

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

THESE

présentée en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

par

Anne BODLENNER

**Synthèse et étude de molécules ciblant le site
de dimérisation de l'ARN du VIH-1**

Soutenue le 24 mars 2006 devant les membres du Jury

Professeur W.D. WOGGON

Docteur B. CARBONI

Professeur M. ROHMER

Docteur P. DUMAS

Professeur P. PALE

Docteur J.M. WEIBEL

Université de Bâle

Université de Rennes

Université Louis Pasteur

Université Louis Pasteur

Université Louis Pasteur

Université Louis Pasteur

Laboratoire de Synthèse et Réactivité Organique

Institut de Chimie de Strasbourg

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du Laboratoire de Synthèse et Réactivité Organique de l'Université Louis Pasteur à Strasbourg.

Mes remerciements vont en premier lieu au Professeur Patrick Pale, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et proposé ce sujet de recherche. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour sa grande disponibilité, son encadrement et ses compétences scientifiques qui m'ont permis de mener à bien cette étude. Je tiens également à le remercier d'avoir toujours cru en mon travail et de m'avoir redonné confiance même lorsque les résultats se faisaient attendre.

Ce travail de recherche n'aurait pas pu avoir lieu sans les excellents travaux de recherche menés sur le DIS de l'ARN du VIH-1 par l'équipe des Professeurs Bernard et Chantal Ehresmann à l'institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg.

C'est de ces travaux, et en particulier des travaux de cristallographie, qu'est né ce sujet de thèse. Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Docteur Philippe Dumas pour tout ce qu'il m'a appris et pour la confiance qu'il m'a accordée.

J'adresse également mes remerciements au Docteur Jean-Marc Weibel pour son dynamisme, son soutien, ses conseils et ses jugements très pertinents sur ce manuscrit.

Je tiens également à remercier très vivement le Professeur Woggon de l'Université de Bâle, le Docteur Carboni de l'Université de Rennes et le Professeur Rohmer de l'Université Louis Pasteur, qui ont accepté de juger ce travail et de participer au jury de cette thèse.

Mes remerciements sincères vont également vers le Docteur Eric Ennifar pour ses travaux de cristallographie, les tests de coupure au plomb qu'il a effectués sur le DIS-23 et sa lecture critique de ce manuscrit.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance au Docteur Jean-Christophe Paillart pour avoir effectué les tests biologiques sur le DIS-615 (tests de protection contre une coupure par le diacétate de plomb et de protection contre des modifications au DMS ainsi que les tests de stabilisation), pour m'avoir expliqué en détail le mécanisme de ces tests et pour ses conseils pertinents concernant ce manuscrit.

Je remercie également Géraldine Albrecht et Anne-Marie Aubertin de l'Institut de Virologie INSERM pour la réalisation du test d'inhibition et de toxicité.

Un grand merci au Docteur Alexander Vasiliev, pour sa gentillesse et pour m'avoir procuré les deux publications des journaux russes Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim. et Vysokomol. Soed. SerA. ainsi que pour la traduction du russe vers l'anglais du premier article. Je remercie également le Professeur A. Varneck pour la traduction du russe vers l'anglais du second article.

J'adresse mon immense gratitude au service de RMN de Rolland Graff et au service de Spectrométrie de Masse de Patrick Wehrung pour leur compétence et leur disponibilité.

Je remercie également le personnel du Buncker et du Magasin de Chimie, sans qui nous n'aurions pas pu manipuler.

Je remercie le Ministère de L'Education Nationale, de l'Enseignement et de la Recherche pour l'allocation de recherche dont j'ai pu bénéficier pendant ces trois années.

Je tiens à remercier également très chaleureusement toute l'équipe du Laboratoire Pale, notamment les amis chers que j'y ai rencontrés, Martine et Cédric dit CC. Merci à Alban pour sa bonne humeur, ses attentions et son amitié. Je remercie également Yann, Aurélien V., Aurélien A., Carmen, Ulla, David, Geoffroy, Sophie, Murielle, Annabelle, Simon, Liu, Sopheak, Fabien, Manu, Vanessa, Jérémy, Jérôme, Laurent, Dominique, Tui, Sidonie et Françoise Rothhut notre secrétaire, pour leur bonne compagnie.

Je remercie également nos voisins du 9^{ème} étage du laboratoire du Professeur Brouillard, Stefan, Géraldine et Marie, et mon amie Maggy Hologne du laboratoire de RMN qui a géré à perfection les entrées au 9^{ème}.

Je tiens à associer à ces remerciements, les chimistes et amis Guigui, Gaëtan, Vincent, Isa et Murielle pour les bons moments passés ensemble.

Je remercie également Jeanne pour m'avoir donné le livret intitulé « Réponses associatives à la lutte contre le sida en Afrique » édité par Aides qui m'a fourni des informations complémentaires.

Je souhaite exprimer toute mon affection à ma famille, et plus particulièrement à mes parents et mes sœurs qui m'ont toujours soutenue et encouragée, ce qui m'a permis de persévérer dans mes entreprises.

Enfin, je voudrais sincèrement remercier Serge, pour son accompagnement et son immense soutien moral et logistique, en toute circonstance.

<i>Chapitre 1 VIH et ARN</i>		1
I	Généralités sur le VIH	5
I.1	Le VIH, un virus dévastateur	5
I.2	Le cycle répliatif du VIH	7
I.3	Les principaux traitements anti-VIH	10
II	L'ARN : Une nouvelle cible thérapeutique prometteuse	13
II.1	L'ARN, une structure riche de découvertes	13
II.2	Interactions entre l'ARN et des petites molécules	15
II.2.1	Définitions	15
II.2.2	Les grandes classes d'interactions avec l'ARN []	15
II.2.3	Quelques exemples de petites molécules ciblant l'ARN	17
II.2.4	Les aminoglycosides en tant que petites molécules capables de se fixer sur l'ARN	18
II.2.4.1	Généralités sur les aminoglycosides	18
II.2.4.2	Exemples d'interactions entre aminoglycosides et ARN	21
II.3	Bilan et perspectives	22
III	Une nouvelle approche contre le VIH-1	24
III.1	Complexe boucle-boucle	24
III.2	Similitude entre le complexe boucle-boucle et le site A	27
III.3	Le projet	28
III.3.1	Action des antibiotiques sur le complexe boucle-boucle	28
III.3.1.1	Tests préliminaires afin de sélectionner les antibiotiques spécifiques	28
III.3.1.2	Test de protection contre la coupure au plomb ^{II} par la néomycine et la paromomycine	29
III.3.1.3	Test de protection contre une modification au DMS par la néomycine et la paromomycine	30
III.3.1.4	Bilan	31
III.3.2	Construction d'un modèle d'étude de l'interaction complexe boucle-boucle / antibiotique	32
III.3.3	Choix et construction des aminoglycosides ciblant le complexe DIS-DIS	35
III.3.4	Schéma rétrosynthétique	36

Chapitre 2 Synthèse d'un dérivé de la néamine ayant l'amine libre en position 1 **39**

I	La néamine : une molécule complexe	41
II	Obtention de la néamine	45
II.1	La néamine tétrachlorhydratée	45
II.2	La néamine libre	46

III	Première approche basée sur des complexations sélectives à l'aide de métaux de transition	49
III.1	Introduction	49
III.1.1	Le principe	49
III.1.2	Première approche de la littérature	51
III.1.3	Seconde approche de la littérature	52
III.2	Mise en application de la première approche	52
III.3	Application de la seconde approche	56
III.4	Bilan	57
IV	Seconde approche basée sur des carbamates	58
IV.1	Les précédents dans la littérature	58
IV.2	Préparation du composé <i>tétra</i> -protégé par des groupements Cbz	59
IV.3	Formation des carbamates cycliques	60
IV.4	Protection des alcools et ouverture du carbamate	64
IV.5	Précisions concernant l'étape d'ouverture du carbamate	70
V	Détermination des structures par RMN	72
V.1	Néamine <i>tétra</i> -protégée par des groupements Cbz	72
V.2	Dérivé ayant deux carbamates cycliques	76
V.3	Composé 14 : le dicarbamate cyclique protégé par un groupement TBS	78
V.4	Composé 16 : produit de décarboxylation du composé 14	85
V.5	Comparaison des composés 14 et 16 :	90
VI	Bilan	91

Chapitre 3 L'étape clé de dimérisation et la déprotection des dimères synthétisés **95**

I	Introduction : le cahier des charges	97
I.1	La longueur du bras	97
I.2	Réaction sélective de la fonction amine par rapport à la fonction alcool	98
I.3	Favoriser la réaction intermoléculaire par rapport à la réaction intramoléculaire	100
I.4	Choix d'une molécule modèle	101
II	Préparation des réactifs de dimérisation	102
II.1	Synthèse des dianhydrides de pivaloyle	102

II.1.1	Introduction	102
II.1.2	<i>Di</i> -anhydride de pivaloyle en C ₄	103
II.1.3	<i>Di</i> -anhydride de pivaloyle en C ₃	104
II.2	Synthèse des diesters de N-hydroxysuccinimide	107
II.2.1	Introduction	107
II.2.2	Synthèse particulière au diester de l'acide succinique	107
II.2.3	Synthèse des diesters de N-hydroxysuccinimide par les dichlorures	109
II.2.4	Synthèse des diesters de N-hydroxysuccinimide par couplage peptidique	110
II.2.5	Synthèse des diesters de N-hydroxysuccinimide par la méthode des trifluoroacétates	111
	II.2.5.1 Préparation du diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide fumarique	111
	II.2.5.2 Mécanismes réactionnels proposés	112
	II.2.5.3 Préparation du diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide malonique	117
II.3	Bilan	119
III	Dimère à chaîne de 4 atomes	121
III.1	Les réactions de dimérisation	121
III.1.1	Dimérisation par réaction avec des anhydrides de pivaloyle	121
III.1.2	Dimérisation par couplage peptidique direct	127
III.1.3	Dimérisation par réaction sur les diesters de N-hydroxysuccinimide	130
III.2	Bilan de la dimérisation pour une chaîne de quatre atomes	133
III.3	Déprotections	135
III.3.1	Déprotection des groupements Carbobenzyloxy	135
III.3.2	Déprotection de l'alcool silylé	138
III.3.3	Test des conditions réductrices en présence de l'alcool libre	141
III.3.4	Déprotection du carbamate cyclique	143
III.3.5	Schéma final de déprotection	145
III.3.6	Vérification de la structure du produit final par RMN	146
IV	Dimère à chaîne de 3 atomes	149
IV.1	Dimérisation par le dichlorure de malonyle	149
IV.2	Dimérisation par couplage peptidique direct	151
IV.3	Dimérisation par transestérification	151
IV.4	Dimérisation par amination réductrice	153
IV.5	Dimérisation par réaction sur le tosylate de glycidol	161
IV.6	Perspectives	163
V	Dimère à chaîne de 2 atomes	165
V.1	Introduction	165
V.2	Amination réductrice « one-pot »	165
V.3	Amination réductrice avec intermédiaire <i>bis</i> -oxazolidine	169
V.4	Bilan	175

VI	Dimère à chaîne de 6 atomes	176
VI.1	Découverte d'une nouvelle méthode de dimérisation et synthèse d'un nouveau dimère	176
VI.2	Déprotection du dimère à chaîne de 6 atomes	178
VI.3	Vers une synthèse encore plus courte ?	179
VII	Bilan et perspectives	181
<hr/>		
	<i>Chapitre 4 Tests biologiques</i>	183
<hr/>		
I	Cristallisation et diffraction des rayons X	185
II	Tests in vitro	189
II.1	Test de coupure au plomb ^{II} sur le petit ARN DIS-23	189
II.2	Test de modification au plomb ^{II} sur l'ARN DIS-615	191
II.3	Test de modification de l'ARN DIS-615 par le DMS	192
II.4	Tests de stabilisation du complexe DIS-DIS	195
II.4.1	Etude du déplacement de dimères d'ARN en présence d'aminoglycosides	196
II.4.2	Cinétique du déplacement des dimères de DIS-615 par un ARN-311	198
II.4.3	Bilan des expériences de stabilisation	200
III	Tests en culture cellulaire	201
III.1	Principe des tests <i>ex vivo</i>	201
III.2	Test de toxicité et d'inhibition.	201
IV	Bilan des tests biologiques	203
<hr/>		
	<i>Chapitre 5 Conclusion et perspectives</i>	205
	<i>Chapitre 6 Partie Expérimentale</i>	213
<hr/>		
	<i>Abréviations</i>	263

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) fait partie des principales causes de mortalité dans le monde. Seules les multi-thérapies permettent pour le moment une prolongation significative de la vie des patients. Néanmoins de plus en plus de résistances aux différents agents thérapeutiques apparaissent à cause de l'extraordinaire capacité de mutation du virus. Il est donc essentiel de trouver de nouvelles cibles virales de façon à combattre plus efficacement la propagation de ce virus particulièrement dévastateur.

Comme tous les rétrovirus, le génome du VIH-1 se compose de deux brins d'ARN homologues, associés étroitement par de nombreuses interactions. Une interaction majeure a été identifiée et s'est avérée nécessaire à la dimérisation des brins d'ARN du VIH-1. Il s'agit d'une tige-boucle auto complémenteaire qui a été nommée « site d'initiation à la dimérisation » (DIS). Il a été montré que cette boucle est nécessaire à l'encapsidation de l'ARN, mais également à la synthèse de l'ADN proviral. Ce site est donc devenu une cible thérapeutique à part entière, d'autant plus que les molécules d'ARN sont de plus en plus considérées comme des cibles thérapeutiques très prometteuses de par leur capacité à fixer des molécules et interagir avec elles.

Les travaux effectués par l'équipe des Pr. B. et C. Ehresmann ont montré que la néomycine est un aminoglycoside spécifique du DIS et ont permis d'élaborer un modèle de l'interaction DIS-néomycine. Il a été proposé, au vu de ce modèle et de la nature dimérique de l'ARN, de synthétiser des dimères de la néamine, sous unité de la néomycine (Cf. Fig. 1). Ces dimères suggérés par le modèle se composent de molécules de néamine reliées par un bras espaceur au niveau de l'amine en position 1 (Cf. Fig. 1).

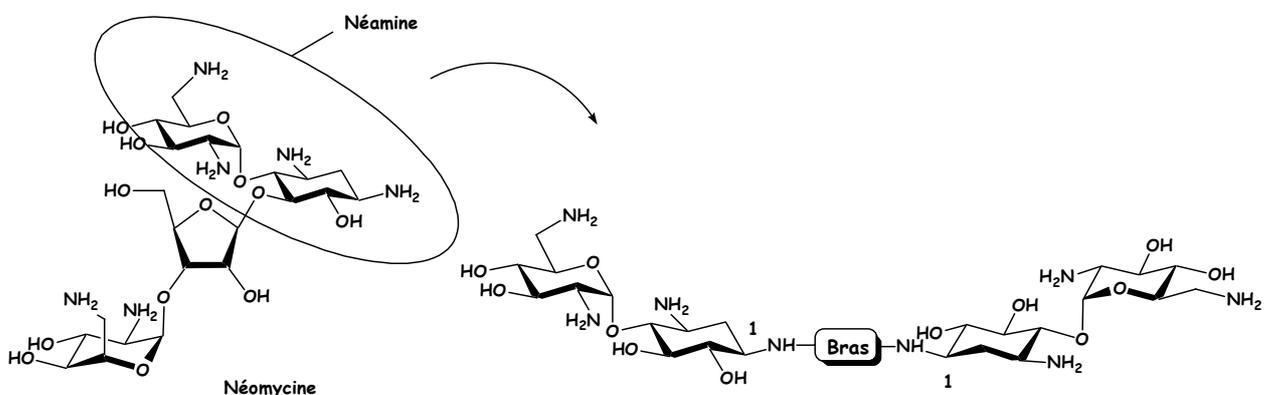


Figure 1 : Dimères de la néamine suggérés par le modèle de l'interaction néomycine-ARN.

Au cours de cette thèse, nous avons élaboré une stratégie de synthèse de ces dimères à partir de la néamine. La néamine étant une molécule hautement fonctionnalisée, il a été nécessaire d'effectuer un travail de protection sélective des fonctions afin de différencier l'amine sur laquelle nous devons fixer le bras espaceur des autres fonctions. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étape réactionnelle dite de « dimérisation » qui consiste à faire réagir deux molécules de néamine protégée sur les deux extrémités d'un bras espaceur. Après cette étape, il a été nécessaire de déprotéger les différentes fonctionnalités pour obtenir la molécule souhaitée. Nous avons ainsi synthétisé deux dimères de la néamine et leur activité a ensuite pu être évaluée sur le DIS.

Chapitre 1

VIH et ARN

I GENERALITES SUR LE VIH

I.1 Le VIH, un virus dévastateur

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est la maladie représentant la phase terminale de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le VIH s'attaque au système immunitaire par la destruction d'une certaine classe de globules blancs, les lymphocytes T4 ou CD4. Il détourne à son profit l'activité cellulaire de ces lymphocytes et induit l'apoptose [1]. La diminution des lymphocytes CD4 dans le sang traduit l'activité du virus. Le sang contient habituellement entre 500 et 1200 lymphocytes CD4 par mm^3 . Le système immunitaire reste encore très résistant aux infections jusqu'à un taux de 350 $\text{CD4}.\text{mm}^{-3}$. Par contre, en dessous de 200 $\text{CD4}.\text{mm}^{-3}$ le risque pour le patient de développer des maladies dites opportunistes devient important. Ces maladies résultent d'infections virales (grippe, hépatite, pneumonie...), bactériennes (tuberculose, salmonellose...), protozoaires (toxoplasmose...) ou de dérèglements (cancers) contre lesquels le corps ne peut plus lutter.

Le SIDA est actuellement la quatrième cause de mortalité dans le monde. L'organisation mondiale pour la santé (OMS) estime que le SIDA a tué 3,1 millions de personnes en 2005 [2]. En décembre 2005, tous continents confondus, 40,3 millions de personnes vivaient avec le VIH (c'est le plus haut niveau jamais atteint). L'Afrique sub-saharienne est la partie du monde la plus touchée. Elle comptait à elle seule 25,8 millions de personnes vivant avec le VIH en fin 2005, 2,4 millions de décès en 2005 et plus de 12 millions d'orphelins du SIDA (12 millions en 2004, pas de nouveau chiffre pour 2005).

1 Apoptose : mort cellulaire

2 ONUSIDA / OMS *Le point sur l'épidémie de SIDA* déc. 2005 : ISBN 92 9 173458 6

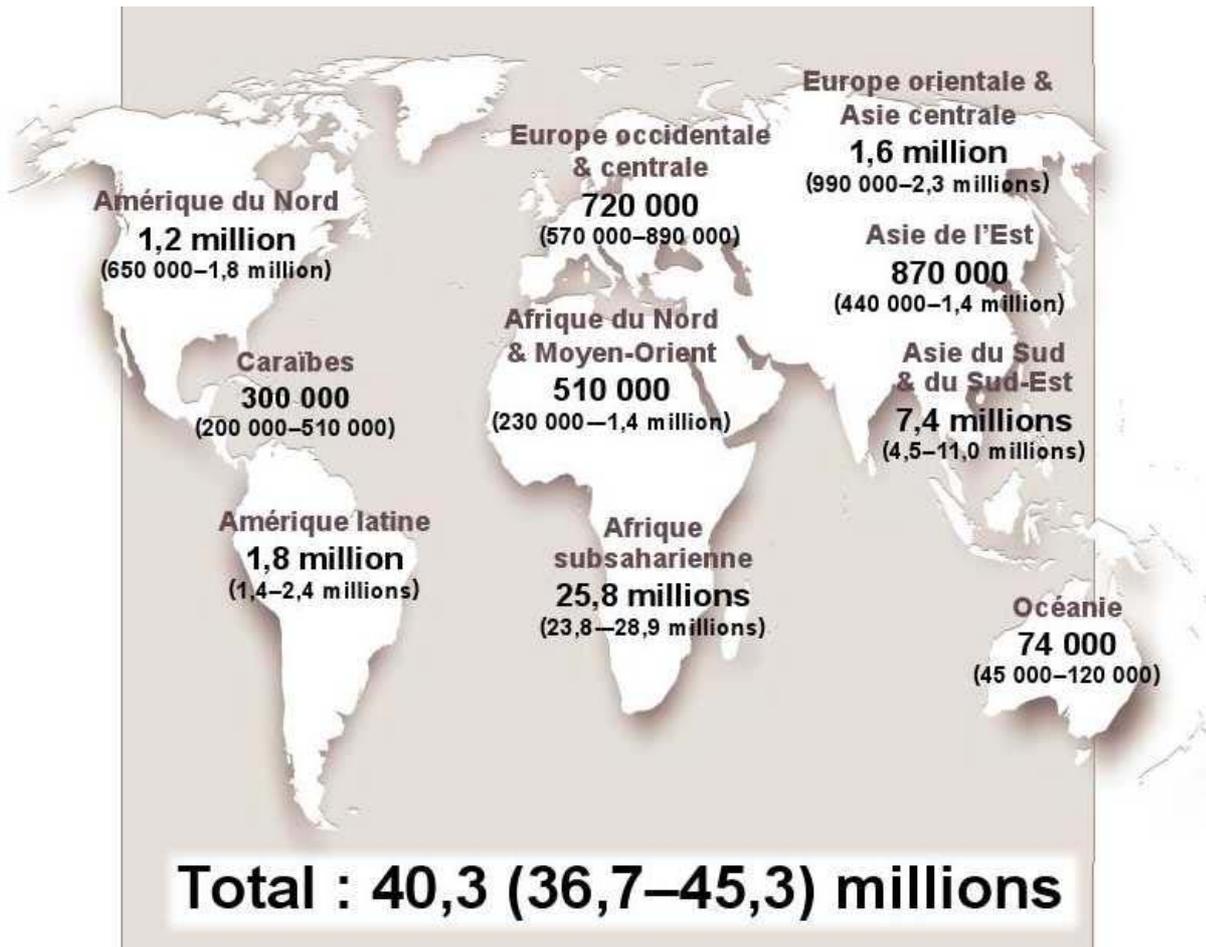


Figure 2 : Carte de répartition de la population vivant avec le VIH : estimations fin 2005 [2]

Le VIH continue de se propager dramatiquement, avec 4,9 millions de nouveaux cas d'infections pour l'année 2005. Le nombre de personnes vivant avec le virus s'est élevé ces dernières années dans toutes les régions du monde et les augmentations les plus fortes se sont produites en Asie de l'Est (augmentation de 26 % entre 2003 et 2005) ainsi qu'en Europe orientale et Asie Centrale (augmentation de 33 % entre 2003 et 2005). L'apparente stabilisation de l'épidémie en Afrique sub-saharienne cache une macabre réalité : le nombre de personnes nouvellement infectées est plus ou moins égal au nombre de personnes décédées des suites de la maladie.

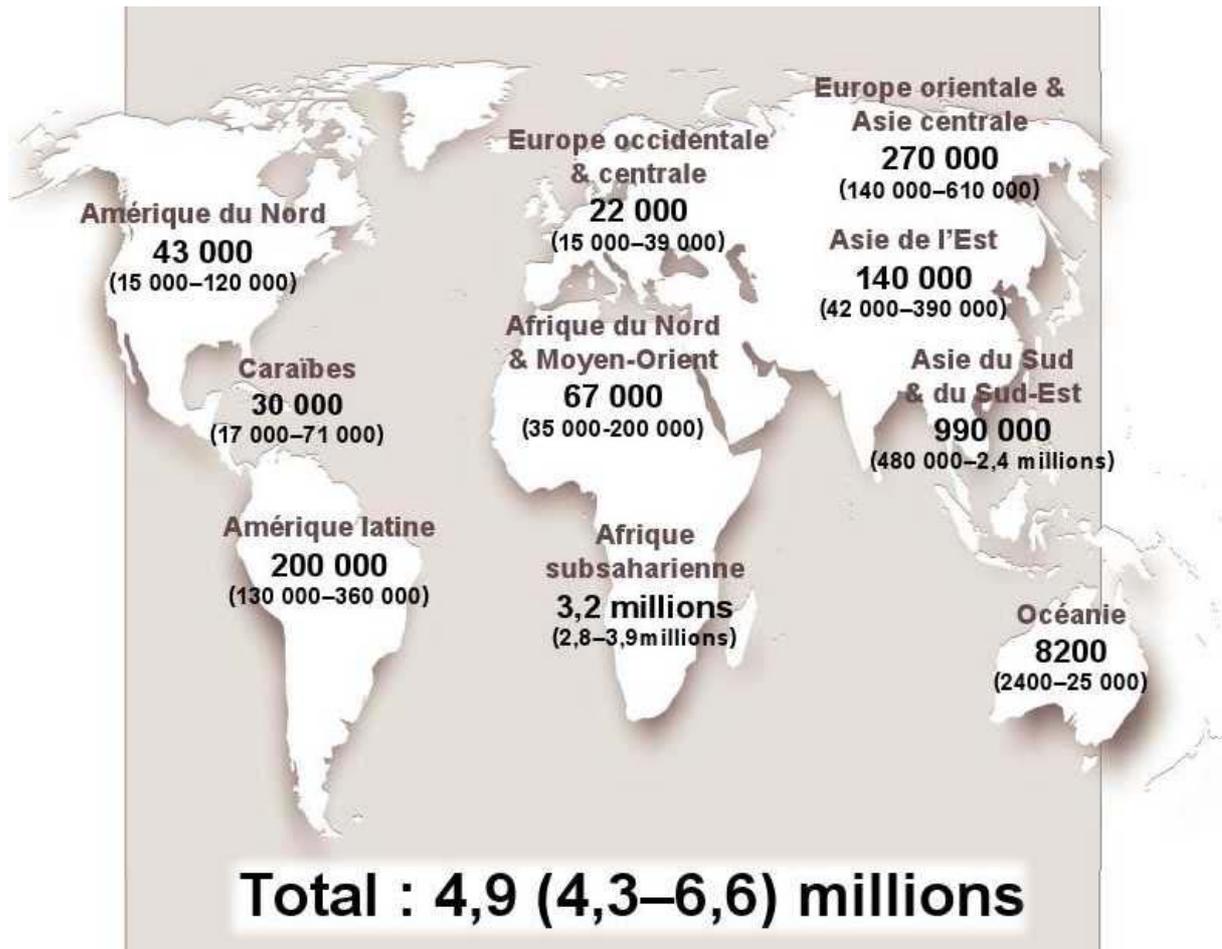


Figure 3 : Carte de répartition des personnes nouvellement infectées par le VIH : estimations fin 2005 [2]

Ce fléau est extrêmement dévastateur et difficilement endiguable parce qu'il n'existe à l'heure actuelle aucun médicament capable de guérir la maladie, et aucun vaccin capable de la prévenir. Les traitements existants, même s'ils permettent une amélioration significative de la durée de vie des patients, se heurtent à l'extraordinaire capacité de mutation du virus et à l'apparition rapide de résistances aux agents dirigés contre lui. De plus, seule une minorité de personnes ont accès aux soins. Les efforts de prévention, d'accessibilité aux soins et de développement de nouveaux médicaments doivent encore être soutenus afin de combattre la maladie et à terme de l'éradiquer.

I.2 Le cycle répliatif du VIH

Il existe deux sortes de VIH : le VIH-1, le plus courant, et le VIH-2 qui est très peu répandu et plus proche du VIS (virus d'immunodéficience simien). Le VIH-2 est

principalement localisé en Afrique de l'ouest. Le VIH-1 présente plusieurs sous-types selon les régions du monde. Le sous-type A (représenté par l'isolat MAL) est très répandu en Asie et Afrique et le sous-type B (isolat LAI) se retrouve en Europe et en Amérique du nord. Il existe aussi le sous-type C qui est en très forte expansion en Asie, en Afrique et en Amérique du Sud, et le sous-type F qui est émergent en Europe de l'Est et Amérique du Sud.

Le VIH-1 est un rétrovirus de la classe des lentivirus. Il se compose de deux molécules homologues d'acide ribonucléique (ARN) simple brin (support de l'information génétique) recouvertes de nombreuses protéines et d'ARN de transfert (ARNt), le tout contenu dans une capsid (coque protéique). La capsid est elle-même localisée à l'intérieur de la matrice protéique, recouverte par l'enveloppe virale (Cf. Fig. 4)

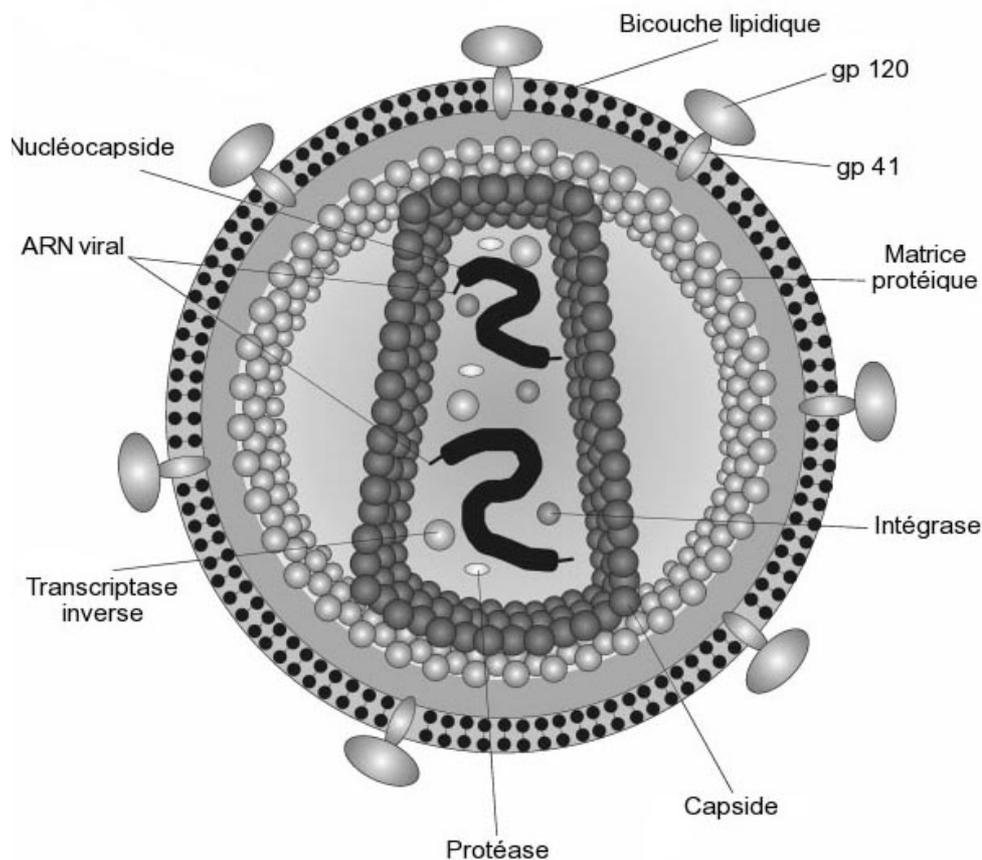


Figure 4 : Organisation structurale du virion du VIH-1 [3].

Le cycle répliatif du VIH-1 est maintenant bien connu (Cf. Fig. 5). Le virus reconnaît les récepteurs de la cellule lymphocytaire via la protéine gp120 de son enveloppe. Une fois fixé sur ces récepteurs, il peut fusionner avec la membrane de la cellule grâce à sa protéine

3 <http://fr.wikipedia.org>

gp41. La capside s'ouvre alors et l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme de la cellule. L'ARN viral est ensuite transcrit en ADN proviral par une enzyme virale appelée transcriptase inverse. Après duplication du simple brin d'ADN, ce dernier peut être intégré à l'ADN humain grâce à une autre enzyme virale : l'intégrase. L'ADN proviral peut alors rester dans la cellule hôte pendant un temps indéterminé sans qu'elle en soit affectée. Les raisons de ce phénomène ne sont pas encore complètement élucidées [4].

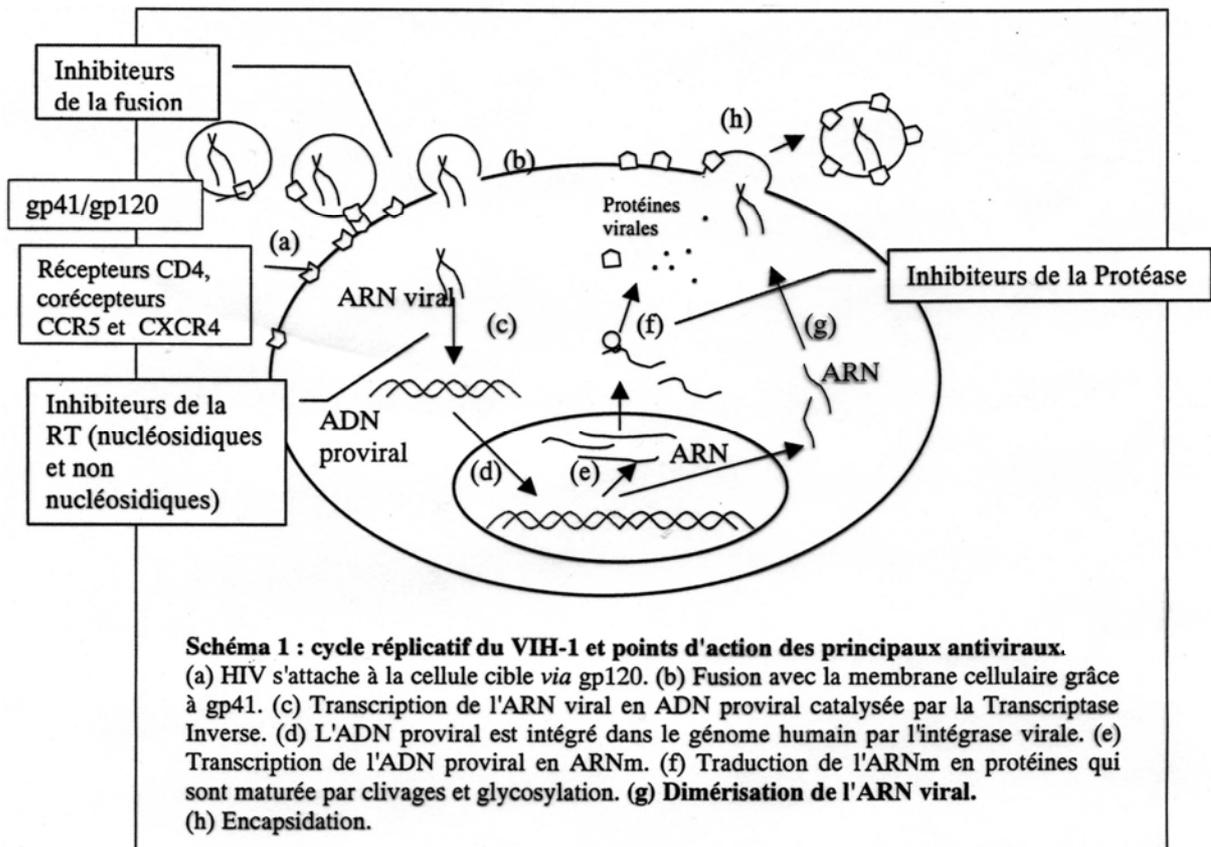


Figure 5 : Le cycle réplcatif du VIH-1 et les points d'action des principaux anti-rétroviraux. [5]

L'ADN proviral est ensuite transcrit en ARN. Ce dernier est en partie épissé et traduit en protéines provirales, qui sont maturées (clivages et glycosylations) pour former les protéines virales, capables d'être assemblées pour former un nouveau virus. En parallèle, une partie de l'ARN viral doit rester non épissée pour former l'ARN génomique. C'est l'ARN génomique qui permet la formation des précurseurs protéiques enzymatiques et de structure, et qui s'associe à un brin homologue (dimérisation) afin de pouvoir être encapsidé. La capside s'entoure ensuite de la membrane cellulaire et l'utilise pour former un nouveau virion.

4 Cohen, J. *Science* **2002**, 297, 2188.

5 Katrin, P. ; Gambertoglio, J. G. . *Pharm. Res.* **1998**, 15, 819.

I.3 Les principaux traitements anti-VIH

Le comptage des lymphocytes CD4 est un outil important pour le praticien afin d'estimer l'activité du virus et d'adapter le traitement. Le taux critique de 350 CD4.mm⁻³ est le taux à partir duquel il est question d'un traitement anti-VIH.

Les traitements existants servent à faire chuter la quantité de virus dans le sang par diminution de la réplication virale. Ils ciblent différentes protéines virales : la protéine gp41, la transcriptase inverse et la protéase (Cf. Tab. 1 et Fig. 5).

Inhibiteurs de la transcriptase inverse

Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

DCI	Nom chimique	spécialité
zidovudine	AZT	Rétrovir®
didanosine	ddl	Videx®
zalcitabine	ddC	Hivid®
stavudine	d4T	Zérit®
lamivudine	3TC	Epivir®
abacavir	ABC	Ziagen®
emtricitabine	FTC	Emtriva®

Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

DCI	Nom chimique	spécialité
névirapine	NVP	Viramune®
delavirdine	DLD	Rescriptor®
éfavirenz	EFV	Sustiva®

Inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse

DCI	Nom chimique	spécialité
ténofovir DF	PMPA	Viréad®

Inhibiteurs de la protéase

DCI	Nom chimique	spécialité
indinavir	IDV	Crixivan®
ritonavir	RTV	Norvir®
nelfinavir	NFV	Viracept®
saquinavir	SQV	Fortovase® Invirase®
amprénavir	APV	Agénérase®
lopinavir/ritonavir	LPV/r	Kalétra®
fosamprénavir	FPV	Telzir® ou Lexiva®
atazanavir	ATZ	Reyataz®

Inhibiteurs de fusion

DCI	Nom chimique	spécialité
enfuvitride	T20	Fuzéon®

Tableau 1 : les différents anti-rétroviraux [6]

Actuellement, les traitements sont des combinaisons de deux ou trois anti-rétroviraux (di ou trithérapies). Par exemple, le Combivir® est un médicament qui combine AZT et 3TC. De même, le Trizivir® combine l’AZT, 3TC et ABC. En effet, cibler différentes étapes du cycle répliatif ou utiliser deux inhibiteurs d’une même protéine est plus efficace que l’utilisation d’un seul anti-rétroviral et permet une diminution de la réplication virale dans la plupart des cas. La trithérapie a permis d’augmenter significativement la vie des patients. Cependant, de plus en plus de souches de virus résistantes apparaissent à cause de la grande capacité de mutation du virus. De nouveaux traitements doivent donc être mis au point et de nombreuses recherches sont en cours. Par exemple, un inhibiteur de protéase, le TMC114 entre en phase III, et un autre, le Tipranavir® a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) durant l’été 2005.

Par ailleurs, de nouvelles approches ciblant d’autres étapes du cycle répliatif voient le jour. Des équipes cherchent à cibler le Rev Responsive Element (RRE), domaine des ARN non épissés (ARN génomique) ou mono épissés du virus. La partie RRE de l’ARN du VIH se lie à la protéine Rev, qui facilite le transport de l’ARN du noyau vers le cytoplasme en le protégeant d’un épissage complet. En effet, les ARN peu épissés sont nécessaires à la formation des précurseurs protéiques enzymatiques et de structure, et l’ARN non épissé constitue le génome des nouveaux virions [7] [8]. En fixant des aminoglycosides sur la partie RRE de l’ARN, ce dernier ne peut plus fixer la protéine Rev. Tous les brins d’ARN sont alors épissés et de nouveaux virions ne peuvent plus être formés.

D’autres équipes se sont intéressées au site TAR (Tat-responsive element) de l’ARN du VIH. La fixation de la protéine Tat (Transactivator of transcription) sur le domaine TAR de l’ARN est nécessaire pour la transcription virale. Il est donc possible de bloquer le cycle

6 Aides, Réponses associatives à la lutte contre le sida en Afrique 2^{ème} édition janv 2005, 83.

7 Zapp, M. L. ; Stern, S. ; Green, M. R. *Cell* **1993**, 74, 969.

8 Demeunynck, M. ; Bailly, C. ; Wilson, W.D. *DNA and RNA binders* Ed. Wiley-vch **2003** ; 1 ; 18. ISBN : 3-527-30244-1

réplicatif du virus en inhibant la fixation de la protéine Tat, par la fixation d'une autre molécule sur le domaine TAR de l'ARN [7] [9] [10] [11].

D'autres étapes du cycle répliatif doivent encore être ciblées afin de pouvoir faire face à la grande variabilité du virus. La clef du traitement repose sûrement sur la multiplicité des cibles thérapeutiques.

En outre, la recherche d'un vaccin, qui a débuté il y a déjà 15 ans, s'est heurtée à de très nombreux obstacles [12]. Le principe d'un vaccin est de stimuler la réponse immunitaire contre des antigènes spécifiques portés par un virus inoffensif ou un support artificiel. Pour ceci, il faut identifier des immunogènes induisant une immunité durable. En 2001, 70 vaccins contre le VIH avaient été évalués en phase I, 5 en phase II et 2 en phase III, mais aucun d'entre eux n'a pu émerger pour des raisons de sécurité. Les problèmes rencontrés sont la grande diversité et variabilité du virus, et la limitation des modèles d'étude : les vaccins mis au point sur des virus de laboratoire on échoué sur les virus naturels. De plus, le modèle simien du virus ainsi que les mécanismes biologiques chez le singe sont très différents du VIH-1. Par ailleurs, le VIH présente des spécificités, que n'ont pas les autres virus, qui lui permettent de contourner les attaques immunitaires par des mécanismes de leurre.

Comme il n'existe pas encore de vaccin pour les personnes séropositives, que la contamination se propage effroyablement, que de très nombreuses personnes sont déjà atteintes du SIDA, et que de plus en plus de souches résistantes apparaissent, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques s'avère nécessaire et urgente !

