18.7 (CH_3 , C-1), 18.8 (CH_3 , C-1*), 19.2 (CH_3 , C-1[§]), 19.6 (CH_3 , C-1[#]), 67.4 (CH, C-2), 67.9 (CH, C-2*), 68.1 (CH, C-2[§]), 70.1 (CH_2 , C-5), 70.2 (CH_2 , C-5*), 70.5 (CH_2 , C-5[§]), 70.7 (CH_2 , C-5[#]), 73.5 (CH_2 , 2 \times CH_2 -Ph), 73.6 (CH_2 , 2 \times CH_2 -Ph*), 73.7 (CH_2 , 2 \times CH_2 -Ph[§]), 76.6 (CH, C-4), 77.2 (CH, C-4*), 77.7 (CH, C-4[§]), 78.7 (CH, C-4[#]), 82.9 (CH, C-3), 83.0 (CH, C-3*), 83.2 (CH, C-3[§]), 83.3 (CH, C-3[#]), 103.6 (CH, CH-Ph), 103.7 (CH, CH-Ph*), 103.8 (CH, CH-Ph[§]), 126.5, 126.6, 126.7, 127.7, 127.8, 128.3, 128.4, 129.3, 129.5, 137.1, 137.4, 137.6 et 137.7 (C aromatiques), .

IR ($CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}) : 3380, 1602, 1489, 1454, 1396, 1364, 1274, 1096, 1068.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 315.1.

HRMS (FAB⁺) : calculée pour $C_{19}H_{23}O_4$: 315.1583, trouvée : 315.1591.

(3*R*,4*S*)-*O*-Benzylidène-5-*O*-benzylpentan-2-one -122

Le composé **122** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **121** en utilisant la méthode **5C** avec un rendement de **86 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.43$ (acétate d'éthyle /cyclohexane, 30/70).

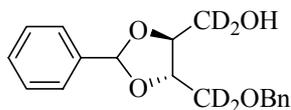
RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 2.29 (1/2 de 3H, s, 1-H), 2.34 (1/2 de 3H, s, 1-H*), 3.78 (2H, m, 5-H), 4.37 (1H, m, 4-H), 4.43 (1/2 de 1H, d, $J_{3-4}=6$ Hz, 3-H), 4.50 (1/2 de 1H, d, $J_{3-4}=6$ Hz, 3-H*), 4.63 (1/2 de 2H, s, CH_2 -Ph), 4.64 (1/2 de 2H, s, CH_2 -Ph*), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 6.09 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.29-7.54 (10H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 26.5 (CH_3 , C-1), 26.8 (CH_3 , C-1*), 70.0 (CH_2 , C-5), 70.4 (CH_2 , C-5*), 73.5 (CH_2 , $2 \times CH_2$ -Ph), 73.6 (CH_2 , $2 \times CH_2$ -Ph*), 78.2 (CH, C-4), 78.3 (CH, C-4*), 82.1 (CH, C-3), 82.3 (CH, C-3*), 105.1 (CH, CH-Ph), 126.7, 126.8, 127.6, 127.7, 127.8, 128.4, 129.6, 129.7, 136.4, 136.6 et 137.7 (C aromatiques), , 207.8 (C quaternaire, C-2), 208.4 (C quaternaire, C-2*).

IR ($CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}) : 1719, 1602, 1495, 1453, 1359, 1272, 1096, 1071.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 313.1.

HRMS (FAB⁺) : calculée pour $C_{19}H_{21}O_4$: 313.1440, trouvée : 313.1437.

(2*R*,3*S*)-[1,1,4,4-²H₄]-*O*-Benzylidène-4-*O*-benzyl-D-thréitol - 125

Le composé **125** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **101** en utilisant la méthode **1A** avec un rendement de **84 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.44$ (acétate d'éthyle /hexane, 60/40).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 2.37 (1/2 de 1H, s, OH), 2.43 (1/2 de 1H, s, OH*), 4.10 (1/2 de 1H, d, $J_{2-3}=7$ Hz, 2-H), 4.14 (1/2 de 1H, d, $J_{2-3}=7$ Hz, 2-H*), 4.22 (1/2 de 1H, d, $J_{2-3}=7$ Hz, 3-H), 4.24 (1/2 de 1H, d, $J_{2-3}=7$ Hz, 3-H*), 4.61 (1/2 de 2H, s, CH₂Ph), 4.63 (1/2 de 2H, s, CH₂Ph*), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.99 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.31 to 7.53 (10H, m, Ph).

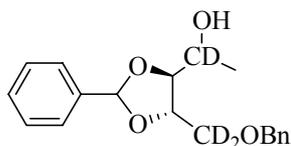
δ_C (75 MHz, CD₃OD) : 61.7 (CD₂, quint, $J_{C-D}=22.5$ Hz, C-1, α shift: -805 ppb), 61.8 (CD₂, quint, $J_{C-D}=22.5$ Hz, C-1*, α shift: -747 ppb), 69.2 (CD₂, quint, $J_{C-D}=22.3$ Hz, C-4, α shift: -854 ppb), 69.3 (CD₂, quint, $J_{C-D}=22.3$ Hz, C-4*, α shift: -780 ppb), 73.5 (CH₂, CH₂-Ph, γ shift: -148 ppb), 76.5 (CH, C-3, $\beta + \gamma$ shifts: -173 ppb), 77.6 (CH, C-3*, $\beta + \gamma$ shifts: -214 ppb), 79.6 (CH, C-2, $\beta + \gamma$ shifts: -246 ppb), 80.1 (CH, C-2*, $\beta + \gamma$ shifts: -222 ppb), 103.8 (CH, CH-Ph), 103.9 (CH, CH-Ph*), 126.5, 126.6, 126.7, 127.7, 128.2, 128.3, 128.4, 129.4, 129.5, 137.2, et 137.4 (C aromatiques), .

δ_D (61.4 MHz, CHCl₃) : 3.69 (s), 3.77 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max} (cm⁻¹) : 3387, 2191, 2079, 1602, 1496, 1456, 1409, 1370, 1288, 1098, 1069.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 305.1.

HRMS (FAB⁺) : (M+H)⁺ calculée pour C₁₈H₁₇D₄O₄ : 305.1691, trouvée : 305.1685.

(3R,4S)-[2,5,5-²H₃]-O-Benzylidène-5-O-benzylpentan-2-ol - 126

Le composé **126** est obtenu sous forme d'un mélange 7:4:2:1 de quatre diastéréomères à partir de **125** en utilisant la méthode **5B** avec un rendement de **88 %**.

Huile incolore

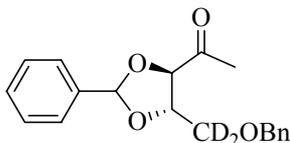
$R_f = 0.41$ (acétate d'éthyle /hexane, 50/50).

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 1.25 (9/14 de 3H, s, 1-H), 1.28 (5/14 de 3H, s, 1-H*), 2.41 (2/14 de 1H, d, $J_{OH-4} = 5.5$ Hz, OH), 2.46 (1/14 de 1H, s, OH*), 2.57 (4/14 de 1H, s, OH[§]), 2.64 (7/14 de 1H, s, OH[#]), 3.39 (7/14 de 1H, d, $J_{3-4} = 6.8$ Hz, 3-H), 3.88 (1/14 de 1H, d, $J_{3-4} = 6.4$ Hz, 3-H*), 3.95 (4/14 de 1H, d, $J_{3-4} = 6.4$ Hz, 3-H[§]), 3.99 (2/14 de 1H, d, $J_{3-4} = 6.4$ Hz, 3-H[#]), 4.25 (1/14 de 1H, d, $J_{3-4} = 6.4$ Hz, 4-H), 4.27 (2/14 de 1H, d, $J_{3-4} = 6.4$ Hz, 4-H*), 4.34 (7/14 de 1H, d, $J_{3-4} = 6.4$ Hz, 4-H[§]), 4.35 (4/14 de 1H, d, $J_{3-4} = 6.4$ Hz, 4-H[#]), 4.62 (2/14 de 2H, s, CH_2 -Ph), 4.63 (7/14 de 2H, s, CH_2 -Ph*), 4.64 (4/14 de 2H, s, CH_2 -Ph[§]), 4.65 (1/14 de 2H, s, CH_2 -Ph[#]), 5.96 (7/14 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (4/14 de 1H, s, CH-Ph*), 5.99 (1/14 de 1H, s, CH-Ph[§]), 6.00 (2/14 de 1H, s, CH-Ph[#]), 7.32-7.53 (10H, m, Ph). **δ_C (75 MHz, $CDCl_3$)** : 18.6 (CH_3 , C-1, β shift: -140 ppb), 18.7 (CH_3 , C-1*, β shift: -115 ppb), 19.1 (CH_3 , C-1[§], β shift: -145 ppb), 19.4 (CH_3 , C-1[#], β shift: -164 ppb), 67.3 (CD, m, C-2, α shift: -707 ppb), 69.7 (CD₂, m, C-5, α shift: -747 ppb), 73.4 (CH_2 , 2 \times CH_2 -Ph, γ shift: -115 ppb), 73.5 (CH_2 , 2 \times CH_2 -Ph*, γ shift: -115 ppb), 73.6 (CH_2 , 2 \times CH_2 -Ph[§], γ shift: -139 ppb), 76.6 (CH, C-4, $\beta + \gamma$ shifts: -90 ppb), 76.8 (CH, C-4*, $\beta + \gamma$ shifts: -380 ppb), 77.5 (CH, C-4[§], $\beta + \gamma$ shifts: -197 ppb), 78.5 (CH, C-4[#], $\beta + \gamma$ shifts: -190 ppb), 82.7 (CH, C-3, $\beta + \gamma$ shifts: -254 ppb), 82.9 (CH, C-3*, $\beta + \gamma$ shifts: -148 ppb), 83.1 (CH, C-3[§], $\beta + \gamma$ shifts: -189 ppb), 103.5 (CH, CH-Ph), 103.7 (CH, CH-Ph*), 103.8 (CH, CH-Ph[§]), 103.9 (CH, CH-Ph[#]), 126.5, 126.6, 126.7, 127.5, 127.6, 127.7, 128.2, 128.3, 128.4, 129.3, 129.4, 137.1, 137.2, 137.4, 137.6 et 137.7 (C aromatiques), . **δ_D (61.4 MHz, $CHCl_3$)** : 3.69 (s), 3.84 (s), 3.98 (s).

IR ($CHCl_3$) ν_{max} (cm^{-1}) : 3378, 2194, 2089, 1602, 1494, 1455, 1406, 1373, 1291, 1097, 1061.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 318.1.

HRMS (FAB⁺) : m/z : calculée pour $C_{19}H_{20}D_3O_4$: 318.1785, trouvée : 318.1779.

(3*R*,4*S*)-[5,5-²H₂]-*O*-Benzylidène-5-*O*-benzylpentan-2-one - 127

Le composé **127** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **128** en utilisant la méthode **5C** avec un rendement de **86 %**.

Huile incolore

$R_f = 0.46$ (acétate d'éthyle /hexane, 30/70).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 2.30 (1/2 de 3H, s, 1-H), 2.35 (1/2 de 3H, s, 1-H*), 4.37 (1/2 de 1H, d, $J_{3-4}=6.5$ Hz, 3-H), 4.40 (1/2 de 1H, d, $J_{3-4}=6.5$ Hz, 3-H*), 4.45 (1/2 de 1H, d, $J_{3-4}=6.5$ Hz, 4-H), 4.51 (1/2 de 1H, d, $J_{3-4}=6.5$ Hz, 4-H*), 4.64 (1/2 de 2H, s, CH₂-Ph), 4.65 (1/2 de 2H, s, CH₂-Ph*), 5.98 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 6.10 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.31-7.56 (10H, m, Ph).