Le VIH étant un virus dont le génome est porté par deux brins d'ARN homologues, de nouvelles approches thérapeutiques orientées vers cet ARN peuvent être fructueuses et nouvelles. En effet, les découvertes de ces vingt dernières années ont montré que l'ARN peut être considéré comme une cible thérapeutique à part entière et rend le champ d'application de la chimie médicinale beaucoup plus vaste.

9 Wang, S. ; Huber, P. W. ; Cui, M. ; Czarnik, A. W. ; Mei, H. Y. *Biochemistry* **1998**, 37, 5549.

10 Faber, C. ; Sticht, H. ; Schweimer, K. ; Rösch, P. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 20660.

11 Puglisi, J. D. ; Chen, L. ; Frankel, A. D. ; Williamson, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 3680.

12 Nabel, G. J. *Nature* **2001**, 410, 1002.

II L'ARN : UNE NOUVELLE CIBLE THERAPEUTIQUE PROMETTEUSE

II.1 L'ARN, une structure riche de découvertes

La famille des acides nucléiques comprend l'acide désoxyribonucléique (ADN), support de l'information génétique, mais aussi l'acide ribonucléique (ARN). Ce dernier se répartit dans la cellule en trois groupes principaux, acteurs complémentaires participants à la synthèse des protéines.

- La majorité de l'ARN est ribosomique (ARNr) et représente 80 % de l'ARN total : complexé à des protéines, il forme le ribosome, siège de l'activité enzymatique nécessaire à la traduction de l'ARN messager (ARNm) en protéines.
- L'ARNm, responsable du transport de l'information génétique, est un ARN de courte durée de vie. De ce fait, il ne représente que 5% de l'ARN total. Il s'associe temporairement aux ribosomes où il est traduit en protéines.
- L'ARN de transfert (ARNt) constitue 15% de l'ARN total. Il est porteur d'un acide aminé. En s'associant à l'ARN messager au niveau de l'ARN ribosomique, il assure la lecture du code de l'ARNm écrit en nucléotides et sa traduction en séquence d'acides aminés.

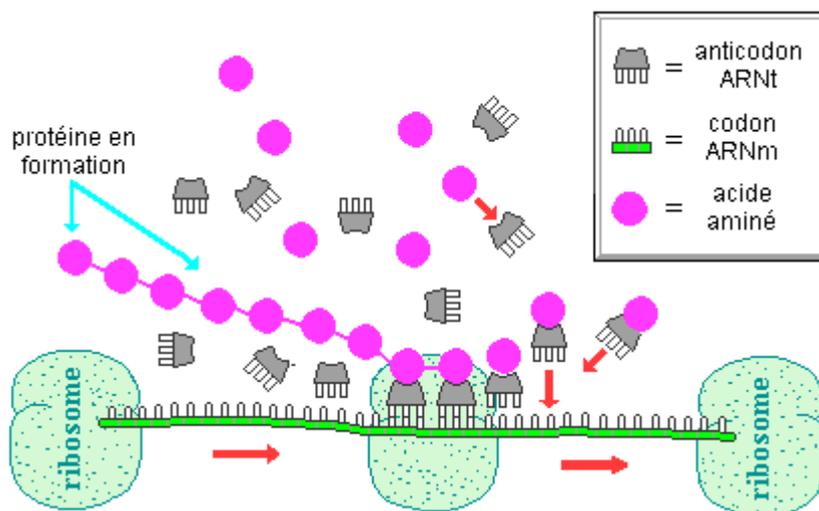


Figure 6 : Les rôles principaux des différents ARN au cours de la synthèse protéique [13].

Les molécules d'ARN ont longtemps été considérées comme une famille moins fondamentale que les molécules d'ADN, et ont bénéficié de moins d'intérêt. Pourtant, il a été découvert récemment que l'ARN est loin d'être un transporteur passif du code génétique [14] [8]. Il possède, au contraire, des propriétés structurales (duplex, boucles, renflements) et même enzymatiques tout aussi complexes et particulières que celles associées aux protéines.

En particulier, le rôle très important des ribozymes (ribonucleic acid enzyme) ou ARN catalytiques a été découvert par T. Cech et S. Altman (Prix Nobel de chimie 1989). Ce sont des ARN qui catalysent des réactions de coupure et de ligation de molécules d'ARN (excision des introns [15] et épissage des exons [16]) et d'ADN sans l'assistance d'une protéine. Certains ribozymes, contenus dans des introns d'un transcrit d'ARN [17], sont autocatalytiques : ils sont capables de s'exciser eux-mêmes. Un autre exemple de ribozyme est le ribosome lui-même [18]. Lorsque sa structure et son fonctionnement ont été mieux élucidés, il a été vérifié que le site actif de l'ARNr (site A ou peptidyltransférase) est entièrement constitué, non pas de protéines, mais d'ARN comme c'était déjà suspecté auparavant. C'est l'ARNr qui fournit la structure et l'activité enzymatique nécessaires à la traduction de l'ARNm en protéines : la reconnaissance entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt, qui porte l'acide aminé correspondant à l'anticodon, s'effectue au niveau du site A de l'ARNr. L'ARNr catalyse alors la formation de la nouvelle liaison peptidique entre l'acide aminé porté par l'ARNt et la chaîne peptidique en formation.

Par ailleurs, d'autres types d'ARN aux propriétés très intéressantes ont été découverts. Les micro-ARN [19] [20] ou ARNmi, petits ARN (comportant une vingtaine de nucléotides) non codants, sont responsables d'une régulation de la synthèse des protéines par l'inhibition de la traduction de l'ARN messager auquel ils se lient. L'inhibition peut se faire sans provoquer la dégradation de l'ARNm, mais certains micro-ARN (les ARNsi pour small interfering RNA) conduisent à la destruction à la fois de l'ARNsi et de l'ARNm complémentaire par un mécanisme d'interférence (ARNi).

14 Vicens, Q. *Biofutur* **2005**, mai, 24.

8 Demeunynck, M. ; Bailly, C. ; Wilson, W.D. *DNA and RNA binders* Ed. Wiley-vch **2003** ; 1 ; 18. ISBN : 3-527-30244-1

15 Intron : Partie d'un gène ne codant pas pour la protéine correspondant au gène. C'est un segment d'ADN non codant, séparant les parties codantes. Après la traduction de l'ADN en ARN, les introns sont retirés afin de former l'ARNm capable alors d'être traduit en protéines.

16 Exon : séquence d'ADN codant pour une partie d'une protéine

17 Le transcrit est l'ARN brut obtenu après transcription de l'ADN. Il contient à la fois les introns et exons.

18 Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P.B.; Steitz, T.A. *Science* **2000**, 289, 920.

19 Lau, N.C. ; Lim, L. P. ; Weinstein, E. G. ; Bartel, D. P. *Science* **2001**, 294, 858.

20 <http://en.wikipedia.org>

Ces exemples montrent que l'ARN possède des caractéristiques qui se rapprochent de celles des protéines et de l'ADN : Il possède des **structures tridimensionnelles particulières**, qui lui confèrent parfois une activité catalytique. Certains ARN sont le siège d'**activités de régulation** ou servent eux mêmes de régulateurs. Enfin, l'ARN, tout comme l'ADN, peut être un mode de **stockage d'informations génétiques**. En effet, de nombreux virus (60 % des virus connus) ont leur génome primaire codé sous forme d'ARN (ex. VIH, hépatites, grippe, ebola, variole...).

L'ARN devient ainsi une nouvelle cible thérapeutique tout à fait intéressante. C'est pourquoi de nombreux groupes se sont intéressés à ses interactions avec des petites molécules [21] [22]. Par ailleurs, ce type d'approche est actuellement possible grâce aux nombreuses avancées technologiques : synthèse chimique d'ARN, analyse en RMN haute résolution, études de cristaux par RX à haute résolution, chimie combinatoire ...

II.2 Interactions entre l'ARN et des petites molécules

II.2.1 Définitions

Lorsque l'on s'intéresse aux interactions entre molécules, spécialement aux molécules biologiques, on parle en termes d'affinité et de spécificité. L'affinité traduit la capacité d'une molécule à se lier à une autre par diverses interactions. La spécificité représente l'affinité d'une molécule pour un site particulier par rapport à l'ensemble des affinités pour tous les sites possibles d'interaction.

II.2.2 Les grandes classes d'interactions avec l'ARN [23]

Les **interactions électrostatiques** existent entre ions. Elles jouent un grand rôle, essentiellement à cause de la nature polyanionique de l'ARN. Les phosphates du squelette de l'ARN, interagissent avec des molécules porteuses de charges positives, qui sont généralement des ions métalliques ou des petites molécules portant des ammoniums.

21 Le terme « petite molécule » est utilisé en général pour parler de molécules naturelles ou synthétiques ciblant l'ARN ou l'ADN, même si celles-ci ont des poids moléculaires « élevés ». En effet, même les substances naturelles de grande taille restent des « petites molécules » face aux macromolécules que sont l'ARN ou l'ADN.

22 Hermann, T. ; Westhof, E. *Curr. Opin. Biotechnology* **1998**, 9, 66.

23 Hermann, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1890

Les **liaisons hydrogène** sont les interactions dipolaires qui ont lieu entre un atome fortement électronégatif et un atome d'hydrogène lié par liaison covalente à atome plus électronégatif que lui. La longueur des liaisons hydrogène est typiquement comprise entre 2,5 et 3,2 Å et leur énergie est comprise entre 10 et 16 kJ.mol⁻¹. Dans le cas de l'ARN, elles ont lieu majoritairement entre les oxygènes des phosphates (accepteurs) des nucléotides et des hydrogènes des hydroxyles ou ammoniums (donneurs) des petites molécules. Ce type d'interaction peut être spécifique car les liaisons hydrogène ont souvent une direction spatiale donnée. Ces liaisons peuvent également se faire à travers des molécules d'eau, souvent observées dans les structures étudiées.

Des **interactions par « π -stacking » ou intercalation** peuvent avoir lieu entre des systèmes aromatiques plans et les bases de l'ARN. Leur énergie est de l'ordre de 10 kJ.mol⁻¹. Ce type d'interaction est amplement utilisé pour cibler l'ADN (anticancéreux de type intercalant), mais il peut également être complémentaire d'autres types d'interactions dans le cas de l'ARN. Ce type d'interaction est en général peu spécifique, sauf dans les cas où il apporte une contrainte à la flexibilité conformationnelle de la petite molécule et l'oriente ainsi de façon plus précise.

Des **interactions de Van der Waals** sont les interactions de plus faible énergie ($E < 8$ kJ.mol⁻¹) dues à des attractions de type électrostatiques entre dipôles permanents (forces de Keesom), ou entre dipôle permanent et dipôle induit (forces de Debye), mais aussi des répulsions dues aux forces de dispersion créées par des dipôles induits (forces de London).

Finalement, la spécificité est majoritairement obtenue par **la complémentarité de forme**. En effet, l'ARN adopte parfois des conformations qui laissent apparaître des cavités chargées. Les molécules d'eau, présentes dans les cavités, jouent un grand rôle en participant à la complémentarité : elles peuvent s'orienter de diverses façons et donner ainsi une certaine plasticité aux liaisons hydrogène ; elles peuvent aussi remplir les cavités interfaciales et augmenter ainsi la surface de contact.

La combinaison de ces divers types d'interaction en fonction de la structure tridimensionnelle de l'ARN pourra conduire à l'élaboration de substrats très sélectifs des sites de l'ARN intéressants d'un point de vue thérapeutique.

II.2.3 Quelques exemples de petites molécules ciblant l'ARN

L'étude des interactions entre les ARN et des petites molécules est un domaine émergeant en biologie [24] [25].

Un bel exemple de régulation de l'expression de gènes par des petites molécules en interaction avec l'ARN est la biochimie des aptamères d'ARN de Green et Werstuck [26]. Un aptamère d'ADN ou d'ARN (il existe aussi des aptamères de protéines) est une courte séquence d'ADN ou d'ARN sélectionnée artificiellement et éventuellement modifiée de telle sorte qu'elle ait une affinité et une sélectivité maximale pour une molécule donnée (acide nucléique, protéine, petite molécule). Il est possible d'obtenir des affinités et spécificités bien plus grandes que dans le cas d'ADN et d'ARN naturels. Green et Werstuck ont introduit dans la région 5'-UTR [27] de l'ARNm des séquences de gènes artificiels (aptamères). L'ajout de ces aptamères ne perturbe pas la lecture de l'ARNm. Par contre, en présence du substrat spécifique de l'aptamère, il se forme un complexe très rigide (aptamère – petite molécule) qui empêche une reconnaissance correcte par la structure de pré-initiation du ribosome. La traduction de cet ARNm en protéine n'a alors pas lieu (Cf. Fig. 7).

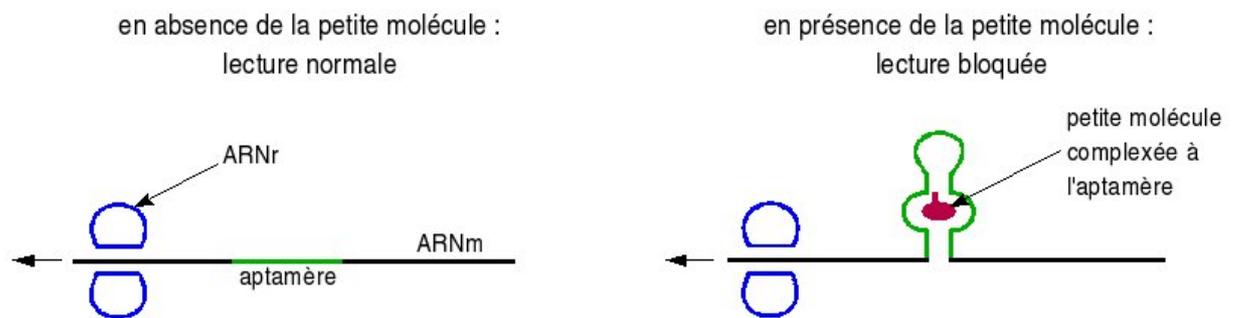


Figure 7 : Influence de la petite molécule sur l'aptamère.

Un mécanisme similaire de régulation de l'expression des gènes par l'interaction de petites molécules avec des ARNm a été découvert chez les bactéries et repose sur un type d'interrupteur moléculaire. Des motifs appelés « riboswitches » sont présents dans la zone 5'-UTR des ARNm codant pour des enzymes impliquées dans des processus chimiques fondamentaux [28]. Lorsque des métabolites atteignent une certaine concentration cellulaire,

24 Sucheck, S. J. ; Wong, C.-H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, , 678.

25 Tor, Y. *Chem. Bio. Chem.* **2003**, 4, 998.

26 Tor, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1579.

27 Zone de l'ARNm faisant partie de la première séquence lue par des ribosomes.

28 Winkler, W. C. ; Breaker, R. R. *Chembiochem* **2003**, 4, 1024.

ils se lient aux « riboswitches » et modifient leur structure afin de bloquer la traduction de la protéine responsable de la production des métabolites en question.

Il existe d'autres exemples de systèmes naturels où une petite molécule interagit avec l'ARN et module son activité. Par exemple, les structures tridimensionnelles des séquences d'ARN primaire [29] sont relativement flexibles et peuvent se replier autour d'un cation divalent ou autour de polyamines linéaires (spermine) ou non linéaires (aminoglycosides). Ces derniers, chargés positivement en milieu physiologique, sont de bons ligands potentiels pour l'ARN chargé négativement au niveau des phosphates. Ils ont été très amplement utilisés pour leurs interactions avec l'ARN et sont présentés plus amplement au paragraphe suivant.

II.2.4 Les aminoglycosides en tant que petites molécules capables de se fixer sur l'ARN

II.2.4.1 Généralités sur les aminoglycosides

Les antibiotiques aminoglycosidiques sont des molécules d'origine naturelle, synthétisées par des bactéries. Ceux qui sont issus des *Streptomyces* ont un suffixe –mycine et ceux qui sont issus des *Micromonospora* ont un suffixe –micine. Ces antibiotiques ont longtemps été utilisés en tant que médicaments efficaces essentiellement contre des bactéries Gram (-) [30] et quelques bactéries Gram (+), mais aussi contre des mycobactéries. En se fixant sur la sous unité 16S de l'ARN ribosomique bactérien, les aminoglycosides engendrent des erreurs de traduction de l'ARN messager ou des fins prématurées de la synthèse protéique, conduisant généralement à la mort de la bactérie. Leur utilisation est cependant limitée par leur toxicité pour l'homme (accumulation dans les reins, dégâts au niveau des oreilles) dont le mécanisme exact est peu connu. D'autre part, de plus en plus de souches résistantes aux aminoglycosides apparaissent [31] [32]. En effet, les souches bactériennes ciblées mutent ou développent des enzymes qui modifient légèrement les aminoglycosides pour les rendre inactifs (acylation, phosphorylation, adenylation).

La plupart des aminoglycosides sont composés d'aminosucres liés à un cyclohexitol, la 2-déoxystreptamine (2-DOS) (Cf. Fig. 8).

29 L'ARN primaire est l'ARN « brut » issu de la transcription de l'ADN. Chez les eucaryotes, l'ARN primaire ou transcrit primaire n'est pas utilisable en tant que tel. Il doit être maturé dans le noyau avant de pouvoir transiter vers le cytoplasme et jouer ses différents rôles.

30 Beaucaire, G. J. *Chemother.* **1995**, 7, 111.

31 Neu, H. C. *Science* **1992**, 257, 1064.

32 Magnet, S. ; Blanchard, J. S. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 477.



Figure 8 : L'unité centrale des aminoglycosides : la 2-déoxystreptamine.

On peut distinguer différentes familles d'antibiotiques selon la substitution du 2-DOS. Il est substitué sur les positions 4 et 5 pour la classe de la néomycine (Cf. Fig. 9).

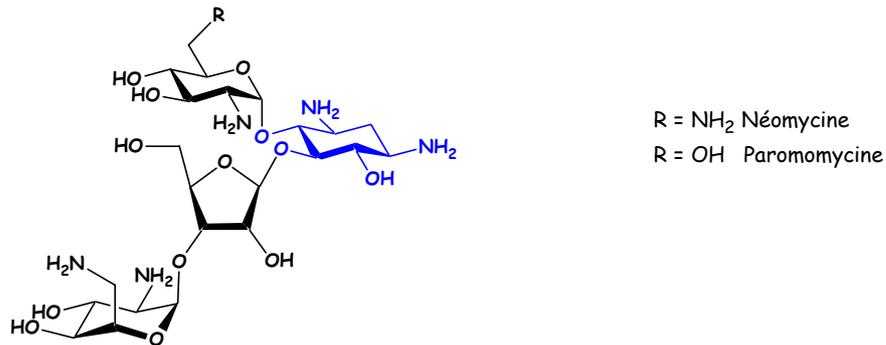


Figure 9 : Les dérivés de la 2-déoxystreptamine substituée aux positions 4 et 5.

Dans le cas de la néomycine, les différentes sous unités ont des noms propres (Cf. Fig. 10).

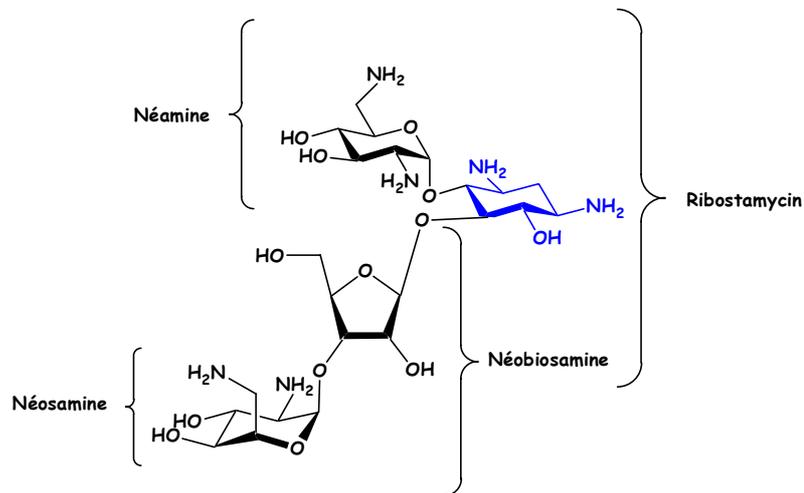
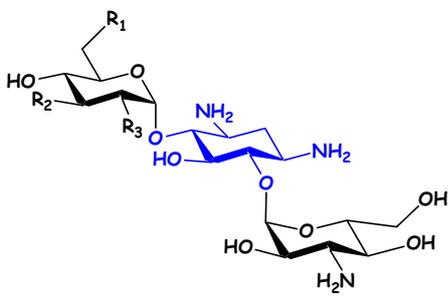
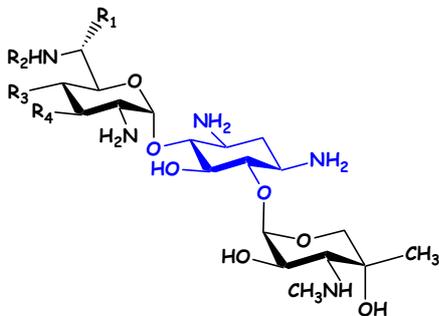
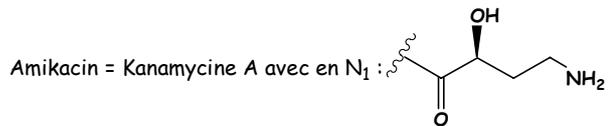


Figure 10 : Nomenclature des différentes sous parties de la néomycine

Le 2-DOS est substitué au niveau des positions 4 et 6 pour la kanamycine, la tobramycine, l'amikacine, la généticine et la gentamicine (Cf. Fig. 11). D'autres antibiotiques sont dérivés de la streptomine, parent de la 2-déoxystreptamine (Cf. Fig. 12).



	R ₁	R ₂	R ₃
Kanamycine A	NH ₂	OH	OH
Kanamycine B	NH ₂	OH	NH ₂
Kanamycine C	OH	OH	NH ₂
Tobramycine	NH ₂	H	NH ₂



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Gentamicine C1	CH ₃	CH ₃	H	H
Gentamicine C2	CH ₃	H	H	H
Gentamicine C1a	H	H	H	H
Généticine	H	H	OH	OH

Figure 11 : Les dérivés de la 2-déoxystreptamine substituée aux positions 4 et 6.

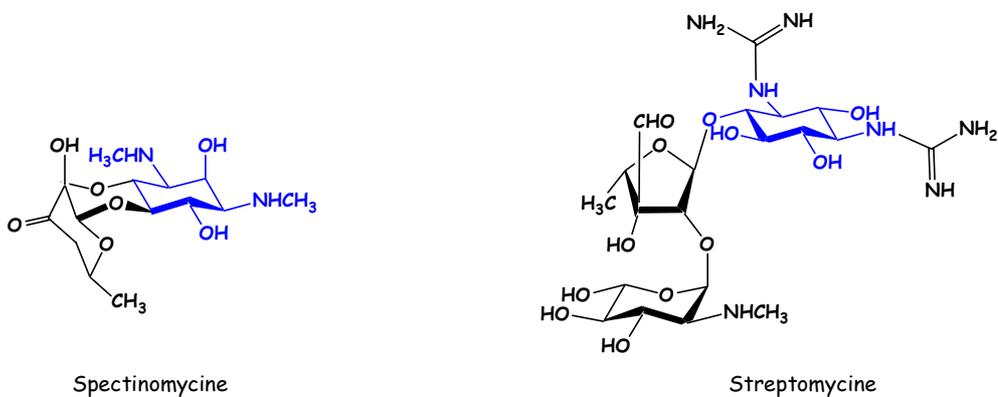


Figure 12 : Les dérivés de la streptomine.

II.2.4.2 Exemples d'interactions entre aminoglycosides et ARN

Les interactions entre ARN et aminoglycosides peuvent être spécifiques ou non. Alors que les interactions électrostatiques non spécifiques entre ARN et aminoglycosides ont été décrites il y a plus de 20 ans, des interactions spécifiques ont été découvertes plus récemment et se sont avérées être à l'origine du mode d'action de ces antibiotiques. Les aminoglycosides sont capables de reconnaître l'ARN procaryotique de façon spécifique, en particulier au niveau du site A de l'ARNr [32] : le site A de l'ARNr contrôle la fidélité de l'appariement codon anticodon en adoptant essentiellement deux types de structures tridimensionnelles. L'une conduit à la poursuite de la synthèse peptidique et l'autre au refoulement des l'ARNt portant un mauvais acide aminé. Cependant, lorsqu'un aminoglycoside est fixé sur le site A, il induit la structure tridimensionnelle qui provoque la poursuite de l'incorporation des acides aminés même si l'appariement codon anticodon n'est pas respecté. Par conséquent, tous les ARNt, y compris ceux qui portent un mauvais acide aminé, conduisent à un signal d'appariement codon anticodon correct, ce qui conduit à une diminution de la fidélité de la traduction, et à terme, à la mort de la bactérie.

L'atout majeur des aminoglycosides est leur spécificité pour l'ARN par rapport à l'ADN. C'est pour cette raison que leurs interactions avec l'ARN ont été amplement étudiées. Ils ont été utilisés dans la littérature pour leurs interactions avec les différents types d'ARN [33] [34] [26]. En particulier, ils ont ciblé l'ARN ribosomique [35], mais aussi les introns du groupe I [36], l'ARN à tête de marteau [37], les ribozymes du virus de l'hépatite humaine D [38], l'ARN RRE [7] et l'ARN TAR [39] du VIH-1.

Ils peuvent servir de modèle, en tant que structure parente, en première approche, pour l'élaboration de nouvelles molécules ciblant l'ARN. Une seconde approche consiste souvent à synthétiser des mimes de ces aminoglycosides. De nombreux mimes d'aminoglycosides ont

32 Magnet, S. ; Blanchard, J. S. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 477.

33 Walter, F. ; Vincens, Q. ; Westhof, E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 694.

34 Schroeder, R. ; Waldisch, C. ; Wank, H. *EMBO. J.* **2000**, 19, 1.

26 Tor, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1579

35 Han, Q ; Zhao, Q. ; Fish, S. ; Simonsen, K. B. ; Vourloumis, D. ; Froelich, J. M. ; Wall, D. ; Hermann, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2695.

36 Von Ahsen, U. ; Davies, J. ; Schroeder, R. *Nature* **1991**, 353, 368.

37 Stage, T. ; Hertel, K. J. ; Uhlenbeck, O. C. *RNA* **1995**, 1, 95.

38 Rogers, J. ; Chang, A. H. ; von Ahsen, U. ; Schroeder, R. ; Davies, J. *J. Mol. Biol.* **1996**, 259, 916.

7 Zapp, M. L. ; Stern, S. ; Green, M. R. *Cell* **1993**, 74, 969.

39 Mei, H. Y. ; Galan, A. A. ; Halim, N. S. ; Mack, D. P. ; Moreland, D. W. ; Sanders, K. B. ; Truong, H. N. ; Czarnik, A. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 2755.

déjà été testés sur les différents types d'ARN [40] [41] [42], en particulier le ribosome bactérien [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57].

II.3 Bilan et perspectives

L'utilisation de petites molécules se liant à des ARN est relativement récente, et même si elle connaît un intérêt croissant, il n'est pas encore possible de dresser des règles à suivre pour créer des molécules qui soient de bons candidats pour une interaction avec un ARN donné. Cela découle du fait que d'une part, il existe peu d'exemples naturels, mais aussi parce que l'ARN est une structure relativement flexible qui peut adopter différentes conformations en équilibre entre elles. La prévision des conformations les plus stables n'est, à l'heure actuelle pas encore possible, même à l'aide d'outils informatiques, car un ligand peut stabiliser certaines conformations et en éliminer d'autres. En revanche, il existe de plus en plus d'outils permettant une meilleure compréhension : la cristallographie (étude des interactions à partir d'analyses aux rayons X de cristaux d'un complexe stable ARN-Ligand), la RMN des macromolécules, et les simulations par informatique.

-
- 40 Ye, X.-S. ; Zhang, L.-H. *Current Med. Chem.* **2002**, 9, 929.
41 Sucheck, S. J. ; Greenberg, W.A. ; Tolbert, T. J. ; Wong, C-H *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1080.
42 Sears, P. ; Wong, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2301.
43 Vourloumis, D. ; Winters, G. C. ; Simonsen, K. B. ; Takahashi, M. ; Ayida, B. K. ; Shandrick, S. ; Zhao, Q. ; Han, Q. ; Hermann, T. *Chembiochem* **2005**, 6, 58.
44 Seeberger, P. H. ; Baumann, M. ; Zhang, G. ; Kanemitsu, T. ; Swayze, E. E. ; Hofstadler, S. A. ; Griffey, R. H. *Synlett* **2003**, 9, 1323.
45 Venot, A. ; Swayze, E. E. ; Griffey, R. H. ; Boons, G-J *Chembiochem* **2004**, 5, 1228.
46 Alper, P. B. ; Hendrix, M. ; Sears, P. ; Wong, C-H *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1965.
47 Liang, F. S. ; Wang, S-K ; Nakatani, T. ; Wong, C-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6496.
48 Wang, H. ; Tor, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 109.
49 Wong, C-H ; Hendrix, M. ; Manning, D. D. ; Rosenbohm, C. ; Greenberg, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8319.
50 Barluenga, S. ; Simonsen, K. B. ; Littlefield, E. S. ; Ayida, B. K. ; Vourloumis, D. ; Winters, G. C. ; Takahashi, M. ; Shandrick, S. ; Zhao, Q. ; Han, Q. ; Hermann, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 713.
51 Wu, B. ; Yang, J. ; Robinson, D. ; Hofstadler, S. ; Griffey, R. ; Swayze, E. E. ; He, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3915.
52 Vourloumis, D. ; Winters, G. C. ; Takahashi, M. ; Simonsen, K. B. ; Ayida, B. K. ; Shandrick, S. ; Zhao, Q. ; Hermann, T. *Chembiochem* **2003**, 4, 879.
53 François, B. ; Szychowski, J. ; Adhikari, S. S. ; Pachamuthu, K. ; Swayze, E.E. ; Griffey, R. H. ; Migawa, M. T. ; Westhof, E. ; Hanessian, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6735.
54 Hanessian, S. ; Tremblay, M. ; Kornienko, A. ; Moitessier, N. *Tetrahedron* **2001**, 57, 3255.
55 Ding, Y. ; Hofstadler, S. A. ; Swayze, E. E. ; Griffey, R. H. *Org. Lett.* **2001**, 3, 1621.
56 Tok, J. B-H ; Wong, W. ; Baboolal, N. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 365.
57 Griffey, R. H. ; Sannes-Lowery, K. A. ; Drader, J. J. ; Mohan, V. ; Swayze, E.E. ; Hofstadler, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9933.

La conception de petites molécules peut alors se faire, mais là encore, il n'existe pas de règles générales. Des auteurs ont tout de même remarqué certaines tendances lors de l'étude d'aminoglycosides modifiés ciblant l'ARN [8] [48] [58] [59] :

- les groupements aminés sont essentiels pour la fixation des aminoglycosides, mais ils peuvent être substitués par d'autres groupements basiques tels que la guanidine.
- La charge positive totale influe beaucoup sur l'affinité de la molécule pour l'ARN.
- La contribution énergétique des hydroxyles est encore débattue : il semblerait que leur retrait conduise à une augmentation de la basicité des amines, provoquant une augmentation de la charge totale, mais ils contribuent également à stabiliser des complexes par des liaisons hydrogène avec l'ARN.
- Des fonctionnalités trop flexibles et trop lipophiles sont néfastes pour la spécificité.
- Des hétérocycles aromatiques polycycliques peuvent augmenter l'affinité, mais diminuent la spécificité.
- Il est nécessaire d'ajuster la longueur du bras dans le cas de dimères.

Malgré les difficultés encore rencontrées, il semblerait que le fait de cibler l'ARN soit encore plus avantageux que le traditionnel ciblage des protéines [60]. Il faut savoir que seulement 1,2 % du génome humain conduit à des protéines. Les ARN non codants représentent donc un champ d'action beaucoup plus vaste. D'autre part, une protéine possède peu de sites actifs, contrairement à l'ARN qui possède de très nombreux sites potentiels d'interactions. De plus, il est souvent difficile de construire, pour une protéine, des ligands plus spécifiques que le substrat naturel. En ciblant l'ARN qui code pour une protéine ou un ARN qui régule la synthèse de cette protéine, il est possible d'agir directement sur la synthèse de cette protéine !

8 Demeunynck, M. ; Bailly, C. ; Wilson, W.D. *DNA and RNA binders* Ed. Wiley-vch **2003** ; 1 ; 18. ISBN : 3-527-30244-1

48 Wang, H. ; Tor, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 109.

58 Sears, P. ; Wong, C-H *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2300.

59 Hermann, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1890.

60 Ecker, D. J. ; Griffey, R. H. *Drug Discovery Today* **1999**, 4, 420.

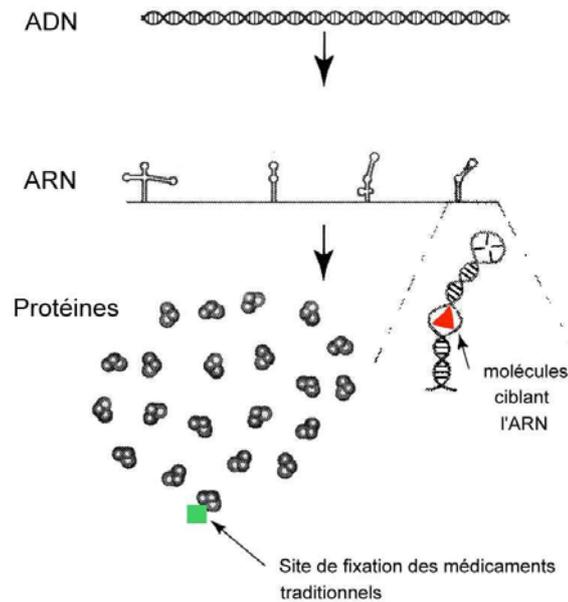


Figure 13 : Parallèle entre l'action de petites molécules sur les protéines et l'ARN [60].

Ainsi, le ciblage de l'ARN, dont les rôles sont multiples et complexes, permet d'envisager de nouvelles thérapies et d'étendre amplement le champ d'action de la médecine.

III UNE NOUVELLE APPROCHE CONTRE LE VIH-1

III.1 Complexe boucle-boucle

La découverte du site d'initiation à la dimérisation de l'ARN du VIH-1 par l'équipe des Pr. B. et C. Ehresmann a permis d'envisager une nouvelle approche thérapeutique contre le VIH-1. Il s'agit de cibler l'étape de dimérisation de l'ARN.

Comme tous les rétrovirus, le génome du VIH-1 se compose de deux brins d'ARN homologues, associés étroitement par de nombreuses interactions. Une interaction majeure a été identifiée dans une région non traduite de l'ARN près de l'extrémité 5'. Elle s'est avérée

nécessaire à la dimérisation des brins d'ARN du VIH-1. De ce fait, ce site a été nommé « site d'initiation à la dimérisation » ou DIS pour Dimerisation Initiation Site [61].

Le DIS est un élément structural en forme de tige-boucle, la boucle comportant 9 nucléotides dont 6 sont auto-complémentaires. L'auto compléментарité des six nucléotides de la boucle permet d'apparier deux brins d'ARN identiques par des liaisons de type Watson Crick entre deux boucles. Il y a formation d'un complexe boucle-boucle ou DIS-DIS, qui rapproche les deux brins d'ARN et initie ainsi la dimérisation (Cf. Fig. 14 et 15). Cette interaction boucle-boucle sert de point de jonction aux homodimères d'ARN [62] [63] [64].

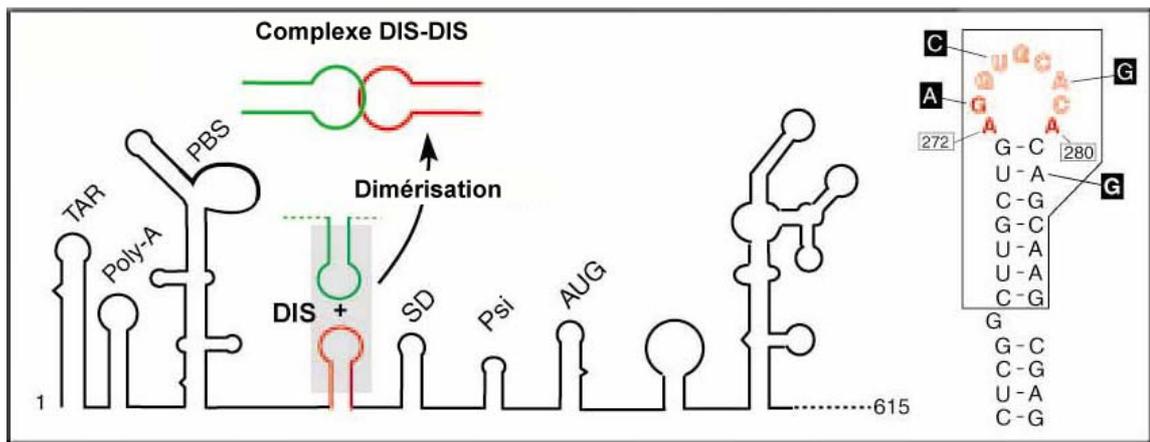


Figure 14 : Structure secondaire du fragment d'ARN 1-615 et localisation du site d'initiation à la dimérisation.

Il a également été démontré par des expériences de substitution et de suppression de cette boucle qu'elle est nécessaire à l'encapsidation de l'ARN, mais également à la synthèse de l'ADN proviral [65]. Il est important de noter que cette structure en tige-boucle permettant l'interaction boucle-boucle est conservée pour les différents sous-types du VIH-1 et qu'il existe une structure similaire pour le VIH-2 et le VIS.

61 Skripkin, E. ; Paillart, J-C ; Marquet, R. ; Ehresmann, B. ; Ehresmann C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 4945.

62 Paillart, J-C ; Marquet, R.; Skripkin, E. ; Ehresmann B. ; Ehresmann, C. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 27486.

63 Paillart, J-C ; Skripkin, E. ; Ehresmann B. ; Ehresmann, C. ; Marquet, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 5572.

64 Paillart, J-C ; Westhof, E. ; Ehresmann C. ; Ehresmann, B. ; Marquet, R. *J. Mol. Biol.* **1997**, 270, 36.

65 Paillart, J-C ; Berthoux, L. ; Ottmann, M. ; Darlix, J-L ; Marquet, R. ; Ehresmann, B. ; Ehresmann C. *J. Virol.* **1996**, 12, 8348.

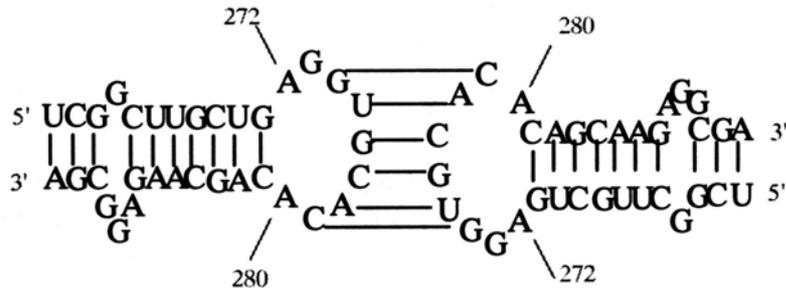


Figure 15 : Interaction boucle-boucle aussi nommée interaction DIS-DIS.

L'étude de la structure du DIS des différents sous-types a montré que les sous-types A et F sont les sous-types les plus proches : ils ne diffèrent dans leur structure primaire qu'au niveau de la base 273 (Cf. Fig. 16) [66]. Les sous-types A et B, quant à eux, ne diffèrent que par trois bases: A282 (sous-type A) remplacée par G282 (sous-type B), A278 remplacée par G278, U275* [67] remplacée par C275* (Cf. Fig. 16).

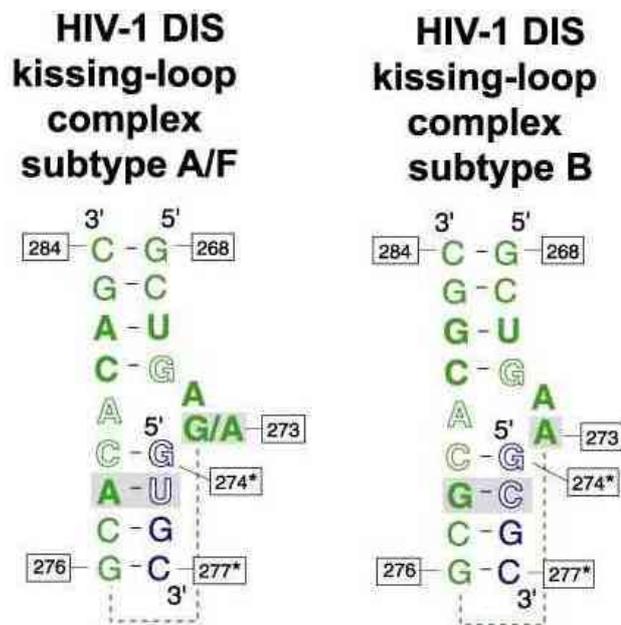


Figure 16 : Structure secondaire des sous-types A/F et B.

Les deux sous-types A et B présentent la même structure secondaire [68] (mêmes appariements formant le complexe boucle-boucle) et la même structure tertiaire [69]. En effet, les structures cristallines des complexes boucle-boucle des sous-types A et B du VIH-1 ont

66 La structure primaire correspond à l'enchaînement des nucléotides.

67 l'astérisque permet de distinguer le second brin d'ARN par rapport au premier.

68 La structure secondaire prend en compte les interactions entre les bases : interactions canoniques (interactions dites de Watson Crick) et interactions non canoniques.