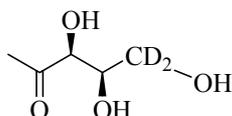
δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 26.5 (CH₃, C-1), 26.7 (CH₃, C-1*), 69.5 (CD₂, quint, $J_{C-D}=20.2$ Hz, C-5, α shift: -501 ppb), 69.6 (CD₂, quint, $J_{C-D}=20.2$ Hz, C-5*, α shift: -546 ppb), 73.4 (CH₂, 2×CH₂-Ph, γ shift: -131 ppb), 73.5 (CH₂, 2×CH₂-Ph*, γ shift: -148 ppb), 78.0 (CH, C-4, β shift: -197 ppb), 78.2 (CH, C-4*, β shift: -181 ppb), 81.9 (CH, C-3, γ shift: -98 ppb), 82.2 (CH, C-3*, γ shift: -90 ppb), 105.0 (CH, CH-Ph), 126.6, 126.7, 127.5, 127.6, 127.7, 128.4, 129.6, 129.7, 136.4, 136.6 et 137.7 (C aromatiques), , 207.7 (C quaternaire, C-2), 208.3 (C quaternaire, C-2*).

δ_D (61.4 MHz, CHCl₃) : 3.76 (s), 3.78 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max} (cm⁻¹) : 2191, 2078, 1721, 1602, 1494, 1453, 1359, 1272, 1097, 1070.

MS (FAB⁺) : (M+H)⁺ 315.1.

HRMS (FAB⁺) : calculée pour C₁₉H₁₉D₂O₄ : 315.1565, trouvée : 318.1561.

[5,5-²H₂]-1-Désoxy-D-xylulose - 128

Le composé **128** est obtenu **quantitativement** sous forme d'un mélange 1:1:4 des anomères α - et β -cycles et de la forme ouverte à partir de **127** en utilisant la méthode **2B**.

Huile incolore

$R_f = 0.18$ (chloroforme/méthanol, 90/10).

$[\alpha]_D^{20} = +34.5$ (c 1, H₂O), lit.¹⁹ $[\alpha]_D = +34.8$ (c 1.0, H₂O).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 1.38 (s, CH₃, anomère furanose) 1.42 (s, CH₃, anomère furanose), 2.24 (s, 1-H, forme ouverte), 3.61 (m, anomère furanose), 3.79 (m, anomère furanose), 3.97 (s, 4-H, forme ouverte), 4.07 (s, anomère furanose), 4.21 (d, $J_{3,4} = 2.2$ Hz, 3-H, forme ouverte).

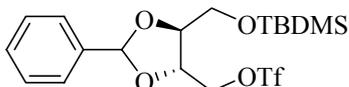
δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 21.8 (CH₃, C-1), 25.0 (CH₃, C-1), 26.5 (CH₃, C-1), signal large centré à 63.2 (CD₂, m, C-5), 73.4 (CH, C-4, β shift: -82 ppb), 77.3 (CH, C-4, β shift: -92 ppb), 78.3 (CH, C-4, β shift: -76 ppb), 78.5 (CH, C-3, γ shift: -24 ppb), 82.8 (CH, C-3, γ shift: -34 ppb), 83.1 (CH, C-3, γ shift: -76 ppb), 103.7 (C quaternaire, C-2, δ shift: -36 ppb), 107.5 (C quaternaire, C-2, δ shift: -21 ppb), 212.3 (C quaternaire, C-2, δ shift: -11 ppb).

δ_D (61.4 MHz, CHCl₃) : 3.76 (s), 3.86 (s).

IR (KBr) ν_{max} (cm⁻¹) : 3428, 3187, 2237, 2098, 1792, 1715, 1664, 1259, 1087, 1017, 873.

MS (ES⁻) : (M-H⁺) 135.

(2*R*,3*S*)-*O*-Benzylidène-4-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-1-*O*-trifluorométhane-sulfonyl-D-thréitol - 129



Le composé **129** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **95** en utilisant la méthode **3A** avec un rendement de **95%**.

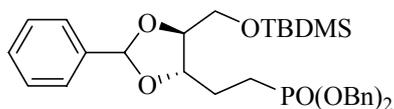
Huile incolore

R_f : 0.57 (acétate d'éthyle/hexane, 20/80).

RMN, δ_H (200 MHz, $CDCl_3$) : 0.08 (1/2 de 6H, s, 2 \times CH₃), 0.11 (1/2 de 6H, s, 2 \times CH₃*), 0.90 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.92 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu*), 3.70-4.14 (3H, m, 2,4-H), 4.38-4.78 (3H, m, 1- et 3-H), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 6.02 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.33-7.51 (5H, m, Ph).

δ_C (50 MHz, $CDCl_3$) : -5.4 (2 \times CH₃), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu), 25.9 (3 \times CH₃, *t*-Bu), 63.3 (CH₂, C-4), 63.4 (CH₂, C-4*), 75.4 (CH₂, C-1), 77.1 (CH, C-2), 77.3 (CH, C-2*), 77.8 (CH, C-3), 104.5 (CH, CH-Ph), 105.1 (CH, CH-Ph*), 126.7, 128.5, 129.8 et 136.7 (C aromatiques),

Dibenzyl [(3*R*,4*S*)-*O*-Benzyldène-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl]-pentyl]-phosphonate - 130



Le composé **130** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **129** en utilisant la méthode **13** avec un rendement de **70 %**.

Huile incolore

R_f : 0.46 (acétate d'éthyle/hexane, 50/50).

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 0.05 (1/2 de 6H, s, $2 \times CH_3$), 0.08 (1/2 de 6H, s, $2 \times CH_3^*$), 0.88 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.90 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu*), 1.77-2.19 (4H, m, 1- et 2-H), 3.61-3.85 (3H, m, 3- et 5-H), 3.96-4.15 (1H, m, 4-H), 4.88-5.17 (4H, s, $2 \times CH_2$ -Ph), 5.83 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.86 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.30-7.44 (15H, m, Ph).

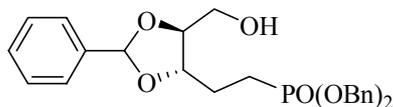
δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : -5.3 ($2 \times CH_3$), 18.4 (C quaternaire, *t*-Bu), 22.5 (CH_2 , d, $^1J_{C-P} = 143$ Hz, C-1), 22.7 (CH_2 , d, $^1J_{C-P} = 143$ Hz, C-1*), 25.9 ($3 \times CH_3$, *t*-Bu), 26.4 (CH_2 , d, $^2J_{C-P} = 4$ Hz, C-2), 26.6 (CH_2 , d, $^2J_{C-P} = 4$ Hz, C-2*), 63.3 (CH_2 , C-5), 63.7 (CH_2 , C-5*), 67.2 (CH_2 , $2 \times CH_2$ -Ph), 67.4 (CH_2 , $2 \times CH_2$ -Ph*), 79.3 (CH, d, $^3J_{C-P} = 18$ Hz, C-3), 79.4 (CH, d, $^3J_{C-P} = 18$ Hz, C-3*), 80.8 (CH, C-4), 81.9 (CH, C-4*), 102.9 (CH, CH-Ph), 103.8 (CH, CH-Ph*), 126.3, 126.7, 127.1, 127.6, 128.0, 128.4, 128.5, 128.7, 129.1, 129.4, 136.4, 136.5, 137.6 et 137.7 (C aromatiques), .

δ_P (121.5 MHz, $CDCl_3$) : 33.9 (s).

IR ($CHCl_3$) ν_{max}/cm^{-1} : 1602, 1498, 1456, 1380, 1256, 1240, 1224, 1091, 1044, 998, 839. MS

MS (FAB⁺) m/z : 583.4 (M + H)⁺.

HRMS (FAB⁺) m/z calculée pour $C_{32}H_{44}O_6SiP$: 583.2645, trouvée : 583.2649.

Dibenzyl [(3*R*, 4*S*)-*O*-benzylidène-5-hydroxy-pentyl]-phosphonate - 131

Le composé **131** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **130** en utilisant la méthode **2A** avec un rendement de **98 %**.

Huile incolore

R_f : 0.31 (acétate d'éthyle).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 1.77-2.12 (4H, m, 1- et 2-H), 3.60-3.89 (3H, m, 3- et 5-H), 4.01-4.17 (1H, m, 4-H), 4.89-5.12 (4H, s, 2×CH₂-Ph), 5.83 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.86 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.33-7.43 (15H, m, Ph).

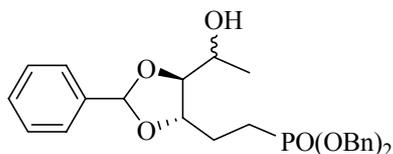
δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 22.5 (CH₂, d, ¹J_{C-P} = 150 Hz, C-1), 22.7 (CH₂, d, ¹J_{C-P} = 150 Hz, C-1*), 25.9 (CH₂, d, ²J_{C-P} = 4 Hz, C-2), 26.1 (CH₂, d, ²J_{C-P} = 4 Hz, C-2*), 62.3 (CH₂, C-5), 62.6 (CH₂, C-5*), 67.4 (CH₂, 2×CH₂-Ph), 67.5 (CH₂, 2×CH₂-Ph*), 77.9 (CH, d, ³J_{C-P} = 16 Hz, C-3), 78.5 (CH, d, ³J_{C-P} = 16 Hz, C-3*), 81.2 (CH, C-4), 82.4 (CH, C-4*), 103.1 (CH, CH-Ph), 103.7 (CH, CH-Ph*), 126.4, 126.7, 127.7, 128.1, 128.6, 128.8, 129.1, 129.6, 136.3, 136.4 et 137.4 (C aromatiques), .

δ_P (121.5 MHz, CDCl₃) : 33.9 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max}/cm^{-1} : 3595, 3405, 1602, 1498, 1456, 1379, 1237, 1221, 1095, 1047, 998.

MS (FAB⁺) m/z : 469.2 (M + H)⁺.

HRMS (FAB⁺) m/z calculée pour C₂₆H₃₀O₆P : 469.1780, trouvée 469.1777.

Dibenzyl [(3*R*, 4*S*)-*O*-benzylidène-5-hydroxy-hexyl]-phosphonate -132

Le composé **132** est obtenu sous forme d'un mélange 14:14:4:1 de quatre diastéréomères à partir de **131** en utilisant la méthode **5B** avec un rendement de **86 %**.

Huile incolore

R_f : 0.42 (acétate d'éthyle).

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 1.18 (1/33 de 3H, d, $J_{5-6} = 6.4$ Hz, 6-H), 1.19 (14/33 de 3H, d, $J_{5-6} = 6.4$ Hz, 6-H*), 1.24 (14/33 de 3H, d, $J_{5-6} = 6.4$ Hz, 6-H[§]), 1.25 (4/33 de 3H, d, $J_{5-6} = 6.4$ Hz, 6-H[#]), 1.75-2.18 (4H, m, 1- et 2-H), 3.54-3.64 (1H, m, 5-H), 3.88-3.98 (1H, m, 4-H), 4.16-4.25 (1H, m, 3-H), 4.91-5.11 (4H, s, 2×CH₂-Ph), 5.79 (14/33 de 1H, s, CH-Ph), 5.81 (4/33 de 1H, s, CH-Ph*), 5.83 (14/33 de 1H, s, CH-Ph[§]), 5.86 (1/33 de 1H, s, CH-Ph[#]), 7.30-7.46 (15H, m, Ph).

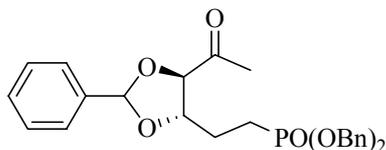
δ_C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : 19.2 (CH₃, C-6), 19.8 (CH₃, C-6*), 22.5 (CH₂, d, $^1J_{C-P} = 142$ Hz, C-1), 22.8 (CH₂, d, $^1J_{C-P} = 142$ Hz, C-1*), 27.0 (CH₂, d, $^2J_{C-P} = 4$ Hz, C-2), 27.1 (CH₂, d, $^2J_{C-P} = 4$ Hz, C-2*), 67.3 (CH₂, 2×CH₂-Ph); 67.4 (CH₂, 2×CH₂-Ph*), 67.5 (CH₂, 2×CH₂-Ph[§]), 67.6 (CH, C-5), 68.1 (CH, C-5*), 77.7 (CH, d, $^3J_{C-P} = 20$ Hz, C-3), 77.8 (CH, d, $^3J_{C-P} = 20$ Hz, C-3*), 79.0 (CH, d, $^3J_{C-P} = 20$ Hz, C-3[§]), 79.1 (CH, d, $^3J_{C-P} = 20$ Hz, C-3[#]), 84.3 (CH, C-4), 85.7 (CH, C-4*), 102.6 (CH, CH-Ph), 103.7 (CH, CH-Ph*), 126.7, 128.0, 128.1, 128.5, 128.6, 128.7, 129.6, 129.7, 136.3, 136.4, 137.2 et 137.7 (C aromatiques), .