69 La structure tertiaire est la structure tridimensionnelle.

été résolues par cristallographie aux rayons X à une résolution de 1,9 Å [70] [71] [72]. Les deux séquences ont des conformations identiques et un alignement coaxial parfait. Toutes deux présentent deux purines expulsées (A 272 et R 273).

III.2 Similitude entre le complexe boucle-boucle et le site A

La comparaison des structures cristallines des complexes boucle-boucle des sous-types A et B du VIH-1 a également permis de remarquer une ressemblance étonnante et certainement fortuite entre ces complexes boucle-boucle et le site de reconnaissance aminoacyl-ARNt dans la partie 16 S des ribosomes des bactéries eucaryotes appelé couramment site A.

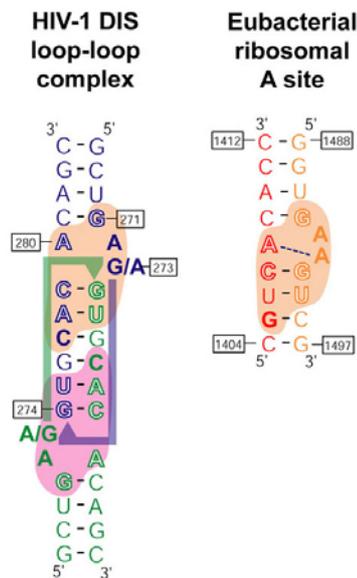


Figure 17 : Comparaison des structures secondaires du complexe boucle-boucle (sous-types F et A) et du site A.

Les seules différences entre les structures secondaires (Cf. Fig. 17) sont le remplacement de l'adénine A278 du complexe boucle-boucle par un uracile (U1406) sur le site A et deux inversions dans l'enchaînement des appariements de Watson Crick (C-G remplacé par G-C).

70 Ennifar, E. ; Yusupov, M. ; Walter, P. ; Marquet, R. ; Ehresmann, B. ; Ehresmann C. ; Dumas, P. *Structure* **2000**, 7, 439.

71 Ennifar, E. ; Walter, P. ; Ehresmann, B. ; Ehresmann C. ; Dumas, P. *Nature Struct. Biol.* **2001**, 8, 1064.

72 Ennifar, E. ; Dumas, P. *J. Mol. Biol.* **2006**, 356, 771.

Comme la structure à haute résolution de la portion du site A était déjà connue [73] [74], il a été possible de la comparer aux structures tertiaires du complexe boucle-boucle des sous-types A et B. De façon étonnante, ces structures sont superposables. Elles présentent une cavité au même endroit due à l'expulsion des purines A1492 et A1493 pour le site A et l'expulsion des purines A272 et A273 (ou G273 selon le sous-type du VIH-1). Cette grande similitude a pu être exploitée afin de monter un projet de « drug design ».

III.3 Le projet

Le site A est bien connu pour ses interactions avec différents antibiotiques aminoglycosidiques qui rendent la traduction imprécise [75] [76] [77] [78]. L'idée découlant de cette information et du parallèle établi entre sa structure et celle du complexe DIS-DIS a été d'utiliser des aminoglycosides et leurs dérivés pour interagir avec le complexe DIS-DIS. De telles interactions interfèreraient alors avec le processus de réplication du virus et pourraient bloquer son développement. Nous aurions ainsi un nouveau moyen d'action contre le VIH. Dans un premier temps, il a été important de tester la fixation d'antibiotiques aminoglycosidiques sur le complexe boucle-boucle d'ARN synthétiques correspondants aux différents sous-types.

III.3.1 Action des antibiotiques sur le complexe boucle-boucle

III.3.1.1 Tests préliminaires afin de sélectionner les antibiotiques spécifiques

Au vu de la forte ressemblance entre le site A et le complexe boucle-boucle, une série d'antibiotiques connus pour se fixer sur le site A a été testée sur le complexe boucle-boucle issus d'ARN synthétiques correspondants aux sous-types A, B et F [79] afin de déterminer ceux qui se fixent sur le complexe boucle-boucle.

73 Carter, A. P. ; Clemons, W. ; Brodersen, D. E. ; Morgan-Warren, R. ; Wimberly, B. T. ; Ramakrishnan, V. *Nature* **2000**, 407, 340.

74 Vincens, Q. ; Westhof, E. *Structure Fold Des.* **2001**, 9, 647.

75 Vincens, Q. ; Westhof, E. *Chem. & Biol.* **2002**, 9, 747.

76 Ma, C. ; Baker, N. A. ; Simpson, J. ; McCammon, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1438.

77 Wong, C.-H. ; Hendrix, M. ; Priestley, E. S. ; Greenberg, W. A. *Chem. & Biol.* **1998**, 5, 397.

78 Moazed, D. ; Noller, H. F. *Nature* **1987**, 327, 389.

79 Ennifar, E. ; Paillart, J.-C. ; Marquet, R. ; Ehresmann, B. ; Ehresmann C. ; Dumas, P. ; Walter, P. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 2723.

Test	Sous-type d'ARN	Aminoglycosides									
		Am	KA	KB	Gm	Ge	Ne	Rb	Pm	Sp	To
migration sur gel	A (DIS-23)	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	B (DIS-23)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F (DIS-23)						+		+	-	-
modification au DMS	A (DIS-615)			-		-	+		+		-
	B (DIS-615)			-		-	-		-		-
	F (DIS-615)						+		+		-
coupure au plomb	A (DIS-23)	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	A (DIS-615)						+		+		-

Figure 18 : Tableau récapitulatif des effets des différents aminoglycosides testés [79] (Am = amikacine, KA, KB = kanamycine A et B, Gm = gentamicine, Ge = généticine, Ne = néomycine, Rb = ribostamycine, Pm = paromomycine, Sp = spectinomycine, To = tobramycine). La notation « ARN-615 » indique que le test a été effectué sur l'ARN 1-615 correspondant aux 615 premiers nucléotides de l'ARN génomique du VIH-1 et la notation « ARN-23 » correspond à la séquence des 23 nucléotides formant le DIS. L'absence d'effet par addition d'aminoglycoside est notée (-) et les effets sont notés (+).

Des expériences de retard sur gel non dénaturant de mélanges d'ARN et d'antibiotique, des expériences de protection contre la modification de l'ARN par le sulfate de diméthyle (DMS) [80] et de protection contre une coupure spécifique par le plomb^{II} (Pb(OAc)₂) [80] ont montré que la néomycine et la paromomycine se fixent de façon spécifique aux sous-types A et F, mais pas B (Cf. Fig. 18).

Des expériences plus précises, ont ensuite été menées afin de déterminer quelles sont les positions protégées par les aminoglycosides et les concentrations minimales en aminoglycoside nécessaires pour avoir une bonne fixation.

III.3.1.2 Test de protection contre la coupure au plomb^{II} par la néomycine et la paromomycine

Ce test a été effectué pour le sous-type A sur une séquence de 615 nucléotides qui contient entre autres, la tige-boucle formant le DIS.

Le principe du test de coupure au plomb^{II} est le suivant. En présence de diacétate de plomb, l'ARN est coupé spécifiquement au niveau de certains nucléotides. Par contre, si l'ARN est lié à un aminoglycoside, il est protégé par ce dernier et n'est alors pas coupé par le plomb^{II}. Les différents brins d'ARN obtenus sont ensuite distingués par migration sur un gel d'acrylamide.

⁷⁹ Ennifar, E. ; Paillart, J.-C. ; Marquet, R. ; Ehresmann, B. ; Ehresmann C. ; Dumas, P. ; Walter, P. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 2723.

⁸⁰ Ce test est présenté rapidement dans le paragraphe suivant, et de façon plus complète dans le chapitre IV.

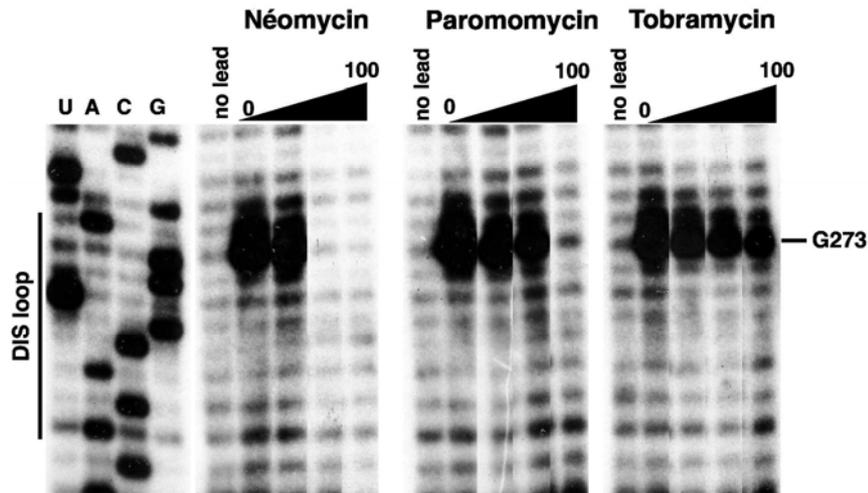


Figure 19 : Test de protection contre une coupure au plomb^{II} sur l'ARN 1-615 du sous-type A [79].

Les gels du test de coupure au plomb^{II} montrent qu'une coupure majeure a lieu entre A272 et G273 (Cf. Fig. 19). La tache correspondant à l'ARN coupé disparaît lorsque la concentration en néomycine et paromomycine augmente, ce qui signifie que la néomycine et la paromomycine sont fixées sur l'ARN. De plus, il faut noter que la néomycine interagit plus fortement que la paromomycine sur le DIS car elle inhibe la coupure au plomb^{II} à une concentration plus faible que la paromomycine.

III.3.1.3 Test de protection contre une modification au DMS par la néomycine et la paromomycine

Le DMS est un agent méthylant réagissant avec les amines de certaines bases : N1-A, N3-C et N7-G. Certaines positions de l'ARN sont méthylées en absence d'aminoglycoside, par contre si un aminoglycoside est fixé sur les bases correspondantes, il les protège contre la méthylation. Après traitement au DMS, l'ARN est lavé (les aminoglycosides sont retirés) puis rétro transcrit en ADN par la transcriptase inverse. Si aucune position n'est méthylée, l'ARN est entièrement rétro transcrit en ADN. Par contre, dans le cas des ARN méthylés, la transcriptase inverse s'arrête au niveau de la base méthylée, et l'ADN formé est plus court et migre donc différemment sur le gel dénaturant. La comparaison des petits fragments d'ARN obtenus au séquençage de référence (U A C G) permet de connaître la position des nucléotides méthylés, ce qui revient à connaître les positions protégées par l'aminoglycoside.

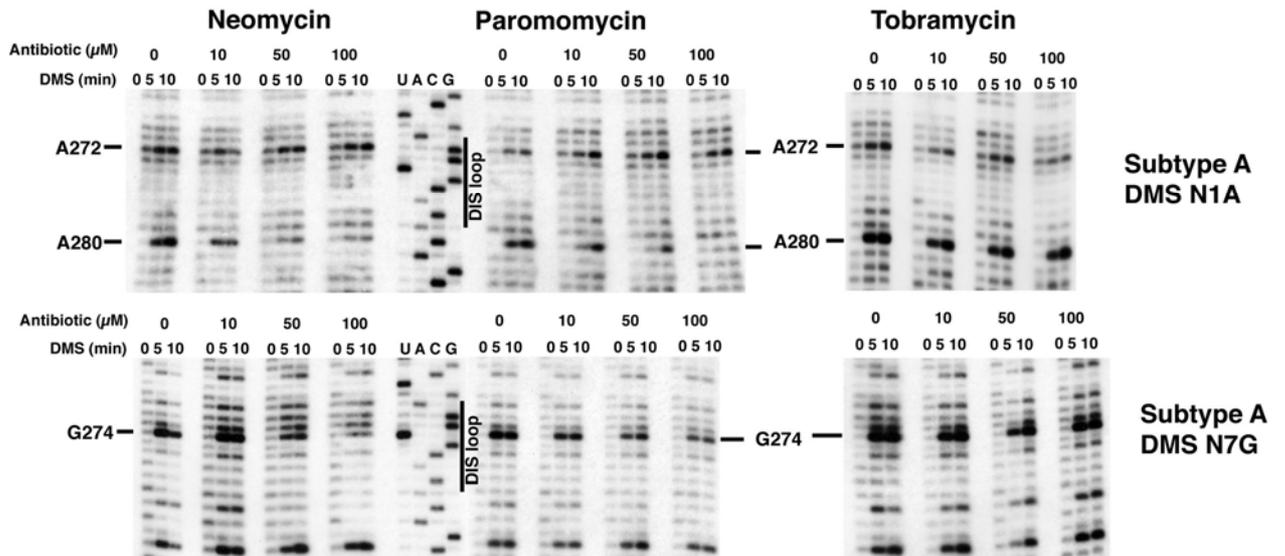


Figure 20 : Test de protection contre une modification au DMS sur l'ARN 1-615 du sous-type A [79].

L'observation des gels permet de remarquer que les taches correspondant à une méthylation de A280 et G274 disparaissent lorsque la concentration en néomycine ou paromomycine augmente (passage d'une colonne à l'autre) (Cf. Fig. 20). Cela signifie que la méthylation de A280 et G274 est inhibée lorsque la concentration en néomycine ou paromomycine augmente. Par conséquent, ces deux antibiotiques se fixent sur l'ARN au niveau de ces deux purines.

III.3.1.4 Bilan

Ces deux tests effectués sur l'ARN 1-615 montrent que la fixation de la néomycine ou paromomycine protège la guanine G273 contre une coupure spécifique par le diacétate de plomb, et protège également l'adénine A280 ainsi que la guanine G274 contre une modification au DMS. D'autres antibiotiques comme la kanamycine B, la généticine et la tobramycine ne se fixent pas et ne protègent pas le complexe boucle-boucle. Ces tests confirment la fixation de la néomycine et la paromomycine au sein des deux cavités du complexe DIS-DIS et donnent une idée de la localisation des interactions (Cf. Fig. 21). Les résultats sur l'ARN 1-615 sont d'autant plus intéressants qu'ils montrent que ces aminoglycosides se fixent de façon spécifique au sein du complexe DIS-DIS.

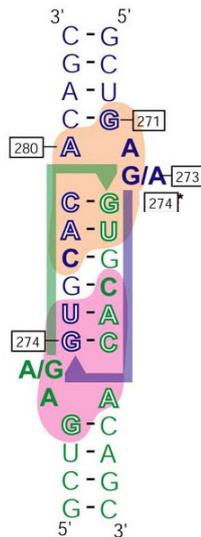


Figure 21 : Bilan des interactions fortes : elles sont situées dans la cavité de la boucle.

Des résultats similaires ont été obtenus avec l'ARN du sous-type F. Par contre le complexe boucle-boucle du sous-type B, qui ne contient pas l'uridine U275 mais C275, ne fixe pas la paromomycine et la néomycine. Ce résultat montre que l'uridine U275 joue également un rôle clef dans la fixation des aminoglycosides. Il sera donc nécessaire de modifier ces aminoglycosides afin de cibler le sous-type B.

Ces premiers tests montrent que le complexe boucle-boucle est bien une nouvelle cible thérapeutique à part entière pouvant être affectée par des dérivés aminoglycosidiques.

III.3.2 Construction d'un modèle d'étude de l'interaction complexe boucle-boucle / antibiotique

Comme l'équipe d'E. Westhof avait résolu la structure à haute résolution de la portion du site A en interaction avec la paromomycine [81] [74] et que l'équipe de P. Dumas avait résolu la structure cristallographique du complexe boucle-boucle [71], il a été possible de créer un modèle de l'interaction de la paromomycine avec le complexe boucle-boucle. Les deux structures ont été superposées virtuellement, puis la structure du site A a été supprimée afin de créer un modèle de l'interaction entre le complexe boucle-boucle et la paromomycine [79] (Cf. Fig. 2 3). Ceci a été possible car les deux structures sont parfaitement superposables. La seule modification nécessaire a été le changement de conformation du ribose 271 (passage

81 Carter, A. P. ; Clemons, W. M. ; Brodersen, D. E.. Morgan-Warren, R. J.Wimberly, B. T. ; Ramakrishnan, V. *Nature* **2000**, 407, 340.

74 Vincens, Q. ; Westhof, E. *Structure Fold Des.* **2001**, 9, 647.

71 Ennifar, E. ; Walter, P. ; Ehresmann, B. ; Ehresmann C. ; Dumas, P. *Nature Struct. Biol.* **2001**, 8, 1064.

de C2'-endo en C3'-endo qui est la conformation dans le site A) afin d'éviter une gêne stérique entre le cycle I de la paromomycine et ce ribose (Cf. Fig. 22). Ce changement de conformation a une faible barrière énergétique et semble donc acceptable [82].

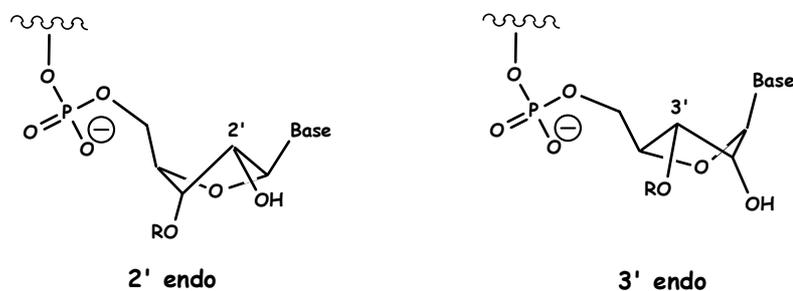


Figure 22 : Changement de conformation du ribose

Ce modèle a été étendu à la néomycine, autre antibiotique se fixant sur le complexe boucle-boucle d'après les tests de protection, et qui ne diffère de la paromomycine que par la fonctionnalité en position 6' (OH ou NH₂) (Cf. Fig. 9, § II.2.4.1).

82 Levitt, M. ; Warshel, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 2607.

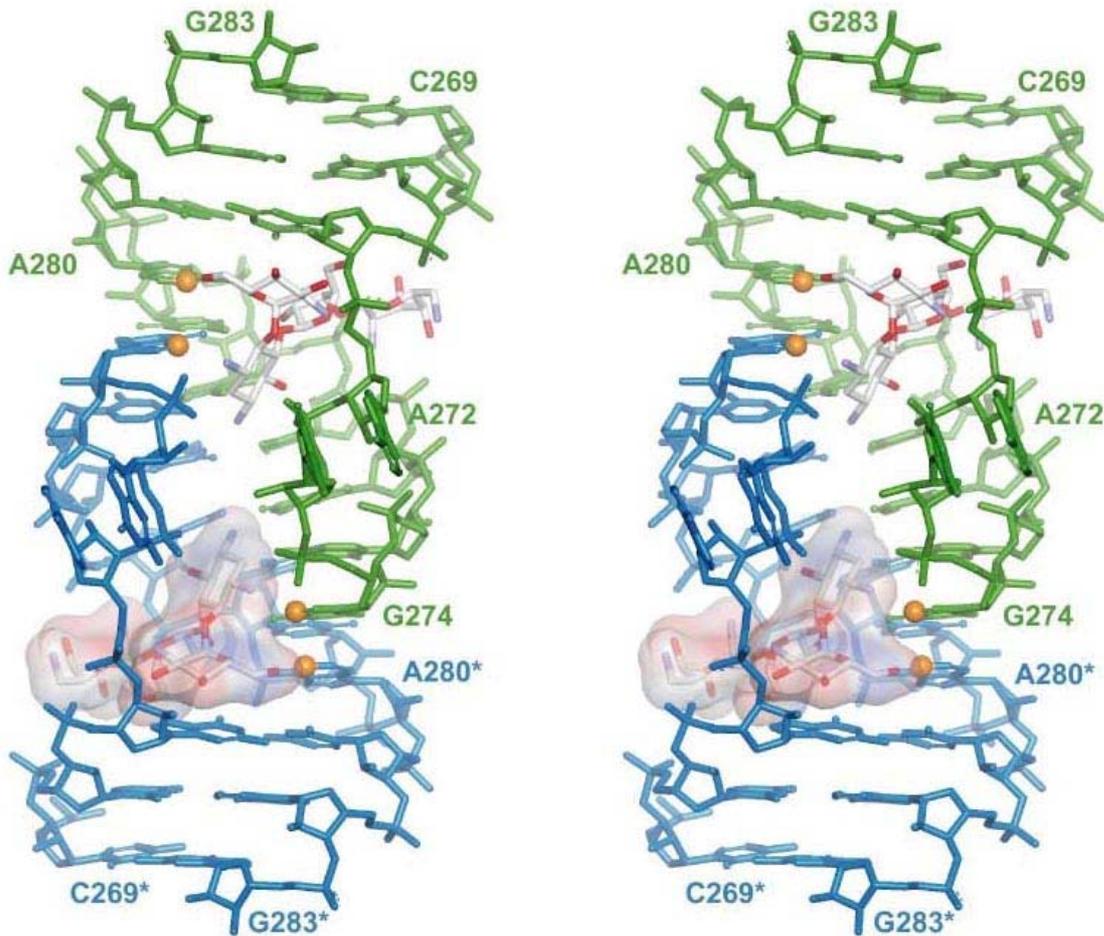


Figure 23 : Modèle moléculaire de l'interaction entre le complexe boucle-boucle de l'ARN du sous-type A et deux antibiotiques (néomycine ou paromomycine).

La mesure des distances entre les fonctionnalités de la néomycine et celles de l'ARN permet d'apprécier les interactions entre cet aminoglycoside et le DIS (Cf. Fig. 23). La présence d'une liaison hydrogène peut être mise en évidence si la distance entre un donneur et un accepteur est de l'ordre de 3 Å. Les interactions entre la néomycine et des phosphates ou sucres contribuent à l'affinité de cet aminoglycoside pour le site DIS, alors que les interactions avec des bases de l'ARN sont responsables à la fois d'une partie de l'affinité mais aussi de la spécificité.

Le modèle montre que le cycle I possède 7 interactions non spécifiques et 2 interactions spécifiques avec A280. Le cycle II possède une interaction non spécifique et 4 interactions spécifiques avec les bases suivantes : G274, U275, G276, A278. Le cycle III possède 3 interactions spécifiques avec les bases G271, C279 et A278. Finalement, le cycle IV ne possède que 2 interactions non spécifiques. Ces observations montrent que les deux cycles les plus importants sont les cycles I et II, qui sont les deux cycles de la néomycine.

Le complexe boucle-boucle est symétrique, il possède donc deux cavités identiques en interaction avec deux molécules de néomycine. La symétrie de l'ensemble fait que ces deux molécules se font face. Chaque molécule pointe vers l'autre son amine en position 1. Le modèle montre que la distance entre ces deux amines est de l'ordre de 5,6 Å. La présence de ces deux molécules n'induit pas de conflit stérique et une cavité étroite reste libre entre les deux molécules.

En l'absence d'aminoglycoside, les sous-types A et F nécessitent un ion magnésium pour dimériser. On remarque que les aminoglycosides jouent le même rôle que cet ion : ils sont chargés positivement et favorisent la dimérisation en interagissant avec les phosphates du DIS pour empêcher leur répulsion. Ainsi, les aminoglycosides n'empêchent pas la dimérisation, mais qu'au contraire, ils stabilisent l'homodimère d'ARN. Ces molécules peuvent donc être vues comme des molécules modèles pour cibler le complexe boucle-boucle. L'idée serait alors d'hyperstabiliser le complexe boucle-boucle par une interaction avec un dérivé aminoglycosidique bien choisi. Le complexe boucle-boucle ne pourrait alors plus libérer d'ARN simple brin, nécessaire à la transcription inverse. Le cycle répliatif du virus serait alors bloqué d'une façon tout à fait nouvelle.

III.3.3 Choix et construction des aminoglycosides ciblant le complexe DIS-DIS

La symétrie du complexe boucle-boucle et la capacité de chaque boucle à fixer un aminoglycoside suggèrent la synthèse de molécules dimériques dérivées de deux aminoglycosides reliés par un bras espaceur. Comme les deux molécules de néomycine ou paromomycine dans le modèle se font face par leur amine en position 1 à une distance de l'ordre de 5 à 6 Å, l'idée est de relier deux aminoglycosides identiques par un bras espaceur d'une longueur avoisinant 5 à 6 Å fixé de part et d'autre sur l'amine en position 1 de l'aminoglycoside. Pour avoir une longueur appropriée, le bras devra donc être constitué d'une chaîne de 3 à 4 atomes, liés par des liaisons covalentes simples.

De plus, il est probable que ce type de dimère soit plus spécifique du site symétrique qu'est le complexe boucle-boucle que deux molécules isolées. En effet, l'approche consistant à synthétiser des dimères d'aminoglycosides s'est déjà montrée intéressante pour la fixation d'aminoglycosides avec différents ARN [83] [84] [85]. En général, la fixation est amplifiée

83 Tok, J. B-H ; Dunn, L. J. ; Des Jean, R. C. *Bioorg. Med. Chem.Lett.* **2001**, 11, 1127.

84 Tok, J. B-H ; Fenker, J. *Bioorg. Med. Chem.Lett.* **2001**, 11, 2987.

85 Wang, H. ; Tor, Y. *Bioorg. Med. Chem.Lett.* **1997**, 7, 1951.

[86] [87]. Si cet effet est observé, la stabilisation du complexe boucle-boucle par un dimère aminoglycosidique devrait permettre de stopper le cycle répliatif du VIH par inhibition de la transcription inverse.

III.3.4 Schéma rétrosynthétique

Les deux aminoglycosides qui se fixent sur le complexe boucle-boucle sont la paromomycine et la néomycine. Ils ne diffèrent que par la fonctionnalité portée par le carbone 6'. Etant donné que la paromomycine est 10 fois plus onéreuse que la néomycine [88], le choix de l'aminoglycoside s'est porté sur la néomycine.

Des dimères de la néomycine auraient pu être envisagés. Cependant, le modèle montre que la partie importante de la néomycine pour la reconnaissance du site est la néamine, la sous unité de la néomycine comportant les cycles I et II. La néamine est responsable d'une grande partie de l'affinité (8 interactions non spécifiques), mais surtout de la spécificité (6 interactions spécifiques), la partie néobiosamine intervenant dans des proportions moindres (3 interactions spécifiques pour le cycle III et 2 interactions non spécifiques pour le cycle IV). Par ailleurs, la néamine semble souvent être la partie essentielle dans les interactions antibiotique-ARN [89] [90] [91] [92]. De plus, l'utilisation de la néamine plutôt que la néomycine comme aminoglycoside de base pour les dimères simplifie nettement les structures, ce qui n'est pas négligeable. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à des dimères de la néamine (Cf. Fig. 24).

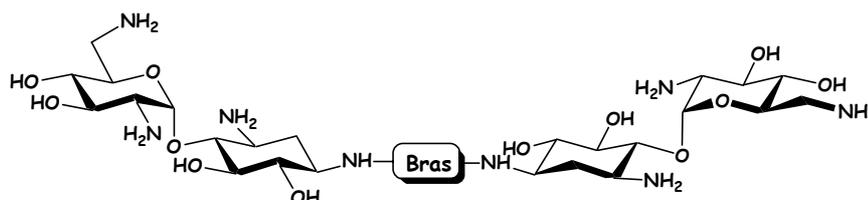


Figure 24 : Dimère de la néamine

86 Katja, M. ; Wang, H. ; Tor, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 1361.

87 Tok, J. B-H ; Huffman, G. R. *Bioorg. Med. Chem.Lett.* **2000**, 10, 1593.

88 Prix des antibiotiques : paromomycine 266 € les 25g / néomycine 104 € les 100g

89 Sucheck, S. J. ; Wong, A. L. ; Koeller, K. M. ; Boehr, D. D. ; Draker, K. ; Sears, P. ; Wright, G. D. ; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5230.

90 Agnelli, F. ; Sucheck, S. B-H ; Marby, K. A. ; Rabuka, D. ; Yao, S-L ; Sears, P. S. ; Liang, F. S. ; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1562.

91 Riguet, E. ; Désiré, J. ; Bailly, C. ; Décout, J.-L. *Tetrahedron* **2004**, 60, 8053.

92 Liang, C.-H. ; Romero, A. ; Rabuka, D. ; Sgarbi, P. W. M. ; Marby, K. A. ; Duffield, J. ; Yao, S. ; Cheng, M. L. ; Ichikawa, Y. ; Sears, P. ; Hu, C. ; Hwang, S.-B. ; Shue, Y.-K. ; Sucheck, S. J. *Bioorg. Med. Chem.Lett.* **2005**, 15, 2123.

De même, dans un but de simplification des spectres RMN et au vu de la symétrie du site de l'ARN, nous avons opté pour des bras espaceurs symétriques (Cf. Fig. 25). Ils pourront être de type alkyle ou acyle, et selon leur nature ils devront pouvoir être introduits soit par amination réductrice soit par couplage peptidique. Ce type de dimères, avec des bras symétriques introduits sur des amines est tout à fait nouveau, bien que la chimie des antibiotiques de type aminoglycosidique se soit fortement développée ces cinq dernières années.

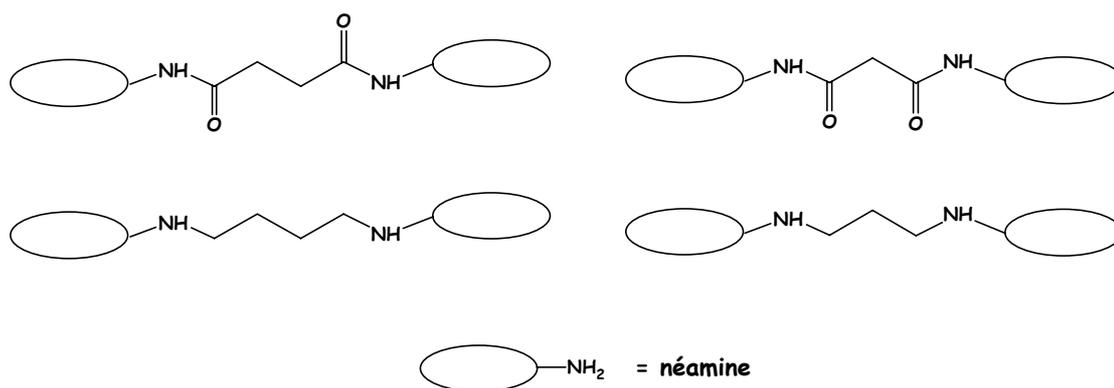


Figure 25 : Suggestions de bras pour les dimères.

Bien que plus simple que son précurseur néomycine, la néamine possède encore quatre fonctions amines et quatre fonctions hydroxyles réparties sur les deux cycles. Pour obtenir le dimère souhaité, il faut être capable de préparer une molécule dont la seule fonction libre serait l'amine en position 1. Elle pourrait alors réagir avec un bras espaceur. Il est donc nécessaire de pouvoir distinguer la fonction amine portée par le carbone 1 des trois autres et des fonctions alcool.

La sélectivité des fonctions amines vis-à-vis des fonctions hydroxyles pourrait reposer sur la plus forte nucléophilie des amines par rapport aux alcools. Par contre, il reste à distinguer l'amine en position 1, qui est une amine « secondaire », des trois autres amines (positions 3, 2' et 6'). Celles qui sont portées par les carbones 3 et 2' sont « secondaires ». Par contre, l'amine en position 6' est une amine « primaire », *a priori* plus réactive que les trois autres [93] [94] [95], car moins encombrée. De ce fait, il semble possible de protéger sélectivement l'amine en 6'. En revanche, la distinction de l'amine en position 1 par rapport aux amines en positions 2' et 3, nécessite un jeu de protections et déprotections moins

93 Grapsas, I. ; Cho, Y. I. ; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1918.

94 Roestamadji, J. ; Grapsas, I. ; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11060.

95 Nunns, C. L. ; Spence, L. A. ; Slater, M. J. ; Berrisford, D. J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 9341.

évident, puisqu'elles ont toutes des réactivités similaires (amines secondaires), même si leur encombrement les distingue *a priori* (l'amine en position 1 est peut-être plus réactive que les deux restantes car elle est plus dégagée).

Finalement, la néamine peut être obtenue à partir de la néomycine, antibiotique commercial, par une coupure de la liaison glycosidique entre les parties néamine et néobiosamine [93]. Sur ces bases, nous proposons de réaliser la synthèse d'une série de dimères dérivés de la néamine selon le schéma rétrosynthétique suivant (Cf. Fig. 26):

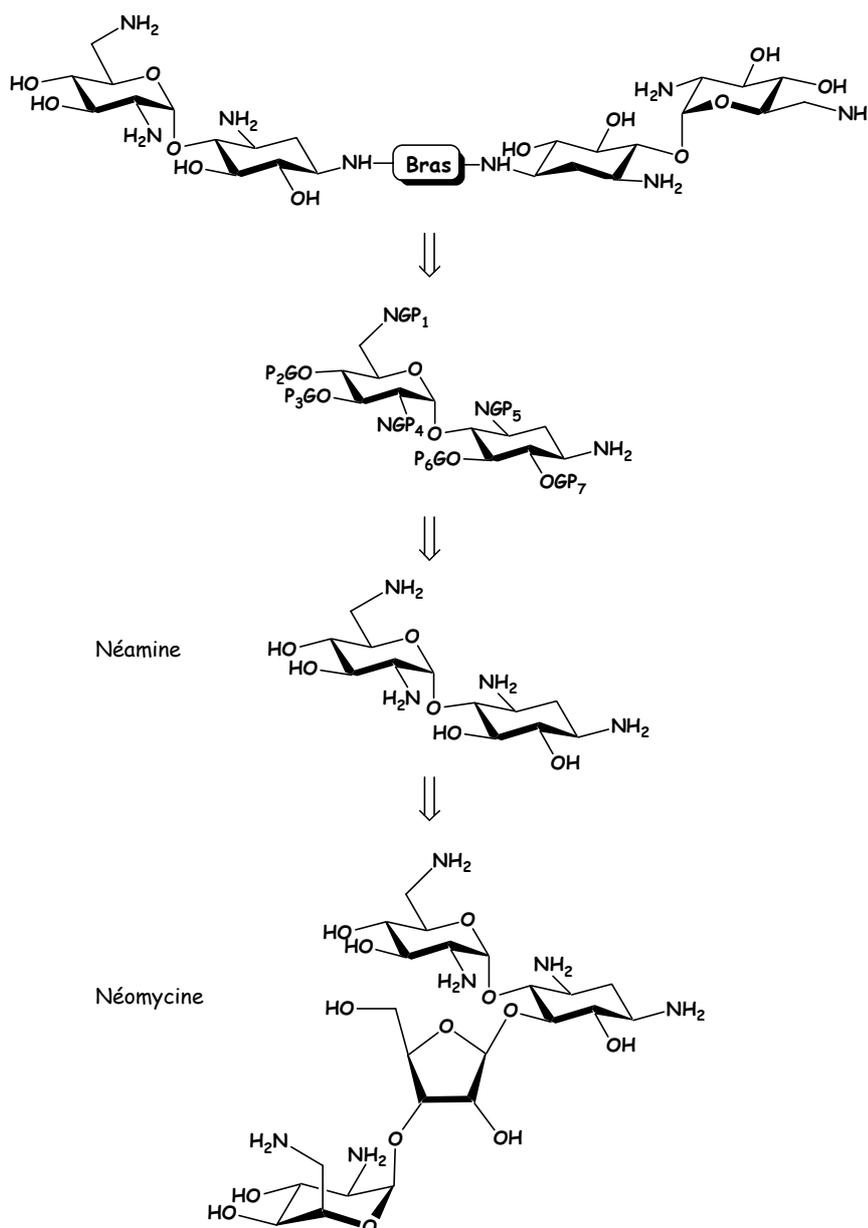


Figure 26 : Schéma rétrosynthétique.

La synthèse de ces composés dimériques est décrite dans les chapitres suivants.

Chapitre 2

Synthèse d'un dérivé de la néamine ayant
l'amine libre en position 1

I LA NEAMINE : UNE MOLECULE COMPLEXE

L'objectif de ce travail étant la synthèse de dimères composés de deux molécules de néamine reliées par un bras espaceur entre les deux fonctions amines en position 1, nous nous sommes intéressés à la réactivité de la néamine.

La plupart des travaux effectués sur la néamine concernent la fonctionnalisation des hydroxyles. En particulier, certains reposent sur la distinction de l'hydroxyle en position 5, puisque c'est la fonction la moins réactive de la molécule [1] [2] [3] [4] [5]. Il est supposé que la faible réactivité de l'alcool en position 5 soit due à son interaction par liaison hydrogène avec l'oxygène de la liaison glycosidique. Il est donc relativement aisé de protéger les autres fonctions en laissant celle-ci libre et de créer des bibliothèques de molécules par fonctionnalisation de cet hydroxyle [6] [7] [8]. D'autre part, c'est en cette position que le ribose de la néomycine est fixé. Il suffit alors de protéger toutes les fonctions de cet antibiotique, puis de couper la liaison glycosidique en O5 pour récupérer la fonction O5 libre [9].

D'autres travaux sont fondés sur la protection chimiosélective de diols. Ainsi, les hydroxyles en position 5 et 6 peuvent être protégés sous forme d'un acétal de la cyclohexanone [10] [11] [12] [13] ou de la propanone [14]. Le composé deux fois acétalisé

1 Alper, P. B. ; Hung, S. C. ; Wong, C-H *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6029.

2 Ding, Y. ; Swayze, E. E. ; Hofstadler, S. A. ; Griffey, R. H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 4049.

3 Agnelli, F. ; Sucheck, S. J. ; Marby, K. A. ; Rabuka, D. ; Yao, S. L. ; Sears, P. ; Liang, S. F. ; Wong, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1562.

4 Riguet, E. ; Désiré, J. ; Bailly, C. ; Décout, J. L. *Tetrahedron* **2004**, 60, 8053.

5 Liang, C. H. ; Romero, A. ; Rabuka, D. ; Sgarbi, P. W. M. ; Marby, K. A. ; Duffield, J. ; Yao, S. ; Cheng, M. L. ; Ichikawa, Y. ; Sears, P. ; Hu, C. ; Hwang, S.-B. ; Shue, Y.-K. ; Sucheck, S. J. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2123.

6 Park, W. K. C., Auer, M. ; Jaksche, H. ; Wong, Chi-Huey *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10150.

7 Wong, C-H ; Hendrix, M. ; Manning, D. D. ; Rosenbohm, C. ; Greenberg, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8319.

8 Alper, P. B. ; Hendrix, M. ; Sears, P. ; Wong, C-H *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1965.

9 Nyffeler, P. T. ; Liang, C. H. ; Koeller, K. M. ; Chi-Huey *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10773.

10 Liu, M. ; Haddad, J. ; Azucena, E. ; Kotra, L.P. ; Kirzhner, M. ; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7422

11 Haddad, J. ; Kotra, L. P. ; Liano-Sotelo, B. ; Kim, C. ; Azucena, E. F. ; Meizheng, J. L. ; Vakulenko, S. B. ; Chow, C. S. ; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3229.

12 Li J. ; Wang, J. ; Czyryca, P. G. ; Chang, H. ; Orsak, T. W. ; Evanson, R. ; Chang, C. W. T. *Org. Lett.* **2004**, 6, 1381.

13 Li, J. ; Chen, H. N. ; chong, H. ; Wang, J. ; Chang, C. W. T. *Org. Lett.* **2005**, 7, 3061.

(en position 5 et 6 et en position 3' et 4') est également obtenu, mais un traitement en milieu acide doux (acide *p*-toluènesulfonique) peut le convertir en composé monoacétalisé en 5 et 6. Une approche similaire est possible pour la protection du diol en 3' et 4' par le diacétal de Ley [15] [16]. Cette étape conduit également à la formation, en quantité moindre, du dérivé protégé en 5 et 6 ainsi que du dérivé ayant deux diacétals. Ces deux sous-produits peuvent être reconvertis en produit non protégé par un traitement à l'acide trifluoroacétique.

Des dimères de la néamine ou d'autres antibiotiques ont déjà été synthétisés, mais uniquement sur les alcools. Ils sont obtenus par des réactions de type Williamson au niveau des alcools [17] [3] [18] [5] (déprotonation de l'alcool par NaH puis réaction de type S_N2) ou alors par réaction de type S_N2 sur un alcool qui a été transformé en groupement partant [19] [20].

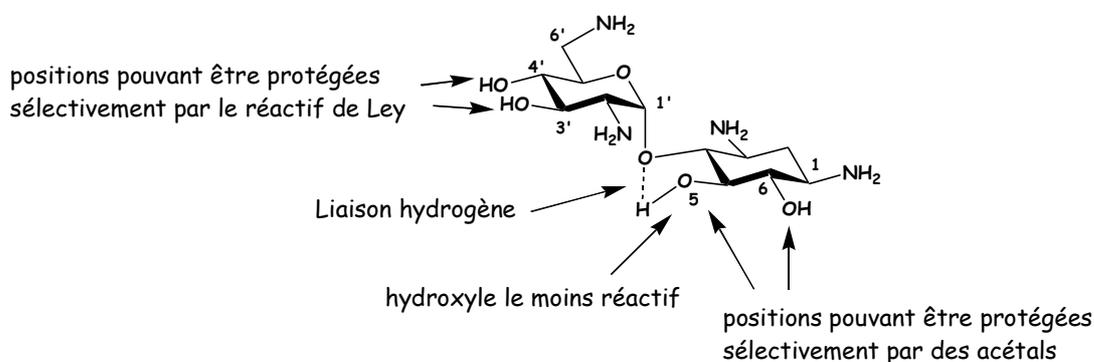


Figure 1 : Résumé de la réactivité des hydroxyles

Toutes ces réactions sélectives de certains alcools nécessitent la protection de toutes les fonctions amines. En revanche, la protection sélective des amines est moins étudiée. Une

14 Simonsen, K. B.; Ayda, B. K.; Vourloumis, D.; Takahashi, M.; Wintens, G. C.; Barluenga, S.; Qamar, S.; Shandrick, S.; Zhao, Q.; Hermann, T. *Chembiochem* **2002**, 3, 1223.