δ_P (121.5 MHz, $CDCl_3$) : 33.8 (s), 33.9 (s), 34.3 (s) et 34.4 (s).

IR ($CHCl_3$) ν_{max}/cm^{-1} : 3598, 3408, 1602, 1498, 1456, 1380, 1236, 1225, 1090, 1047, 998.

MS (FAB⁺) m/z : 483.3 (M + H)⁺.

HRMS (FAB⁺) m/z calculée pour $C_{27}H_{32}O_6P$: 483.1937, trouvée : 483.1941.

Dibenzyl [(3*R*, 4*S*)-*O*-benzylidène-5-oxo-hexyl]-phosphonate - 133

Le composé **133** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **132** en utilisant la méthode **5C** avec un rendement de **79 %**.

Huile incolore

R_f : 0.46 (acétate d'éthyle).

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 1.18-2.15 (4H, m, 1- et 2-H), 2.21 (1/2 de 3H, s, 6-H), 2.29 (1/2 de 3H, s, 6-H*), 4.01 (1/2 de 1H, d, $J_{3-4} = 7$ Hz, 4-H), 4.04 (1/2 de 1H, d, $J_{3-4} = 6$ Hz, 4-H*), 4.05-4.17 (1H, m, 3-H), 4.92-5.11 (4H, s, 2 \times CH₂-Ph), 5.86 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.89 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.32-7.48 (15H, m, Ph).

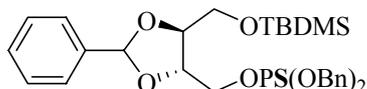
δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 22.3 (CH₂, d, $^1J_{C-P} = 143$ Hz, C-1), 22.6 (CH₂, d, $^1J_{C-P} = 143$ Hz, C-1*), 26.6 (CH₃, C-6), 26.9 (CH₃, C-6*), 26.7 (CH₂, d, $^2J_{C-P} = 4$ Hz, C-2), 67.4 (CH₂, 2 \times CH₂-Ph), 67.5 (CH₂, 2 \times CH₂-Ph*), 78.9 (CH, d, $^3J_{C-P} = 22$ Hz, C-3), 79.0 (CH, d, $^3J_{C-P} = 22$ Hz, C-3*), 84.7 (CH, C-4), 85.9 (CH, C-4*), 103.8 (CH, CH-Ph), 104.8 (CH, CH-Ph*), 126.7, 126.8, 128.1, 128.8, 129.8, 129.9, 136.2, 136.4, 136.5 et 136.6 (C aromatiques), , 207.4 (C quaternaire, C-5), 208.5 (C quaternaire, C-5*).

δ_P (121.5 MHz, $CDCl_3$) : 33.2 (s) et 33.3 (s).

IR ($CHCl_3$) ν_{max}/cm^{-1} : 1718, 1657, 1598, 1498, 1456, 1407, 1378, 1359, 1244, 1225, 1094, 998.

MS (FAB⁺) m/z : 481.2 (M + H)⁺.

HRMS (FAB⁺) m/z calculée pour $C_{27}H_{30}O_6P$: 481.1780, trouvée 481.1780.

(2*R*,3*R*)-4-*O*-(*t*-butyldiméthylsilyl)-2,3-benzylidènebutanol-1-diéthylthiophosphate - 150

Le composé **150** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **95** en utilisant la méthode **12A** avec un rendement de **91 %**.

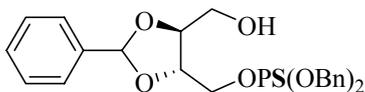
Huile incolore

$R_f = 0.39$ (acétate d'éthyle /hexane, 10/90).

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 0.07 (1/2 de 6H, s, $2 \times CH_3$), 0.09 (1/2 de 6H, s, $2 \times CH_3^*$), 0.89 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu), 0.92 (1/2 de 9H, s, *t*-Bu*), 3.78 (2H, m, 1-H), 4.05 (1H, m, 3-H), 4.25 (3H, m, 2-H et 4-H), 5.08 (4H, m, $2 \times CH_2$ -Ph), 5.87 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.32-7.48 (15H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : -5.4 ($2 \times CH_3$), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu), 25.9 ($3 \times CH_3$, *t*-Bu), 63.4 (CH_2 , s, C-4), 67.7 (CH_2 , d, $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1), 67.8 (CH_2 , d, $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1*), 69.6 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2 -Ph), 69.8 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2 -Ph*), 77.2 (CH, d, $J_{C2-P} = 8.6$ Hz, C-2), 77.3 (CH, d, $J_{C2-P} = 8.0$ Hz, C-2*), 78.2 (CH, C-3), 78.4 (CH, C-3*), 104.0 (CH, CH-Ph), 104.6 (CH, CH-Ph*), 126.6, 126.7, 127.9, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 129.4, 135.7, 135.8, 137.2 et 137.3 (C aromatiques), .

δ_P (121.5 MHz, $CHCl_3$) : 69.8 (s), 70.2 (s).

(2*R*,3*R*)-*O*-Benzylidène-4-hydroxybutyl-1-diéthylthiophosphate - 151

Le composé **151** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **150** en utilisant la méthode **2A** avec un rendement de **87 %**.

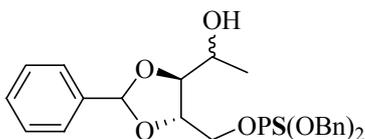
Huile incolore

$R_f = 0.38$ (acétate d'éthyle /hexane, 50/50).

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 1.85 (1H, s, OH), 3.73 (1H, m, 1-H), 4.17 (3H, m, 2-, 3- et 4-H), 5.08 (4H, m, 2 x CH_2 -Ph), 5.87 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.96 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.32-7.48 (15H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 62.1 (CH_2 , s, C-4), 62.2 (CH_2 , s, C-4*), 67.0 (CH_2 , d, $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1), 67.1 (CH_2 , d, $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1*), 69.8 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2 -Ph), 69.9 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2 -Ph*), 75.6 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2), 76.4 (CH, d, $J_{C2-P} = 8.0$ Hz, C-2*), 78.6 (CH, C-3), 79.1 (CH, C-3*), 104.0 (CH, CH-Ph), 104.1 (CH, CH-Ph*), 126.6, 127.9, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.4, 129.6, 135.4, 135.5, 137.2 et 137.3 (C aromatiques), .

δ_P (121.5 MHz, $CHCl_3$) : 69.9 (s), 70.3 (s).

(2*R*,3*R*)-*O*-Benzylidène-4-hydroxypentyl-1-diéthylthiophosphate - 152

Le composé **152** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **151** en utilisant la méthode **5B** avec un rendement de **87 %**.

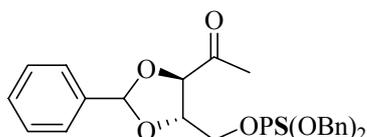
Huile incolore

$R_f = 0.24$ (acétate d'éthyle /hexane, 40/60).

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 1.19 (5/9 de 3H, d, $J_{5-4} = 6.4$ Hz, 5-H), 1.24 (4/9 de 3H, d, $J_{5-4} = 6.4$ Hz, 5-H*), 3.87 (2H, m, 3-H et 4-H), 4.21 (3H, m, 1- et 2-H), 5.08 (4H, m, 2 x CH_2 -Ph), 5.85 (3/9 de 1H, s, CH-Ph), 5.87 (2/9 de 1H, s, CH-Ph*), 5.94 (1/9 de 1H, s, CH-Ph[§]), 5.96 (3/9 de 1H, s, CH-Ph[#]), 7.32-7.49 (15H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 18.8 (CH_3 , C-5), 19.3 (CH_3 , C-5*), 19.6 (CH_3 , C-5[§]), 66.9 (CH_2 , $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1), 67.1 (CH, C-4), 67.4 (CH, C-4*), 67.5 (CH, C-4[§]), 67.6 (CH_2 , $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1*), 67.7 (CH_2 , $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1[§]), 67.9 (CH, C-4[#]), 69.1 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2 -Ph), 69.5 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2 -Ph*), 76.2 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2), 76.4 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2*), 77.9 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2[§]), 81.0 (CH, C-3), 81.6 (CH, C-3*), 82.2 (CH, C-3[§]), 82.4 (CH, C-3[#]), 103.7 (CH, CH-Ph), 103.9 (CH, CH-Ph*), 104.0 (CH, CH-Ph[§]), 104.3 (CH, CH-Ph[#]), 126.5, 126.6, 126.7, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.4, 129.5, 129.6, 135.5, 135.6, 135.7, 136.7, 136.8 et 137.3 (C aromatiques), .

δ_P (121.5 MHz, $CDCl_3$) : 69.8 (s), 69.9 (s), 70.2 (s), 70.3 (s).

(2*R*,3*S*)-*O*-Benzylidène-4-oxopentyl-1-diéthylthiophosphate - 153

Le composé **153** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **152** en utilisant la méthode **5C** avec un rendement de **89 %**.

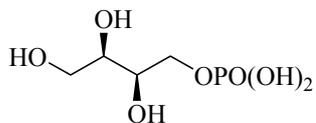
Huile incolore

$R_f = 0.4$ (acétate d'éthyle /hexane, 30/70).

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 2.26 (1/2 de 3H, s, 5-H), 2.30 (1/2 de 3H, s, 5-H*), 4.28 (3H, m, 1-, 2- et 3-H), 5.10 (4H, m, 2 x CH_2 -Ph), 5.90 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.32-7.50 (15H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 26.6 (CH_3 , C-5), 26.7 (CH_3 , C-5*), 66.9 (CH_2 , d, $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1), 67.4 (CH_2 , d, $J_{C1-P} = 5.6$ Hz, C-1*), 69.8 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2 -Ph), 69.9 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH_2 -Ph*), 76.7 (CH, d, $J_{C2-P} = 8.0$ Hz, C-2), 76.9 (CH, d, $J_{C2-P} = 7.4$ Hz, C-2*), 81.5 (CH, C-3), 81.7 (CH, C-3*), 105.0 (CH, CH-Ph), 105.1 (CH, CH-Ph*), 126.6, 126.7, 127.9, 128.0, 128.4, 128.5, 128.6, 129.7, 129.8, 135.5, 135.6, 135.9 et 136.2 (C aromatiques), , 206.7 (C quaternaire, C-4), 207.6 (C quaternaire, C-4*).

δ_P (121.5 MHz, $CDCl_3$) : 69.9 (s), 70.2 (s).

(2R,3S)-2,3,4-Trihydroxybutan-1-phosphate - 154

Le composé **154** est obtenu à partir de **97** en utilisant la méthode **2C** avec un rendement **quantitatif**.

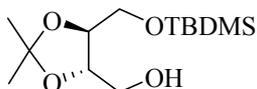
Huile incolore

$R_f = 0.19$ (*i*-propanol/eau/acétate d'éthyle, 6/3/1).

RMN, δ_H (300 MHz, D_2O) : 3.69 (2H, m, 2-, 3-H), 3.83 (4H, m, 1-, 4-H).

δ_C (75 MHz, D_2O) : 62.8 (CH_2 , C-4), 65.2 (CH_2 , d, $^1J_{C-P} = 4.5$ Hz, C-1), 70.8 (CH , d, $^2J_{C-P} = 6.5$ Hz, C-2), 71.7 (CH , C-3).

δ_P (121.5 MHz, D_2O) : 5.8 (s).

(2*R*,3*R*)-4-*O*-(*t*-butyldiméthylsilyl)-2,3-isopropylidène-D-thréitol - 155

Le composé **155** est obtenu à partir de **78** en utilisant la méthode **1A** avec un rendement de **96** %.