15 Chou, C-H; Wu, C-S; Chen, C-H; Lu, L-D; Kulkarni, S. S.; Wong, C-H; Hung, S-H *Org. Lett.* **2004**, 6, 585.

16 Hense, A.; Ley, S. V.; Osborn, H. M. I.; Owen, D. R.; Poisson, J.-F.; Warriner, S. L.; Wesson, K. E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 2023.

17 Sucheck, S. J.; Wong, A. L.; Koeller, K. M.; Boehr, D. D.; Draker, K.; Sears P.; Wright, G. D.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5230.

3 Agnelli, F.; Sucheck, S. J.; Marby, K. A.; Rabuka, D.; Yao, S. L.; Sears, P.; Liang, S. F.; Wong, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1562.

18 Riget, E.; Désiré, J.; Boden, O.; Ludwig, V.; Göbel, M.; Bailly, C.; Décout, J. L. *Bioorg. Chem. Lett.* **2005**, 15, 4651.

5 Liang, C. H.; Romero, A.; Rabuka, D.; Sgarbi, P. W. M.; Marby, K. A.; Duffield, J.; Yao, S.; Cheng, M. L.; Ichikawa, Y.; Sears, P.; Hu, C.; Hwang, S.-B.; Shue, Y.-K.; Sucheck, S. J. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2123.

19 Wang, H.; Tor, Y. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 1951.

20 Michael, K.; Wang, H.; Tor, Y. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **1999**, 7, 1361.

bonne sélectivité est possible avec l'amine en position 6' [21] [22] [23] [24] [25] qui est l'unique amine primaire de la néamine et qui est, par conséquent, l'amine la plus réactive de la molécule.

Finalement, peu de travaux concernent la fonction amine N1 qui nous intéresse. Ils peuvent être classés en trois catégories.

On peut distinguer d'une part les travaux qui s'appuient sur des différences d'encombrement, de basicité et de configuration spatiale des amines. Ils reposent sur des complexations régiosélectives par des métaux de transition (Cf. Fig. 2). Quelques travaux de complexation par des métaux de transition ont été effectués sur les différents antibiotiques aminoglycosidiques, dont certains concernent la position 1 de la néamine [26] [27].

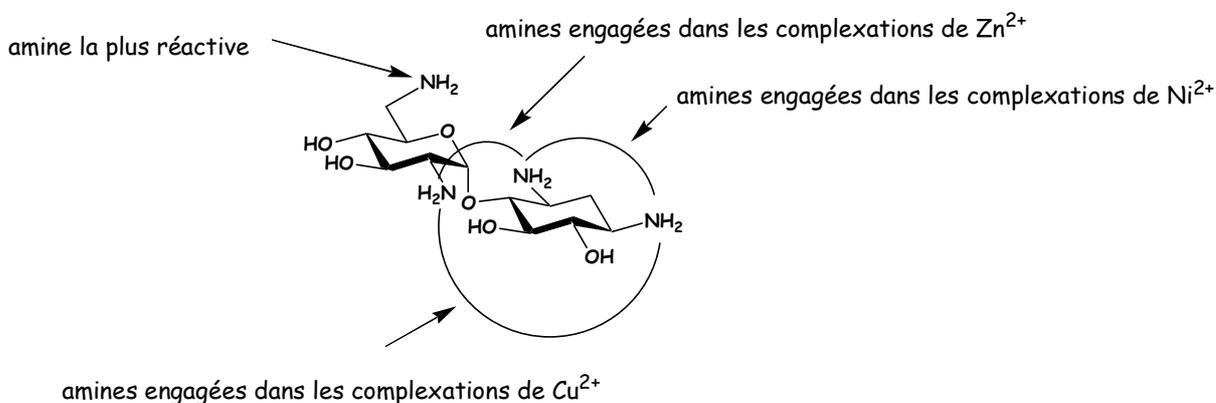


Figure 2 : Résumé de la réactivité des amines par rapport aux métaux de transition, et amine la plus réactive.

D'autres travaux distinguent les fonctions amines selon leur voisinage : il est possible de former des carbamates cycliques entre des aminoalcools vicinaux (Cf. Fig 3). Deux publications seulement concernent l'amine en position 1 [28] [11].

21 Grapsas, I. ; Cho, Y. I. ; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1918.

22 Roestamadji, J. ; Grapsas, I. ; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11060

23 Nunns, C. L. ; Spence, L. A. ; Slater, M. J. ; Berrisford, D. J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 9341.

24 Hamasaki, K. ; Uens, A. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 591.

25 Gao, F. ; Yan, X. ; Baettig, O. M. ; Berghuis, A. M. Auclair, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6859.

26 Kirst, H. A. ; Truedell, B. A. ; Toth, J. E. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 295.

27 Roestamadji, J. ; Grapsas, I. ; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11060.

28 Sharma, M. N. ; Kumar, V. ; Remers, W. A. *J. of Antibiotics* **1982**, 35, 905.

11 Haddad, J. ; Kotra, L. P. ; Liano-Sotelo, B. ; Kim, C. ; Azucena, E. F. ; Meizheng, J. L. ; Vakulenko, S. B. ; Chow, C. S. ; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3229.

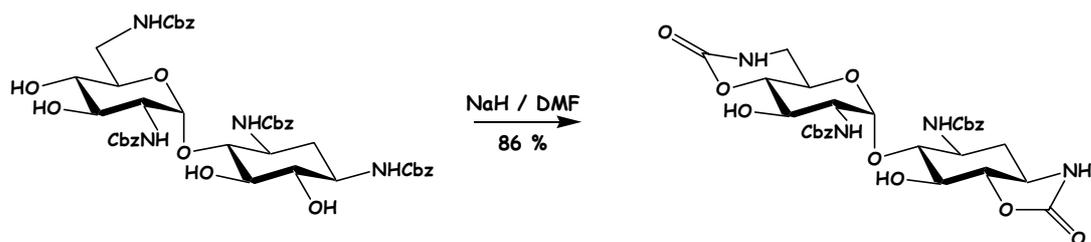


Figure 3 : Carbamates pouvant être obtenus [29].

Dernièrement, une nouvelle stratégie est apparue [30]. Elle est fondée sur la réduction régiosélective du groupement azido en position 1 grâce aux effets stéréoelectroniques des groupements protecteurs portés par les hydroxyles (Cf. Fig. 4).

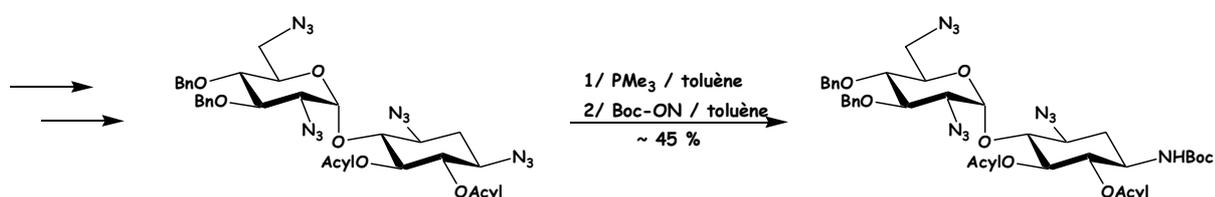


Figure 4 : réduction stéréosélective de l'amine en position 1 [30].

Finalement, en parallèle de ces hémisynthèses basées sur des modifications de la néamine, de plus en plus d'approches de synthèse totale d'aminoglycosides modifiés ont vu le jour [31] [32] [33] [34] [35] [36].

Compte tenu du fait que l'approche reposant sur des complexations sélectives par des métaux de transition semblait vraiment rapide, car elle ne nécessite pas de protection des alcools, et par conséquent, pas de déprotections après dimérisation, nous avons opté pour une approche hémisynthétique plutôt qu'une synthèse totale. Nous avons, dans un premier temps préparé la néamine, puis nous avons élaboré une stratégie s'inspirant des réactions connues mettant en jeu des complexations par des métaux de transition.

29 Kumar, V. ; Remers, W. A. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 3327.

30 Li J. ; Chen, H-N ; Chang, H. ; Wang, J. ; Chang, C-W T. *Org. Lett.* **2005**, 7, 3061.

31 Greenberg, W. A. ; Priestley, E. S. ; Sears, P. S. ; Alper, P. B. ; Rosenbohm, C. ; Hendrix, M., Hung, S-H ; Wong, C-H *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6527.

32 Ding, Y. ; Swayze, E. E. ; Hofstadler, S. A. ; Griffey, R. H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 4049.

33 Ryu, D. H. ; Tan, C-H ; Rando, R. R. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 901.

34 Seeberger, P. H. ; Baumann, M. ; Zhang, G. ; Kanemitsu, T. ; Swayze, E.E. ; Hofstadler, S. A. ; Griffey, R. H. *Synlett* **2003**, 9, 1323.

35 Verhelst, S. H. L. ; Magnée, L. ; Wennekes, T. ; Wiedenhof, W. ; van der Marel, G. A. ; Overkleeft, H. S. ; van Boeckel, C. A. A. ; van Boom, J. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2404.

36 Busscher, G. F. ; Rutjes, F. P. J. T. ; van Delft, F. L. ; *Chem. Rev.* **2005**, 105, 775.

II OBTENTION DE LA NEAMINE

II.1 La néamine *tétra*-chlorhydratée

La néamine peut être obtenue à partir de la néomycine, antibiotique commercial, par une coupure de la liaison glycosidique, séparant la néamine du ribose. Cette coupure peut s'effectuer par une méthanolyse en milieu acide [21] [37] [38]. C'est la méthode couramment utilisée. La néomycine est solubilisée dans le méthanol, puis de l'acide chlorhydrique méthanolique est ajouté et la solution est chauffée à reflux pendant 4 h.

Notre variante par rapport à la littérature consiste à préparer la solution d'acide chlorhydrique méthanolique par réaction à 0°C du chlorure d'acétyle avec le méthanol (Cf. Fig. 5). La méthanolyse de la néomycine s'est ensuite avérée assez simple, puisque la réaction est totale. La purification peut alors se faire par précipitation. En effet, il ne reste dans le milieu, que la néamine et la néobiosamine, qui ont des solubilités différentes dans le méthanol. Lorsque la solution est concentrée, seule la néamine précipite, la néobiosamine restant soluble dans le méthanol. La néamine pure a donc été obtenue par précipitations successives. Elle est ensuite rincée à l'éther diéthylique, ce qui permet de retirer le méthanol résiduel plus aisément.

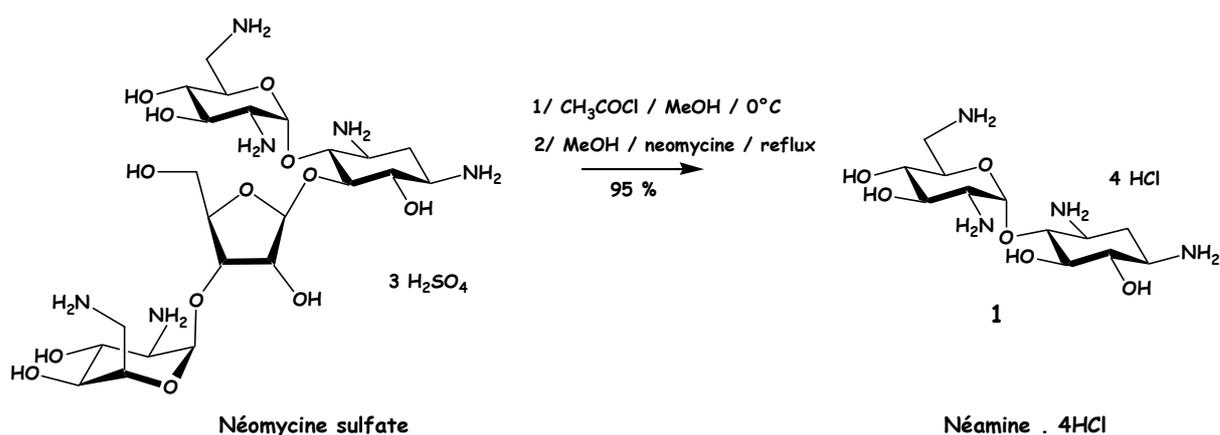


Figure 5 : Réaction de méthanolyse conduisant à la néamine *tétra*-chlorhydratée.

21 Grapsas, I. ; Cho, Y. I. ; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1918.

37 Dutcher, J. ; Donnin, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 3420.

38 Byron, E. ; Leach, E. ; Teeters, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 2794.

II.2 La néamine libre

La néamine libre a été obtenue par déprotonation de la néamine *tétra*-chlorhydratée par la résine A26(HO⁻) dans le méthanol de façon classique [21] (Cf. Fig. 6). La résine a ensuite été retirée par simple filtration, puis l'évaporation du solvant a conduit à la néamine libre. Cependant, les spectres RMN du produit « libre » étaient toujours sensiblement différents dans D₂O. Ceci peut s'expliquer de la façon suivante.

Comme la néamine est une polybase faible, sa dissolution dans l'eau ou D₂O s'accompagne d'une protonation partielle. Tous les états de protonation (néamine mono, di, tri et *tétra*-protonée) existent, mais les espèces prédominantes sont la néamine libre et la néamine *mono*-protonée. En négligeant ainsi les autres états de protonation, on se ramène, en première approximation, dans le cas de la dissolution d'une base faible dans l'eau. Or le pH d'une base faible dans l'eau dépend de sa concentration [39] : $\text{pH} = 7 + \text{pKa}/2 + 1/2\log C$. Le pH varie donc selon la concentration en néamine dissoute, et comme il influence les déplacements chimiques, les spectres sont différents à des concentrations différentes.

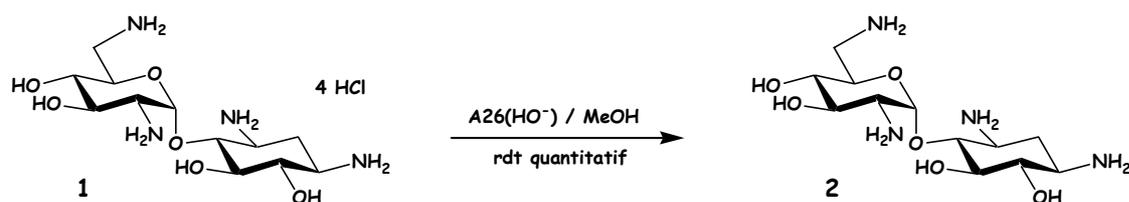


Figure 6 : Déprotonation de la néamine pour obtenir la néamine libre

Les pKa de la néamine sont décrits dans la littérature. Un titrage potentiométrique de la néamine tétrachlorhydratée par de la soude a conduit à trois valeurs de pKa [40] : $\text{pKa}_1 = 6,35 \pm 0,2$, $\text{pKa}_2 = 7,73 \pm 0,15$ et $\text{pKa}_3 = 8,62 \pm 0,08$. Les auteurs ne donnent pas de quatrième valeur de pKa, sans doute car cette dernière n'est pas estimable. Très souvent, lors du dosage de polybases, le dernier saut de pH n'est pas suffisamment marqué pour pouvoir donner des informations ou encore, il est possible que deux pKa proches soient assimilés à un pKa global.

21 Grapsas, I. ; Cho, Y. I. ; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1918.

39 Domaine de validité de cette expression : $K_a > 10^{-12}$ et $C > 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ce qui est le cas puisque $\text{pKa}_4 = 8,6$ (Cf Fig. 7) et la concentration moyenne en néamine dissoute dans un tube RMN était de l'ordre de $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (environ 5 mg dans 0,5 mL avec $M = 322,2 \text{ g.mol}^{-1}$).

40 Sutrisno ; Baran, Y. ; Lawrance, G. A. ; von Nagy-Felsobuki, E. I. *Structural Chem.* **2001**, 12, 189.

La connaissance de ces trois valeurs de pKa est intéressante, mais cette étude ne permet pas l'attribution des pKa aux différentes amines.

Néanmoins, les pKa des amines de la néomycine ont été attribués par des études en RMN de ^{15}N [41]. Ils sont respectivement : pKa (N1) = $8,04 \pm 0,03$; pKa (N3) = $5,74 \pm 0,04$; pKa (N2') = $7,55 \pm 0,04$; pKa (N6') = $8,60 \pm 0,02$; pKa (N2'') = $7,60 \pm 0,02$; pKa (N6'') = $8,80 \pm 0,01$ (Cf. Fig. 7).

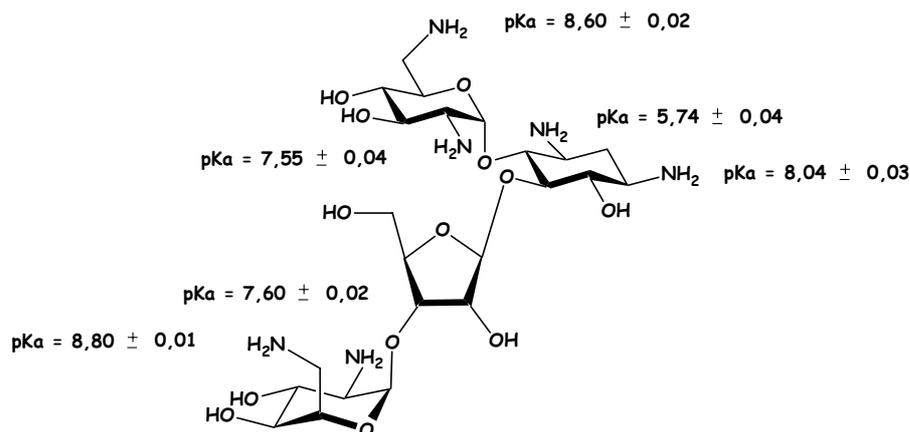


Figure 7 : Les pKa de la néomycine

Ces valeurs ont été calculées pour chaque amine à partir des courbes de titration des déplacements chimiques de chaque ^{15}N . Les déplacements chimiques de chaque amine ont été attribués par comparaison avec les déplacements chimiques des différents aminoglycosides composant la néomycine et des aminoglycosides de structure proche (la néamine, la méthyl néobiosaminidine, la 2-déoxystreptamine, le 2,6-diamino-2,6-dideoxy-D-glucose, la glucosamine et le 6-amino-6-désoxy-D-glucose). Les attributions spécifiques des amines 1 et 3 ont nécessité des expériences de spin labelling utilisant un réactif de relaxation paramagnétique. Il a été noté que les substituants situés en position γ ou plus ont peu d'influence sur les déplacements chimiques de ^{15}N . La néamine et la néomycine ont sensiblement les mêmes déplacements chimiques pour leurs amines similaires même à différents états de protonation (Cf. Fig. 8).

41 Botto, R. E. ; Coxon, B. J. *Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 1021.

composé	N1	N3	N2'	N6'
néomycine libre	-345,8	-343,5	-353,9	-361,8
néamine libre	-345,2	-343,7	-353,8	-361,1
néomycine.6HCl	-337,9	-336,3	-342,1	-349,3
néamine.4HCl	-338,0	-336,9	-342,2	-349,8

Figure 8 : Similitude des déplacements chimiques en ^{15}N de la néamine et la néomycine

Au vu de la similarité des déplacements chimiques des amines de la néamine et de la néomycine et étant donné que l'attribution des pKa de la néomycine a été effectuée à partir des courbes des déplacements chimiques en fonction du pH, il nous semble correct de penser que les pKa de la néamine sont sensiblement les mêmes que ceux des amines correspondantes de la néomycine (Cf. Fig. 9).

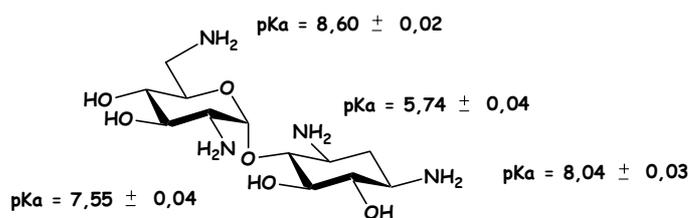


Figure 9 : Extrapolation à partir de la néomycine : les pKa de la néamine

La connaissance de ces pKa nous donne des informations utiles pour la suite. On peut prévoir qu'à pH 6, au moins trois amines de la néamine sont protonées. On peut également remarquer que l'amine en 6' est à la fois la plus basique (son doublet d'électrons est libre) et la plus accessible (ce qui explique sa forte nucléophilie).

III PREMIERE APPROCHE BASEE SUR DES COMPLEXATIONS SELECTIVES A L'AIDE DE METAUX DE TRANSITION

III.1 Introduction

III.1.1 Le principe

Il existe dans la littérature une méthode de protection sélective de différentes amines d'un aminoglycoside fondée sur l'utilisation de complexes de métaux de transition. Initialement développée par Hanessian *et al.* [42], elle a été reprise par d'autres groupes [43] [26] [27] [44]. Le principe repose sur la coordination d'un ion métallique par des aminoalcools vicinaux ou non ou, plus rarement, par deux fonctions amines. Selon la nature de l'ion, sa coordinance et sa géométrie ($Zn^{II}L_4$ est tétraédrique, $Cu^{II}L_4$ est tétraédrique déformé ou carré plan, $Cu^{II}L_6$ est octaédrique ou octaédrique déformé et $Ni^{II}L_6$ est octaédrique) [45], la complexation se fait par des fonctions différentes selon leur environnement et permet *a priori* de sélectionner certaines fonctions parmi les autres. De plus, pour un même aminoglycoside comportant plusieurs fonctions amine et alcool, plusieurs complexes sont en équilibre. Cependant, pour des raisons stériques et de basicité différente des fonctions, un complexe peut être majoritaire. En variant le métal, on peut donc avoir accès à une protection temporaire de l'une ou l'autre amine, permettant d'effectuer des réactions sur les autres amines, restées alors accessibles. Dans le cas de la néamine, les métaux utilisés sont $Cu(OAc)_2$, $Zn(OAc)_2$ et $Ni(OAc)_2$ [26] [27]. Les fonctions masquées en présence des différents métaux sont présentées sur la Figure 10.

42 Hanessian, S. ; Patil, G. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 12, 1031 et 1035.

43 Tsuchiya, T. ; Takagi, Y. ; Umezawa, S. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 51, 4951.

44 Grapsas, I. ; Massova, I. ; Mobashery, S. *Tetrahedron* **1998**, 54, 7705.

45 Cotton, F. A. ; Wilkinson, G. ; Murillo, C. A. ; Bochmann, M. *Advanced Inorganic Chemistry* 6th ed. 1999.

26 Kirst, H. A. ; Truedell, B. A. ; Toth, J. E. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 295.

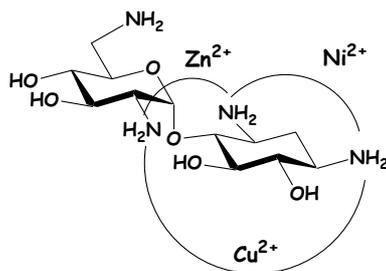


Figure 10 : Schéma récapitulatif des amines engagées dans la complexation des différents métaux.

Il est à noter que la préparation et l'utilisation des complexes avec le nickel ne sont pas décrits dans la littérature. Ils sont juste cités [26]. Le cas du cuivre a été par contre bien étudié par Mobashery *et al.* [44]. L'étude par RMN du proton, des temps de relaxation induits par le cuivre sur les protons proches des sites de coordination a suggéré la présence en solution des complexes présentés sur la Figure 11. Il est à noter que la première de ces molécules est très stable et même isolable. Elle permet d'effectuer des coupures oxydatives de l'ADN [46].

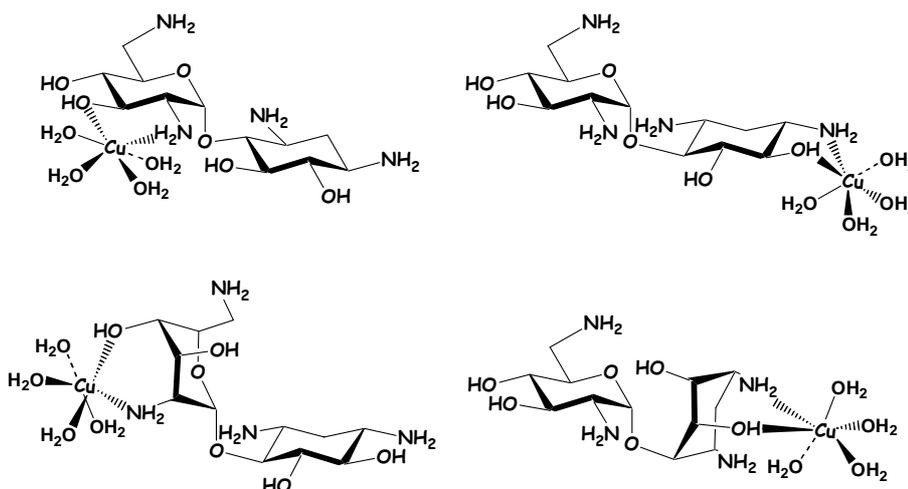


Figure 11 : Complexes dont la présence en solution a été montrée [44].

Les complexations temporaires de certaines fonctions par des métaux de transition ont été appliquées en synthèse par Mobashery *et al.* [27] [21]. Deux de leurs approches nous ont semblé intéressantes, notre but étant de distinguer la fonction amine en position 1 des autres fonctions. Elles nous ont permis d'envisager deux stratégies.

46 Sreedhara, A. ; Freed, J. D. ; Cowan, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8814.

44 Grapsas, I. ; Massova, I. ; Mobashery, S. *Tetrahedron* **1998**, 54, 7705.

27 Roestamadji, J. ; Grapsas, I. ; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11060.

21 Grapsas, I. ; Cho, Y. I. ; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1918.

III.1.2 Première approche de la littérature

Mobashery *et al.* ont appliqué cette méthodologie à la protection sélective des amines en position 3 et 6'. En effet, en traitant la néamine par du diacétate de cuivre, les amines en position 1 et 2' sont masquées temporairement par des complexes du cuivre. Les amines restantes (en position 3 et 6'), non complexées, sont alors modifiées par le pyrocarbonate de *tert*-butyle également présent dans le milieu. Les auteurs ont en effet obtenu après purification la néamine protégée par deux groupements Boc au niveau des amines en position 3 et 6' avec un rendement de 50 % (Cf. Fig. 12). Ils ont ainsi montré que la complexation des amines portées par les carbones C1 et C2' par des ions cuivriques, permet une protection sélective des amines en C3 et C6' par des groupements Boc [27].

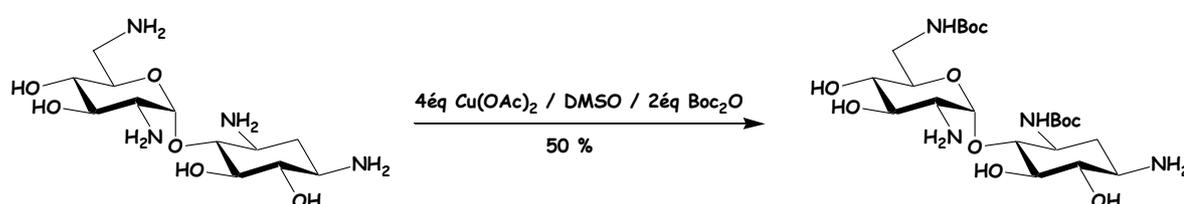


Figure 12 : Protection sélective en présence de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ [28].

Suite à cette *di*-protection, Mobashery *et al.* ont utilisé une complexation par des ions zinciques de l'amine en 2' afin de protéger l'amine en position 1 par un groupement Cbz. Pour ceci, ils ont utilisé le N-BND, réactif encombré permettant d'introduire le groupement Cbz. L'utilisation de ce réactif permet *a priori* de rendre la réaction encore plus sélective (Cf. Fig. 13).

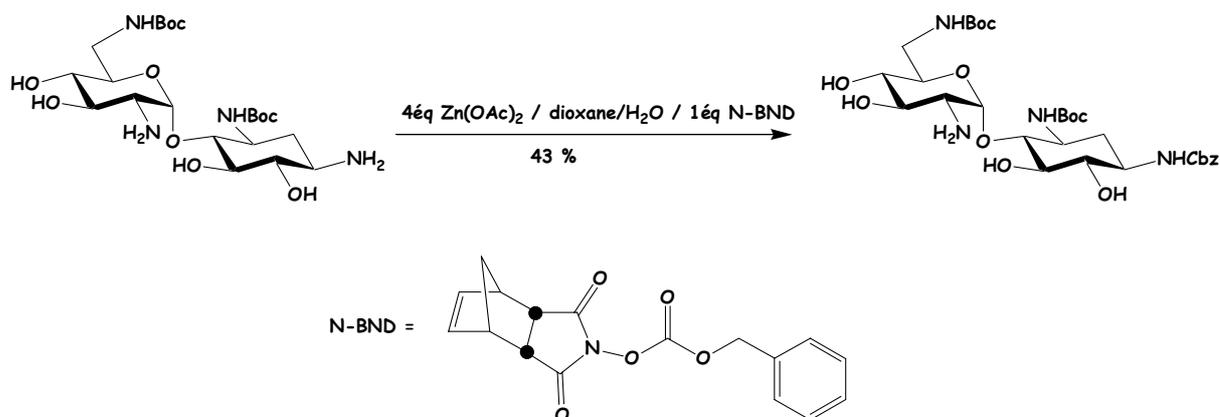


Figure 13 : Introduction d'un groupement Cbz sur l'amine en position 1 en présence de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ [27].

Il faut noter que les rendements ne sont pas très bons, mais que ces réactions donnent accès de façon très rapide (2 étapes) à un produit dont l'amine en position 1 a été distinguée des autres fonctions.

III.1.3 Seconde approche de la littérature

Une autre approche décrite par Mobashery *et al.* est attractive. Elle consiste, dans un premier temps à protéger l'amine la plus réactive (en C6') à l'aide d'un réactif encombré (Cf. Fig. 14) [21]. Un réactif encombré permet de mieux distinguer l'amine « primaire » (plus accessible) par rapport aux autres amines, toutes « secondaires ».

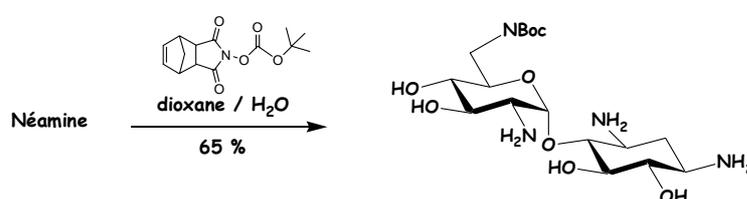


Figure 14 : Protection sélective de l'amine primaire par un réactif encombré [21].

Ces deux méthodes doivent être *a priori* applicables à notre projet. Deux approches fondées sur ces travaux nous ont paru rapides et simples.

III.2 Mise en application de la première approche

En tirant profit des travaux de Mobashery *et al.* (Cf. § III.1.2), nous pouvons envisager d'effectuer la même *di*-protection par des groupements Boc (amines en position 3 et 6'), suivie ensuite d'une réaction d'acylation capable d'introduire directement le bras espaceur sur l'amine en position 1. Pour cela, il faudrait soit jouer sur la plus grande réactivité de l'amine en position 1 (qui est plus dégagée que celle en 2'), soit utiliser une protection temporaire par des ions zinciques, comme dans la version de Mobashery *et al.*. Pour cette deuxième étape, divers réactifs acylants peuvent être envisagés (Cf. fig. 15). Ils doivent être stables dans l'eau, puisque les dérivés deux fois protégés de la néamine sont peu solubles et nécessitent des mélanges de solvants de type THF/H₂O ou CH₃CN/H₂O. Il s'agirait alors de préparer des bras espaceurs activés à chaque extrémité par des groupements partants faiblement hydrolysables. Les bras espaceurs à mettre en réaction seraient de type diester de N-hydroxysuccinimide, diesters de p-nitrophényle, diester d'imidazole, et éventuellement des

dichlorures d'acide (certains chlorures d'acide sont relativement stables dans l'eau) (Cf. Fig. 15) [47].

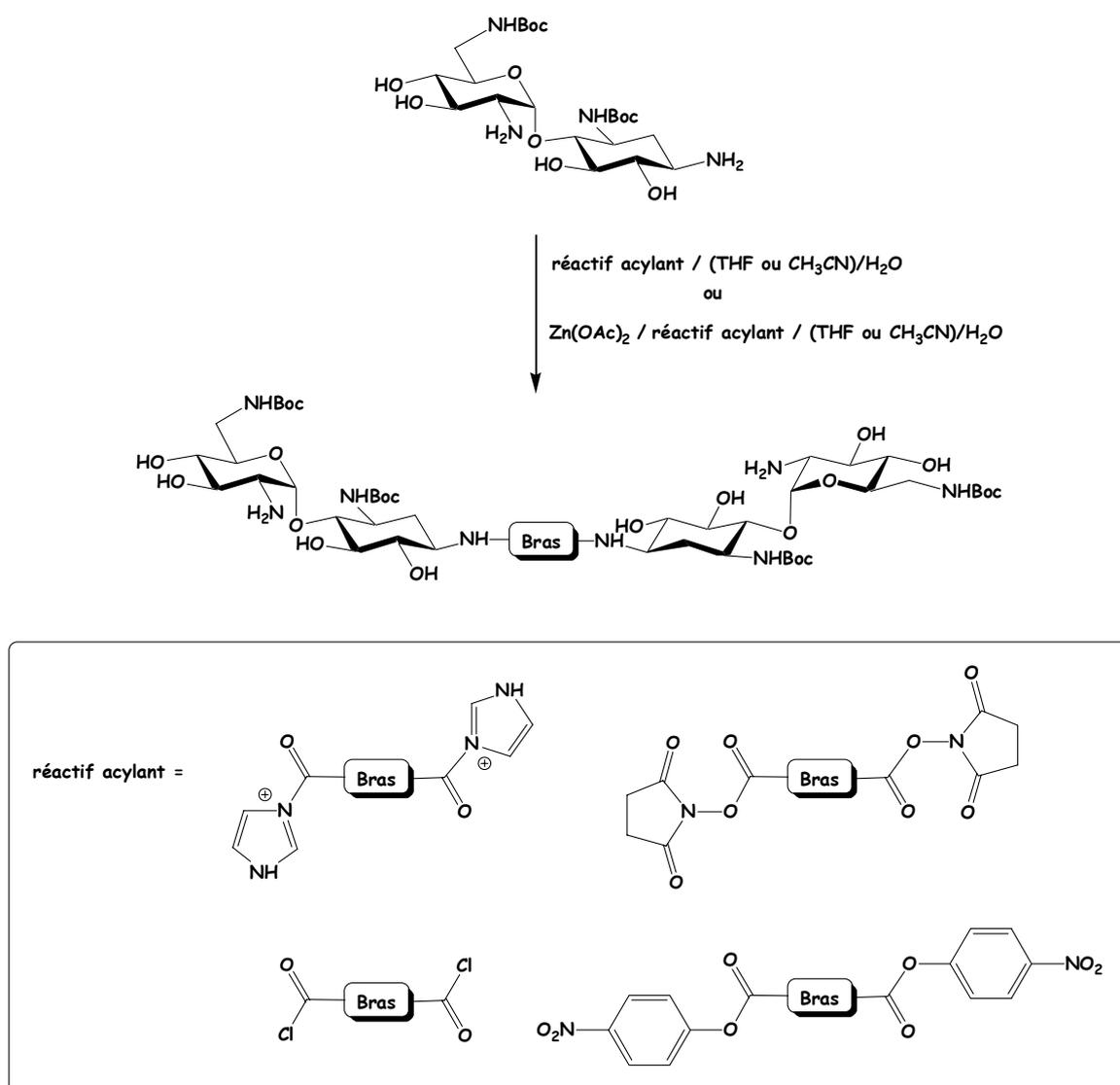


Figure 15 : Projet de synthèse

Dans un premier temps, la réaction de *di*-protection décrite par Mobashery *et al.* a été testée. La néamine libre a été dissoute dans du DMSO avec 4éq de Cu(OAc)₂. La solution était verte turquoise, et indiquait que le complexe s'était probablement bien formé. Deux équivalents de Boc₂O ont ensuite été ajoutés. Au bout d'une nuit d'agitation à température ambiante, la solution avait changé de couleur et était devenue verte menthe. Il s'agissait alors de séparer le produit du DMSO. Les dérivés de la néamine n'étant pas solubles dans l'éther, le produit a pu être séparé du DMSO, par « saturation » de ce dernier par ajout d'une grande

47 Tanaka, H. ; Nishida, Y. ; Furuta, Y. ; Kobayashi, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1723.

quantité d'éther et agitation forte. Le produit s'est séparé de la phase étherée sous forme d'une huile verte et a été récupéré. L'huile a ensuite été solubilisée dans un mélange de méthanol et d'eau : la solution était alors bleue. Du sulfure de sodium (Na_2S) a été ajouté en tant que ligand pour complexer le cuivre à la place du dérivé de la néamine. Cet échange de ligand a permis de récupérer le « produit » par filtration sur célite[®] du sulfure de cuivre formé (solide noir). Les spectres RMN du produit brut, étaient cependant difficilement interprétables. Ils présentaient de nombreux pics. Seuls les protons 1', 2ax et 2'éq se distinguaient des autres protons des cycles. Les protons *tert*-butyle des groupements Boc attendus étaient également difficilement attribuables (Cf. Fig. 16).

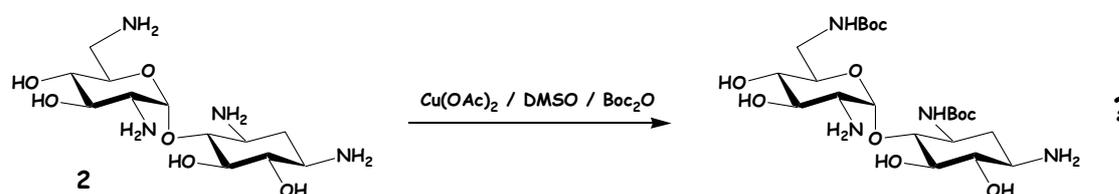


Figure 16 : Essai de *di*-protection sélective en présence de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$.

Les purifications de ce type de produits se font généralement par chromatographie échangeuse d'ions sur colonne de résine CG-50 (NH_4^+) et des éluions à l'aide de solvants mixtes (chloroforme/méthanol/ammoniaque ou dioxane/eau/ammoniaque) [44] [21]. Les produits polyaminés à l'état protoné (solubilisés dans un mélange dioxane/eau) s'échangent avec les ammoniums de la résine et sont alors retenus sur la colonne. Une élution avec des solvants organiques contenant un pourcentage d'ammoniaque de plus en plus élevé (de 0 à 5%), permet de décrocher successivement les produits, en commençant par les produits non chargés, pour finir avec ceux qui possèdent plusieurs d'ammoniums. L'échange d'un ion par un autre est favorable, si l'affinité et la concentration de l'ion arrivant sont plus élevées que celles de l'ion accroché à la résine.

Nous avons effectué plusieurs essais, en respectant exactement les protocoles décrits dans la littérature, mais nous n'avons jamais réussi à purifier nos produits de cette façon. Il semblerait que les produits n'aient pas été retenus. Pourtant, le produit souhaité est le même que celui de la publication et a été préparé de la même façon [44]. Le produit brut était-il vraiment protoné ?

Par ailleurs, en ce qui concerne la préparation de la colonne, nous avons suivi la fiche technique de Sigma Aldrich et chargé fraîchement la résine avec des ammoniums, en suivant

les consignes de préparation de la résine selon les cycles de Hirs [48] [49] [50]. Dans ce protocole, la résine doit être chargée, après nettoyage, par des ions sodium par une mise en suspension dans une solution 2M de NaOH, puis elle est chargée H^+ par lavage à l'aide d'une solution 3M de HCl, et enfin, l'échange H^+ / NH_4^+ peut avoir lieu par lavage avec une solution tampon d'acétate d'ammonium. Ces opérations sont nécessaires, car l'échange de Na^+ par NH_4^+ se fait de façon incomplète.

Au vu des échecs de ce type de purification, nous nous sommes rabattus sur des purifications sur colonne de gel de silice en utilisant des éluants très polaires à base de chloroforme, de méthanol et d'ammoniaque, dans des proportions telles que ces trois solvants soient miscibles. Ce type des purifications est également utilisé dans la littérature [27].

Certains produits de la réaction de *di*-protection par des groupements Boc en présence d'acétate de cuivre ont pu être ainsi séparés à partir du brut réactionnel (il y avait tout de même 10 taches sur la CCM !), parmi lesquels se trouvait le produit *di*-protégé souhaité. Cependant, le rendement n'était que de 15 % (Cf. Fig. 17). Etrangement, lors de l'analyse des spectres RMN des différents produits isolés, plusieurs produits aux rapports frontaux différents, ayant une intégration correcte pour les groupements Boc (18H) ont été observés. Il est possible que la réaction n'ait pas été sélective et que différents produits *di*-protégés aient été formés. Le produit *di*-protégé aux positions 3 et 6' a pu être identifié parmi les autres produits *di*-protégés par son rapport frontal ($R_f = 0,42$ pour l'éluant $CHCl_3/MeOH/NH_3 : 2/1/0,25$) qui est proche de celui donné dans la publication [27] ($R_f = 0,49$) pour le même éluant.

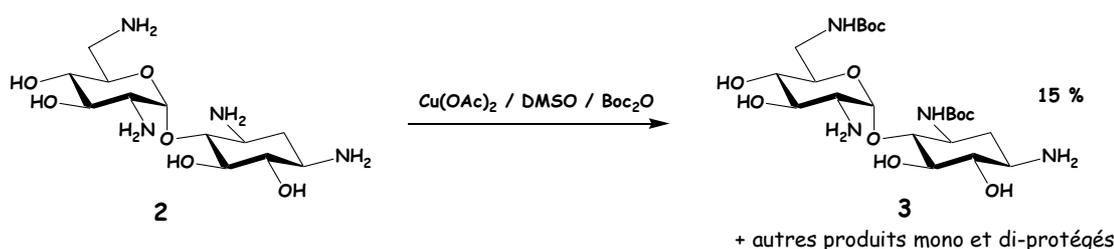


Figure 17 : *Di*-protection de la néamine en présence de $Cu(OAc)_2$.

Nous avons effectué de nombreux essais de cette réaction de *di*-protection en présence de $Cu(OAc)_2$, en variant le nombre d'équivalents d'acétate de cuivre, mais aussi en utilisant

48 Flemming, R. M. ; Clark, W. G. *Analytical. Chem.* **1965**, 37, 693.

49 Rochat, C. ; Rochat, H. ; Miranda, F. ; Lissitzki, S. *Biochem* **1967**, 6, 579.

27 Roestamadji, J. ; Grapsas, I. ; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11060.

50 Hirs, C. H. W. ; Moore, S. ; Stein, W. H. *J. Biol. Chem.* **1953**, 200, 493.

un réactif acylant plus encombré à la place de Boc₂O : le N-(t-butoxycarbonyloxy)-5-norbornène-*endo*-2,3-dicarboximide (Cf. Fig. 18). Ce réactif est utilisé parfois pour rendre la réaction plus sélective [27]. Aucune des réactions testées n'a été concluante.

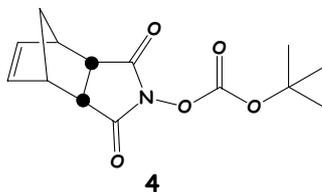


Figure 18 : N-(t-butoxycarbonyloxy)-5-norbornène-*endo*-2,3-dicarboximide

Cette approche, fondée sur des métaux de transition, présente plusieurs désavantages. D'une part, de nombreux produits sont formés et sont difficilement séparables, et d'autre part, la sélectivité de la réaction repose sur des protections temporaires. Nous ne savons pas grand'chose de la stabilité respective des différents complexes. Ils sont *a priori* en équilibre en solution, et leur interchangeabilité conduit, visiblement, à de nombreuses réactions parasites. Il y a formation de produits protégés, isomères de position des produits souhaités, donc difficilement séparables. Au vu de ces résultats, une autre approche a été testée en parallèle.

III.3 Application de la seconde approche

L'approche consistant à protéger l'amine « primaire » par un groupement Boc en utilisant un réactif encombré (Cf. § III.1.3) nous a semblé intéressante, car il suffirait ensuite d'insérer le bras espaceur selon une des méthodes proposées dans la voie précédente et de déprotéger la molécule pour obtenir le dimère souhaité. Nous avons préparé, avec un rendement de 50 %, le N-(t-butoxycarbonyloxy)-5-norbornène-*endo*-2,3-dicarboximide, selon la procédure de Mobashery *et al.* (Cf. Fig. 19).

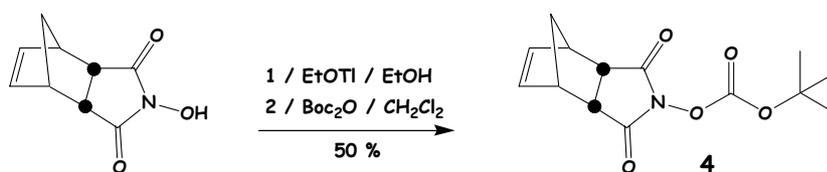


Figure 19 : Préparation du N-(t-butoxycarbonyloxy)-5-norbornène-*endo*-2,3-dicarboximide.

Ce dernier a été mis en réaction avec la néamine libre, selon le protocole décrit. Le protocole donne des conditions d'éluion pour CCM ainsi que les rapports frontaux des

produits *mono*-protégés et *di*-protégés. D'après les auteurs, la purification est réalisée par chromatographie échangeuse d'ions sur résine CG-50 (NH_4^+). Comme les essais déjà effectués avec ce type de résine n'avaient pas été efficaces, nous avons opté pour une purification sur colonne de gel de silice avec l'éluant utilisé par les auteurs en CCM ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 5/3/1). La première fraction comprend la quasi totalité du sous-produit attendu : le N-hydroxy-5-norbornène-2,3-dicarboximide. Par contre, la deuxième fraction, est composée d'un mélange de trois produits (un produit *di*-protégé (rdt = 17%) et deux produits *mono*-protégés (rdt tot. = 15 %) d'après leurs spectres RMN). Finalement, un des deux produits *mono*-protégés a été récupéré pur avec un rendement de 3 % dans une troisième fraction (Cf. Fig. 20).

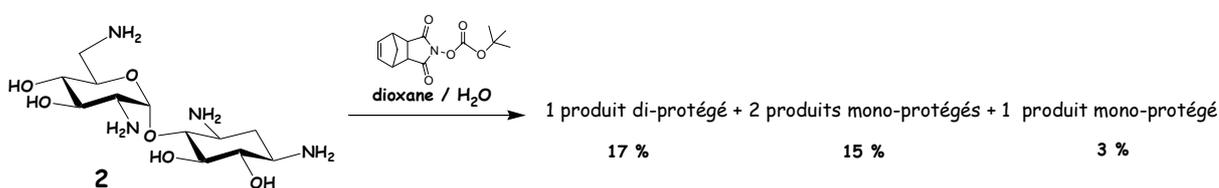


Figure 20 : Tentative de protection sélective de l'amine en position 6'.

Quoi qu'il en soit, nous rencontrons de sérieux problèmes de purification, et la réaction ne semble pas très sélective, puisqu'au moins deux produits *mono*-protégés différents et un produit *di*-protégé ont été observés. Nous n'avons donc pas été en mesure de tester la réaction de dimérisation.

III.4 Bilan

Ces deux voies basées sur des protections sélectives semblaient avantageuses car très rapides (deux étapes et une déprotection), cependant, elles reposent toutes les deux sur des travaux que nous n'avons jamais réussi à reproduire malgré les nombreux essais et variantes réalisés. Les méthodes basées sur les complexations semblent nécessiter des finesses que nous n'avons pas su trouver. Une publication atteste des difficultés d'une autre équipe à reproduire ces mêmes résultats [23]. Par ailleurs, ces réactions sont sous brevet. Il est possible que les auteurs n'aient pas tout dévoilé. C'est pour ces raisons que nous avons envisagé une méthode complètement différente.

IV SECONDE APPROCHE BASEE SUR DES CARBAMATES

IV.1 Les précédents dans la littérature

Il existe dans la littérature [51] [52] [53] [54] [29] [55] [56], une méthode astucieuse permettant de distinguer les amines vicinales d'un alcool en position trans-diéquatoriale des amines ayant un entourage différent (Cf. Fig. 21). Elle repose sur la formation de carbamates cycliques. Un carbamate est tout d'abord introduit sur l'amine, puis un traitement par une base permet de déprotomer les fonctions alcool présentes. L'alcoolate ainsi formé, s'il est adjacent au carbamate, réagit alors sur ce dernier par une réaction d'addition-élimination intramoléculaire afin de former un carbamate cyclique. Cette réaction est efficace pour la formation de carbamates cycliques à 5 ou 6 chaînons. Ces carbamates peuvent ensuite être ouverts en milieu basique (hydroxyde de baryum) afin de libérer les deux fonctions concernées.

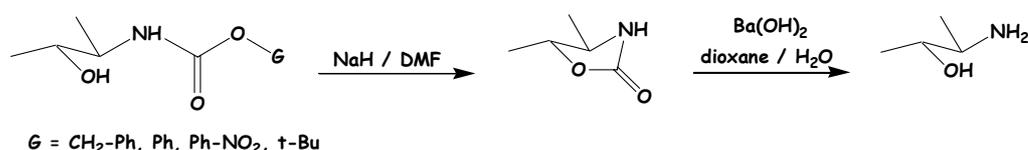


Figure 21 : Schéma général de l'utilisation de carbamates cycliques pour sélectionner des aminoalcools vicinaux.

Cette réaction peut être exploitée de la façon suivante pour notre synthèse : si toutes les fonctions amines de la molécule sont protégées sous forme d'un carbamate, seules celles ayant un alcool adjacent sont déprotégées par cette méthode.

Cette séquence a déjà été appliquée à la streptomine [51], mais également à la néamine [29]. L'équipe de Remers a effectué la synthèse suivante (Cf. Fig. 22) [28]. Toutes les amines de la néamine sont protégées par des groupements carbobenzyloxy, puis l'action de l'hydrure de sodium permet de former deux carbamates cycliques entre les aminoalcools vicinaux 1 et 6

51 Umezawa, S. ; Tsuchiya, T. ; Umezawa, H. *Bull. Chem. Soc. Jn.* **1970**, 43, 1602.

52 Umezawa, S. ; Takagi, Y. ; Tsuchiya, T. *Bull. Chem. Soc. Jn.* **1971**, 44, 1411.

53 Ikeda, D. ; Tsuchiya, T. ; Umezawa, S. ; Umezawa, H. *Bull. Chem. Soc. Jn.* **1974**, 47, 3136.

54 Takagi, Y. ; Ikeda, D. ; Tsuchiya, T. ; Umezawa, S. ; Umezawa, H. *Bull. Chem. Soc. Jn.* **1974**, 47, 3139.

29 Kumar, V. ; Remers, W. A. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 3327.

55 Kumar, V. ; Jones, G.S. ; Blacksberg, I. ; Remers, W. A. *J. Med. Chem.* **1980**, 23, 42.

ainsi que 6' et 4'. Les amines en 2' et 3 restent protégées par les groupements Cbz. En effet, l'amine en 3 n'a pas d'alcool vicinal et ne peut donc pas évoluer vers un système cyclique. Par contre, l'amine en 2' en possède un. Un troisième carbamate risque donc se former. La molécule est ensuite entièrement benzylée. Finalement, l'ouverture du carbamate du cycle à cinq atomes se fait de façon sélective par rapport à l'ouverture du carbamate du cycle à six chaînons en présence d'un équivalent de Ba(OH)₂.

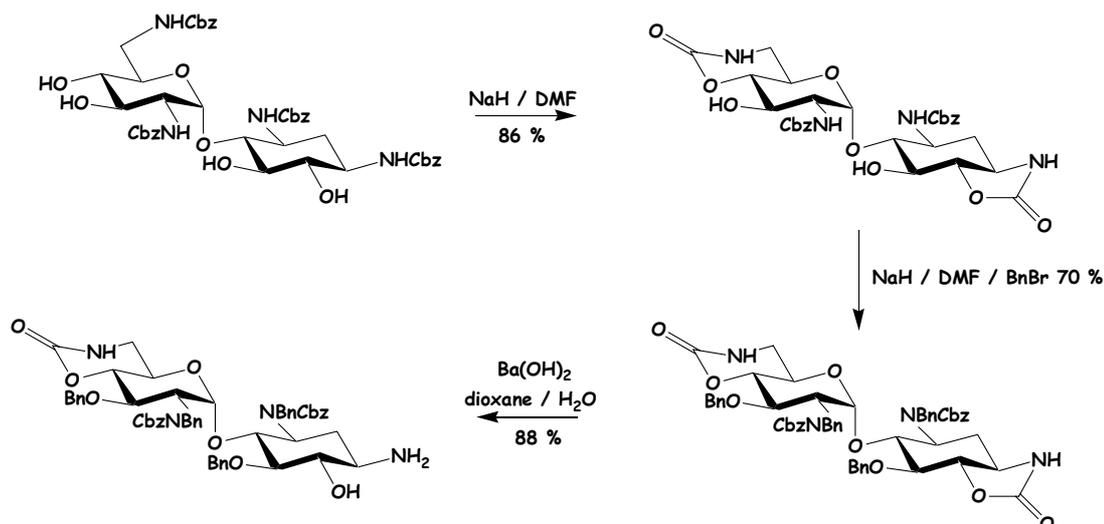


Figure 22 : La synthèse décrite par Remers *et al.* [28].

IV.2 Préparation du composé *tétra*-protégé par des groupements Cbz

Cette méthode répondait au but que nous nous étions fixé. Dans un premier temps, nous avons protégé toutes les amines par des groupements Cbz. Cette réaction est décrite plusieurs fois dans la littérature [57][58][6]. Cependant, en essayant de reproduire les différentes conditions expérimentales décrites, nous n'avons obtenu que des rendements de l'ordre de 65 %. La médiocrité de ces rendements est essentiellement liée à la procédure d'extraction du composé *tétra*-protégé (solide) peu efficace (dissolution dans l'acétone ou dans un mélange dioxane/H₂O 85/6 à chaud). En effet, le produit *tétra*-protégé par des Cbz

56 Haddad, J. ; Kotra, L. P. ; Llano-Sotelo, B. ; Kim, C. ; Azucena, E. F. ; Meizheng, J. L. ; Vakulenko, S. B. ; Chow, C. S. ; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3229.

57 Umezawa, S. ; Koto, S. ; Tatsuta, K. ; Hineno, H. ; Nishimura, Y. ; Tsumura, T. *Bull. Chem. Soc. Jn.* **1969**, 42, 537.

58 Canas-Rodriguez, A. ; Galan Ruiz-Poveda, S. *Carbohydrate Research* **1977**, 58, 379.

est de nature visqueuse en présence de solvant et très peu soluble dans la plupart des solvants. Il semblerait que les carbamates soient responsables de la nature visqueuse du produit. Il est possible que les molécules s'organisent dans l'espace et soient liées entre elles par des liaisons hydrogène pour former un réseau s'apparentant à un gel.

Nous avons réussi à améliorer ce rendement (passage de 65 % à 75 %) grâce à quelques modifications (Cf. Fig. 23). Nous avons remplacé la base (Na_2CO_3) par de la triéthylamine et modifié le traitement après réaction : les extractions sont remplacées par des triturations énergiques à l'eau et l'éther, suivies de filtrations et rinçages. Les triturations à l'eau permettent de retirer les sels, et celles à l'éther, retirent les résidus organiques, le composé *tétra*-protégé n'étant soluble ni dans l'eau ni dans l'éther. Ces étapes successives doivent être répétées jusqu'à ce que le solide présente une granulométrie très fine. En présence de solvant, le composé est visqueux, mais la filtration permet de récupérer le produit sous forme de poudre fine. Ses caractérisations sont conformes à celles de la littérature.

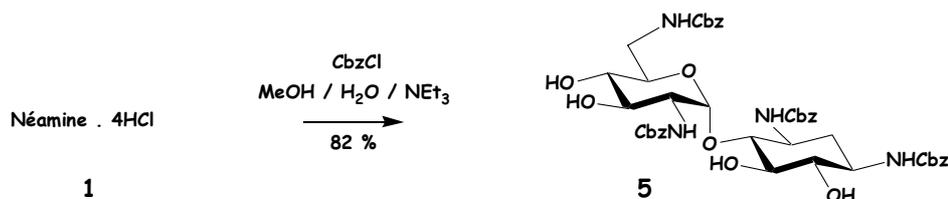


Figure 23 : Variante proposée pour la préparation du composé *tétra*-protégé par des groupements Cbz.

IV.3 Formation des carbamates cycliques

Ayant obtenu le dérivé *tétra*-protégé par des Cbz avec un rendement satisfaisant et de façon reproductible, nous avons tenté d'accéder aux carbamates cycliques. Après plusieurs essais, nous nous sommes rendu compte que le nombre d'équivalents en hydrure de sodium et le suivi de la réaction sont très importants puisque trois carbamates peuvent se former sur une même molécule. *A priori*, seuls deux équivalents d'hydrure de sodium sont nécessaires, mais le nombre idéal est de 4,6 équivalents. D'après nos observations sur CCM, l'analyse des produits récupérés et les résultats des publications, il semblerait que la réaction se déroule de la façon suivante. Les carbamates se formant les premiers sont les deux souhaités (entre l'amine 6' et l'alcool 4' et entre l'amine 1 et l'alcool 6) et le troisième (entre l'amine 2' et l'alcool 3'), non désiré, se forme dans un deuxième temps (Cf. Fig. 24).

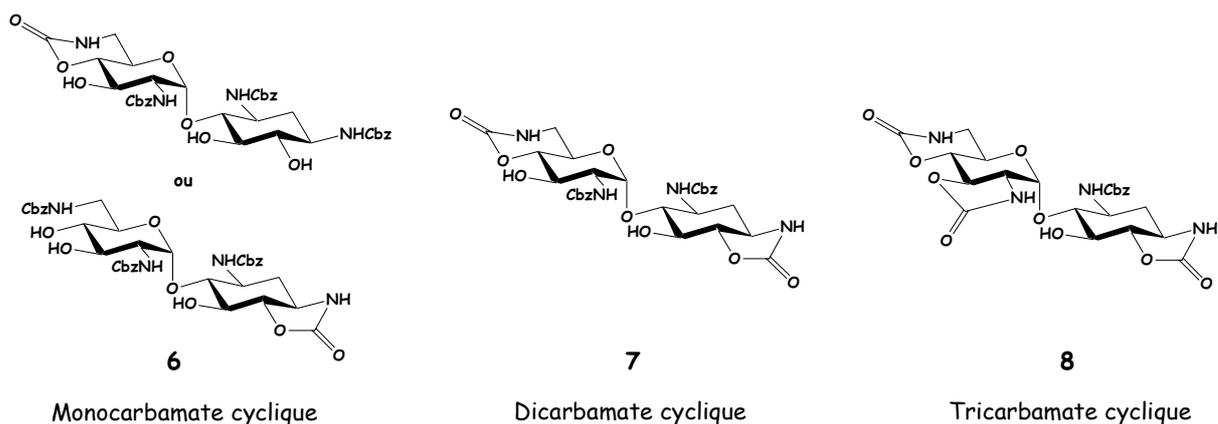


Figure 24 : Les différents produits de la réaction

Le problème de cette réaction repose sur le fait que le troisième carbamate, non souhaité, peut commencer à se former alors que le produit intermédiaire ne portant qu'un seul carbamate n'est pas encore été entièrement converti en produit souhaité. La réaction suit une cinétique assez complexe. Avec 4,6 équivalents, on peut former les trois carbamates cycliques. Il faut alors jouer sur le temps de réaction : elle doit être arrêtée avant que le troisième carbamate cyclique ne soit formé, mais suffisamment tard pour que les *mono*-carbamates cycliques soient déjà convertis en *di*-carbamates cycliques. Par contre, si on utilise moins de 4,6 équivalents (pour éviter la formation du troisième carbamate cyclique), le rendement s'en trouve affecté car il reste beaucoup de produit ayant un seul carbamate cyclique. De même, en présence de plus de 4,6 équivalents, le troisième carbamate intramoléculaire se forme en plus grande quantité. Il est délicat de jongler ici avec la cinétique de la réaction d'autant plus qu'elle est difficile à suivre, le solvant étant le DMF. Il semblerait que le nombre de 4,6 équivalents accompagné d'un bon suivi de la réaction soit un bon compromis, néanmoins, cette réaction est très délicate. Nous n'avons jamais obtenu de rendement aussi bon que celui décrit par Remers *et al.* (86 %). Pour notre part, nous avons obtenu au maximum 75 % (Cf. Fig. 25).

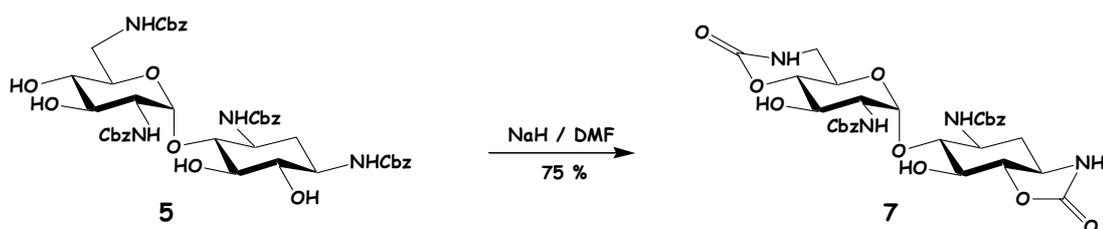


Figure 25 : Etape de formation du produit portant deux carbamates cycliques.

Le composé **7** n'est pas facile à purifier. Il est séparé du composé **8** lors du traitement post-réactionnel, mais il reste accompagné d'un peu de composé **6** : la réaction est stoppée par ajout d'acide acétique, le DMF est ensuite évaporé jusqu'à obtenir une huile visqueuse. Un traitement à l'eau glacée fait alors précipiter les composés **6** et **7**. Par contre, le composé **8** étant soluble dans l'eau, il est éliminé lors de la filtration du précipité. Il cristallise plus tard, dans les eaux de lavage. Les essais de recristallisation du dicarbamate cyclique **7** n'ont pas été concluants. Il a donc été utilisé sans purification ultérieure. Toutefois, un échantillon analytique a pu être obtenu lors des essais de recristallisation et a servi à effectuer les analyses.

Les structures de ces trois molécules ont été élucidées par l'analyse des spectres de masse et des spectres en RMN ^1H et ^{13}C . Le produit *mono*-carbamate cyclique (**6**) n'a jamais été isolé, il accompagne éventuellement le composé *di*-carbamate cyclique (**7**). Lorsque la réaction est menée dans les conditions optimales, il est présent en faible quantité sur les spectres du dérivé **7**, qui est le composé majoritaire. Le *tri*-carbamate (**8**) a été obtenu avec une excellente pureté par filtration et rinçage des cristaux apparus dans les eaux de lavage.

L'analyse des spectres en RMN du proton, nous a permis de conclure quant au nombre de groupements Cbz présents. La comparaison de l'intégration des protons connus (1', 2ax et 2éq), qui servent de référence, et des parties caractéristiques du groupement Cbz (la partie aromatique et les CH_2 benzyliques) a permis de déterminer le nombre de groupements Cbz présents sur la molécule. La présence des carbamates cycliques a pu être mise en évidence par le spectre de masse et par la présence, sur le spectre ^{13}C , de carbonyles ayant des déplacements chimiques différents (155,7 158,4 et 162,0 ppm dans CD_3OD) de ceux des carbonyles des groupements Cbz (158,2 et 158,9 ppm dans CD_3OD). Nous connaissons ainsi le nombre de carbamates portés par chaque molécule. Par contre, il restait à déterminer leur localisation.

Dans le cas du composé « *mono*-carbamate cyclique » (**6**), nous avons supposé qu'il s'agissait d'un des deux carbamates qui se forment facilement (Cf. Fig. 26). Il n'a pas été possible d'effectuer des spectres RMN 2D permettant d'attribuer le carbamate, car ce produit était un produit minoritaire, jamais isolé du produit dicarbamate. Il est seulement visible sur le spectre ^1H du *di*-carbamate cyclique. Il est caractérisé par un proton 2éq à 2,1 ppm dans le méthanol deutérié. Ses protons aromatiques sont superposés à ceux du dicarbamate cyclique, mais il est possible de vérifier par calcul qu'il y en a quinze. De même, le nombre de CH_2 benzyliques est calculé sur la RMN.

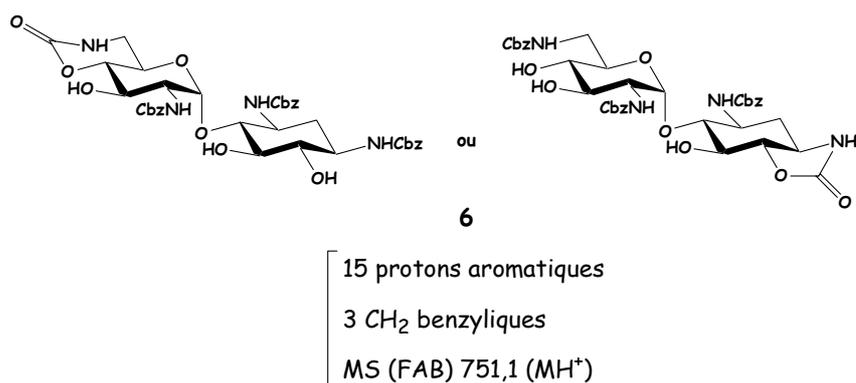
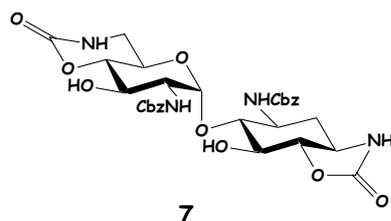


Figure 26 : Identification du produit « mono-carbamate cyclique »

Par ailleurs, nous avons supposé que le produit portant deux carbamates et deux groupements Cbz était le composé souhaité, celui qui est décrit par Remers *et al.* pour cette réaction (Cf. Fig. 27). La localisation des deux carbamates n'a pas pu être vérifiée directement, car son spectre ¹H n'est pas suffisamment étalé pour permettre une identification par des corrélations en 2D (6 H sous un même multiplet entre 3,56 et 3,83 ppm, et 2 H à 3,46 ppm). La localisation des carbamates a pu être vérifiée ultérieurement, lors de la caractérisation des produits dérivés de ce dernier, synthétisés par la suite. Ceux-ci peuvent, en effet, être purifiés convenablement, et ils ont des spectres RMN plus éclatés ce qui rend l'analyse plus aisée. Il faut noter que les publications de Remers *et al.* ne donnent aucune description de spectre RMN. Seules les caractéristiques spectrales importantes en IR ont été décrites, et nous ont donné peu d'indications. En effet, les fréquences de vibration des carbamates cycliques se distinguent à peine de celles des groupements Cbz : les vibrations ν des Cbz et du cycle à 6 sont sous une large bande à 1695 cm⁻¹ seule la vibration ν de l'amide I du cycle à 5 se distingue par un épaulement à 1756 cm⁻¹. Toutes les autres vibrations sont confondues avec celles de groupements Cbz. En outre, les mesures du pouvoir rotatoire et de la température de décomposition du composé dicarbamate cyclique coïncident avec les données décrites [29].

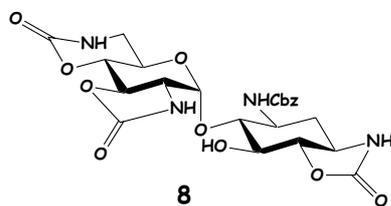


7

10 protons aromatiques
 2 CH₂ benzyliques
 MS (FAB) 665,2 (MNa⁺) 643,2 (MH⁺)

Figure 27 : Identification du produit « dicarbamate cyclique »

Le troisième composé, quant à lui, ne porte plus qu'un seul groupement Cbz, il s'agit donc d'un composé contenant trois carbamates cycliques. Par ailleurs, le spectre RMN ¹³C, montre la présence de trois carbonyles de carbamate (pas de carbonyle d'urée ou autre fonction) et d'un carbonyle de Cbz. Il s'agit donc forcément du composé ci-dessous (Cf. Fig. 28). On peut noter qu'un composé similaire, portant un groupement acétyle à la place du Cbz, a été obtenu par Remers *et al* en présence de résine Dowex (HO⁻) à partir du composé tétra-acétylé [29].



8

10 protons aromatiques
 2 CH₂ benzyliques
 MS (FAB) 557,1 (MNa⁺) 535,1 (MH⁺)

Figure 28 : Identification du produit « tri-carbamate cyclique »

IV.4 Protection des alcools et ouverture du carbamate

Dans la synthèse décrite par Remers *et al.* (Cf. Fig. 22, § IV.1), une benzylation des alcools libres et des amines est réalisée après la formation des carbamates. Elle nécessite

l'utilisation d'hydrure de sodium pour déprotoner les alcools. Les alcoolates formés peuvent alors réagir sur le bromure de benzyle.

Dans notre cas, la réaction de benzylation a conduit à deux produits séparables, tous deux difficiles à analyser, à cause de leur mauvaise résolution, probablement due à la présence de rotamères. Les spectres RMN ^1H ont été effectués dans le chloroforme, le méthanol et le benzène deutériés, sans qu'aucun d'entre eux ne soit réellement exploitable. L'analyse de ces spectres laisse supposer que l'un des produits serait le produit benzylé souhaité (présence de 40 protons aromatiques) et que le second serait le produit *tri*-carbamate cyclique benzylé (présence de 30 protons aromatiques) (Cf. Fig. 29).

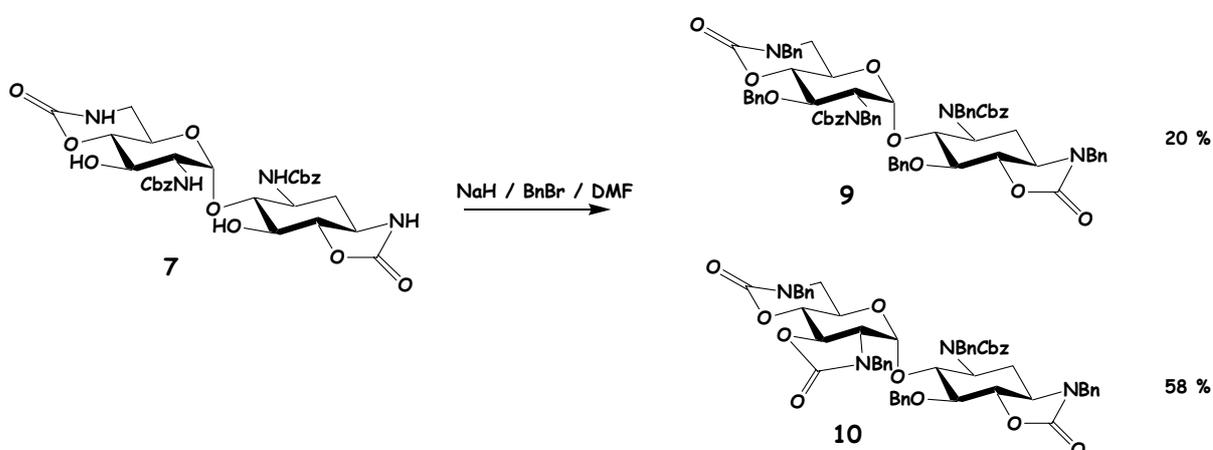


Figure 29 : Résultat de la réaction de benzylation du composé dicarbamate cyclique.

La formation de ce second produit peut s'expliquer par le fait que la benzylation a été effectuée en présence d'hydrure de sodium, réactif utilisé dans l'étape précédente pour former les carbamates. La formation du troisième cycle lors de la benzylation est gênante.

De plus, au vu de la résolution des spectres protons, il n'était pas envisageable d'effectuer des spectres 2D. Or, nous souhaitions vérifier exactement la structure du produit afin de vérifier la régiosélectivité de la formation des carbamates. Comme ce composé présentait un spectre difficilement décryptable et qu'il en serait sans doute de même pour les produits qui en seraient dérivés, nous n'avons pas cherché à étudier et utiliser cette benzylation.

Nous supposons que le rôle de la benzylation effectuée par Remers *et al.* était de rendre la réaction d'ouverture des carbamates cycliques sélective du cycle le plus tendu (carbamate à 5 chaînons). Il en découlait, qu'en absence de protection de la molécule par des groupement benzyles, les deux carbamates seraient ouverts en présence d'hydroxyde de

baryum. L'ouverture des deux carbamates ne nous semblait pas gênante, car elle conduirait à deux amines libres distinguables (Cf. Fig. 30). En effet, l'amine en position 6' est une amine primaire, et l'amine en position 1 est secondaire. Il serait donc envisageable de reprotéger, à ce stade l'amine primaire, pour garder l'amine en position 1 libre.

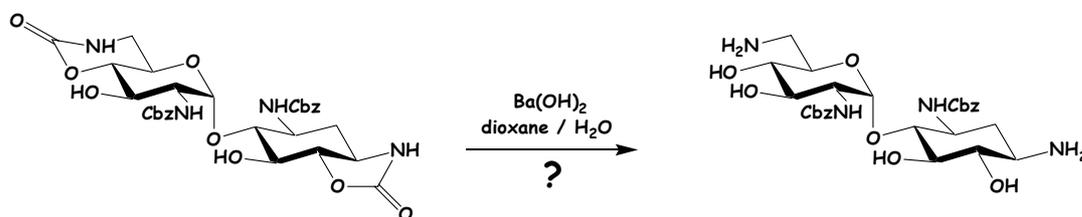


Figure 30 : Suppositions concernant l'ouverture par $\text{Ba}(\text{OH})_2$ en absence des groupements benzyles.

C'est pour cette raison que nous avons testé l'ouverture des carbamates sans protection des autres fonctions en présence d'un excès d'hydroxyde de baryum (Cf. Fig. 31). Deux produits ont été isolés, et ont pu être identifiés grâce aux spectres de masse et surtout aux spectres RMN (^1H , HSQC, HMBC, COSY). Il s'agit du produit d'ouverture des deux carbamates (rdt = 28 %) et du produit dont seule l'amine en position 3 est protégée par un groupement Cbz (rdt = 34 %). Les autres sous-produits n'ont pas pu être identifiés.

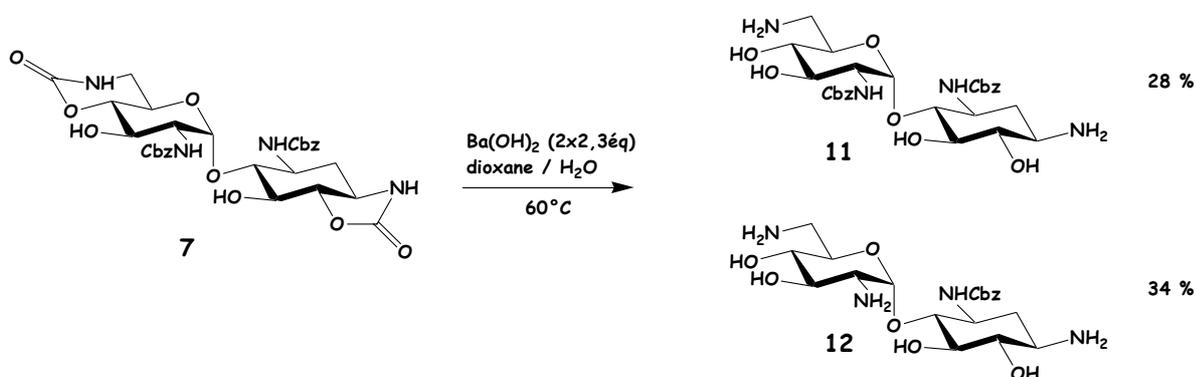


Figure 31 : Réaction d'ouverture du composé 7 en présence d'un excès de $\text{Ba}(\text{OH})_2$

L'hydroxyde de baryum n'est pas suffisamment réactif pour déprotéger une amine portant un groupement Cbz. Or, l'amine en position 2' a été déprotégée partiellement (34 % du produit 12). Il est probable qu'un carbamate cyclique situé entre l'amine en position 2' et l'alcool en position 3', se soit formé lors de la réaction et que son ouverture ultérieure ait libéré l'amine en position 2'. Il semblerait donc que l'hydroxyde de baryum entraîne la

formation du composé *tri*-carbamate cyclique, dont l'ouverture conduit à un produit non exploitable pour notre synthèse.

Il s'agissait donc d'éviter la formation du composé *tri*-carbamate cyclique. Un moyen d'éviter l'addition-élimination de l'alcool en position 3' sur le groupement Cbz est de protéger cet alcool.

Nous avons opté pour des groupements silylés, car ils peuvent être chimiosélectifs des alcools. Les amines « secondaires » ne sont pas protégées dans les conditions classiques de protection des alcools [59]. En effet, les silylamines sont très fortement sensibles aux acides et à l'eau. De même, si la silylation est effectuée en présence de fonctions alcool et amine, les amines sont silylées en premier lieu, puis le groupement silylé migre sur l'alcool car l'énergie de la liaison O-Si est plus forte que celle de la liaison N-Si.

Le choix du groupement silylé se fait en fonction des conditions réactionnelles des étapes ultérieures. Dans notre cas, il doit pouvoir supporter les conditions basiques de l'étape d'ouverture du carbamate ($[Ba(OH)_2] = 0,05\text{ M}$). Les groupements silylés sont plus ou moins labiles en milieu basique selon leur encombrement, la concentration et le temps d'exposition [60]. Cet effet est directement relié à l'encombrement de l'atome de silicium : plus il est encombré, plus il est stable aux attaques nucléophiles. L'ordre de stabilité des groupements est donc le suivant : TIPS > TBS > TES. Par ailleurs, un groupement protecteur trop volumineux pourrait devenir difficile à introduire sur notre molécule, déjà assez encombrée, et pourrait induire, s'il s'est fixé, des changements de conformation induisant des modifications de la réactivité de la molécule. Il s'agit donc ici de trouver un compromis entre stabilité et encombrement de notre molécule. C'est pourquoi nous avons testé plusieurs groupements.

Le groupement TIPS étant très volumineux, nous l'avons introduit grâce au triflate correspondant, les groupements TBS et TES ont été introduits par les chlorures correspondants (Cf. Fig. 32). Néanmoins, dans le cas des chlorures de silyle, il a été nécessaire de forcer les conditions, en se plaçant en large excès de réactif et de base [11] (4 éq. de TBSCl et 6 éq. d'imidazole ; 6 éq. de TESCl avec 9,3 éq. d'imidazole, 1 éq. de triéthylamine et 0,6 éq. de DMAP), pour compenser la faible réactivité des alcools du dicarbamate cyclique [28]. Par exemple, à temps de réaction équivalent (une nuit), avec 3

59 Colvin, E. W. *Silicon Reagents in Organic Synthesis* **1990**, 88-89. ISBN 0-12-182560-4

11 Haddad, J. ; Kotra, L. P. ; Liano-Sotelo, B. ; Kim, C. ; Azucena, E. F. ; Meizheng, J. L. ; Vakulenko, S. B. ; Chow, C. S. ; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3229.

60 Nelson, T. D. ; Crouch, R. D. *Synthesis* **1996**, 1031.

équivalents de TBSCl, on obtient 35 % de produit souhaité, et avec 4 équivalents, on en obtient 55 %.

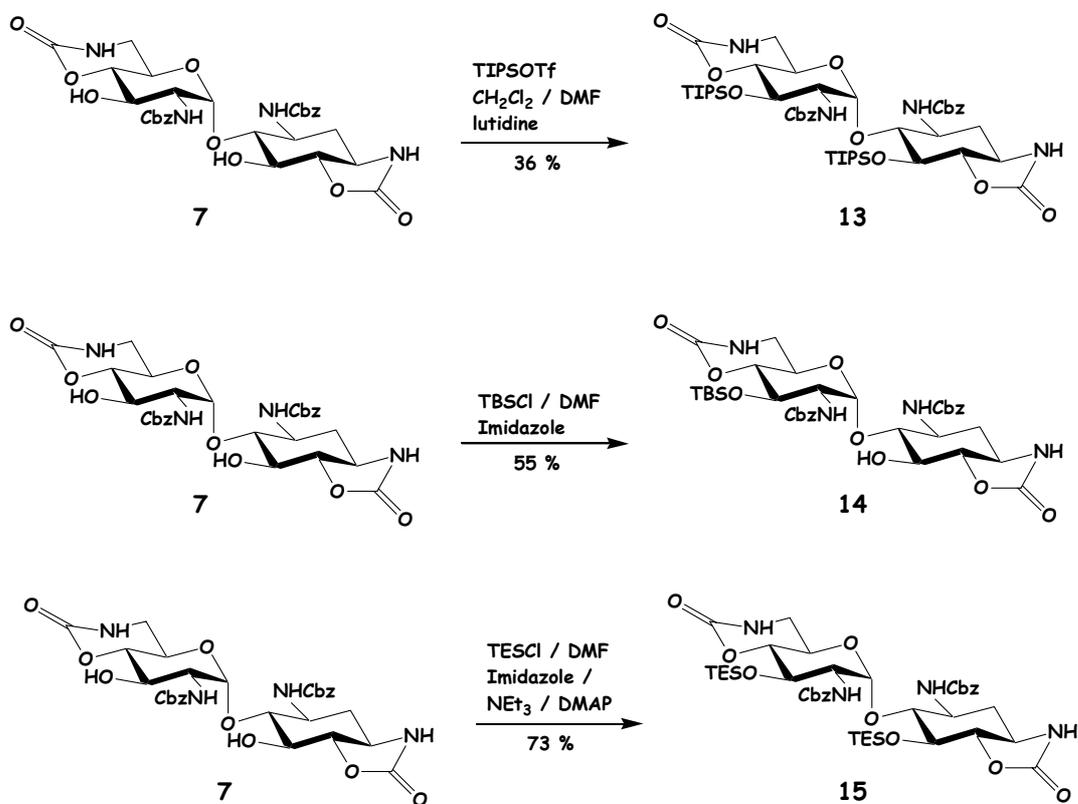


Figure 32 : Réactions de silylation : comparaison des groupements silylés.

Nous avons ainsi obtenu par les silylations « en conditions forcées », les produits **13**, **14** et **15**. Ces produits sont solubles dans le dichlorométhane et le chloroforme, contrairement aux produits précédents, ce qui rend possible une extraction en présence d'une phase aqueuse, et une purification par chromatographie sur colonne de silice. Ils présentent également des spectres RMN bien résolus et éclatés, ce qui a permis l'attribution de tous les signaux en RMN et la vérification des structures.

Alors qu'une *mono*-protection en 3' a bien été observée dans le cas du TBS, une *di*-protection en 3' et 5 a eu lieu dans le cas du TES. Ces résultats s'expliquent par la différence de réactivité entre ces deux alcools. L'alcool en C5 est connu comme étant peu réactif car il est supposé être impliqué dans une liaison hydrogène avec l'oxygène de la liaison glycosidique. La *di*-protection par le groupement TES s'est avérée possible à partir du TESCl en présence de bases, car c'est un groupement de taille « raisonnable ». Par contre, avec le groupement TBS, qui est plus volumineux, seule la protection de l'alcool en C3' a été possible en utilisant le TBSCl comme réactif.