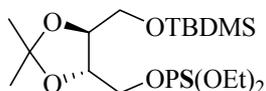
Huile incolore

$R_f = 0.45$ (cyclohexane/acétate d'éthyle, 80/20)

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 0.07 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.89 (9H, s, *t*-Bu), 1.39 (3H, s, CH_3), 1.40 (3H, s, CH_3), 3.65-3.97 (6H, m, 1-H, 2-H, 3-H, 4-H).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu), 25.9 (3 \times CH_3 , *t*-Bu), 28.9 (2 \times CH_3 , $Si(CH_3)_2$), 27.0 (2 \times CH_3), 62.7 (CH_2 , C-4), 63.7 (CH_2 , C-1), 78.1 (CH, C-2), 80.1 (CH, C-3), 109,1 (C quaternaire).

(2*R*,3*R*)-4-*O*-(*t*-butyldiméthylsilyl)-2,3-isopropylidènebutanol-1-diéthylthiophosphate - 156



Le composé **156** est obtenu à partir de **157** en utilisant la méthode **12B** avec un rendement de **82 %**.

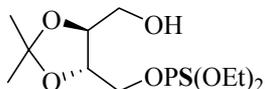
Huile incolore

R_f = 0.49 (cyclohexane/acétate d'éthyle, 95/5)

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) : 0.05 (6H, s, Si(CH₃)₂), 0.87 (9H, s, *t*-Bu), 1.29 (3H, t, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 1.30 (3H, t, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 1.37 (3H, s, CH₃), 1.38 (3H, s, CH₃), 3.69 (1H, dd, ³J_{4a-3} = 5.7 Hz, ²J_{4a-4b} = 10.6 Hz, 4-H_a), 3.78 (1H, dd, ³J_{4b-3} = 4 Hz, ²J_{4a-4b} = 10.6 Hz, 4-H_b), 3.88 (1H, ddd, ³J_{3-4a} = 5.7 Hz, ³J_{3-4b} = 4 Hz, ³J₃₋₂ = 7.5 Hz, 3-H), 4.02-4.25 (7H, m, 1-H, 2-H, P(OCH₂CH₃)₂).

δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) : 15.8 (CH₃, d, ³J_{C-P} = 7.4 Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 15.9 (CH₃, d, ³J_{C-P} = 7.4 Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu), 25.9 (3 × CH₃, *t*-Bu), 26.9 (2 × CH₃, Si(CH₃)₂), 27.0 (2 × CH₃), 63.4 (CH₂, C-4), 64.3 (CH₂, d, ²J_{C-P} = 5.6 Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 64.4 (CH₂, d, ²J_{C-P} = 5.6 Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 67.7 (CH₂, d, ²J_{C-P} = 5.6 Hz, C-1), 77.1 (CH, d, ³J_{C-P} = 8.7 Hz, C-2), 77.6 (CH, C-3), 109.7 (C quaternaire).

δ_{P} (121.5 MHz, CDCl₃) : 69.2 (s).

(2*R*,3*R*)-*O*-Isopropylidène-4-hydroxybutyl-1-diéthylthiophosphate - 157

Le composé **157** est obtenu à partir de **156** en utilisant la méthode **2A** avec un rendement de **81 %**.

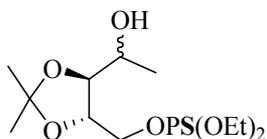
Huile incolore

R_f = 0.50 (cyclohexane/acétate d'éthyle, 60/40)

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) : 1.29 (3H, t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.30 (3H, t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.39 (3H, s, CH_3), 1.40 (3H, s, CH_3), 3.65 (1H, dd, $^3J_{3-4a} = 4.2$ Hz, $^2J_{4a-4b} = 12.1$ Hz, 4- H_a), 3.81 (1H, dd, $^3J_{3-4b} = 3.7$ Hz, $^2J_{4a-4b} = 10.6$ Hz, 4- H_b), 4.00 (1H, m, 3-H), 4.05-4.20 (7H, m, 1-H, 2-H, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$).

δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) : 15.8 (CH_3 , d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.4$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 15.9 (CH_3 , d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.4$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 26.8 (CH_3); 27.0 (CH_3), 61.9 (CH_2 , C-4), 64.5 (CH_2 , d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.2$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 64.5 (CH_2 , d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.2$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 67.0 (CH_2 , d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, C-1), 75.4 (CH , d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.7$ Hz, C-2), 78.3 (CH , C-3), 109.7 (C quaternaire).

δ_{P} (121.5 MHz, CDCl_3) : 69.3 (s).

(2*R*,3*R*)-*O*-Isopropylidène-4-hydroxypentyl-1-diéthylthiophosphate - 158

Le composé **158** est obtenu à partir de **157** en utilisant la méthode **5B** avec un rendement de **85 %**.

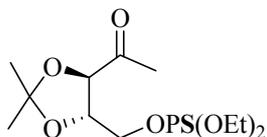
Huile incolore

R_f = 0.47 (cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30)

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) : 1.23 (3H, d, $^3J_{4-5}$ = 6.6 Hz, 5-H), 1.30 (3H, t, $^3J_{\text{H-H}}$ = 7.1 Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 1.31 (3H, t, $^3J_{\text{H-H}}$ = 7.1 Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 1.39 (3H, s, CH₃), 1.40 (3H, s, CH₃), 3.78 (1H, dd, $^3J_{2-3}$ = 7.3 Hz, $^3J_{3-4}$ = 5.1 Hz, 3-H), 3.91 (1H, m, 4-H), 4.05-4.25 (7H, m, 1-H, 2-H, P(OCH₂CH₃)₂).

δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) : 15.8 (CH₃, d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 7.4 Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 15.8 (CH₃, d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 7.4 Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 19.0 (CH₃, C-5), 26.8 (CH₃), 27.1 (CH₃), 64.4 (CH₂, d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 5.6 Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 64.5 (CH₂, d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 5.6 Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 67.5 (CH, C-4), 68.1 (CH₂, d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 5.6 Hz, C-1), 76.3 (CH, d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 8.7 Hz, C-2), 80.5 (CH, C-3), 109.5 (C quaternaire).

δ_{P} (121.5 MHz, CDCl₃) : 69.3 (s).

(2*R*,3*S*)-*O*-Isopropylidène-4-oxopentyl-1-diéthylthiophosphate - 159

Le composé **159** est obtenu à partir de **159** en utilisant la méthode **5C** avec un rendement de **90 %**.

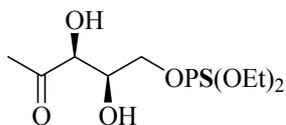
Huile incolore

R_f = 0.72 (cyclohexane/acétate d'éthyle, 80/20)

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) : 1.30 (3H, t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.31 (3H, t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.39 (3H, s, CH_3), 1.45 (3H, s, CH_3), 2.28 (3H, s, 5-H), 4.07-4.2 (6H, m, 1-H, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 4.24 (2H, m, 2-H, 3-H).

δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) : 15.8 (CH_3 , d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.4$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 15.9 (CH_3 , d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.4$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 26.3 (CH_3 , C-5), 26.6 (CH_3), 26.7 (CH_3), 64.5 (CH_2 , d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 64.6 (CH_2 , d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 66.9 (CH_2 , d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.9$ Hz, C-1), 76.3 (CH, d, $^3J_{\text{C-P}} = 9.3$ Hz, C-2), 81.4 (CH, C-3), 111.3 (C quaternaire), 207.8 (C quaternaire, C-4).

δ_{P} (121.5 MHz, CDCl_3) : 69.2 (s).

(2R,3S)-2,3-Hydroxy-4-oxopentyl-1-diéthylthiophosphate - 160

Le composé **160** est obtenu à partir de **159** avec un rendement **quantitatif**.

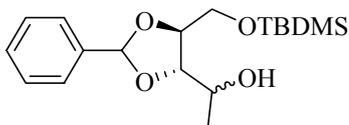
Huile incolore

Rf = 0.45 (cyclohexane/acétate d'éthyle, 80/20)

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 1.30 (3H, t, $^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, $P(OCH_2CH_3)_2$), 1.31 (3H, t, $^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, $P(OCH_2CH_3)_2$), 2.31 (3H, s, 5-H), 4.03-4.21 (6H, m, 1-H, $P(OCH_2CH_3)_2$), 4.24 (2H, m, 2-H, 3-H).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 15.8 (CH_3 , d, $^3J_{C-P} = 7.4$ Hz, $P(OCH_2CH_3)_2$), 15.9 (CH_3 , d, $^3J_{C-P} = 7.4$ Hz, $P(OCH_2CH_3)_2$), 26.8 (CH_3 , C-5), 64.4 (CH_2 , d, $^2J_{C-P} = 5.6$ Hz, $P(OCH_2CH_3)_2$), 64.6 (CH_2 , d, $^2J_{C-P} = 5.6$ Hz, $P(OCH_2CH_3)_2$), 66.8 (CH_2 , d, $^2J_{C-P} = 4.9$ Hz, C-1), 76.4 (CH , d, $^3J_{C-P} = 9,3$ Hz, C-2), 80.8 (CH , C-3), 207.3 (C quaternaire, C-4).

δ_P (121.5 MHz, $CDCl_3$) : 69.3 (s).

(3*R*,4*S*)-*O*-Benzylidène-5-*O*-(*t*-butyldiméthylsilyl)pentan-2-ol - 161

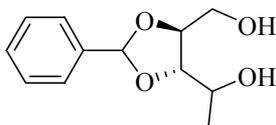
Le composé **161** est obtenu sous forme d'un mélange 1:3:3:12 de quatre diastéréomères à partir de **95** en utilisant la méthode **5B** avec un rendement de **72 %**.

Huile incolore

R_f = 0.21 (hexane/acétate d'éthyle, 80/20)

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) 0.08 (6H, s, 2×CH₃), 0.10 (12/19 de 9H, s, *t*-Bu), 0.12 (7/19 de 9H, s, *t*-Bu*), 0.91 (7/19 de 3H, d, $J_{1-2} = 6.4$ Hz, 1-H), 0.92 (12/19 de 3H, d, $J_{1-2} = 6.4$ Hz, 1-H), 2.4 (1H, s, OH), 3.71-4.21 (5H, m, 2-, 3-, 4-, 5-H), 5.94 (3/19 de 1H, s, CH-Ph), 5.95 (12/19 de 1H, s, CH-Ph*), 5.96 (1/19 de 1H, s, CH-Ph[§]), 5.97 (3/19 de 1H, s, CH-Ph[#]), 7.32-7.49 (5H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, CDCl₃) : -5.6 (2×CH₃), -5.5 (2×CH₃*), -5.4 (2×CH₃[§]), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu), 18.7 (C quaternaire, *t*-Bu*), 18.9 (CH₃, C-1), 19.3 (CH₃, C-1*), 25.8 (3×CH₃, *t*-Bu), 25.9 (3×CH₃, *t*-Bu*), 63.5 (CH₂, C-5), 63.8 (CH₂, C-5*), 63.9 (CH₂, C-5[§]), 64.1 (CH₂, C-5[#]), 67.4 (CH, C-4), 67.5 (CH, C-4*), 68.2 (CH, C-4[§]), 78.1 (CH, C-2), 78.2 (CH, C-2*), 78.7 (CH, C-2[§]), 83.7 (CH, C-3), 83.8 (CH, C-3*), 103.5 (CH, CH-Ph), 103.7 (CH, CH-Ph*), 104.1 (CH, CH-Ph[§]), 126.5, 126.6, 126.7, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.4, 129.5, 129.6, 135.5, 135.6, 135.7, 136.7, 136.8 et 137.3 (C aromatiques).

(2*R*,3*S*)-*O*-Benzylidène-pentan-1,4-diol - 162

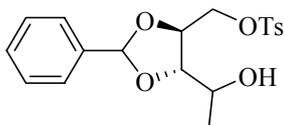
Le composé **162** est obtenu sous forme d'un mélange 1:2:4:6 de quatre diastéréomères à partir de **161** en utilisant la méthode **2A** avec un rendement de **93 %**.