La *mono*-protection en C3' par le TESCl a été également observée (avec 2,5 éq. de TESCl), cependant, le rendement était mauvais (21 %). Comme il faut forcer les conditions pour avoir des rendements appréciables, il a été plus aisé de préparer le produit *di*-protégé par des groupements TES que le produit *mono*-protégé par un TES.

Etant donné que le groupement TIPS est encore plus volumineux, nous avons choisi comme réactif le TIPSOTf, beaucoup plus réactif que le TIPSCl. Dans ces conditions et de façon surprenante, nous avons à nouveau observé une *di*-protection mais avec un faible rendement de 36 %. Il est probable que l'utilisation du triflate force la silylation en position 5. Le faible rendement de cette silylation nous a fait exclure le groupement TIPS à ce stade.

Nous avons ensuite testé la réaction d'ouverture du carbamate du cycle à 5 dans un mélange de dioxane et d'eau, nécessaire pour solubiliser les différentes espèces en présence, avec un équivalent d'hydroxyde de baryum sur les produits 14 et 15 (Cf. Fig. 33).

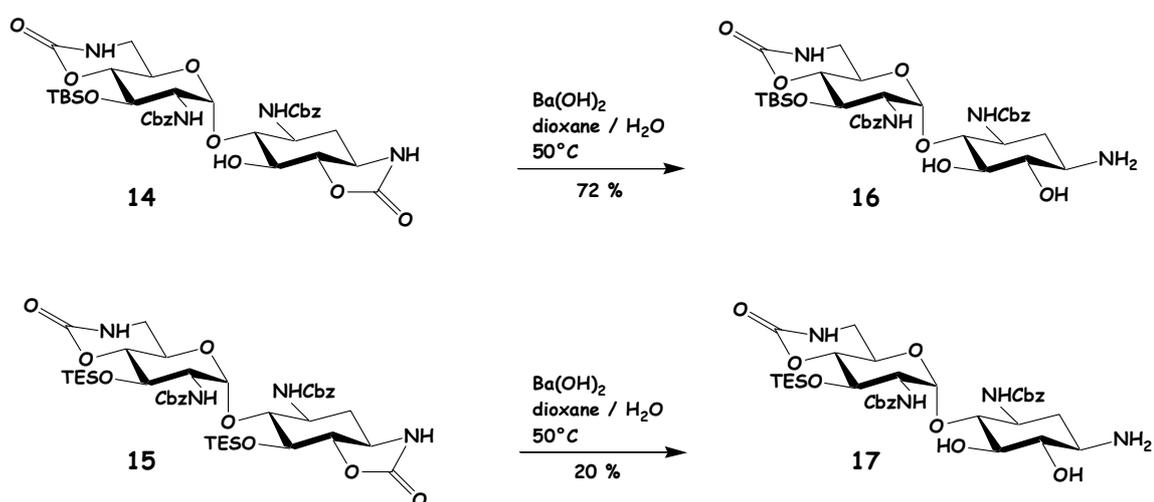


Figure 33 : Décarboxylation.

Nous avons observé dans les deux cas, une ouverture sélective du carbamate cyclique le plus tendu (cycle à 5 chaînons). C'est l'analyse en RMN des spectres ^1H , ^{13}C et 2D de ces deux produits qui a permis de vérifier le positionnement des différentes fonctionnalités. Par exemple, il a été démontré que le carbamate cyclique restant se situait entre l'amine en position 6' et l'alcool en position 4' par la présence d'une corrélation en HMBC entre le carbonyle du carbamate cyclique et les protons 6'. La corrélation avec le proton en position 4' n'est pas visible, sans doute car ces deux liaisons sont perpendiculaires (courbe de Karplus, Cf. Fig. 48, § V.3). Des corrélations ont également été observées entre les carbonyles des Cbz

et les protons 3 et 2' située au pied des deux amines respectives. Une analyse plus détaillée des spectres RMN est présentée au § V.

Le carbamate formant un cycle à 6 chaînons n'a pas été touché, sans doute car il est plus stable (cycle à 6) et rendu moins accessible par la proximité du groupement silyle. De plus, l'alcool en position 3' étant protégé, il ne peut pas assister l'ouverture du carbamate à 6 chaînons.

Dans ces conditions basiques ($[Ba(OH)_2] = 0,05\text{ M}$), le groupement TBS n'a pas été affecté, par contre le groupement TES en position 5 a été perdu, ce qui explique le faible rendement de la réaction : une partie de l'hydroxyde de baryum a été consommée pour déprotéger l'alcool en C5 et n'était donc plus disponible pour ouvrir le carbamate cyclique. Il aurait donc été nécessaire de travailler en présence de deux équivalents, plutôt qu'un seul. Cependant, avec deux équivalents d'hydroxyde de baryum, il n'est plus garanti que le second carbamate ne soit pas touché. De plus, il n'est pas très sensé d'introduire un groupement pour le retirer dans l'étape suivante. Au vu de ces résultats, nous avons sélectionné le groupement TBS, pour la séquence optimale.

IV.5 Précisions concernant l'étape d'ouverture du carbamate

Généralement, lorsqu'il s'agit d'ouvrir des carbamates cycliques, l'hydroxyde de baryum est utilisé en large excès [29] [61]. Des équivalents sont rajoutés à des intervalles d'une heure. Cependant, lorsque l'ouverture doit être sélective, seul un équivalent est utilisé [28]. Un équivalent d'hydroxyde de baryum correspond à deux équivalents d'ion hydroxyde. Ces deux équivalents sont nécessaires. Le mécanisme que nous proposons suggère que les hydroxydes servant à l'ouverture du carbamate soient restitués lors de la reprotonation de l'amine (Cf. Fig. 34).

29 Kumar, V. ; Remers, W. A. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 3327.

61 Kumar, V. ; Jones, G. S. ; Blacksberg, I. ; Remers, W.A. *J. Med. Chem.* **1980**, 23, 42.

28 Sharma, M. N. ; Kumar, V. ; Remers, W. A. *J. of Antibiotics* **1982**, 35, 905.

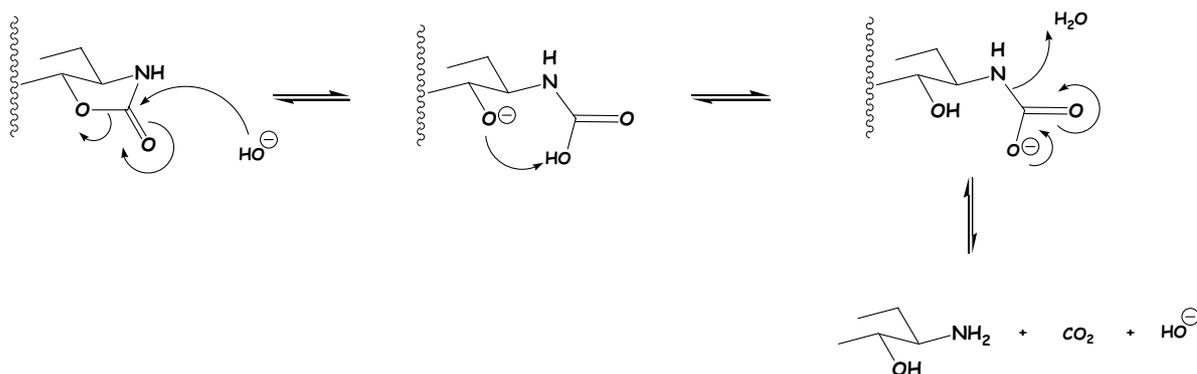


Figure 34 : Mécanisme réactionnel de l'ouverture d'un carbamate par un ion hydroxyde.

Il y a globalement consommation et restitution des hydroxydes. Par contre, les ions hydroxydes peuvent réagir avec le dioxyde de carbone, qui est acide. Les équilibres acido-basiques faisant intervenir le dioxyde de carbone montrent que deux équivalents d'hydroxyde sont consommés par un équivalent de dioxyde de carbone formé lors de la réaction (Cf. Fig. 35).

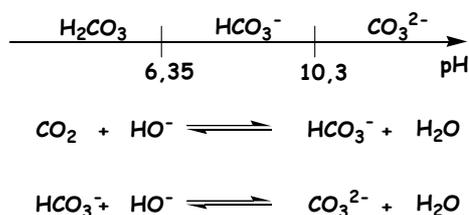


Figure 35 : Equilibres acido-basiques mettant en jeu le dioxyde de carbone.

Nous avons observé la précipitation de carbonate de baryum lors de la réaction. Ce sel est très peu soluble, même dans l'eau ($K_s = 0,02 \text{ g.L}^{-1}$). Sa précipitation déplace donc les équilibres jusqu'à ce que l'équivalent de CO_2 libéré ait consommé les deux équivalents d'hydroxyde régénérés. Un seul équivalent d'hydroxyde de baryum est donc nécessaire et suffisant pour que l'ouverture du carbamate ait lieu.

Il est à noter, que nous avons observé une fois, en travaillant à plus grande échelle, la formation d'un produit secondaire (composé 18, rdt = 3 %) que nous avons trouvé intéressant. Son étude complète en RMN et un spectre de masse nous ont permis de savoir qu'il s'agissait du composé formé par l'ouverture du carbamate du réactif de départ par le produit lui même (Cf. Fig. 36).

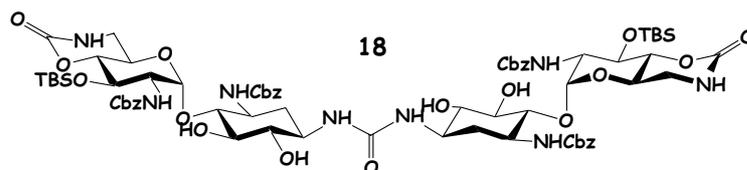


Figure 36 : Sous-produit de la réaction d'ouverture du carbamate à 5 chaînons.

Cette réaction pourrait donner accès au dimère le plus court possible, n'ayant que deux chaînons sur le bras espaceur.

V DETERMINATION DES STRUCTURES PAR RMN

Dans la littérature, la description des spectres RMN des produits dérivés de la néamine est incomplète voire inexistante, en partie parce que certaines publications sont anciennes, mais également car de nombreux groupes n'ont pas cherché à attribuer les signaux. Nous nous sommes donc spécialement étendus sur la détermination des structures afin de caractériser pleinement les produits et d'être sûr de la transformation réalisée. Il est particulièrement délicat de caractériser la modification sélective de fonctions sur des structures aussi complexes et polyfonctionnelles que celles de la néamine et ses dérivés. La RMN s'est avérée être un outil de choix pour ces caractérisations de structure, et pour favoriser cela, nous avons utilisé un spectromètre à 500 MHz. Les spectres ont été réalisés à température ambiante, sauf indication contraire.

V.1 Néamine *tétra*-protégée par des groupements Cbz

Le composé *tétra*-protégé par des Cbz est décrit de façon très incomplète [6] et les références plus anciennes ne décrivent pas de spectres.

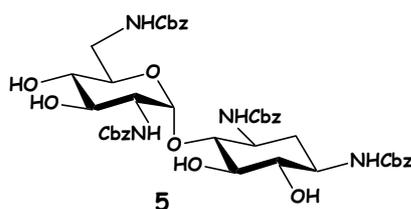
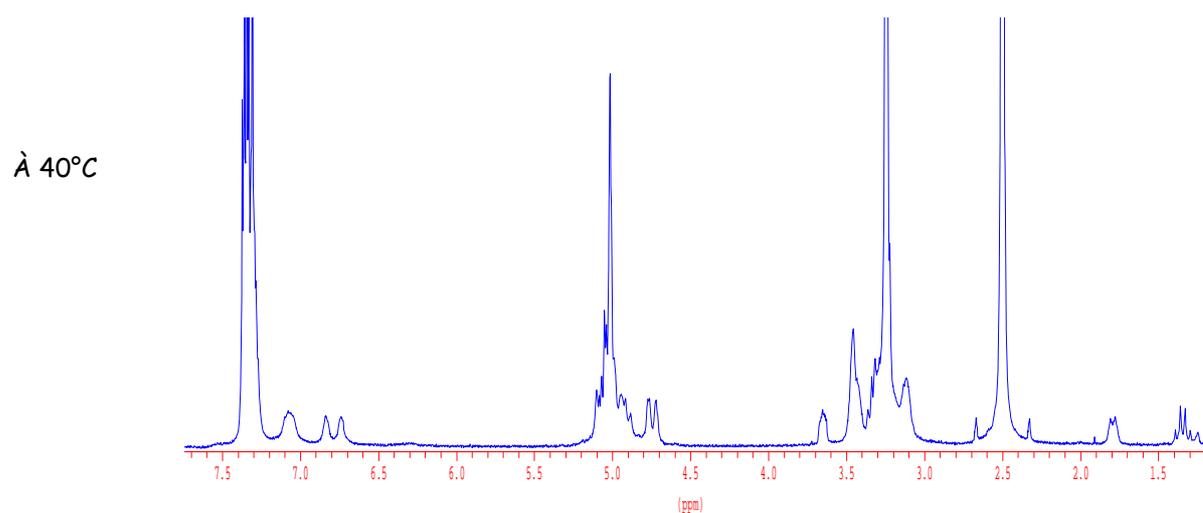
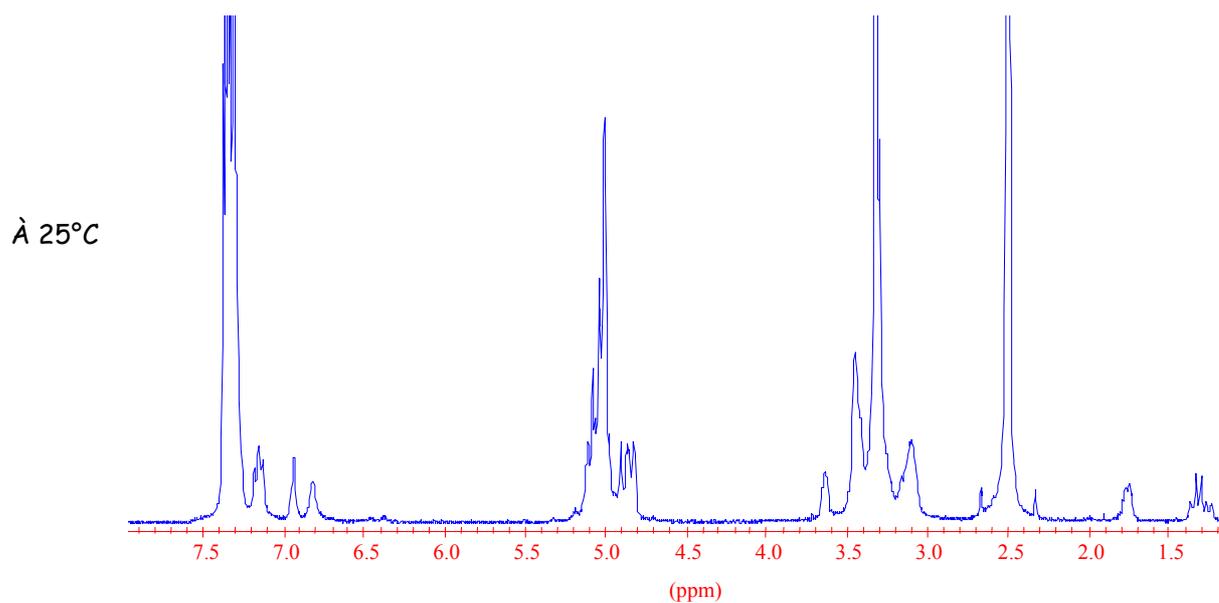
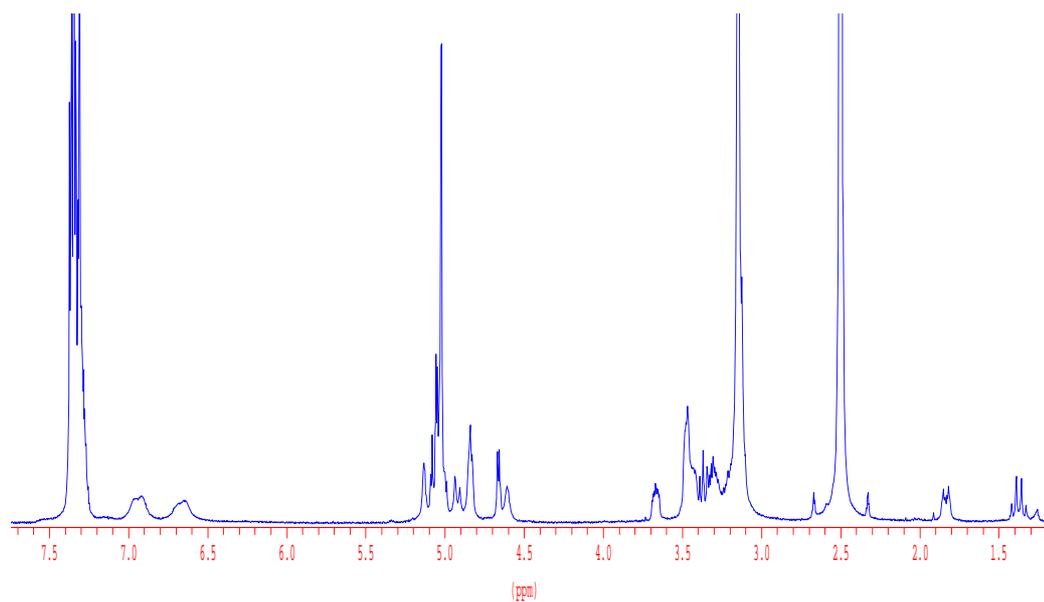


Figure 37 : Composé *tétra*-protégé par des groupements Cbz.

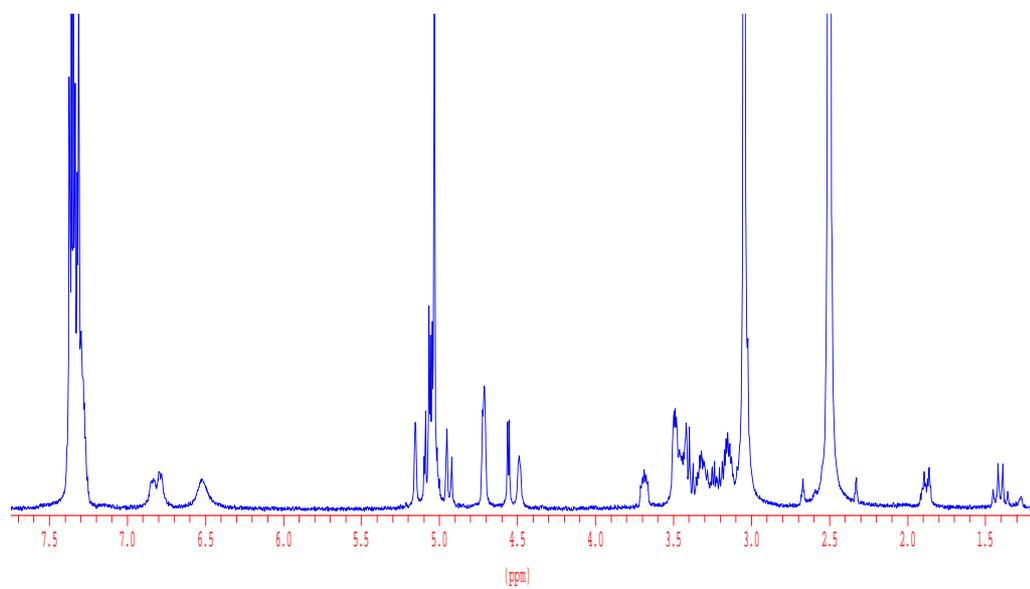
Nous avons obtenu un spectre RMN ^1H dans le DMSO- d_6 , seul solvant capable de le solubiliser. Curieusement, dans tous les essais, le spectre est très mal résolu à température ambiante. La structure du produit avec ses quatre fonctions carbamate nous a laissé penser que plusieurs rotamères pouvaient coexister en solution à température ambiante. Nous avons donc vérifié cette hypothèse grâce à une série d'expériences RMN à différentes températures (Cf. Fig. 38).



À 60°C



À 80°C



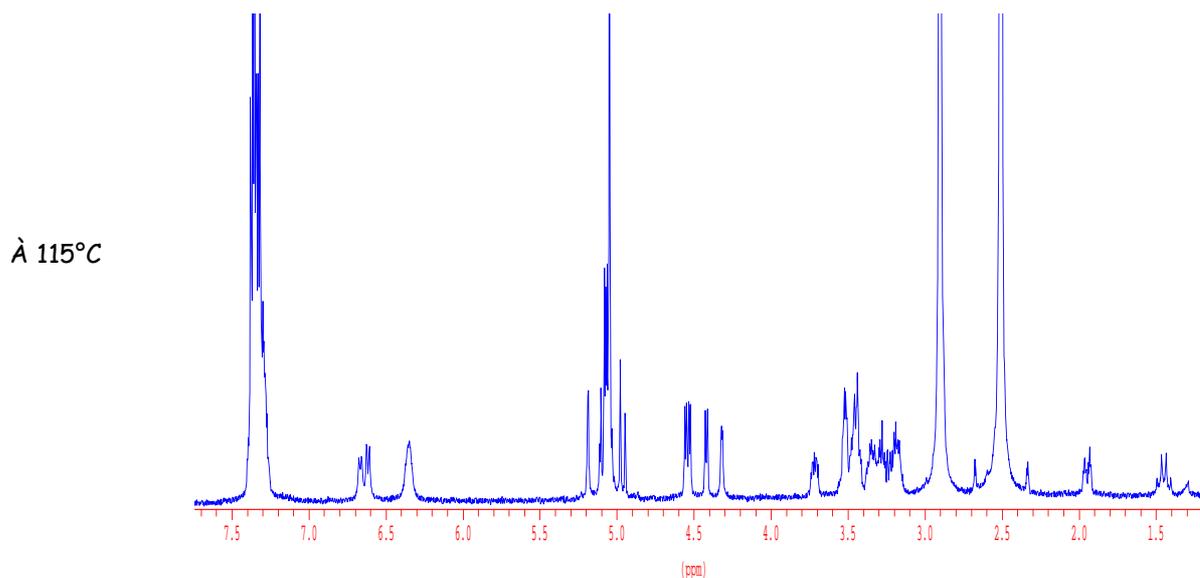


Figure 38 : Evolution en fonction de la température du spectre RMN ^1H de la néamine *tétra*-protégée par des groupements Cbz dans le DMSO- d_6 .

Au fur et à mesure que la température augmente, la résolution du spectre s'améliore. Globalement, les signaux se déplacent et se séparent. Les bosses donnent lieu à des signaux plus fins. Les multiplicités commencent à apparaître à partir de 60°C, mais il a fallu chauffer jusqu'à 115°C pour pouvoir en observer un maximum. Le spectre à 115°C est bien résolu et correspond effectivement à un seul produit, confirmant la présence de plusieurs isomères de conformation. Ces isomères sont appelés des rotamères. Ils découlent du fait que chacune des quatre fonctions carbamate possède deux isomères de rotation séparés par une haute barrière énergétique (Cf. Fig. 39). La rotation autour de la liaison C-N de la fonction carbamate est extrêmement lente à température ambiante à cause de son caractère de double liaison. Certains conformères peuvent être plus ou moins stabilisés par des liaisons intra et/ou intermoléculaires. A 115°C, l'agitation thermique est telle que la rotation autour de la liaison C-N des carbamates s'effectue suffisamment rapidement pour que seule une conformation moyenne apparaisse sur le spectre.

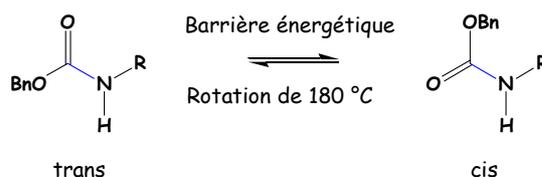


Figure 39 : Les conformères de la fonction carbamate.

Il n'a pas été possible d'effectuer les spectres RMN 2D à 115°C, mais il est tout de même possible d'attribuer certains signaux du spectre RMN ^1H à 115°C. On reconnaît aisément le signal en forme de quadruplet (doublet deux fois dédoublé) à 1,45 ppm qui correspond au proton 2ax, ainsi que le signal de son homologue 2éq à 1,95 ppm (ddd). Viennent ensuite 10 protons portés par les deux cycles sous forme d'une série de multiplets compris entre 3,14 et 3,56 ppm. Le proton 5' se détache de ce massif à 3,72 ppm, il est reconnaissable par sa forte multiplicité (ddd) qui entraîne sa petite hauteur. Les quatre alcools apparaissent ensuite sous forme de doublets respectivement à 4,31 , 4,41 , 4,52 et 4,55 ppm. Les huit protons des CH_2 benzyliques sont tous situés dans la zone 4,95 – 5,11 ppm et forment quatre systèmes AB dont certains sont bien visibles. Le proton anomérique 1' résonne à 5,19 ppm, sous forme d'un doublet ayant une constante de couplage de 2,8 Hz. Deux amines sont confondues à 6,35 ppm, les deux autres sortent à 6,61 et 6,66 sous forme de large doublet à cause du moment magnétique de l'azote. Finalement, les protons aromatiques des groupements Cbz (20 protons) forment un massif entre 7,27 et 7,39 ppm.

Un spectre RMN ^{13}C à température ambiante montre également la présence des groupements Cbz. Par contre, deux d'entre eux ont sûrement un entourage très similaire car leurs signaux sont superposés (ils ont des intensités plus importantes notées par un I en exposant). Les carbonyles sont visibles à 155,8^I , 156,2 et 156,6 ppm. Les carbones tertiaires aromatiques apparaissent à 127,4^I , 127,8^I et 128,4^I ppm, et les aromatiques quaternaires sortent à 137,0 , 137,2 et 137,3^I ppm. Finalement, les CH_2 benzyliques résonnent à 65,2 , 65,3 et 65,4^I ppm.

V.2 Dérivé ayant deux carbamates cycliques

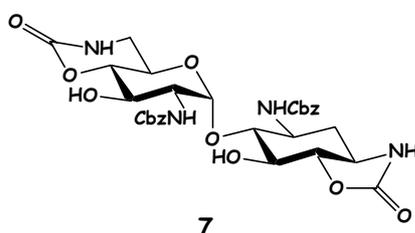


Figure 40 : Le composé ayant deux carbamates cycliques.

Le composé ayant deux carbamates cycliques ainsi que son analogue entièrement benzylé ne sont pas décrits dans la littérature, car les publications sont anciennes. Nous

n'avons pas pu attribuer tous les protons car les spectres ne sont pas suffisamment éclatés et résolus pour permettre une lecture des spectres 2D. Nous avons décrit le spectre ^1H du composé dicarbamate cyclique en n'attribuant que les protons évidents (spectre ^1H dans le méthanol deutérié).

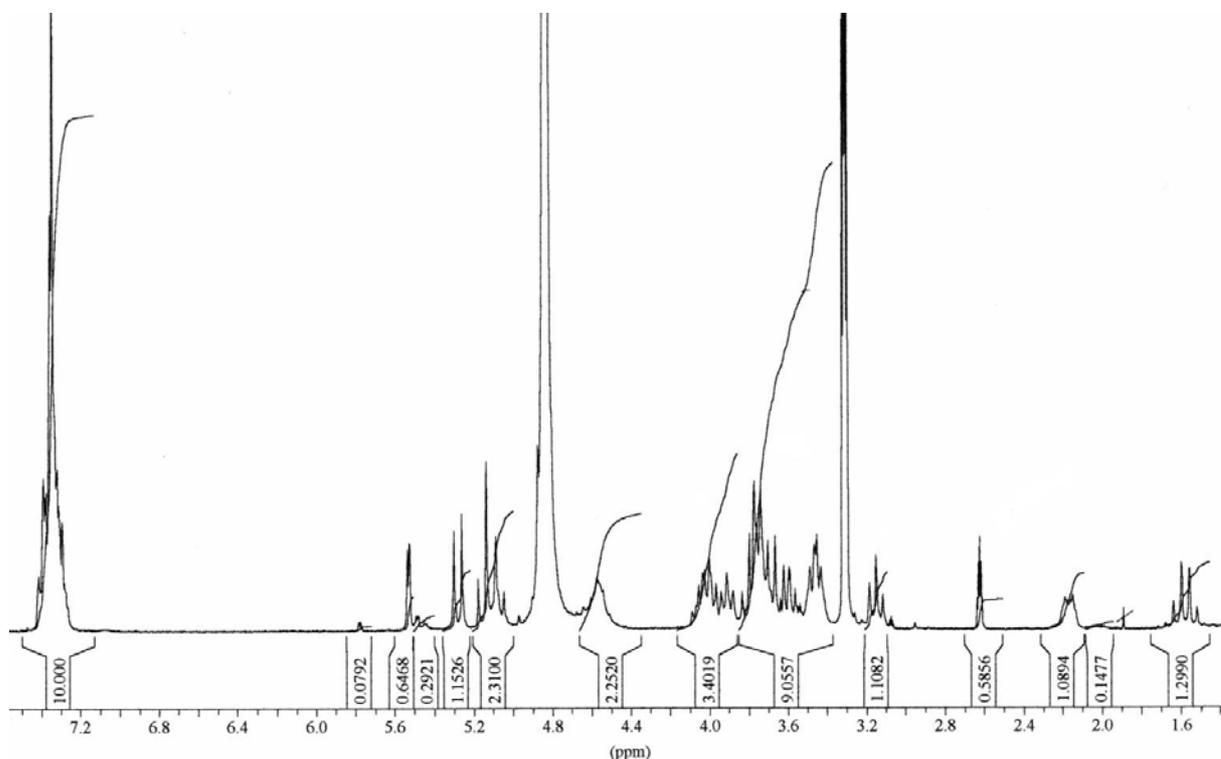


Figure 41 : Spectre ^1H du composé dicarbamate cyclique dans le méthanol deutérié.

De même que précédemment, on reconnaît le pseudo quadruplet à 1,58 ppm qui correspond au proton 2ax, ainsi que le « doublet de triplets » de son homologue 2éq à 2,17 ppm (ddd). Un proton cyclique plus blindé se détache sous forme d'un triplet à 3,15 ppm, alors que les 10 autres protons portés par les deux cycles apparaissent sous forme de trois massifs respectivement à 3,46 ppm (2H), entre 3,56 et 3,83 ppm (5H) et entre 3,88 et 4,10 ppm (3H). Les quatre doublets des CH_2 benzyliques sont tous situés dans la zone 4,80 – 5,30 ppm (3H). Les quatre doublets des CH_2 benzyliques sont tous situés dans la zone 4,80 – 5,30 ppm et le proton anomérique résonne à 5,53 ppm sous forme d'un doublet ayant une constante de couplage de 2,9 Hz. Finalement, les protons aromatiques des groupements Cbz (10 protons) forment un massif entre 7,32 et 7,39 ppm.

En revanche, nous avons entièrement pu attribuer les signaux des spectres des produits **14**, **15**, **16**, qui permettent de vérifier *a posteriori* la structure du composé ayant deux carbamates cycliques.

V.3 Composé 14 : le dicarbamate cyclique protégé par un groupement TBS

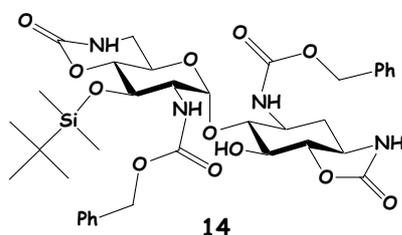


Figure 42 : Le dicarbamate cyclique protégé par un groupement TBS.

L'observation du spectre proton permet directement l'attribution des protons des groupements phényle (multiplet entre 7,28 et 7,42 ppm), ainsi que ceux du groupement *tert*-butyldiméthylsilyle avec deux singulets à 0,13 et 0,20 ppm pour les deux méthyles et un singulet à 0,87 pour le groupe *tert*-butyle. Le proton anomérique est aussi caractéristique avec son doublet à 5,57 ppm ($J = 3,6$ Hz). Les protons CH_2 benzyliques sont également localisés aux alentours de 5 ppm. Les protons restants sont étalés dans la zone 1,5 à 4,1 ppm. Ils sont pour la plupart isolés, ou ont un enchevêtrement facilement décryptable, à l'exception de deux massifs intégrant chacun pour deux protons.

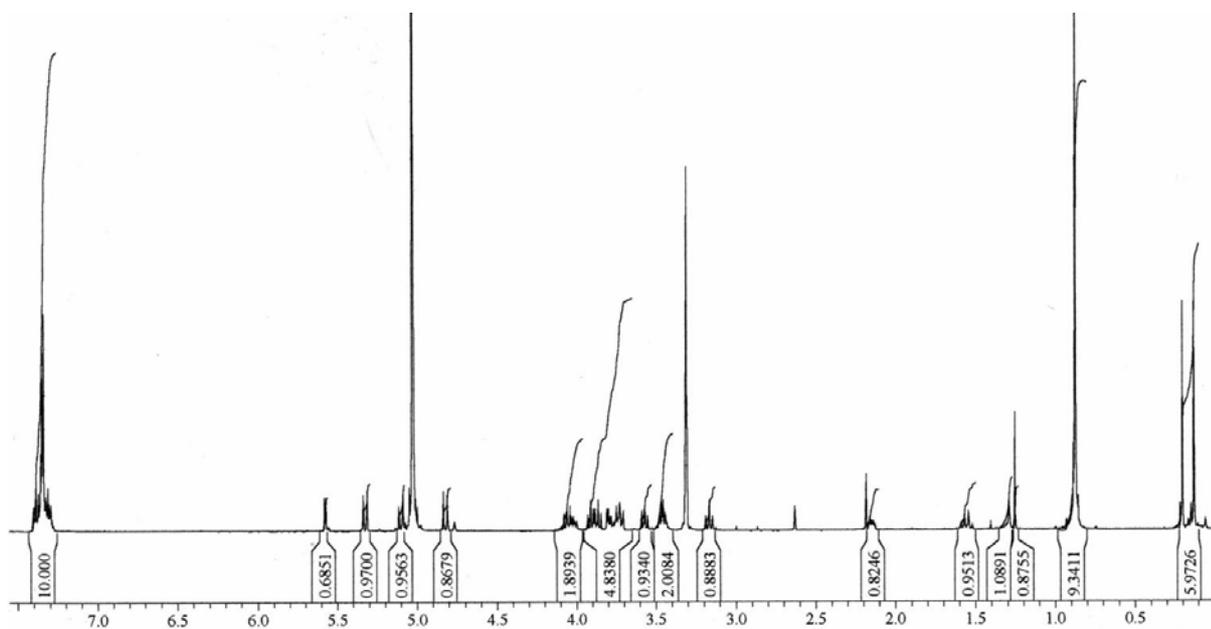


Figure 43 : Spectre 1H du composé 14 dans le CD_3OD .

La molécule comprend trois types de protons CH₂. Ceux-ci peuvent être attribués par les corrélations courte distance ¹H-¹³C sur le spectre HSQC. En effet, le spectre correspondant montre que quatre carbones sont corrélés à deux protons à la fois : ils sont placés respectivement à 33,4 ppm, 44,2 ppm et 67,9 ppm. Ils peuvent être attribués au vu de leur déplacement chimique dans l'ordre suivant : CH₂ du 2-DOS (2), CH₂ en alpha de l'amine primaire (6') puis les CH₂ des groupements Cbz (superposés). Ces derniers peuvent également être facilement identifiés sur le spectre COSY : les CH₂ des groupements Cbz corréleront deux à deux entre eux, mais ne corréleront pas avec d'autres protons.

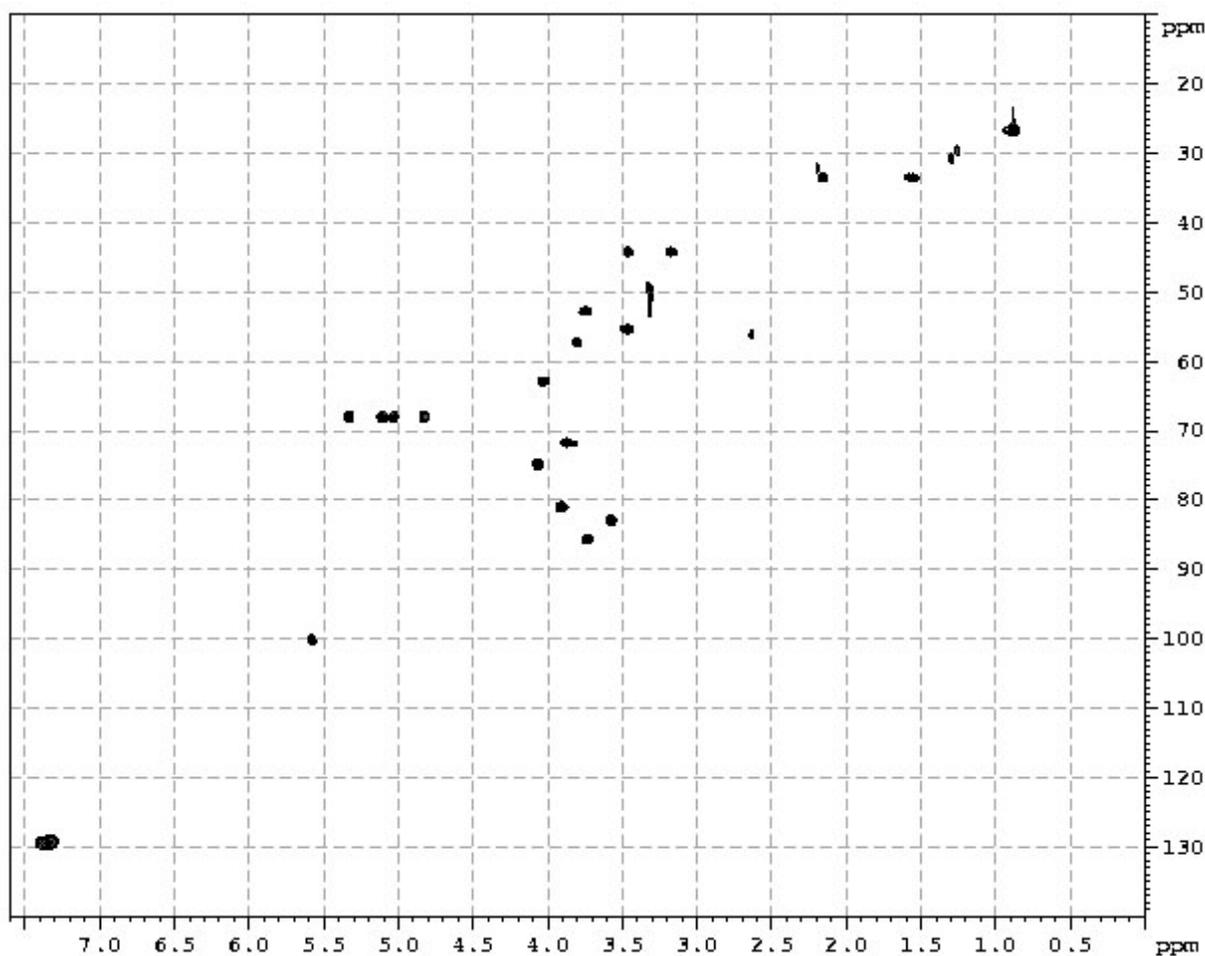


Figure 44 : Spectre HSQC du composé 14 dans le CD₃OD.

Les protons du cycle aminoglycosidique sont ensuite attribués grâce au spectre COSY (Cf. Fig. 45) de la façon suivante. En partant du proton anomérique (1') connu, et en suivant les corrélations, le proton 2' est identifié à 3,76 ppm, puis le proton 3' à 3,86 ppm, le proton 4' à 3,91 ppm, et enfin le proton 5' à 4,02 ppm. Ces différentes corrélations sont visibles sur

des agrandissements, car ces protons sont tous très proches. La corrélation entre le proton 5' et les deux protons 6' permet de retrouver les protons 6', déjà identifiés sur le spectre HSQC.

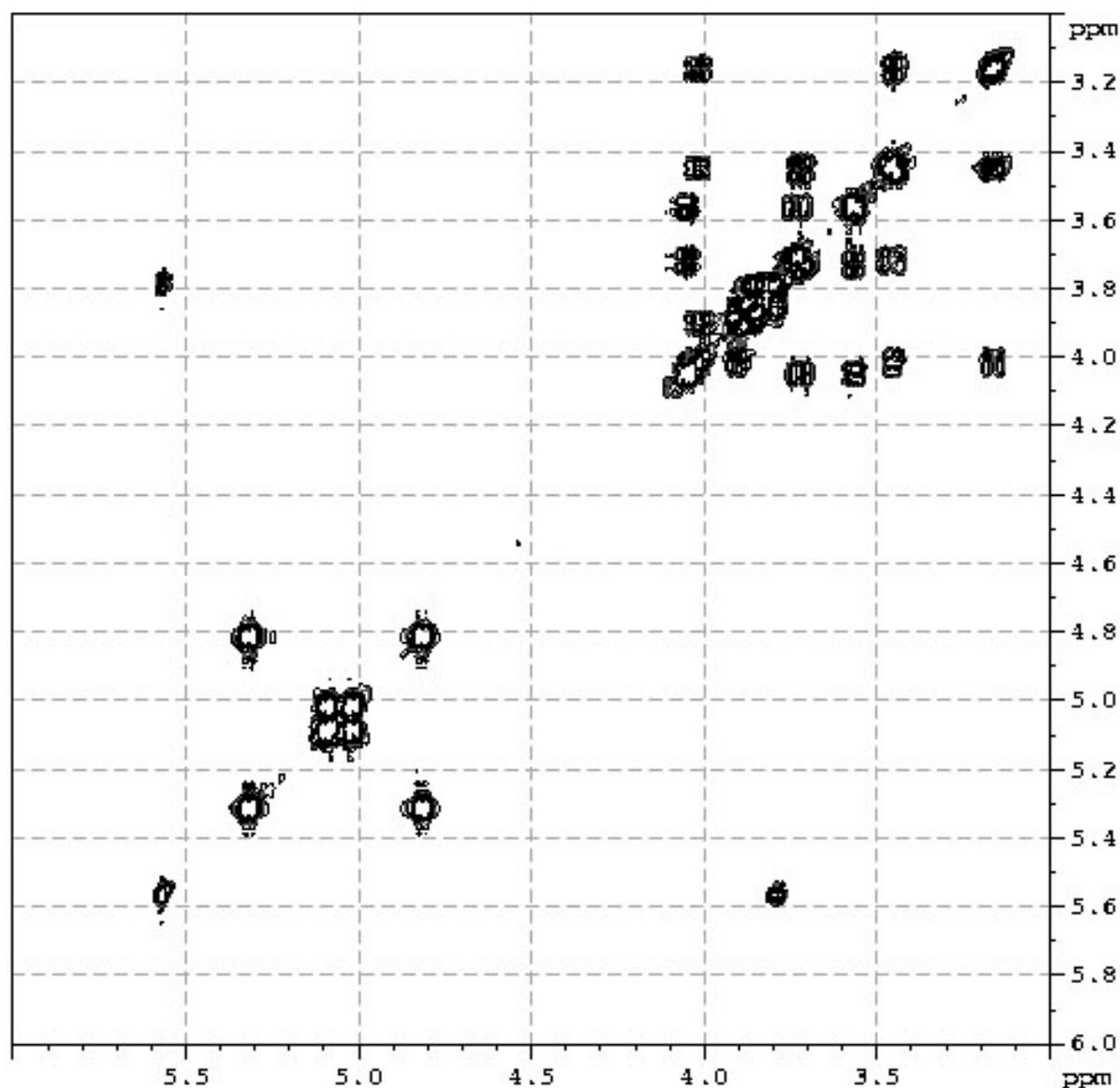


Figure 45 : Agrandissement du spectre COSY du composé 14 montrant les corrélations du cycle aminoglycosidique.

L'interprétation du cycle 2-DOS est plus difficile à cause de la symétrie de la 2-déoxystreptamine. En effet, les corrélations sur le spectre COSY, avec pour point de départ les protons 2ax et 2_{éq}, déjà identifiés, permettent d'attribuer les autres protons avec cependant deux inconnues : il y a deux protons qui peuvent être attribués aux protons 1 ou 3 et deux autres qui peuvent être attribués aux protons 4 ou 6 (Cf. Fig. 46).

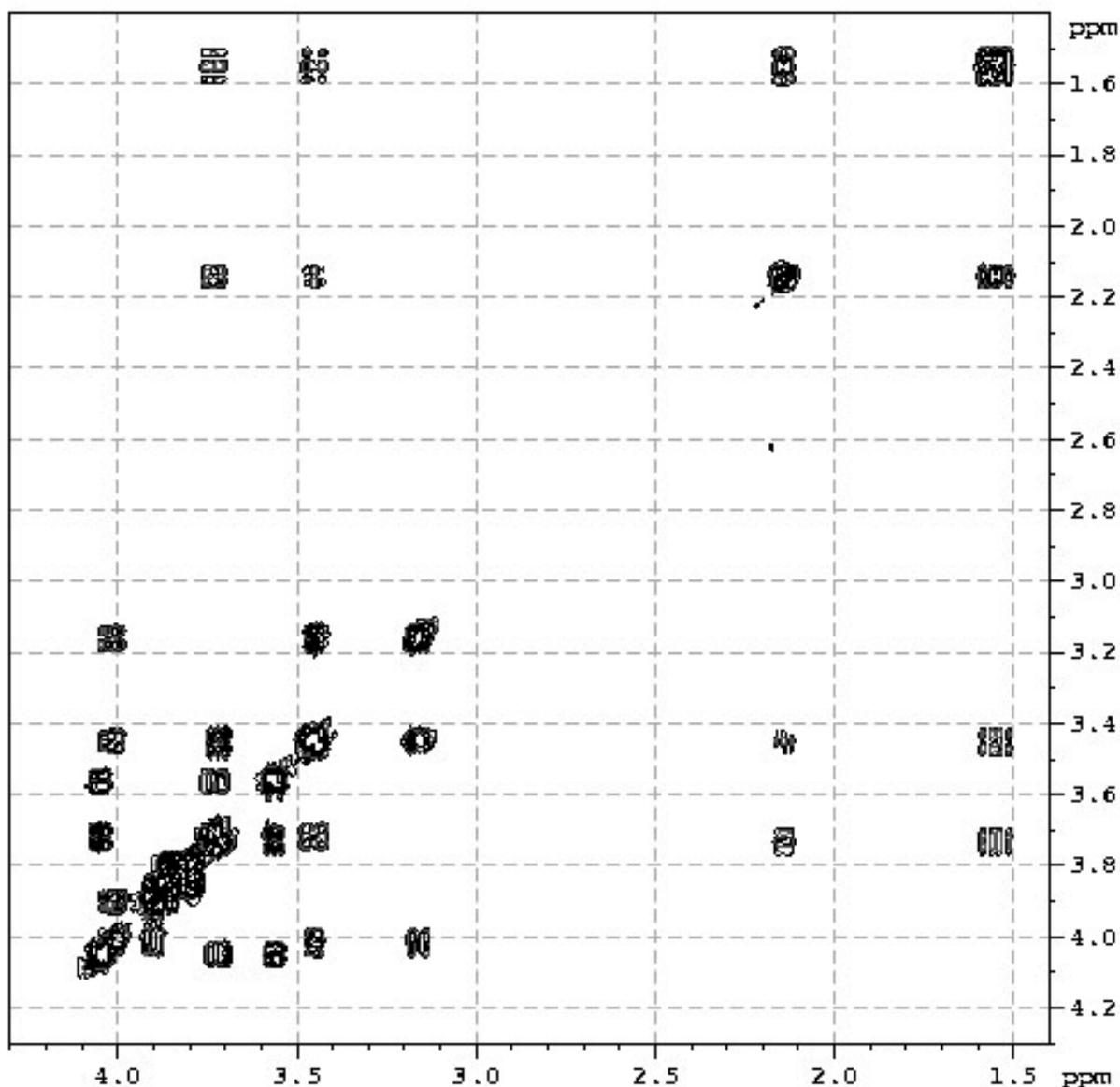


Figure 46 : Agrandissement du spectre COSY du composé 14 montrant les corrélations du cycle 2-DOS.

Les protons 2ax et 2éq corrélient d'une part avec un proton à 3,72 ppm (1 ou 3), qui corréle lui-même avec un proton à 3,57 ppm (4 ou 6). D'autre part, les protons 2ax et 2éq corrélient avec un autre proton (1 ou 3) à 3,45 ppm, au même déplacement chimique qu'un des protons 6'. Or les corrélations du proton 6' sont déjà résolues, la corrélation restante est donc attribuée au proton « 1 ou 3 ». Le proton « 1 ou 3 » placé à 3,45 ppm corréle donc avec un proton « 4 ou 6 » placé à 3,72 ppm, c'est à dire au même déplacement chimique que le second proton « 1 ou 3 ».

A ce stade, il est nécessaire d'attribuer les carbones à partir des protons connus par la l'analyse du spectre HSQC. Tous les carbones sont ainsi attribués, sauf pour les carbones en

« 1 ou 3 » et « 4 ou 6 ». Le carbone correspondant au proton « 1 ou 3 » placé à 3,45 ppm peut être attribué malgré le fait que son proton soit superposé à un proton 6', car le carbone 6' est déjà connu. Cependant, comme deux protons « 1 ou 3 » et « 4 ou 6 » sont superposés, il y a deux possibilités pour attribuer leurs carbones respectifs. Ces deux possibilités seront maintenues malgré la levée de l'inconnue « 1 ou 3 ».

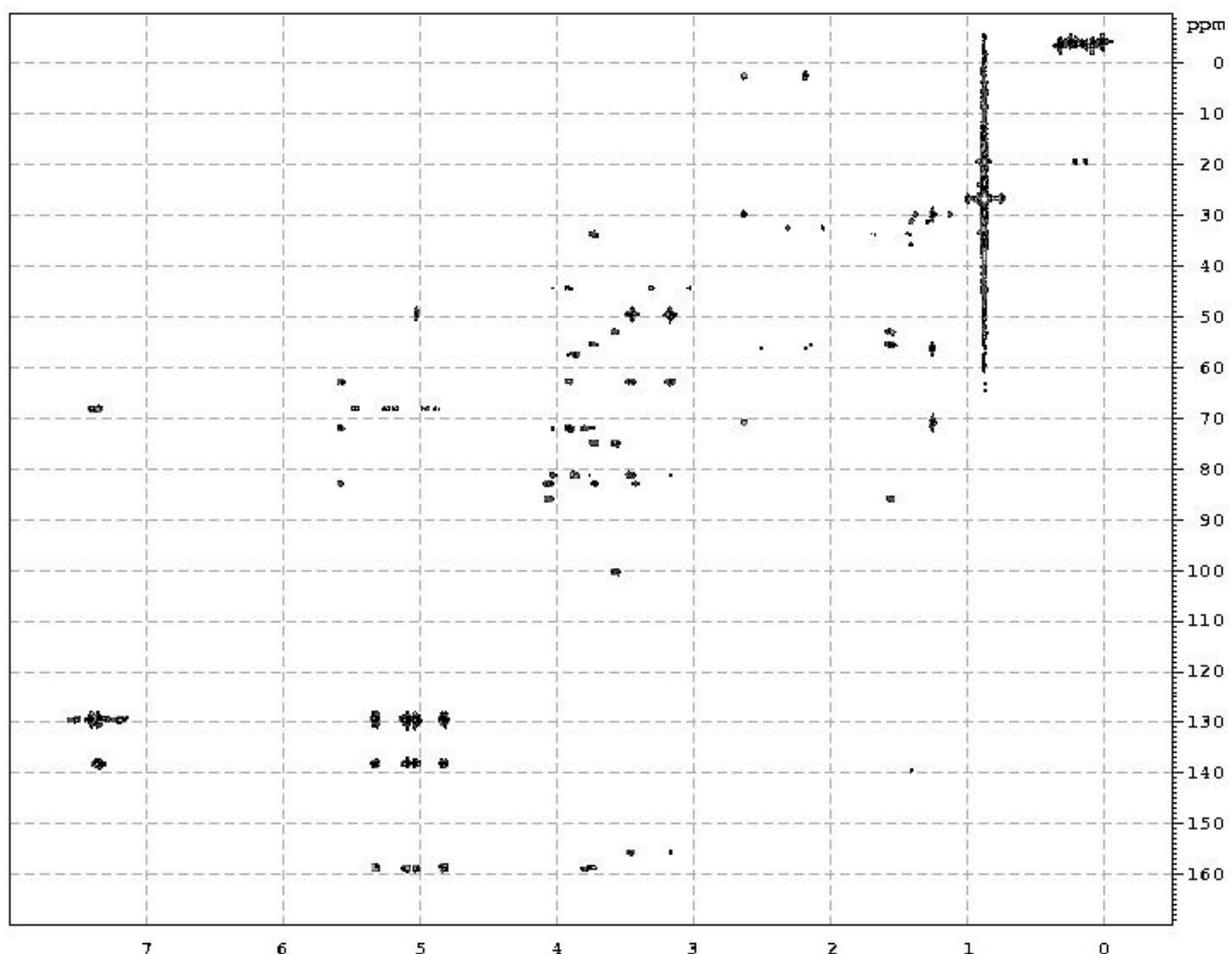


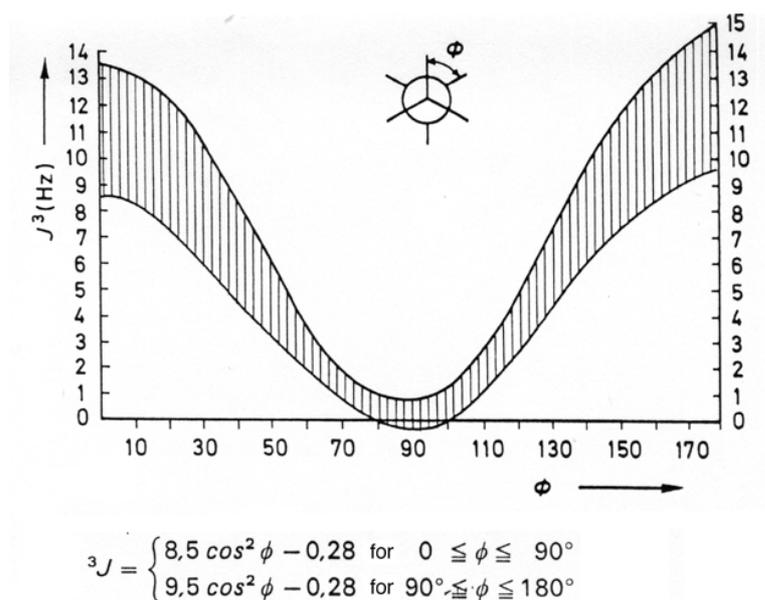
Figure 47 : Spectre HMBC du composé 14 dans le CD₃OD.

Une expérience de corrélation ^1H - ^{13}C longue distance HMBC permet de lever les incertitudes « 1 ou 3 » et « 4 ou 6 » liées à la symétrie du 2-DOS. Cette symétrie est levée grâce à la corrélation longue distance, à travers la liaison glycosidique, entre le carbone 1' du cycle I et le proton 4 du cycle 2-DOS. De plus, un agrandissement de la zone des carbonyles du spectre HMBC permet de distinguer les deux carbonyles de Cbz et de vérifier qu'ils corrélaient avec les protons 2' et 3 : les groupements Cbz sont bien portés par les amines en 2' et 3. De même, la lecture du spectre HMBC permet de vérifier que le carbamate cyclique est

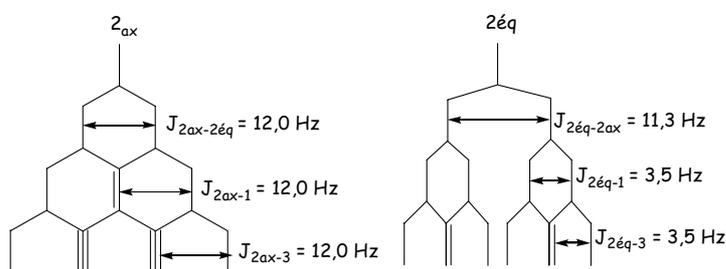
porté par l'amine en position 6'. Sa corrélation avec le proton 4' est absente pour les raisons déjà invoquées (Cf. § IV.4).

Il ne persiste alors plus que l'inconnue concernant l'attribution des carbones 3 et 6 due à la superposition de ces deux protons sur le spectre ^1H et aussi sur le spectre HSQC. Les deux carbones sont situés à 52,9 et 85,6 ppm. Or, le carbone 3 porte une amine et le carbone 6 un alcool. Le plus déblindé est donc le carbone 6.

D'autres informations utiles peuvent encore être obtenues par l'examen des spectres. La faible constante de couplage du proton anomérique (3,6 Hz) permet d'affirmer que la liaison glycosidique est bien en configuration α . La détermination des constantes de couplages des autres protons montre qu'elles sont toutes quasiment équivalentes et qu'elles sont élevées (comprises entre 7,9 et 12 Hz). Or, des protons en position trans diaxiale ont des constantes de couplage de l'ordre de 10-12 Hz. Les protons de notre molécule ont des constantes de couplage proches de celles attendues pour des positions trans diaxiales, ce qui signifie que les deux cycles présentent des configurations de type chaise légèrement déformées. On peut noter également que la constante de couplage du proton anomérique est plus élevée (3,6 Hz) que celle du composé dicarbamate cyclique non protégé (2,9 Hz). Or les constantes de couplage dépendent de l'angle entre les liaisons concernées (Cf. Courbe de Karplus : Fig. 48). Une déformation de la conformation chaise entraîne une diminution de l'angle dièdre entre les liaisons C-H_{1'} et C-H_{2'} qui devient inférieur à 60° et entraîne une augmentation de la constante de couplage. Le composé dicarbamate cyclique protégé présente donc sans doute une conformation de type chaise légèrement déformée par rapport à celle du dicarbamate cyclique non protégé. Ce résultat semble plausible puisque le groupement TBS est volumineux et qu'il est possible qu'il induise une légère déformation du cycle.


Figure 48 : Courbe de Karplus

En outre, les protons $2_{\text{éq}}$ et 2_{ax} sont attribués grâce à l'analyse de leurs constantes de couplage. Nous attendons pour chacun d'eux, un doublet deux fois dédoublé, mais ils doivent se distinguer par le fait que l'un est axial et l'autre équatorial. Toutes les constantes de 2_{ax} sont grandes (constante gem $J_{2_{\text{ax}}-2_{\text{éq}}}$ et des constantes entre des protons en position trans diaxiale $J_{2_{\text{ax}}-1}$ et $J_{2_{\text{ax}}-3}$) alors que $2_{\text{éq}}$ corrèle avec les protons 1 et 3 à travers des constantes cis axiales-équatoriales plus faibles ($J_{2_{\text{éq}}-1}$ et $J_{2_{\text{éq}}-3}$). Effectivement, nous observons d'une part un « quadruplet » à 1,56 ppm, résultant du fait que toutes les constantes de couplage sont égales, qui peut donc être attribué à 2_{ax} (Cf. Fig. 49). D'autre part, nous observons également un « doublet de triplets » à 2,15 ppm, résultant d'une grande constante de couplage (gem) et de deux plus petites égales entre elles ($J_{2_{\text{éq}}-1}$ et $J_{2_{\text{éq}}-3}$) (Cf. Fig. 49).


Figure 49 : Interprétation des multiplicités des protons 2_{ax} et $2_{\text{éq}}$.

En dernier lieu, l'analyse du spectre ROESY permet de vérifier la conformation chaise des deux cycles : les protons axiaux dirigés vers le haut corrélient tous entre eux, il en est de

même pour les protons axiaux orientés vers le bas, mais ces deux catégories de protons sont séparées d'un angle de 180° et ne corrélient pas entre elles.

L'analyse du spectre ROESY au niveau du groupement TBS permet de vérifier qu'il est bien placé sur l'alcool en $3'$. En effet, les groupements méthyle corrélient avec le proton en position $3'$ du cycle aminoglycosidique.

On remarque également que les deux groupements Cbz protégeant les amines en position 3 et $2'$ corrélient entre eux par leurs différents protons. Ces deux groupements sont proches dans l'espace et interagissent sûrement par π -stacking.

Par ailleurs, des corrélations entre protons des deux cycles apportent quelques informations concernant la disposition des cycles l'un par rapport à l'autre en solution. En particulier, le proton anomérique interagit avec les protons 4 et 5 et réciproquement, et, de même, le proton $5'$ voit le proton 4 et réciproquement (Cf. Fig. 50).

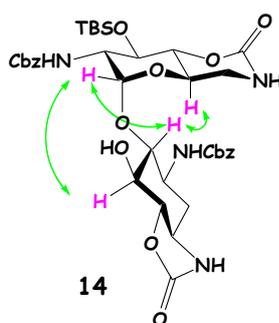


Figure 50 : Conformation permettant les interactions observées sur le spectre ROESY. Les deux groupements Cbz des amines en position 3 et $2'$ interagissent. Leur structure n'est pas dessinée afin de ne pas surcharger le dessin, mais les chaînes des groupements Cbz sont suffisamment souples pour qu'ils interagissent dans la conformation présentée ici.

V.4 Composé 16 : produit de décarboxylation du composé 14

La série de spectres ^1H , ^{13}C , COSY, ROESY, HSQC et HMBC a été réalisée dans le méthanol deutérié et l'étude a été menée de façon similaire à celle effectuée sur le composé 14.

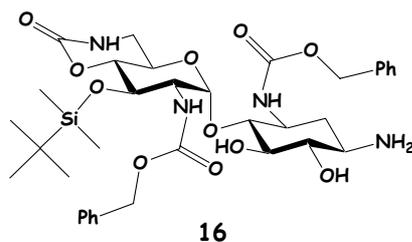


Figure 51 : Structure du produit de décarboxylation.

L'observation du spectre proton permet, comme précédemment, d'attribuer directement les protons des groupes phényle (multiplet entre 7,25 et 7,40 ppm), ainsi que ceux du groupement *tert*-butyldiméthylsilyle avec deux singulets à 0,13 et 0,20 ppm pour les deux méthyles et un singulet à 0,88 ppm pour le groupe *tert*-butyle. Le proton anomérique, caractéristique avec son doublet ($J = 3,8$ Hz) à 5,48 ppm est légèrement plus blindé que celui du composé 14. Les protons CH_2 benzyliques sont localisés aux alentours de 5 ppm. Les protons restants sont étalés dans la zone 1,2 à 4,1 ppm. Ils sont pour la plupart isolés, à l'exception de deux massifs intégrant, l'un pour trois protons et l'autre pour deux.

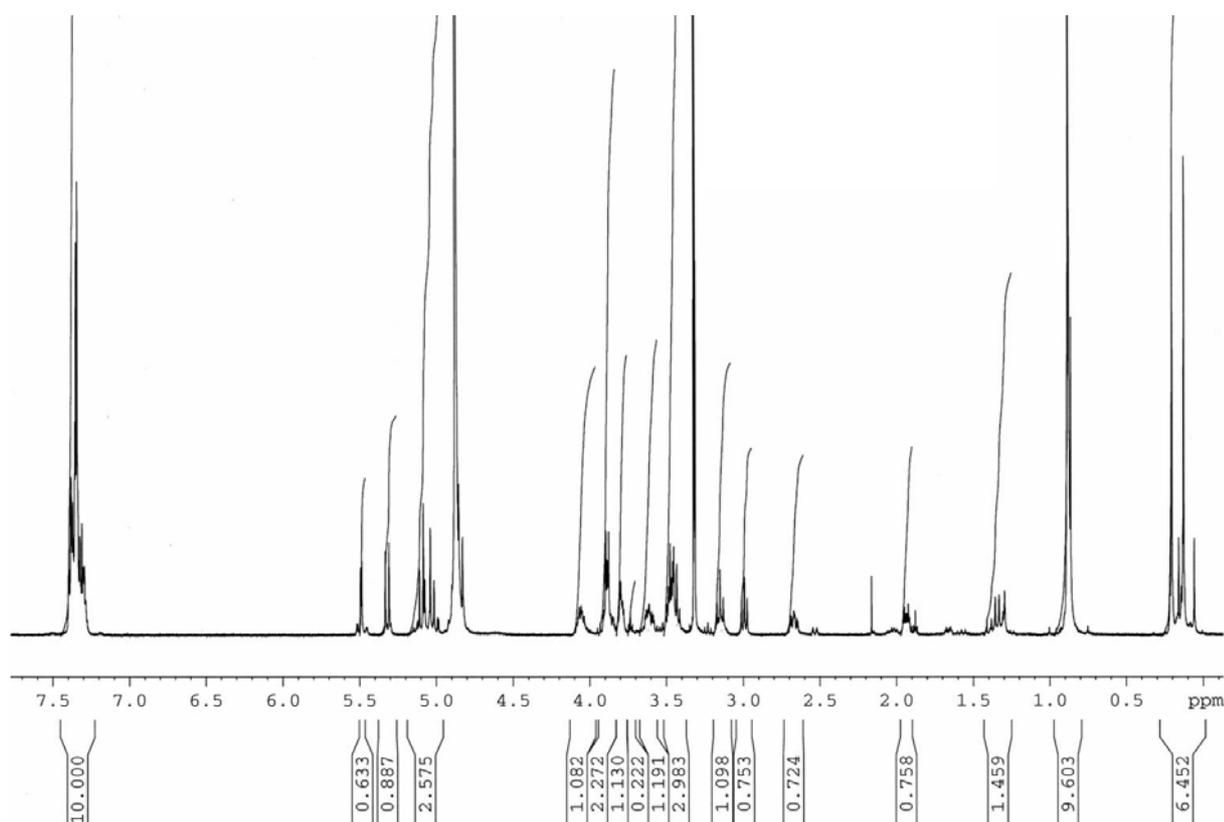


Figure 52 : Spectre 1H du composé 16 dans le CD_3OD .

Comme précédemment, les trois types de protons CH₂ peuvent être attribués grâce à l'analyse ¹H-¹³C HSQC. En effet, quatre carbones (36,0 ppm, 44,2 ppm, 67,7 et 67,8 ppm) corrélient avec deux protons à la fois. Ils correspondent respectivement, au vu de leur déplacement chimique, au CH₂ du 2-DOS (2), au CH₂ en alpha de l'amine primaire (6') et aux deux CH₂ des groupements Cbz (Cf. Fig. 53).

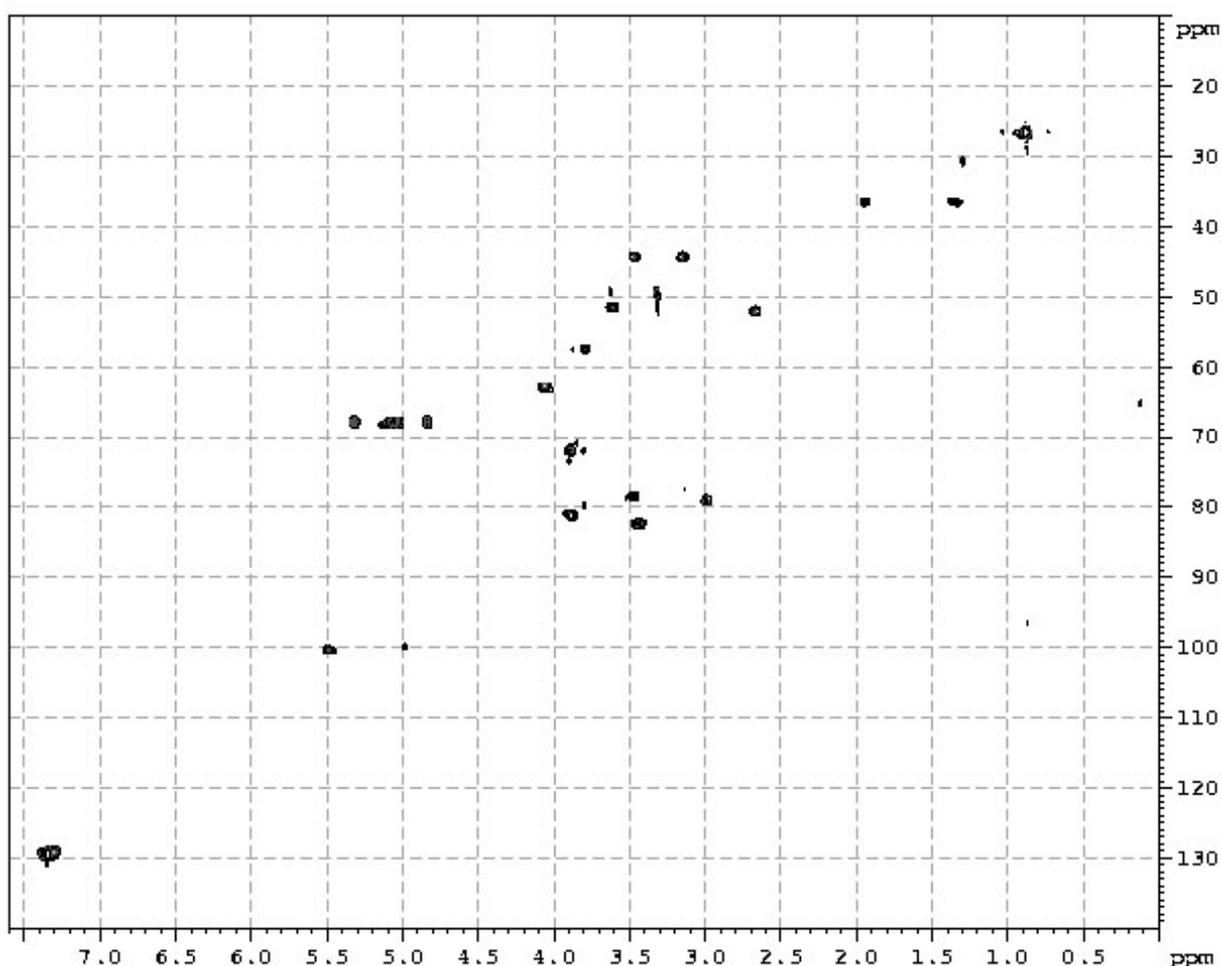


Figure 53 : Spectre HSQC du composé 16 dans le CD₃OD.

Le spectre COSY permet de confirmer l'attribution des CH₂ des groupements Cbz, mais également l'attribution des protons des cycles (Cf. Fig. 54). Le proton anomérique (1') connu, corréle avec le proton 2' à 3,80 ppm, qui lui-même corréle avec le proton 3' à 3,88 ppm. La même opération est ensuite effectuée à partir des protons 6', déjà identifiés sur le spectre HSQC, et permet d'attribuer le proton 5' à 4,06 ppm ainsi que le proton 4' à 3,88 ppm. Il s'avère que les protons 3' et 4' sont superposés, ce qui se vérifie à l'aide de l'intégration du spectre proton.

L'interprétation du cycle 2-DOS est plus difficile à cause de la symétrie de la molécule et conduit comme précédemment à l'incertitude « 1 ou 3 » engendrant l'incertitude « 4 ou 6 ».

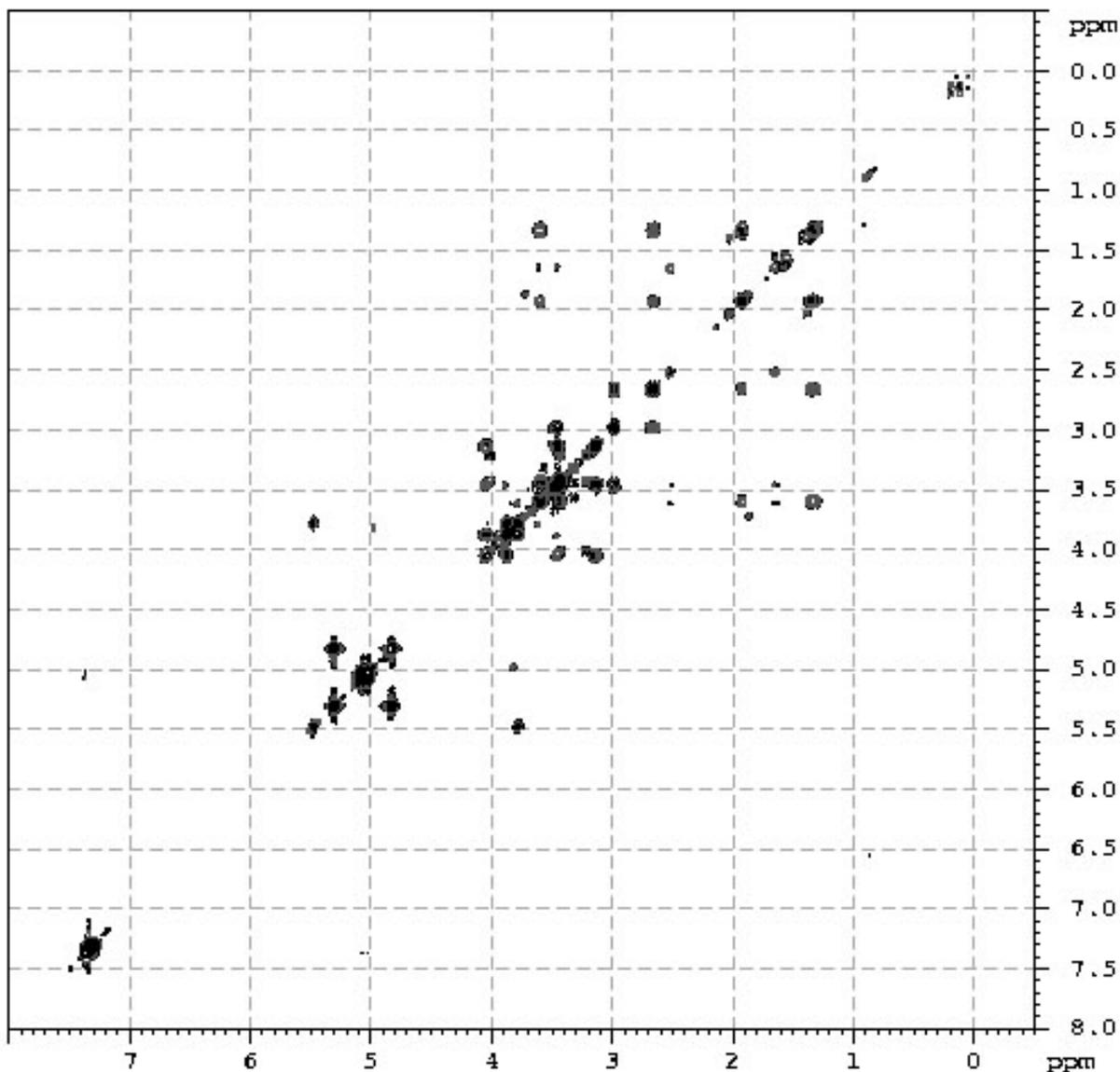


Figure 54 : Spectre COSY du composé 16 dans le CD₃OD.

Les attributions des protons permettent d'attribuer les carbones par l'analyse du spectre HSQC. Tous les carbones sont ainsi attribués à l'exception de ceux en 3' et 4'. En effet, les deux protons étant superposés, il y a deux possibilités pour attribuer leurs carbones respectifs.

Une expérience de corrélation ^1H - ^{13}C longue distance HMBC permet de lever toutes les incertitudes restantes (1 ou 3 / 4 ou 6) liées à la symétrie du 2-DOS. La corrélation longue

distance, à travers la liaison glycosidique, entre le proton 1' du cycle I et le carbone 4 du cycle 2-DOS permet d'identifier ce dernier. Finalement, un agrandissement de la zone des carbonyles du spectre HMBC permet de distinguer les deux carbonyles de Cbz et de vérifier qu'ils sont portés par les amines en 3 et 2'.

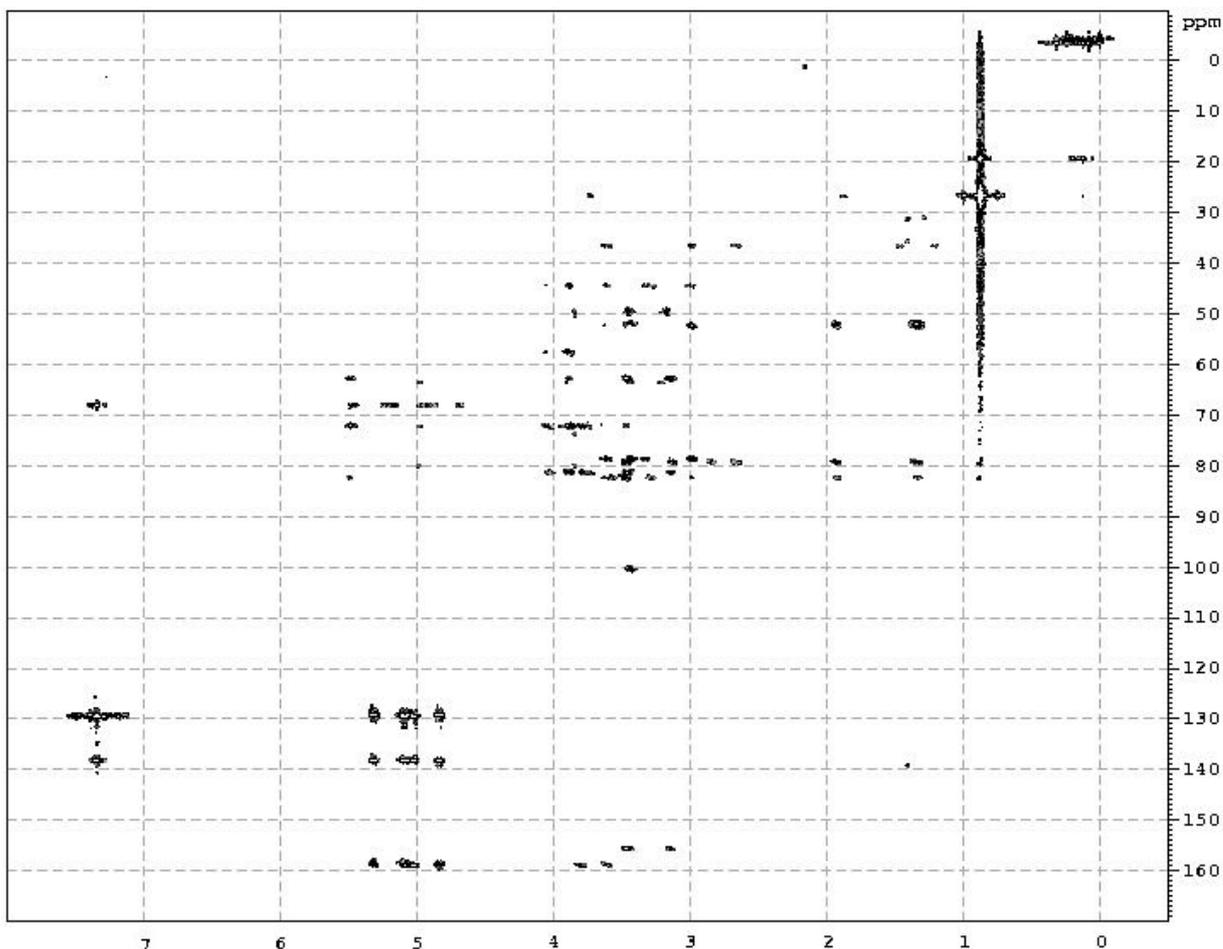


Figure 55 : Spectre HMBC du composé 16 dans le CD₃OD.

Par ailleurs, les constantes de couplage restent similaires à celles du composé 14. Le couplage anomérique (3,8 Hz) confirme la configuration α de la liaison glycosidique. Les constantes de couplages des autres protons (de l'ordre de 9-10 Hz) montrent à nouveau que les deux cycles ont une conformation chaise légèrement déformée.

Comme pour le composé précédent, les protons 2_{éq} et 2_{ax} sont attribués grâce à l'analyse de leurs constantes de couplage, l'un (2_{ax}) apparaissant sous forme d'un pseudo quadruplet à 1,34 ppm, et l'autre (2_{éq}) apparaissant sous forme « doublet de triplets » à 1,94 ppm (Cf. Fig. 56).

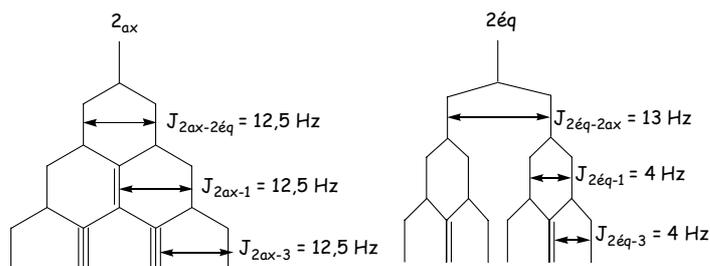


Figure 56 : Interprétation des multiplicités des protons 2ax et 2éq.

Curieusement, l'analyse du spectre ROESY permet de vérifier la conformation chaise des deux cycles, mais elle n'apporte pas d'information concernant la disposition des cycles l'un par rapport à l'autre, contrairement au spectre du produit **14**.

Une fois l'analyse de ces deux produits effectuée, il nous a semblé intéressant de les comparer, puisque le produit **16** est obtenu à partir du composé **14** par ouverture du carbamate cyclique.

V.5 Comparaison des composés **14** et **16** :

Les produits **14** et **16** sont très proches, puisqu'ils ne se distinguent que par la disparition du carbamate cyclique entre l'amine en position 1 et l'alcool en position 6 du cycle 2-DOS. L'observation du spectre RMN ^{13}C permet de remarquer tout de suite la disparition du carbamate par la disparition du carbonyle cyclique à 163,0 ppm. Dans un deuxième temps il est intéressant de comparer les déplacements chimiques en RMN des protons et carbones du cycle 2-DOS, le cycle I n'étant pas modifié (Cf. Fig. 57).

Protons	δ 14	δ 16	δ 14 - δ 16	Carbones	δ 14	δ 16	δ 14 - δ 16
H1	3,45	2,67	0,78	C1	55,2	52,1	3,1
H2ax	1,56	1,34	0,22	C2	33,4	36	-2,6
H2éq	2,15	1,94	0,21	C3	52,9	51,5	1,4
H3	3,72	3,61	0,11	C4	83,2	82,1	1,1
H4	3,57	3,43	0,14	C5	74,7	78,3	-3,6
H5	4,06	3,47	0,59	C6	85,6	79	6,6
H6	3,72	2,99	0,73				

Tableau 57 : Comparaison des déplacements chimiques des protons du cycle 2-DOS pour les produits **14** et **16**.

Tous les protons du cycle 2-DOS sont légèrement plus déblindés pour le composé 14, qui possède un carbamate cyclique électroattracteur. Comme on pouvait s'y attendre, les protons 1 et 6, situés respectivement au pied de l'amine et de l'alcool, impliqués ou non dans un carbamate cyclique selon le composé, sont les plus affectés. Ceci confirme bien que c'est le carbamate cyclique situé entre les positions 1 et 6 du cycle 2-DOS qui a été ouvert par l'hydroxyde de baryum.

La comparaison des déplacements chimiques des carbones confirme le blindage des atomes proches des fonctions concernées par la décarboxylation. On remarque, par contre, que la décarboxylation a déblindé les carbones adjacents 2 et 5.