Huile incolore

R_f = 0.24 (hexane/acétate d'éthyle, 20/80)

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) : 1.24 (1/13 de 3H, d, $J_{5-4} = 6.4$ Hz, 5-H), 1.26 (2/13 de 3H, d, $J_{5-4} = 6.4$ Hz, 5-H*), 1.29 (6/13 de 3H, d, $J_{5-4} = 6.4$ Hz, 5-H[§]), 1.31 (4/13 de 3H, d, $J_{5-4} = 6.4$ Hz, 5-H[#]), 2.3 (1H, s, OH), 3.76-3.96 (3H, m, 1-, 4-H), 3.95-4.21 (1H, m, 3-H), 4.26-4.32 (1H, m, 2-H), 5.95 (4/13 de 1H, s, CH-Ph), 5.97 (6/13 de 1H, s, CH-Ph*), 5.98 (2/13 de 1H, s, CH-Ph[§]), 5.99 (1/13 de 1H, s, CH-Ph[#]), 7.32-7.49 (5H, m, Ph).

δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) : 18.8 (CH₃, C-5), 19.2 (CH₃, C-5*), 19.7 (CH₃, C-5[§]), 21.0 (CH₃, C-5[#]), 63.1 (CH₂, C-1), 63.4 (CH₂, C-1*), 67.4 (CH, C-2), 67.5 (CH, C-2*), 67.7 (CH, C-2[§]), 68.7 (CH, C-2[#]), 77.2 (CH, C-4), 77.4 (CH, C-4*), 78.3 (CH, C-4[§]), 79.7 (CH, C-4[#]), 81.6 (CH, C-3), 81.9 (CH, C-3*), 82.4 (CH, C-3[§]), 82.6 (CH, C-3[#]), 103.5 (CH, CH-Ph), 103.8 (CH, CH-Ph*), 103.9 (CH, CH-Ph[§]), 126.5, 126.6, 126.7, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.4, 129.5, 129.6, 135.5, 135.6, 135.7, 136.7, 136.8 et 137.3 (C aromatiques).

(3*R*,4*S*)-*O*-Benzylidène-5-tosylpentan-2-ol - 163

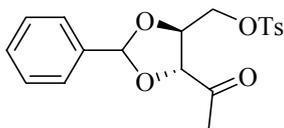
Le composé **163** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1:2:1 de quatre diastéréomères à partir de **162** en utilisant la méthode **3B** avec un rendement de **87 %**.

Huile incolore

R_f = 0.69 (hexane/acétate d'éthyle, 10/90)

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) : 1.20 (1/5 de 3H, d, J_{1-2} = 6.4 Hz, 1-H), 1.22 (1/5 de 3H, d, J_{1-2} = 6.4 Hz, 1-H*), 1.23 (2/5 de 3H, d, J_{1-2} = 6.4 Hz, 1-H[§]), 1.26 (2/5 de 3H, d, J_{1-2} = 6.4 Hz, 1-H[#]), 2.04 (1H, s, OH), 2.42 (2/5 de 3H, s, CH₃-OTs), 2.44 (3/5 de 3H, s, CH₃-OTs), 3.76-3.85 (1H, m, 3-H), 3.88-4.03 (1H, m, 4-H), 4.08-4.44 (3H, m, 2-,5-H), 5.80 (1/5 de 1H, s, CH-Ph), 5.81 (1/5 de 1H, s, CH-Ph*), 5.93 (2/5 de 1H, s, CH-Ph[§]), 5.96 (1/5 de 1H, s, CH-Ph[#]), 7.25-7.83 (9H, m, Ph).

δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) : 14.2 (CH₃, CH₃-OTs), 18.8 (CH₃, C-1), 18.9 (CH₃, C-1*), 19.8 (CH₃, C-1[§]), 21.6 (CH₃, C-1[#]), 68.0 (CH, C-2), 69.6 (CH₂, C-5), 69.8 (CH₂, C-5*), 75.2 (CH, C-3), 76.44 (CH, C-3*), 78.3 (CH, C-3[§]), 81.0 (CH, C-4), 81.6 (CH, C-4*), 103.9 (CH, CH-Ph), 104.0 (CH, CH-Ph*), 104.2 (CH, CH-Ph[§]), 104.4 (CH, CH-Ph[#]), 126.5, 126.6, 126.7, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.4, 129.5, 129.6, 135.5, 135.6, 135.7, 136.7, 136.8 et 137.3 (C aromatiques).

(3*R*,4*S*)-*O*-Benzylidène-5-tosylpentan-2-one - 164

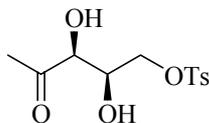
Le composé **164** est obtenu sous forme d'un mélange 1:1 de deux diastéréomères à partir de **163** en utilisant la méthode **5C** avec un rendement de **92 %**.

Huile incolore

R_f = 0.43 (hexane/acétate d'éthyle, 60/40)

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) : 2.26 (1/2 de 3H, s, 1-H), 2.33 (1/2 de 3H, s, 1-H), 2.43 (3H, s, CH₃-OTs), 4.19-4.26 (1H, m, 3-H), 4.28-4.44 (3H, m, 4-,5-H), 5.87 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 5.93 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.27-7.84 (9H, m, Ph).

δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) : 21.6 (CH₃, CH₃-OTs), 26.6 (CH₃, C-1), 26.8 (CH₃, C-1*), 68.6 (CH₂, C-5), 69.1 (CH₂, C-5*), 75.9 (CH, C-3), 76.1 (CH, C-3*), 81.4 (CH, C-4), 81.6 (CH, C-4*), 105.1 (CH, CH-Ph), 105.2 (CH, CH-Ph*), 126.5, 126.6, 128.0, 128.4, 129.8, 129.9, 130.0, 132.5, 132.6, 135.9, et 135.7 (C aromatiques), 206.5 (C quaternaire, C-2), 207.4 (C quaternaire, C-2*).

(3*R*,4*S*)-3,4-Dihydroxy-5-tosylpentan-2-one - 165

Le composé **165** est obtenu à partir de **164** en utilisant la méthode **2B** avec un rendement **quantitatif**.

Huile incolore

R_f = 0.39 (hexane/acétate d'éthyle, 20/80)

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) : 2.22 (3H, s, 1-H), 2.41 (3H, s, CH₃-OTs), 4.10 (2H, m, 5-H), 4.18 (1H, d, J_{3-4} = 6 Hz, 3-H), 4.29 (1H, m, 4-Ph), 7.33 (2H, d, $J_{\text{H-H}}$ = 8 Hz, Ph-OTs), 7.76 (2H, d, $J_{\text{H-H}}$ = 8 Hz, Ph-OTs).

δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) : 21.5 (CH₃, CH₃-OTs), 25.3 (CH₃, C-1), 69.1 (CH, C-4), 69.9 (CH₂, C-5), 76.3 (CH, C-3), 127.8, 129.9, 132.1, 145.1 (C aromatiques), 207.4 (C quaternaire, C-2).

(2*R*,3*R*)-4-*O*-(*t*-butyldiméthylsilyl)-2,3-isopropylidènebutanol-1-diéthylphosphorothioate**- 166**

Le composé **166** est obtenu à partir de **155** en utilisant la méthode **12C** avec un rendement de **66 %**.

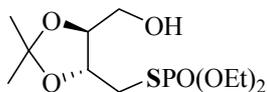
Huile incolore

R_f = 0.41 (cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30).

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) : 0.06 (6H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.88 (9H, s, *t*-Bu), 1.34 (3H, t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.35 (3H, t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.38 (3H, s, CH_3), 1.41 (3H, s, CH_3), 3.01 (1H, m, 1-H), 3.17 (1H, m, 1-H), 3.68-3.85 (3H, m, 3-H, 4-H), 4.09-4.2 (5H, m, 2-H, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$).

δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) : 15.9 (CH_3 , d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.4$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 16.0 (CH_3 , d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.4$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 18.3 (C quaternaire, *t*-Bu), 25.8 (3 \times CH_3 , *t*-Bu), 27.0 (2 \times CH_3 , $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 27.1 (2 \times CH_3), 33.2 (CH_2 , d, $^2J_{\text{C-P}} = 3.7$ Hz, C-1), 63.3 (CH_2 , C-4), 63.5 (CH_2 , d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 64.6 (CH_2 , d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$), 77.3 (CH, d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.2$ Hz, C-2), 80.1 (CH, C-3), 109.5 (C quaternaire).

δ_{P} (121.5 MHz, CDCl_3) : 28.6 (s).

(2*R*,3*R*)-*O*-Isopropylidène-4-hydroxybutyl-1-diéthylphosphorothioate - 167

Le composé **167** est obtenu à partir de **166** en utilisant la méthode **2A** avec un rendement de **84 %**.

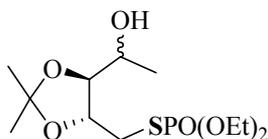
Huile incolore

R_f = 0.37 (cyclohexane/acétate d'éthyle, 30/70).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 1.32 (3H, td, $^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, $^4J_{H-P} = 1$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 1.33 (3H, td, $^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, $^4J_{H-P} = 1$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 1.37 (3H, s, CH₃), 1.39 (3H, s, CH₃), 3.02 (1H, m, 1-H), 3.14 (1H, m, 1-H), 3.73 (2H, d, $^3J_{H-H} = 4.7$ Hz, 4-H), 3.91 (1H, m, 3-H), 4.03-4.20 (5H, m, 2-H, P(OCH₂CH₃)₂).

δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 15.9 (CH₃, d, $^3J_{C-P} = 7.4$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 15.9 (CH₃, d, $^3J_{C-P} = 7.4$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 27.0 (2 × CH₃), 32.7 (CH₂, d, $^2J_{C-P} = 3.7$ Hz, C-1), 62.3 (CH₂, C-4), 63.9 (CH₂, d, $^2J_{C-P} = 6.2$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 63.9 (CH₂, d, $^2J_{C-P} = 6.2$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 77.1 (CH, d, $^3J_{C-P} = 3.7$ Hz, C-2), 79.7 (CH, C-3), 109.4 (C quaternaire).

δ_P (121.5 MHz, CDCl₃) : 29.0 (s).

(2*R*,3*R*)-*O*-Isopropylidène-4-hydroxypentyl-1-diéthylphosphorothioate - 168

Le composé **168** est obtenu à partir de **167** en utilisant la méthode **5B** avec un rendement de **56 %**.

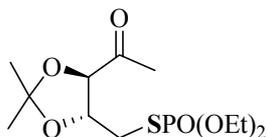
Huile incolore

R_f = 0.49 (cyclohexane/acétate d'éthyle, 30/70).

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) : 1.25 (3H, d, $^3J_{4,5} = 6.2$ Hz, 5-H), 1.33 (3H, td, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $^4J_{\text{H-P}} = 1.6$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 1.34 (3H, td, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $^4J_{\text{H-P}} = 1$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 1.37 (3H, s, CH₃), 1.40 (3H, s, CH₃), 3.03 (1H, m, 1-H), 3.29 (1H, m, 1-H), 3.40-4.10 (7H, m, 2-H, 3-H, 4-H, P(OCH₂CH₃)₂).

δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) : 15.9 (CH₃, d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 16.0 (CH₃, d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 20.3 (CH₃, C-5), 27.0 (2 × CH₃), 33.7 (CH₂, d, $^2J_{\text{C-P}} = 3.1$ Hz, C-1), 63.9 (CH₂, d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.2$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 64.0 (CH₂, d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.2$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 68.9 (CH, C-4), 78.8 (CH, d, $^3J_{\text{C-P}} = 3.1$ Hz, C-2), 82.6 (CH, C-3); 109.2 (C quaternaire).

δ_{P} (121.5 MHz, CDCl₃) : 30.0 (s).

(2*R*,3*S*)-*O*-Isopropylidène-4-oxopentyl-1-diéthylphosphorothioate - 169

Le composé **169** est obtenu à partir de **168** en utilisant la méthode **5C** avec un rendement de **76 %**.

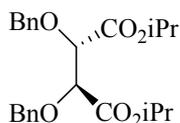
Huile incolore

R_f = 0.56 (cyclohexane/acétate d'éthyle, 50/50)

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) : 1.33 (3H, t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 1.34 (3H, t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 1.39 (3H, s, CH₃), 1.46 (3H, s, CH₃), 2.27 (3H, d, 5-H), 3.04 (1H, m, 1-H), 3.24 (1H, m, 1-H), 3.4-4.1 (6H, m, 2-H, 3-H, P(OCH₂CH₃)₂).

δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) : 14.0 (CH₃, d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.4$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 15.9 (CH₃, d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.4$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 26.2 (CH₃, C-5), 26.5 (CH₃), 26.9 (CH₃), 33.2 (CH₂, d, $^2J_{\text{C-P}} = 3.7$ Hz, C-1), 63.7 (CH₂, d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.2$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 63.8 (CH₂, d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.2$ Hz, P(OCH₂CH₃)₂), 76.4 (CH, d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, C-2), 83.7 (CH, C-3), 111.1 (C quaternaire), 207.6 (C quaternaire, C-4).

δ_{P} (121.5 MHz, CDCl₃) : 28.2 (s).

Diisopryl (2S,3S)-2,3-dibenzyloxysuccinate* - 174

Le composé **174** est obtenu à partir de **173** en utilisant la méthode **1B** avec un rendement de **95 %**.

Solide incolore

mp : 76-77 °C

Rf = 0.32 (hexane/acétate d'éthyle, 80/20)

$[\alpha]_D^{20}$ = - 88 (c 1, CHCl₃), lit.* $[\alpha]_D$ = - 90.3 (c 0.5, CHCl₃).

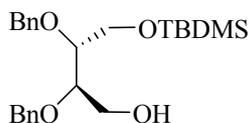
RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 1.16 (3H, d, J_{H-H} = 6.3 Hz, CH₃-iPr), 1.25 (3H, d, J_{H-H} = 6.3 Hz, CH₃-iPr), 4.39 (2H, s, 2-, 3-H), 4.47 (2H, 2d, J_{H-H} = 11.7 Hz, CH₂Ph), 4.86 (2H, 2d, J_{H-H} = 11.7 Hz, CH₂Ph), 5.05 (2H, hept, J_{H-H} = 6.3 Hz, CH-iPr), 7.25-7.33 (10H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 21.7 (CH₃, iPr), 69.2 (CH, iPr), 73.4 (CH₂, CH₂Ph), 78.9 (CH, C-2,-3), 127.8, 128.2, 128.3, 137.1 (C aromatiques), 168.8 (C quaternaire, C-1,-4).

IR (CHCl₃) ν_{max}/cm^{-1} : 1749, 1723, 1602, 1497, 1454, 1375, 1275, 1225, 1102.

MS (FAB⁺) m/z : 415.5 (M + H)⁺.

* *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1995, 2849.

(2R, 3R) 2,3-O,O-Dibenzyl-4-O-tert-butyl-diméthylsilylthréitol * - 175

Le composé **175** est obtenu à partir de **70** en utilisant la méthode **1A** avec un rendement de **87** %.

Huile incolore

$R_f = 0.47$ (acétate d'éthyle /hexane, 3/7).

$[\alpha]_D^{20} = -16$ (c 1, CHCl_3), lit.* $[\alpha]_D = -15.7$ (c 0.48, CHCl_3).

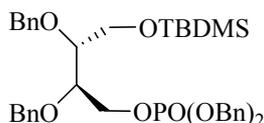
RMN, δ_H (300 MHz, CDCl_3) : 0.07 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3\text{-TBDMS}$) 0.91 (9H, s, $2 \times \text{CH}_3\text{-TBDMS}$), 2.43 (1H, s, OH), 3.63-3.84 (6H, m, 1-,2-,3-,4-H), 4.63 et 4.67 (2H, 2d, $J_{H-H} = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.64 et 4.74 (2H, 2d, $J_{H-H} = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 7.25-7.38 (10H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, CDCl_3) : - 5.5 (CH_3 , TBDMS), 18.2 (C quaternaire, TBDMS), 25.8 (CH_3 , TBDMS), 61.4 (CH_2 , C-4), 62.3 (CH_2 , C-1), 72.7 (CH_2 , CH_2Ph), 73.0 (CH_2 , CH_2Ph), 79.3 (CH , C-3), 80.2 (CH , C-2), 127.7, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.4, 138.3 (C aromatiques).

IR (CHCl_3) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3581, 3446, 1496, 1471, 1454, 1257, 1216, 1090, 1074, 838.

MS (FAB⁺) m/z : 417.5 (M + H)⁺.

* *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1995, 2849.

(2*R*, 3*R*) 2,3-*O,O*-Dibenzyl-4-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl butyl-1-dibenzylphosphate - 176

Le composé **176** est obtenu à partir de **175** en utilisant la méthode **11E** avec un rendement de **85 %**.

Huile incolore

R_f = 0.26 (acétate d'éthyle /hexane, 25/75).

[α]_D²⁰ = - 11 (c 1, CHCl₃).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 0.01 (6H, s, 2×CH₃-TBDMS) 0.87 (9H, s, 2×CH₃-TBDMS), 3.55 (1H, ddd, J_{3-4a} = J_{3-4b} = 5.3 Hz, J₃₋₂ = 9.0 Hz, 3-H), 3.66 (1H, dd, J_{3-4a} = 5.3 Hz, J_{4a-4b} = 10.6 Hz, 4-Ha), 3.71 (1H, dd, J_{3-4b} = 5.3 Hz, J_{4a-4b} = 10.6 Hz, 4-Hb), 3.77 (1H, ddd, J_{2-1a} = 4.4 Hz, J_{2-1b} = 6.4 Hz, J₃₋₂ = 9.0 Hz, 2-H), 4.12 (1H, ddd, J_{1a-1b} = 10.7 Hz, J_{1a-2} = 6.4 Hz, J_{1a-P} = 13.2 Hz, 1-Ha), 4.22 (1H, ddd, J_{1a-1b} = 10.7 Hz, J_{1b-2} = 4.4 Hz, J_{1b-P} = 6.4 Hz, 1-Hb), 4.54 (2H, dd, J_{Ha-Hb} = 11.7 Hz, J_{Ha-P} = 2.6 Hz, 2×Ha-CH₂Ph-phosphate), 4.64 (2H, dd, J_{Ha-Hb} = 11.7 Hz, J_{Hb-P} = 2.0 Hz, 2×Hb-CH₂Ph-phosphate), 4.98 (2H, s, CH₂Ph), 5.01 (2H, s, CH₂Ph), 7.30 (20H, m, Ph).

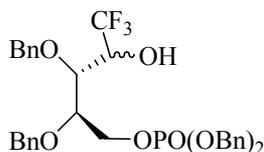
δ_C (75 MHz, CDCl₃) : -5.5 (CH₃, TBDMS), 18.2 (C quaternaire, TBDMS), 25.8 (CH₃, TBDMS), 62.1 (CH₂, C-4), 67.2 (CH₂, d, J_{C-P} = 6.2 Hz, C-1), 69.2 (CH₂, d, J_{C-P} = 5.6 Hz, CH₂Ph-phosphate), 73.1 (CH₂, CH₂Ph), 73.4 (CH₂, CH₂Ph), 77.5 (CH, d, J_{C-P} = 7.4 Hz, C-2), 78.8 (CH, C-3), 127.5, 127.6, 127.8, 127.9, 128.0, 128.3, 128.4, 128.5, 135.8, 138.2, 138.4 (C aromatiques).

δ_P (121.5 MHz, CDCl₃) : 0.5 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max}/cm⁻¹ : 1492, 1455, 1258, 1222, 1213, 1099, 1016, 838.

MS (FAB⁺) m/z: 677.5 (M + H)⁺.

HRMS (FAB⁺) m/z calculée pour C₃₈H₅₀O₇SiP : 677.3063, trouvée : 677.3060.

(2R, 3R) 2,3-O,O-Dibenzyl-4-hydroxy-5,5,5-trifluoropentyl-1-dibenzylphosphate - 177

Le composé **177** est obtenu à partir de **72** en utilisant la méthode **9** avec un rendement de **72** %.

Huile incolore

R_f = 0.29 (acétate d'éthyle /hexane, 4/6).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 3.08 (1/2 de 1H, s, OH), 3.12 (1/2 de 1H, s, OH*), 3.72 (1H, m, 3-H), 3.96 (1H, m, 2-H), 4.10 (3H, m, 1- et 4-H), 4.54 (4H, m, CH₂Ph), 5.01 (1/2 de 2H, s, CH₂Ph), 5.02 (1/2 de 2H, s, CH₂Ph*), 5.04 (1/2 de 2H, s, CH₂Ph), 5.05 (1/2 de 2H, s, CH₂Ph*), 7.32 (20H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 64.4 (CH₂, d, J_{C-P} = 5.6 Hz, C-1), 65.9 (CH₂, d, J_{C-P} = 5.6 Hz, C-1*), 66.4 (CH, q, J_{C-F} = 30 Hz, C-4), 68.2 (CH₂, d, J_{C-P} = 5.6 Hz, CH₂Ph-phosphate), 68.3 (CH₂, d, J_{C-P} = 5.6 Hz, CH₂Ph-phosphate*), 68.8 (CH, q, J_{C-F} = 30 Hz, C-4*), 72.1 (CH₂, CH₂Ph), 72.2 (CH, C-3), 72.3 (CH₂, CH₂Ph), 72.9 (CH₂, CH₂Ph*), 73.2 (CH, C-3*), 75.9 (CH, d, J_{C-P} = 8.0 Hz, C-2), 76.7 (CH, d, J_{C-P} = 8.0 Hz, C-2*), 125.8, 126.8, 126.9, 127.0, 127.1, 127.2, 127.3, 127.4, 127.5, 127.6, 135.4, 135.7, 135.8, 136.3 (C aromatiques), 128.2 (C quaternaire, q, J_{C-F} = 283 Hz, C-5), 128.3 (C quaternaire, q, J_{C-F} = 283 Hz, C-5*).

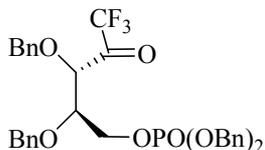
δ_P (121.5 MHz, CDCl₃) : 0.3 (s), 0.4 (s).

δ_F (282 MHz, CDCl₃) : - 77.99 (d, J_{H-F} = 6.2 Hz, CF₃), - 76.18 (d, J_{H-F} = 6.2 Hz, CF₃*).

IR (CHCl₃) ν_{max}/cm^{-1} : 3406, 3019, 1599, 1497, 1455, 1382, 1225, 1106, 1081, 1017.

MS (FAB⁺) m/z : 631.4 (M + H)⁺.

HRMS (FAB⁺) m/z calculée pour C₃₃H₃₅O₇F₃P : 631.2072, trouvée : 631.2073.

(2R, 3R) 2,3-O,O-Dibenzyl-4-oxo-5,5,5-trifluoropentyl-1-dibenzylphosphate - 178

Le composé **178** est obtenu à partir de **177** en utilisant la méthode **5F** avec un rendement de **54 %**.

Huile incolore

R_f = 0.42 (acétate d'éthyle /CH₂Cl₂, 1/9).

[α]_D²⁰ = - 15 (c 1, CHCl₃).

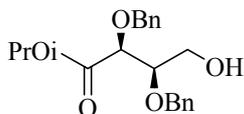
RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 3.86 (1H, m, 3-H), 3.96 (1H, m, 2-H), 4.19 (3H, m, 1- et 2-H), 4.55 (4H, m, 2×CH₂Ph), 5.02 (4H, m, 2×CH₂Ph), 7.35 (20H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 64.6 (CH₂, d, J_{C-P} = 6.2 Hz, C-1), 65.6 (CH₂, d, J_{C-P} = 6.2 Hz, C-1*), 69.3 (CH₂, d, J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂Ph-phosphate), 69.4 (CH₂, d, J_{C-P} = 5.5 Hz, CH₂Ph-phosphate*), 73.3 (CH₂, CH₂Ph), 73.8 (CH₂, CH₂Ph*), 74.1 (CH₂, CH₂Ph), 74.6 (CH, C-3), 75.1 (CH₂, CH₂Ph*), 76.8 (CH, d, J_{C-P} = 8.0 Hz, C-2), 78.2 (CH, d, J_{C-P} = 8.0 Hz, C-2*), 79.8 (CH, C-3*), 94.2 (C quaternaire, q, J_{C-F} = 31.6 Hz, C-4), 119.0 (C quaternaire, q, J_{C-F} = 287 Hz, C-5), 119.1 (C quaternaire, q, J_{C-F} = 287 Hz, C-5*), 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 135.5, 135.6, 136.0, 136.3, 136.7 (C aromatiques), 189.4 (C quaternaire, q, J_{C-F} = 34 Hz, C-4*).

δ_P (121.5 MHz, CDCl₃) : 0.3 (s), 0.4 (s).

δ_F (282 MHz, CDCl₃) : - 83.76 (s, CF₃), - 76.71 (s, CF₃).

IR (CHCl₃) ν_{max}/cm⁻¹ : 1730, 1598, 1491, 1455, 1374, 1248, 1222, 1212, 1045, 1019.

(2*R*, 3*R*) 2,3-Dibenzyl-4-hydroxybutanoate d'isopropyle - 179

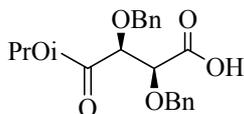
Le composé **179** est obtenu à partir de **180** en utilisant la méthode **6C** avec un rendement de **48 %**.

Huile incolore

R_f = 0.48 (acétate d'éthyle /cyclohexane, 5/5).

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) : 1.25 (3H, d, $J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, $\text{CH}_3\text{-iPr}$), 1.28 (3H, d, $J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, $\text{CH}_3\text{-iPr}$), 1.94 (1H, s, OH), 3.69 (2H, m, 4-H), 3.87 (1H, m, 3-H), 4.13 (1H, d, $J_{2-3} = 5.4$ Hz, 2-H), 4.45 (2H, 2d, $J_{\text{H-H}} = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.70 (2H, 2d, $J_{\text{H-H}} = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 5.12 (1H, hept., $J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, CH-iPr), 7.28-7.33 (10H, m, Ph).

δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) : 21.7 (CH_3 , iPr), 21.8 (CH_3 , iPr), 61.6 (CH_2 , C-4), 69.0 (CH, iPr), 72.8 (CH_2 , CH_2Ph), 73.0 (CH_2 , CH_2Ph), 78.6 (CH, C-2), 79.3 (CH, C-3), 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.3, 128.5, 137.0, 137.9 (C aromatiques), 170.1 (C quaternaire, C-1).

(2*R*, 3*R*) 2,3-Dibenzyl-4-carboxylate-butanoate d'isopropyle - 180

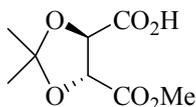
Le composé **180** est obtenu à partir de **174** en utilisant la méthode **6D** avec un rendement de **65 %**.

Huile incolore

R_f = 0.31 (acétate d'éthyle /hexane, 5/5 + ε HCO₂H).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 1.19 (3H, d, J_{H-H} = 6.3 Hz, CH₃-iPr), 1.26 (3H, d, J_{H-H} = 6.3 Hz, CH₃-iPr), 4.37 (1H, d, J₂₋₃ = 3 Hz, 2-H), 4.49 (1H, d, J₂₋₃ = 3 Hz, 3-H), 4.51 (2H, 2d, J_{H-H} = 11.7 Hz, CH₂Ph), 4.74 (2H, 2d, J_{H-H} = 11.7 Hz, Ha-CH₂Ph), 5.08 (1H, hept., J_{H-H} = 6.3 Hz, CH-iPr), 7.28-7.33 (10H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 21.7 (CH₃, iPr), 21.8 (CH₃, iPr), 69.7 (CH, iPr), 73.6 (CH₂, CH₂Ph), 74.1 (CH₂, CH₂Ph), 77.9 (CH, C-2), 78.9 (CH, C-3), 128.2, 128.4, 128.5, 128.6, 135.9, 136.4 (C aromatiques), 168.4 (C quaternaire, C-4), 171.8 (C quaternaire, C-1).

(2*R*, 3*R*) 2,3-Isopropylidène-4-carboxylate-butanoate de méthyle - 181

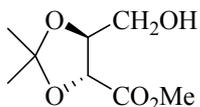
Le composé **181** est obtenu à partir de **75** en utilisant la méthode **6D** avec un rendement de **86** %.

Huile incolore

R_f = 0.27 (acétate d'éthyle /hexane, 5/5 + ε HCO₂H).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 1.48 (3H, s, CH₃-isoprop.), 1.50 (3H, s, CH₃-isoprop.), 3.83 (3H, s, CH₃-OMe), 4.81 (1H, d, J₂₋₃ = 5.4 Hz, 2-H), 4.85 (1H, d, J₂₋₃ = 5.4 Hz, 3-H), 8.43 (1H, s, -CO₂H).

δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 26.3 (CH₃, isoprop.), 53.0 (CH₃, OMe), 76.5 (CH, C-3), 77.0 (CH, C-2), 114.3 (C quaternaire, isoprop.), 170.0 (C quaternaire, C-4), 174.3 (C quaternaire, C-1).

(2*R*, 3*R*) 2,3-Isopropylidène-4-hydroxy-butanoate de méthyle - 182

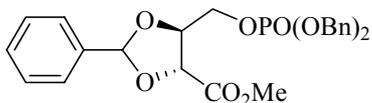
Le composé **182** est obtenu à partir de **181** en utilisant la méthode **x** avec un rendement de **31** %.

Huile incolore

R_f = 0.44 (acétate d'éthyle /cyclohexane, 8/2).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 1.43 (3H, s, CH₃-isoprop.), 1.48 (3H, s, CH₃-isoprop.), 3.78 (3H, s, CH₃-OMe), 3.94 (2H, m, 4-H), 4.24 (1H, m, 3-H), 4.46 (1H, d, $J_{2,3} = 7$ Hz, 2-H).

δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 26.3 et 26.7 (CH₃, isoprop.), 52.5 (CH₃, OMe), 61.7 (CH₂, C-4), 74.8 (CH, C-3), 79.1 (CH, C-2), 111.4 (C quaternaire, isoprop.), 171.2 (C quaternaire, C-1).

(2*R*, 3*S*) Methyl-2,3-*O,O*-Benzylidène-4-(dibenzyl)phosphate butyrate - 183

Le composé **183** est obtenu à partir de **117** en utilisant la méthode **11E** avec un rendement de **81 %**.

Huile incolore

R_f = 0.17 (acétate d'éthyle /cyclohexane, 4/6).

RMN, δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) : 3.77 (1/2 de 3H, s, OCH₃), 3.80 (1/2 de 3H, s, OCH₃*), 4.25 (2H, m, 4-H), 4.42 (1/2 de 1H, m, 3-H), 4.47 (1/2 de 1H, m, 3-H*), 4.55 (1/2 de 1H, d, J_{2-3} = 5.4 Hz, 2-H), 4.58 (1/2 de 1H, d, J_{2-3} = 5.4 Hz, 2-H*), 5.03 (1/2 de 2H, d, $J_{\text{H-P}}$ = 8.1 Hz, CH₂-Ph), 5.09 (1/2 de 2H, d, $J_{\text{H-P}}$ = 8.1 Hz CH₂-Ph*), 5.98 (1/2 de 1H, s, CH-Ph), 6.03 (1/2 de 1H, s, CH-Ph*), 7.41 (15H, m, Ph).

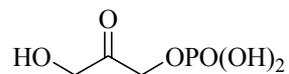
δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) : 52.5 (CH₃, OCH₃), 52.6 (CH₃, OCH₃*), 66.3 (CH₂, d, $J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz, C-4), 66.4 (CH₂, d, $J_{\text{C-P}}$ = 5.5 Hz, C-4*), 69.4 (CH₂, d, $J_{\text{C-P}}$ = 5.6 Hz, CH₂-Ph), 69.5 (CH₂, d, $J_{\text{C-P}}$ = 5.6 Hz, CH₂-Ph*), 75.3 (CH, C-2), 75.5 (CH, C-2*), 77.8 (CH, d, $J_{\text{C-P}}$ = 8.0 Hz, C-3), 78.2 (CH, d, $J_{\text{C-P}}$ = 8.0 Hz, C-3*), 105.4 (CH, CH-Ph), 105.6 (CH, CH-Ph*), 126.8, 126.9, 127.9, 128.0, 128.3, 128.5, 128.6, 129.6, 129.7, 129.8, 135.5, 135.6, 136.2 (C aromatiques), 169.6 (C quaternaire, C-1), 170.7 (C quaternaire, C-1*).

δ_{P} (121.5 MHz, CDCl₃) : 0.1 (s), 0.3 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max} /cm⁻¹ : 3019, 1759, 1602, 1497, 1456, 1272, 1221, 1114, 1034, 1020.

MS (FAB⁺) m/z : 499.4 (M + H)⁺.

HRMS (FAB⁺) m/z calculée pour C₂₆H₂₈O₈P : 499.1522, trouvée : 499.1532.

Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) - 185

Le composé **185** est obtenu à partir de **191** en utilisant la méthode **2B** avec un rendement quantitatif.

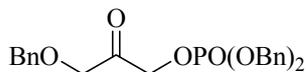
Huile incolore

R_f = 0.34 (*i*-propanol/eau/acétate d'éthyle, 6/3/1).

RMN, δ_H (300 MHz, D₂O) : forme hydrate, 3.90 (2H, d, J = 7.5 Hz, 1-H), 3.65 (2H, s, 3-H),
forme cétoniques, 4.55 (2H, d, J = 6.5 Hz, 1-H), 4.60 (2H, s, 3-H).

δ_C (75 MHz, D₂O) : 65.9, 66.4, 67.0, 68.4 (CH₂), 96.0 (C quaternaire, C-2 hydrate), 212.5 (C quaternaire, C-2, C=O).

δ_P (121.5 MHz, D₂O) : 2.5 (s), 2.9 (s).

3-(Benzyloxy)-2-oxopropyl dibenzylphosphate - 191

Le composé **191** est obtenu à partir de **195** en utilisant la méthode **5C** avec un rendement de 82 %.

Huile incolore

Rf = 0.33 (acétate d'éthyle /hexane, 7/3).

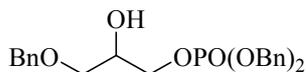
RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 4.12 (2H, s, 3-H), 4.53 (2H, s, CH_2 -Ph de OBn), 4.72 (2H, d, J_{H-P} = 9.7 Hz, 1-H), 5.08 (2H, dd, J_{H-P} = 8.3 Hz, J_{H-H} = 11.5 Hz, CH_2 -Ph de OPO(OBn)₂), 5.13 (2H, dd, J_{H-P} = 8.3 Hz, J_{H-H} = 11.5 Hz, CH_2 -Ph de OPO(OBn)₂), 7.35 (15H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 69.6 (CH_2 , d, J_{C-P} = 4.9 Hz, C-1), 69.7 (d, J_{C-P} = 5.6 Hz, 2× CH_2 -Ph de OPO(OBn)₂), 73.3 (CH_2 , C-3), 73.6 (CH_2 -Ph de OBn), 127.8, 128.0, 128.2, 128.6, 135.5, 135.6, 137.7 (C aromatiques), 201.9 (C quaternaire, d, J_{C-P} = 5.6 Hz, C-2).

δ_P (121.5 MHz, $CDCl_3$) : 0.20 (s).

IR ($CHCl_3$) ν_{max}/cm^{-1} : 1746, 1600, 1495, 1495, 1380, 1273, 1235, 889.

MS (FAB⁺) m/z : 441.0 (M + H)⁺.

3-(Benzyloxy)-2-hydroxypropyl dibenzylphosphate - 194

Le composé **194** est obtenu à partir de **198** en utilisant la méthode **4A** avec un rendement de 88 %.

Huile incolore

R_f = 0.22 (acétate d'éthyle /CH₂Cl₂, 1/9).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl₃) : 3.16 (1H, s, OH), 3.48 (2H, d, $J_{3-2} = 5.3$ Hz, 3-H), 3.96 (1H, m, 2-H), 4.08 (2H, m, 1-H), 4.51 (2H, s, CH₂-Ph de OBn), 5.03 (2H, dd, $J_{H-P} = 8.3$ Hz, $J_{H-H} = 11.4$ Hz, CH₂-Ph de OPO(OBn)₂), 5.07 (2H, dd, $J_{H-P} = 8.3$ Hz, $J_{H-H} = 11.4$ Hz, CH₂-Ph de OPO(OBn)₂), 7.34 (15H, m, Ph).

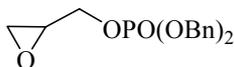
δ_C (75 MHz, CDCl₃) : 68.9 (CH₂, d, $J_{C-P} = 6.2$ Hz, C-1), 69.2 (CH, d, $J_{C-P} = 6.8$ Hz, C-2), 69.4 (d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, 2×CH₂-Ph de OPO(OBn)₂), 70.1 (CH₂, C-3), 73.3 (CH₂-Ph de OBn), 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.3, 128.4, 128.5, 135.5, 135.6, 137.7 (C aromatiques).

δ_P (121.5 MHz, CDCl₃) : 1.02 (s).

IR (CHCl₃) ν_{max}/cm⁻¹ : 3582, 3394, 1600, 1495, 1455, 1380, 1269, 1231, 1020, 870.

MS (FAB⁺) m/z: 443.0 (M + H)⁺.

HRMS (FAB⁺) m/z: calculée pour C₂₄H₂₈O₆P 443.1624, trouvée 443.1631.

Dibenzyl oxiran-2-ylmethyl phosphate - 198

Le composé **198** est obtenu à partir de **197** en utilisant la méthode **11E** avec un rendement de 85 %.

Huile incolore

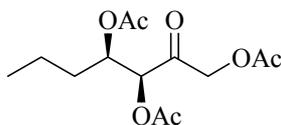
$R_f = 0.29$ (acétate d'éthyle /hexane, 7/3).

RMN, δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) : 2.59 (1H, dd, $J_{3a-2} = 2.6$ Hz, $J_{3a-3b} = 4.7$ Hz, 3-Ha), 2.78 (1H, dd, $J_{3b-2} = 4.2$ Hz, $J_{3a-3b} = 4.7$ Hz, 3-Hb), 3.16 (1H, m, 2-H), 3.90 (1H, ddd, $J_{1a-2} = 5.8$ Hz, $J_{1a-1b} = 8.2$ Hz, $J_{1a-P} = 11.7$ Hz, 1-Ha), 4.24 (1H, ddd, $J_{1b-2} = 3.4$ Hz, $J_{1a-1b} = 8.2$ Hz, $J_{1b-P} = 11.7$ Hz, 1-Hb), 5.08 (4H, d, $J_{CH_2-P} = 8.4$ Hz, CH_2 -Ph de $OPO(OBn)_2$), 7.35 (10H, m, Ph).

δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) : 44.4 (CH_2 , C-3), 49.8 (CH, d, $J_{C-P} = 8.0$ Hz, C-2), 67.9 (d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, $2 \times CH_2$ -Ph de $OPO(OBn)_2$), 69.4 (CH_2 , d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, C-3), 127.9, 128.5, (C aromatiques), 135.6 (C quaternaire, d, $J_{C-P} = 6.8$ Hz, C aromatiques).

δ_P (121.5 MHz, $CDCl_3$) : 0.32 (s).

IR ($CHCl_3$) ν_{max}/cm^{-1} : 3002, 1600, 1495, 1456, 1380, 1269, 1260, 1236, 1020, 871.

1,3,4-Tri-*O*-acétyl-5-désoxy-5-éthyl-D-xylulose - 200

Le composé **200** est obtenu à partir de **185** en utilisant la méthode **10** avec un rendement de 35 %.

Huile incolore

$R_f = 0.19$ (acétate d'éthyle /hexane, 25/75).

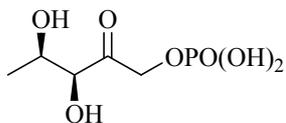
$[\alpha]_D^{20} = +25$ (c 2.8, CHCl_3), lit¹⁷ $[\alpha]_D^{25} = 25$ (c 1.05, CHCl_3).

RMN, δ_H (300 MHz, CDCl_3) : 0.91 (3H, t, $J_{7-6} = 7.3$ Hz, 7-H), 1.30 (2H, m, 6-H), 1.59 (2H, m, 5-Ha et 5-Hb), 2.05, 2.13 et 2.19 (3×3H, 3s, $\text{CH}_3\text{-COO-}$), 4.72 (1H, d, $J_{1a-1b} = 17.2$ Hz, 1-Ha), 4.85 (1H, d, $J_{1a-1b} = 17.2$ Hz, 1-Hb), 5.28 (1H, d, $J_{3-4} = 3.1$ Hz, 3-H), 5.34 (1H, ddd, $J_{3-4} = 3.1$ Hz, $J_{4-5a} = 6.0$ Hz, $J_{4-5b} = 8.0$ Hz, 4-H).

δ_C (75 MHz, CDCl_3) : 13.6 (CH_3 , C-7), 18.4 (CH_2 , C-6), 20.2, 20.3 et 20.7 (3× CH_3 , 3× $\text{CH}_3\text{-COO-}$), 32.3 (CH_2 , C-5), 66.7 (CH_2 , C-1), 71.4 (CH, C-4), 76.5 (CH, C-3), 169.7, 169.9 et 170.1 (3×C quaternaire, 3× $\text{CH}_3\text{-COO-}$), 198.3 (C quaternaire, C-2).

IR (CHCl_3) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1746, 1373, 1235, 1226, 1072, 1017.

MS (FAB⁺) m/z : 289.0 (M + H)⁺.

5-désoxy-D-xylulose 1-phosphate - 203

Le composé **203** est obtenu à partir de **185** en utilisant la méthode **10**.

Huile incolore

$R_f = 0.19$ (acétate d'éthyle /hexane, 25/75).

RMN, δ_H (300 MHz, D_2O) : 0.90 (3H, d, $J_{5-4} = 7.5$ Hz, 5-H), 1.55 (2H, m, 1-H), 3.90 (1H, td, $J_{5-4} = 7.5$ Hz, $J_{3-4} = 2.1$ Hz, 4-H), 4.40 (1H, d, $J_{3-4} = 2.1$ Hz, 3-H).

δ_C (75 MHz, D_2O) : 9.4 (CH_3 , C-5), 25.5 (CH_2 , C-1), 73.3 (CH, C-4), 77.1 (CH, C-3), 209.7 (C quaternaire, d, $J_{C-P} = 6.7$ Hz, C-2).

δ_P (121.5 MHz, D_2O) : 0.5 (s).

publications.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Cross-talk between the Cytosolic Mevalonate and the Plastidial Methylerythritol Phosphate Pathways in Tobacco Bright Yellow-2 Cells

Andréa Hemmerlin, Jean-François Hoeffler, **Odile Meyer**, Denis Tritsch, Isabelle A. Kagan, Catherine Grosdemange-Billiard, Michel Rohmer, and Thomas J. Bach

The Journal of Biological Chemistry, 2003, Vol. 278, n° 29, pages 26666-26676

Pages 26666-26676 :

- La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.
- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/M302526200v1>

- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Isoprenoid biosynthesis via the MEP pathway. Synthesis of (3R,4S)-3,4-dihydroxy-5-oxohexylphosphonic acid, an isosteric analogue of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, the substrate of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reducto-isomerase

Odile Meyer, Catherine Grosdemange-Billiard , Denis Tritsch and Michel Rohmer

Organic & Biomolecular Chemistry, 2003, Vol.1, n°24, pages 4367-4372

Pages 4367-4372:

- La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.
- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

http://www.rsc.org/CFmuscat/intermediate_abstract.cfm?FURL=/ej/OB/2003/b312193c.PDF

- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Short and efficient synthesis of a stock material of dihydroxyacetone phosphate from glycidol

Odile Meyer, Michel Rohmer and Catherine Grosdemange-Billiard

Tetrahedron Letters, 2004, Vol. 45, n°42, pages 7921–7923

Pages 7921–7923:

- La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.
- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.08.148>

- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Practical synthesis of 1-deoxy-D-xylulose and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate allowing deuterium labelling

Odile Meyer, Jean-François Hoeffler, Catherine Grosdemange-Billiard and Michel Rohmer

Tetrahedron, 2004, Vol. 60, pages 12153–12162

Pages 12153–12162 :

- La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.
- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2004.10.016>

- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Les isoprénoïdes sont des produits naturels présents chez tous les organismes vivants qui peuvent être synthétisés selon deux voies de biosynthèse différentes : la voie du mévalonate et la voie du méthylérythritol 4-phosphate (MEP). Les enzymes de la voie du MEP présentes chez de nombreux microorganismes mais absentes chez les animaux, représentent des cibles potentielles pour le développement de nouveaux médicaments contre les maladies causées par des bactéries pathogènes ou par des parasites. Dans cet objectif, l'élaboration d'inhibiteurs potentiels de cette voie a été envisagée. La désoxyxylulose réducto-isomérase (DXR), une enzyme de la voie du MEP, a été choisie comme cible et des analogues de son substrat, le désoxyxylulose 5-phosphate, (DXP), ont été préparés puis leurs caractéristiques biochimiques (substrat, inhibiteur) ont été déterminées. La première partie de ce travail consiste en la mise au point d'une synthèse simple et efficace du DXP qui a été appliquée à la préparation de DXP marqué au deutérium, de son analogue non phosphorylé, le DX, et de DX marqué au deutérium. Ces composés ont été utilisés dans le cadre de collaborations. Dans une deuxième partie, la synthèse d'analogues phosphonates et fluorés du DXP est réalisée selon deux approches : une approche à partir de chirons et une approche par synthèse asymétrique. Les chirons utilisés sont des dérivés du L-tartrate. L'approche par synthèse asymétrique utilisée met en jeu une aldolisation asymétrique enzymatique. Au cours de ce travail une nouvelle méthode de synthèse d'un précurseur de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP), substrat spécifique des aldolases, a été mise au point. L'activité biologique des analogues du DXP synthétisés a ensuite été évaluée *in vitro* sur la DXR et *in vivo* sur des souches d'*E. coli*. Nous avons pu montrer que l'analogue phosphonate du DXP est substrat de la DXR et que les autres composés synthétisés se comportent comme des inhibiteurs.

Isoprenoids are natural compounds present in all living organism and can be synthesised via two different biosyntheses : the mevalonate pathway or the methylerythritol phosphate pathway (MEP). The enzymes involved in the MEP pathway are present in many microorganisms but absent in animal cells and therefore are potential targets for the design of new drugs acting on the diseases cause by pathogenic bacteria or parasites. In this purpose, the elaboration of potential inhibitors of this pathway has been considered. The deoxyxylulose 5-phosphate reducto-isomerase (DXR), one of the enzymes of the MEP pathway, has been chosen as a target. The synthesis of analogues of deoxuxylulose phosphate (DXP), the natural substrate of the DXR has been developed and their biochemical properties (substrate, inhibitor) have been determined. The first part of this work is the elaboration of a practical and efficient synthesis of DXP. This relevant synthesis allowed the preparation of deuterium labelled DXP, and its non phosphorylated analogue, DX, with a possible deuterium labelling at C-5. All these compounds were used for investigations on the MEP pathway. In a second part, phosphonate and fluorinated analogues of DXP have been synthesised via two different approaches: one from chirons and the other one from asymmetric synthesis. Compounds derived from the L-tartrate ester were used as chirons for the synthesis of the analogues of DXP. Such compounds were prepared by using biocatalysts: the aldolases, allowing the a asymmetric aldolisation reaction. Due to the specific substrate of aldolases, the dihydroxyacetone phosphate (DHAP), a short and efficient synthesis of a precursor of DHAP, has been developped. The biological activity of the synthesised compounds was then determined *in vitro* on the DXR and *in vivo* on *E. coli*. We found that the phosphonate analogue of DXP is substrate of DXR and that the other analogues are inhibitors.