VI BILAN

Après des tentatives peu fructueuses de protection temporaire des fonctions par des complexes de métaux de transition, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de groupements protecteurs de type carbamate cyclique. Ces derniers donnent lieu à une sélectivité, par l'exploitation du voisinage des fonctions amines. C'est ainsi que nous avons préparé le composé dicarbamate cyclique décrit par Remers *et al.* Ce dernier ne peut être décarboxylé convenablement, que si l'alcool en position 3' est protégé. Notre stratégie se distingue à ce niveau de celle de Remers *et al.* par l'utilisation d'un groupement silylé pour protéger l'alcool. Ce dernier présente l'avantage de redonner au produit une solubilité « classique » (c.a.d. permettant des extractions liquide-liquide et des purifications par chromatographie sur colonne de silice), mais il permet également de mieux distinguer les protons de la molécule en éclatant plus les spectres RMN ^1H . Ceci a permis l'analyse de corrélations en 2D, et la vérification du positionnement des carbamates, alors que les publications de Remers *et al.* ne décrivaient pas de RMN. Après des essais de protection de l'hydroxyle en 3' par des groupements TIPS, TBS et TES, et d'ouverture sélective du carbamate à cinq chaînons, nous avons opté pour une protection par un groupement TBS. Le schéma réactionnel pour accéder au composé souhaité est finalement le suivant (Cf. Fig. 58).

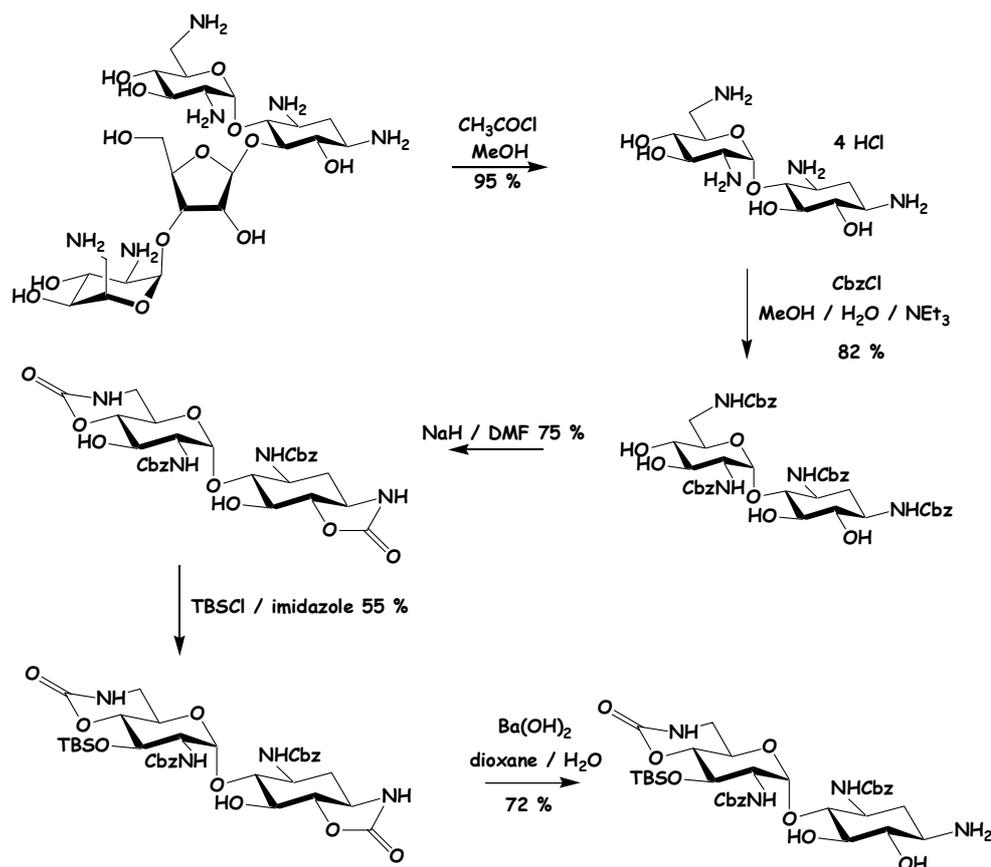


Figure 58 : Schéma réactionnel final pour la sélection de l'amine en position 1.

Ainsi, en seulement 5 étapes et avec un rendement global de 23 %, nous avons entre nos mains un dérivé de la néamine presque entièrement protégé et dont la seule amine libre est celle sur laquelle nous devons fixer le bras espaceur. Il reste deux hydroxyles libres, qui ne devraient pas poser de problèmes de compétition, puisque la fonction amine est plus nucléophile qu'eux.

Tout récemment, Chang *et al.* ont publié une nouvelle synthèse donnant accès à une molécule proche de la notre (amine en position 1 libre) [62] [63]. Leur approche repose sur la transformation des amines de la néamine en groupements azido, suivie d'une réduction de Staudinger sélective de l'amine en position 1 (Cf. Fig. 59).

62 Li, J ; Chen, H-N ; Chang, H. ; Wang, J. ; Chang, C.-W. T. *Org. Lett.* **2005**, 7, 3061.

63 Li, J. ; Wang, J. ; Czyryca, P. G. ; Orsak, T. W. ; Evanson, R. ; Chang, C ;-W. T. *Org. Lett.* **2004**, 6, 1381.

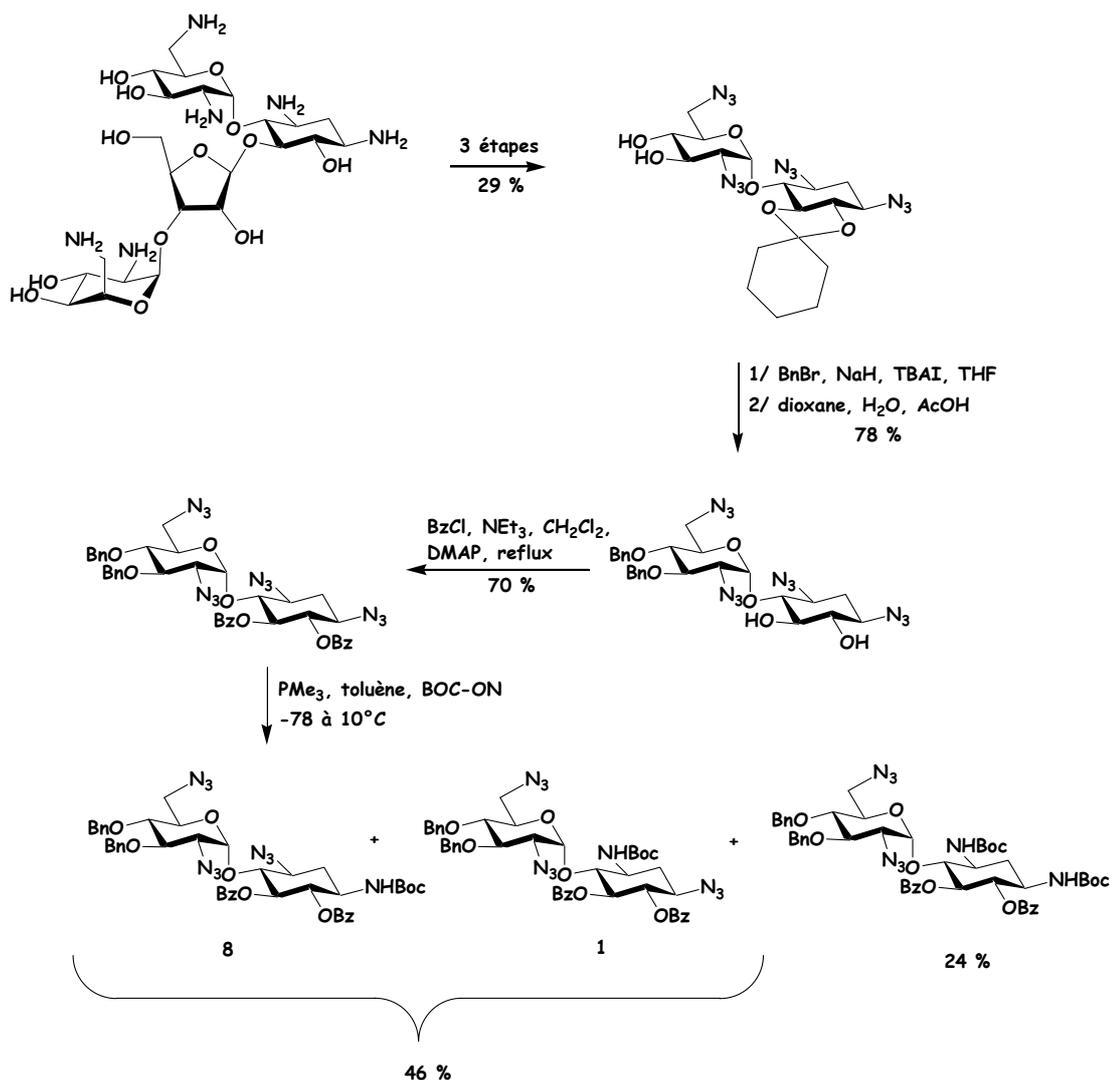


Figure 59 : Approche de Chang et al. pour la protection sélective de la néamine [62].

Cette réduction est sélective de cette amine seulement si les groupements hydroxyle sont protégés de telle sorte que seul l'azido en position 1 ait une réactivité augmentée par la proximité de groupements électroattracteurs. Leur approche est élégante, cependant, la sélectivité de la réduction de Staudinger reste réduite (obtention des différents produits de réduction dont l'un n'est pas séparable du produit souhaité) et elle nécessite 8 étapes. Le rendement global (6 % à partir de la néomycine) est faible à cause des rendements réduits des étapes de réduction de Staudinger et de protection par le groupement cyclohexylidène. Cette étape de protection conduit à seulement 41 % de produit, mais 47 % du réactif sont récupérés. Par conséquent, cette étape a un rendement fictif de 77 %, ce qui conduit à un rendement global de 12 %. Pour que cette approche soit intéressante dans le cadre d'une longue synthèse, il faudrait encore améliorer la sélectivité de la réaction de Staudinger.

Par ailleurs, l'approche de Mobashery *et al.* [11], également fondée sur des carbamates, est extrêmement longue (11 étapes à partir de la néomycine avec un rendement global de 29 %), car elle nécessite un très grand nombre d'étapes de protections et déprotections (Cf. Fig. 60). Il est à noter que l'étape de protection sélective du diol par un groupement cyclohexylidène conduit également au composé diprotégé qui peut être reconverti en dérivé *mono*-protégé. En intégrant ce recyclage et donc une étape de plus, les auteurs décrivent un rendement global de 29 %.

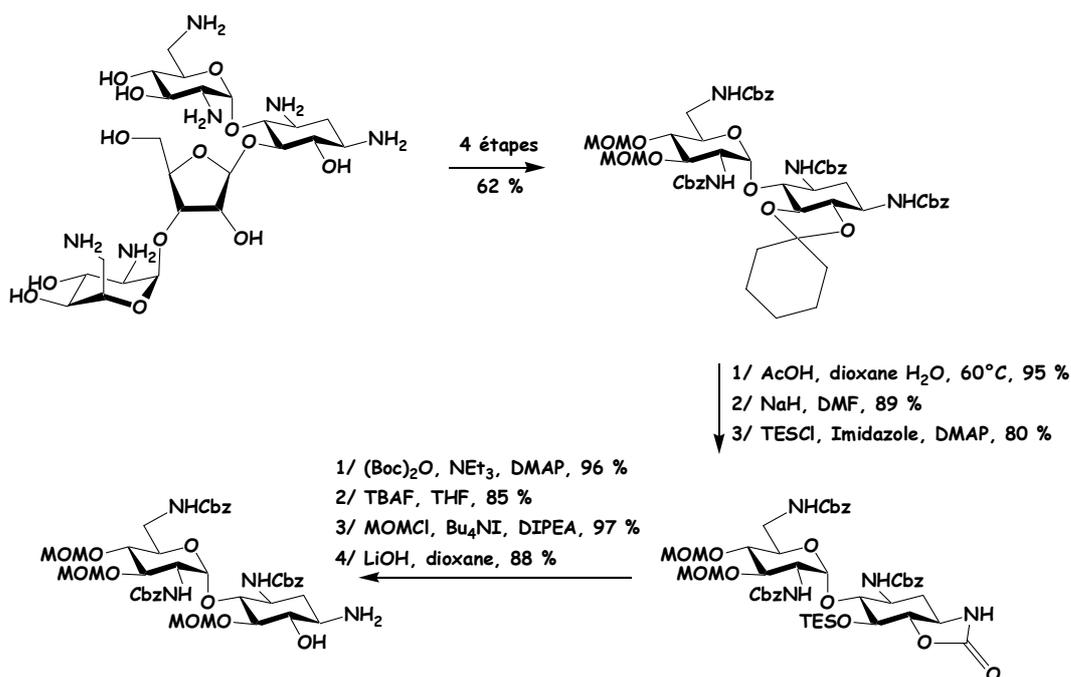


Figure 60 : Approche de Mobashery *et al.* [11].

Même si notre approche ne présente qu'un rendement global de 23 %, elle présente l'avantage d'être plus rapide, car elle ne nécessite que 5 étapes à partir du même antibiotique de départ.

Chapitre 3

L'étape clé de dimérisation et la
déprotection des dimères synthétisés

Grâce à la stratégie adoptée, nous avons réussi à distinguer la fonction amine en position 1 des trois autres (Cf. Chapitre 2). Afin d'obtenir différents dimères, il s'agit ensuite de greffer divers bras espaceurs entre l'amine en position 1 des deux molécules de néamine partiellement protégées (Cf. Fig. 1). Une déprotection des différentes fonctions conduirait ensuite aux dimères souhaités.

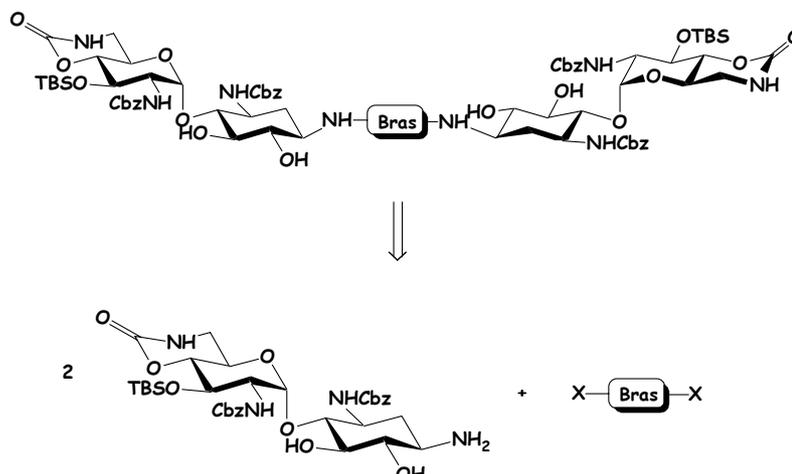


Figure 1 : Réaction de dimérisation à effectuer.

I INTRODUCTION : LE CAHIER DES CHARGES

I.1 La longueur du bras

Comme nous l'avons vu précédemment (Cf. Chapitre 1 § III.3.2), la modélisation de l'interaction entre deux molécules de néamine et le complexe boucle-boucle nous indique une distance entre les deux amines de 5 à 6 Å. Une telle distance correspond à un enchaînement de quatre à cinq liaisons simples C-C et C-N. Par conséquent, le bras espaceur doit posséder une chaîne de trois à quatre atomes de carbone. Compte tenu du fait que la dimérisation doit se faire sur une fonction amine, le bras sera relié à chaque unité de néamine modifiée par deux liaisons C-N. Deux types de liaisons sont alors envisageables, soit une liaison peptidique N-(CO)-C, soit une liaison simple de type alkyle N-C. Relier les amines par des liaisons

peptidiques implique que le bras espaceur soit un diacide. Dans ce cas, les candidats possibles sont les acides commerciaux suivants : l'acide malonique et l'acide succinique.

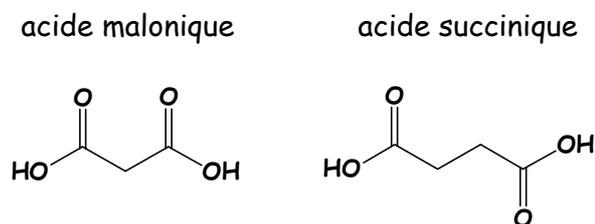


Figure 2 : Les précurseurs du bras espaceur.

Par contre, si l'on souhaite relier les deux amines par des liaisons C-N simples, plusieurs méthodes sont envisageables. Chaque amine peut être alkylée par substitution nucléophile ou par amination réductrice. Les précurseurs sont alors respectivement des dihalogénures (ou tout autre composé ayant deux groupements partants à chaque extrémité) ou des dialdéhydes.

Cependant, quelle que soit la méthode d'accrochage du bras, plusieurs problèmes se posent. En effet, compte tenu qu'il reste deux alcools libres sur la néamine, la réaction de dimérisation devra être chimiosélective. De plus, de part la double réactivité de la fonction amine, il faudra éviter qu'une même amine ne réagisse sur deux bras différents ou sur les deux fonctionnalités d'un même bras.

I.2 Réaction sélective de la fonction amine par rapport à la fonction alcool

De par la plus grande nucléophilie des amines, il est possible d'acyler sélectivement une amine en présence d'hydroxyyles par réaction avec des agents acylants. Il y en existe trois

types : les chlorures d'acides [1] [2], les anhydrides mixtes [3] [4] [5] et les esters [6] [7] [8] [9] [10] [1].

L'ordre de réactivité est classiquement : chlorures d'acides > anhydrides mixtes > esters. La catégorie ester comprend les couplages peptidiques, pour lesquels un ester activé est un intermédiaire réactionnel. Nous nous sommes spécialement intéressés aux anhydrides mixtes et aux esters activés, car les chlorures, trop réactifs, sont décrits comme étant moins sélectifs et conduisant à des rendements moins bons [1] [2].

Par ailleurs, si l'on envisage une alkylation par une réaction de type SN₂, il semble possible de jouer sur la différence de nucléophilie entre une amine et un alcool pour alkyler sélectivement l'amine. Par contre, il est difficile d'éviter une *di*-alkylation puisque l'amine alkylée est plus réactive que l'amine primaire de départ [11]. Cette stratégie n'a donc pas été testée. Une autre idée aurait été de protéger l'amine en position 1 par un groupement benzyle, qui aurait l'avantage de pouvoir être déprotégé par la suite en même temps que les groupements Cbz. Cependant, l'introduction du benzyle sur l'amine libre pose à nouveau un problème de *di*-alkylation. Il faudrait alors l'introduire sur l'amine lorsqu'elle est encore sous forme de carbamate cyclique. Ceci nous ramène à la benzylation que nous avons déjà testée sur le composé contenant deux carbamates cycliques avec les problèmes qui en découlent (formation du troisième carbamate cyclique et d'interprétation des RMN) (Cf. Chapitre 2 § IV.4).

Le problème de *poly*-alkylation peut également être rencontré lors d'aminations réductrices « one-pot ». Il peut cependant être contourné si l'on contrôle la formation de l'imine intermédiaire qui est alors isolée avant d'être réduite. Plus particulièrement, dans le cas de 1,2-aminoalcools, la formation d'imine peut n'être qu'une étape vers un intermédiaire oxazolidine. Néanmoins, ce type de composés peut également être réduit pour former le produit *mono*-alkylé [11] (Cf. Fig. 3).

-
- 1 Tanaka, H. ; Nishida, Y. ; Furuta, Y. ; Kobayashi, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1723.
 - 2 Katsarava, R. D. ; Kharadze, D. P. ; Japaridze, N. S. ; Omiadze, T. N. ; Avalishvili, L. M. ; Zaalishvili, M. *Makromol. Chem.* **1985**, 186, 939.
 - 3 Kocian, O. ; Stransky, K. ; Zavada, J. *Coll. Czech. Chem. Comm.* **1982**, 47, 1356.
 - 4 Najera, C. ; Abellan, T. ; Sansano, J. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2809.
 - 5 Myers, A. G. ; Gleason, J. L. Yoon, T., Kung, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 656.
 - 6 Ikeda, D. ; Tsuchiya, T. ; Umezawa, S. ; Umezawa, H. *Bull. Chem. Soc. Jn.* **1974**, 47, 3136.
 - 7 Takagi, Y. ; Ikeda, D. ; Tsuchiya, T. ; Umezawa, S. ; Umezawa, H. *Bull. Chem. Soc. Jn.* **1974**, 47, 3139.
 - 8 Sharma, M. N. ; Kumar, V. ; Remers, W. A. *J. of Antibiotics* **1982**, 35, 905.
 - 9 Gestin, J. F. ; Benoist, E. ; Loussouarn, A. ; Mishra, A. K. ; Faivre-Chauvet, A. ; Chatal, J. F. *New. J. Chem.* **1997**, 21, 1021.
 - 10 Haddad, J. ; Kotra, L. P. ; Liano-Sotelo, B. ; Kim, C. ; Azucena, E. F. ; Meizheng, J. L. ; Vakulenko, S. B. ; Chow, C. S. ; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3229.
 - 11 Baxter E. W. ; Reitz, A. B. *Org. React.* **2002**, 59.

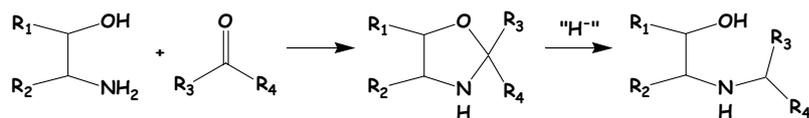


Figure 3 : Amination réductrice dans le cas d'aminoalcools vicinaux.

I.3 Favoriser la réaction intermoléculaire par rapport à la réaction intramoléculaire

Afin d'être sûr de dimériser, il faudra éviter la réaction intramoléculaire, possible pour une amine primaire, puisqu'elle peut réagir deux fois (une fois sur chaque extrémité du bras). Le risque de réaction intramoléculaire n'existe cependant que pour les chaînes flexibles et à partir de bras à quatre atomes de carbone. Pour ces derniers, la réaction intramoléculaire, entropiquement favorisée, conduit à un cycle à 5 chaînons, particulièrement stable et donc favorable (Cf. Fig. 4). Par contre, les cycles plus petits seront défavorisés, car trop tendus.

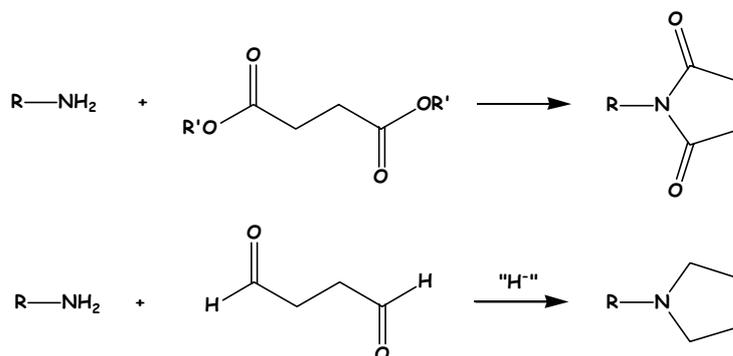


Figure 4 : Exemples de réactions de cyclisation intramoléculaire.

Cependant, dans le cas des acylations, des études [12] concernant des polymérisations à partir de différents diesters de l'acide succinique montrent que la réaction intramoléculaire ne devrait pas avoir lieu à condition de ne pas utiliser des électrophiles trop réactifs (les esters de N-hydroxysuccinimide semblent être les meilleurs) et de se placer dans des solvants ayant des faibles pK_{HB} (HB pour « hydrogen bonding » : ce coefficient traduit la capacité à effectuer des liaisons hydrogène), tels que le benzène, le chlorobenzène, mais également l'acétonitrile et le dioxane. En effet, les auteurs ont remarqué que les solvants à fort pK_{HB} favorisaient la réaction intramoléculaire. L'étude montre qu'il est cependant possible de

12 Katsarava, R. D. ; Kharadze, D. P. ; Avalishvili, L. M. *Makromol. Chem.* **1986**, 187, 2053.

limiter cette réaction parasite même en présence de DMSO ou HMPT du moment qu'on utilise des conditions douces. Pour ces raisons, nous avons tenté des dimérisations à partir des esters activés dérivés de l'acide succinique mais pas avec le chlorure de succinimidyle.

I.4 Choix d'une molécule modèle

Ces problèmes potentiels laissaient prévoir la réalisation de nombreux essais de dimérisation pour trouver les conditions optimales. Afin d'éviter de consommer notre dérivé protégé de la néamine pour la mise au point de la dimérisation, nous avons choisi de travailler sur une molécule modèle, de structure proche de notre dérivé. Il nous a semblé que les caractères décisifs pour la dimérisation de notre dérivé de la néamine étaient le motif aminoalcool et sa stéréochimie relative *trans* sur le système cyclique de la 2-déoxystreptamine.

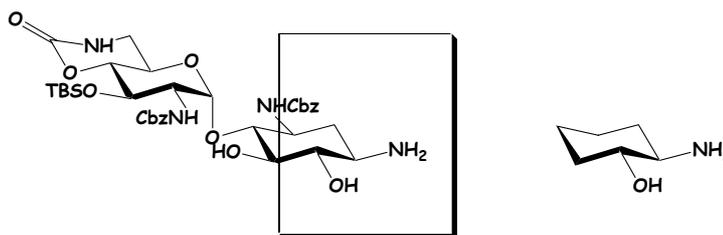


Figure 5 : Choix de la molécule modèle.

Nous avons donc choisi comme modèle le *trans*-aminocyclohexanol, qui est commercial sous sa forme chlorhydratée. L'amine libre correspondante a été obtenue par traitement avec la résine A26(HO⁻). Le pKa de cette amine est de 9,92 ce qui nous a poussés à choisir comme base pour le milieu réactionnel la DIPEA (pKa = 10,98) lorsqu'il est nécessaire de neutraliser des acides formés en cours de réaction pour éviter que l'amine du *trans*-aminocyclohexanol ne serve elle-même de base et ne conduise à l'ammonium correspondant, qui n'est pas nucléophile.

II PREPARATION DES REACTIFS DE DIMERISATION

La dimérisation peut se faire par acylation à partir des acides activés que sont les anhydrides mixtes ou les esters. Comme ces réactifs doivent être sélectifs des amines par rapport aux alcools, nous avons sélectionné les réactifs connus dans la littérature pour présenter cette chimiosélectivité, à savoir les anhydrides de pivaloyle [3] et les esters de N-hydroxysuccinimide [1]. Nous nous intéressons dans cette partie à la synthèse de ces réactifs pour des bras espaceurs à trois et quatre atomes.

II.1 Synthèse des dianhydrides de pivaloyle

II.1.1 Introduction

D'après la littérature, les anhydrides mixtes de type pivaloyle sont sélectifs des amines par rapport aux fonctions alcool [3]. Ils sont préparés aisément à partir de l'acide correspondant et du chlorure de pivaloyle dans du dichlorométhane en présence de DIPEA. Par contre, ils ne sont généralement pas isolés, ils sont utilisés directement [4] [5].

L'intérêt d'utiliser un anhydride de pivaloyle repose sur le fait que l'attaque du nucléophile se fait régiosélectivement sur le carbonyle de l'acide plutôt que sur le second carbonyle, puisque ce dernier est plus encombré à cause de la proximité du groupement *tert*-butyle (Cf. Fig. 6) [13].

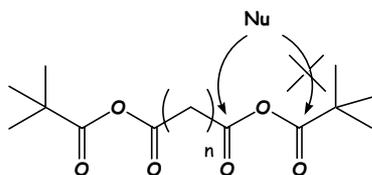


Figure 6 : Régiosélectivité de l'addition-élimination.

Un di-anhydride mixte de type pivaloyle formé à partir de l'acide 2,3-O-isopropylidène-L-tartrique est décrit dans la littérature [14].

5 Myers, A. G. ; Gleason, J. L. Yoon, T., Kung, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 656.

13 Wittenberger, S. J.; McLaughlin, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 7175.

14 Picard, C. ; Arnaud, N. ; Tisnes, P. *Synthesis* **2001**, 10, 1471.

II.1.2 Di-anhydride de pivaloyle en C₄

Pour préparer le dianhydride correspondant, l'acide succinique a été dissout dans du dichlorométhane en présence de 2,5 éq. de DIPEA, puis 2,2 éq. de chlorure de pivaloyle ont été ajoutés à 0°C. La solution a été agitée 10 min à 0°C puis 45 min à TA. Cette solution est censée contenir le dianhydride.

Pour le vérifier, elle a ensuite été ajoutée au goutte à goutte à une solution de *trans*-aminocyclohexanol dans le dichlorométhane en présence de 2,5 éq. de DIPEA et d'un peu de DMF (pour solubiliser le *trans*-aminocyclohexanol). Au bout de 3h de réaction, le produit a été extrait puis purifié pour conduire essentiellement au *trans*-aminocyclohexanol modifié (rdt = 41%). L'analyse en RMN ¹H (présence du groupement *tert*-butyle et déblindage du proton au pied de l'amine) et ¹³C (carbonyle et groupement *tert*-butyle) de ce produit a montré que le produit formé n'était pas le produit attendu, mais un simple produit de N-acylation (Cf. Fig. 7). Du *trans*-aminocyclohexanol a également été récupéré après chromatographie.

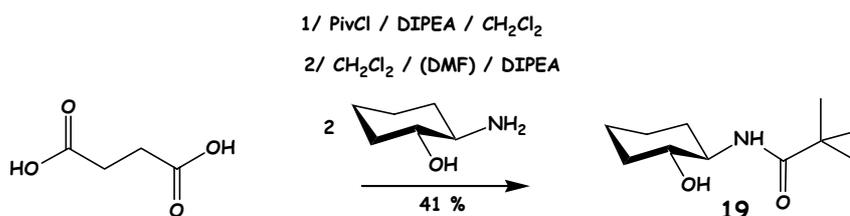


Figure 7 : Réaction sur l'acide succinique.

Ce résultat peut s'expliquer par une réaction parasite intramoléculaire du *mono*-anhydride. En effet, comme la chaîne carbonée de l'acide succinique permet le repliement de la molécule, le *mono*-anhydride peut réagir sur lui même pour former un anhydride cyclique (Cf. Fig. 8).

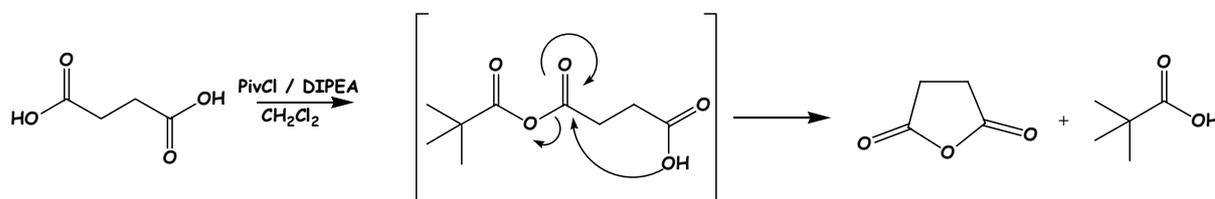


Figure 8 : Réaction intramoléculaire parasite formant l'anhydride succinique.

Le second équivalent de chlorure de pivaloyle, non utilisé, reste alors dans le milieu réactionnel et peut alors réagir sur le *trans*-aminocyclohexanol.

Ce problème a néanmoins pu être facilement contourné par l'utilisation de l'acide fumarique à la place de l'acide succinique. En effet, l'acide fumarique, de part sa configuration, interdit la réaction intramoléculaire parasite. Le dianhydride mixte de l'acide fumarique a ainsi pu être préparé selon le même mode opératoire que précédemment (Cf. Fig. 9).

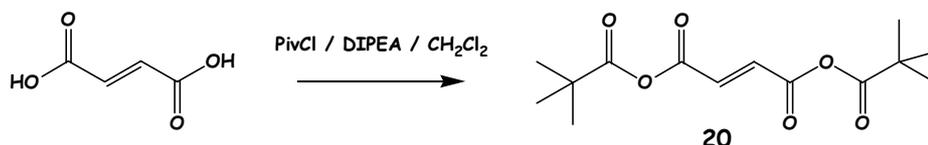


Figure 9 : Formation du dianhydride de pivaloyle de l'acide fumarique.

Il n'a pas été isolé, mais placé directement en réaction (Cf. Fig. 10). C'est le succès de la réaction de dimérisation qui a permis de conclure quant à la bonne formation du dianhydride mixte.

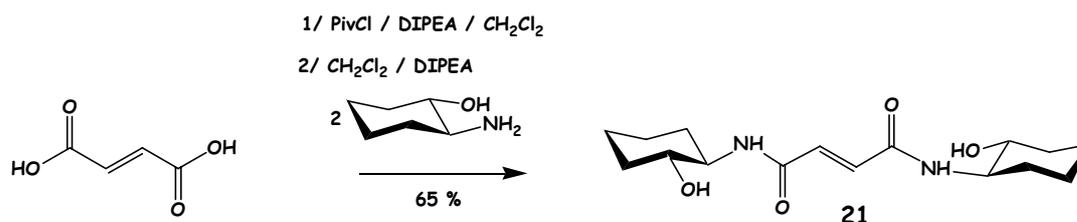


Figure 10 : Réaction de dimérisation sur la molécule modèle montrant la bonne formation du dianhydride de pivaloyle de l'acide fumarique.

Comme nous savons préparer le dianhydride de pivaloyle de l'acide fumarique, nous pourrions l'utiliser pour effectuer la réaction de dimérisation sur le composé dérivé de la néamine pour obtenir un dimère à chaîne de quatre atomes (Cf. Chapitre 3 § III.1.1).

II.1.3 Di-anhydride de pivaloyle en C₃

Pour la préparation du dianhydride de pivaloyle de l'acide malonique, nous avons procédé comme pour l'acide fumarique. Le supposé dianhydride de pivaloyle a été mis en réaction directement après sa formation sur le *trans*-aminocyclohexanol et a conduit au produit de N-acylation avec un rendement de 69 % (Cf. Fig. 11).

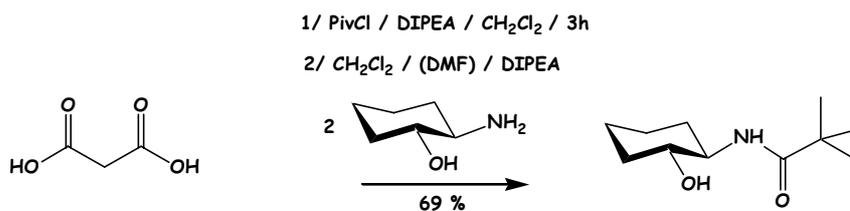


Figure 11 : Réaction avec l'acide malonique. 19

Cette même réaction a tout de même été testée sur le dérivé de la néamine (l'ajout de DMF n'est alors pas nécessaire pour solubiliser le dérivé de la néamine). Le produit de N-acylation sur l'amine en position 1 a été à nouveau isolé avec un rendement de 56 %, et de la néamine protégée (16) à été récupérée à 21 % (Cf. Fig. 12).

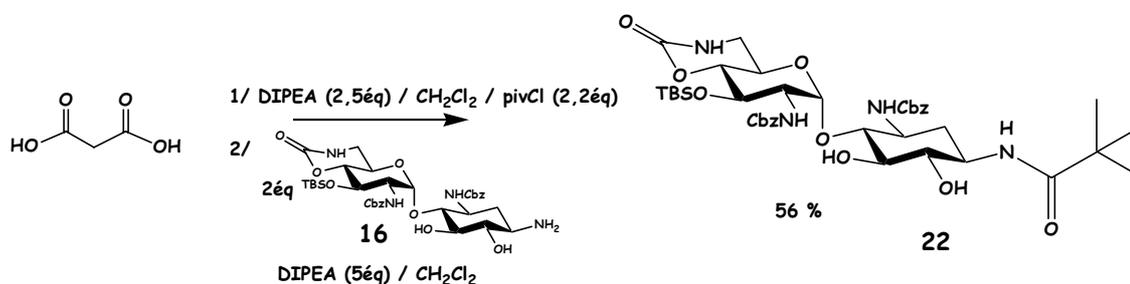


Figure 12 : Réaction effectuée sur le produit 16.

On peut noter que le dimère ne s'est pas formé. Etant donné que le produit principal est le produit acylé par le chlorure de pivaloyle, nous avons supposé que le dianhydride de pivaloyle ne s'était pas formé et qu'il restait dans le milieu un équivalent de chlorure de pivaloyle.

Ces résultats peuvent laisser supposer qu'une réaction intramoléculaire du *mono*-anhydride de l'acide malonique ait conduit à l'anhydride de l'acide malonique (Cf. Fig. 13).

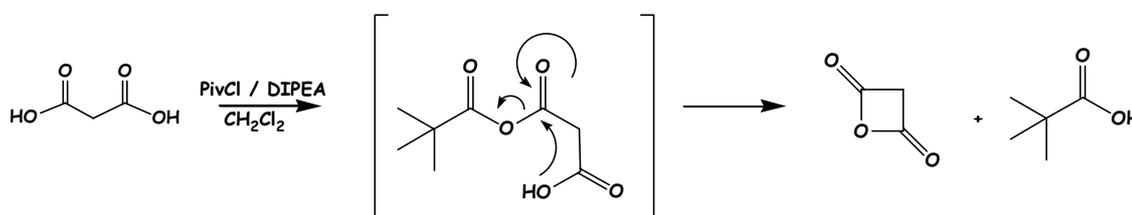


Figure 13 : Hypothèse conduisant à une équivalent de chlorure de pivaloyle restant.

On peut aussi penser que la réaction soit restée bloquée au niveau du *mono*-anhydride par une diminution de réactivité de la seconde fonction acide due à une énolisation en présence de la DIPEA (Cf. Fig. 14).

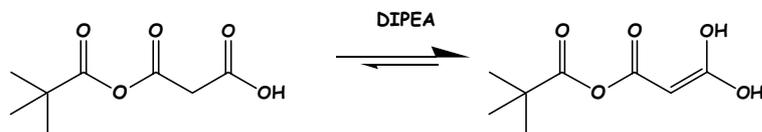


Figure 14 : Réaction d'énolisation

Une autre hypothèse reposerait sur le fait que la réaction de formation du dianhydride de l'acide malonique n'était pas finie. En effet, le suivi de la réaction par CCM n'étant pas possible, nous avons respecté le même temps pour la formation de ce dianhydride que dans le cas de l'acide fumarique.

Afin de tester ces deux dernières hypothèses, nous avons d'une part sensiblement augmenté le temps de la réaction de formation du dianhydride (6h10 à TA au lieu de 50 min à TA), mais également utilisé un équivalent supplémentaire de DIPEA pour tenir compte de l'acidité supplémentaire du malonate (Cf. Fig. 15). Nous avons ensuite ajouté ce mélange au *trans*-aminocyclohexanol solubilisé dans un mélange CH₂Cl₂/DMF en présence de 5 éq. de DIPEA. Là encore, le temps de réaction a sensiblement été augmenté (14h au lieu de 2h). Nous avons alors récupéré après purification adéquate, le *trans*-aminocyclohexanol à 97 %.

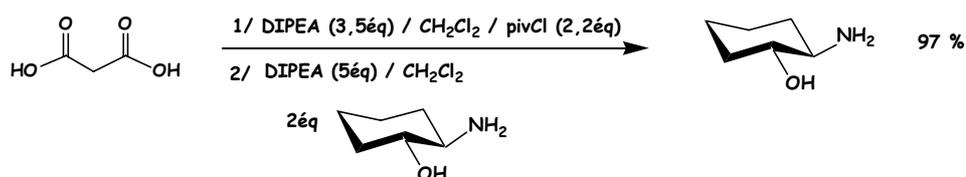


Figure 15 : Réaction en présence d'un équivalent supplémentaire de DIPEA et avec un temps de réaction nettement plus long.

Le fait que le *trans*-aminocyclohexanol n'ait pas été acylé, contrairement à la fois précédente, laisse penser que le dianhydride mixte a été préparé (tout le chlorure de pivaloyl a été consommé). Par contre, il semblerait qu'il n'ait pas réagi. Ce manque de réactivité s'expliquerait-il par un système conjugué, très stable, dû à une énolisation ?

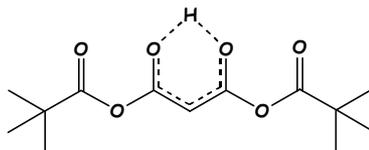


Figure 16 : Enolisation qui expliquerait la grande stabilité du dianhydride.

II.2 Synthèse des diesters de N-hydroxysuccinimide

II.2.1 Introduction

L'utilisation de diesters de N-hydroxysuccinimide (NHS) permet d'effectuer des couplages peptidiques dans des solvants contenant de l'eau. L'absence de réactivité de ces esters vis-à-vis de l'eau, et également des alcools, les rend chimiosélectifs des amines. Ils apparaissent parfois en tant qu'intermédiaire réactionnel formé lors d'un couplage peptidique, mais ils peuvent aussi être isolés et purifiés afin d'être mis en réaction avec un aminoalcool [8] [15]. Nous nous intéressons dans cette partie à la préparation des diesters de N-hydroxysuccinimide des acides maloniques, succiniques et fumariques, en tant que réactifs de dimérisation (Cf. Fig. 17). Plusieurs méthodes ont été testées pour les préparer et sont présentées ici.

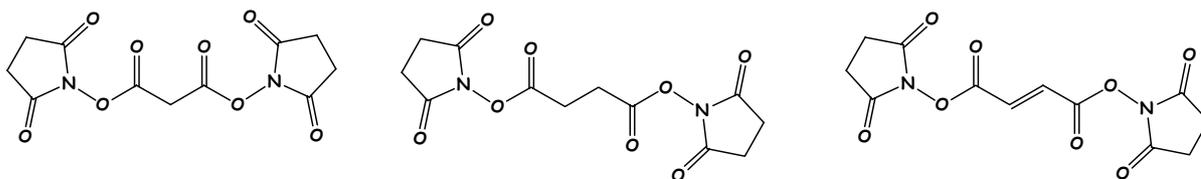


Figure 17 : Diesters de N-hydroxysuccinimide des acides maloniques, succiniques et fumariques

II.2.2 Synthèse particulière au diester de l'acide succinique

La préparation du diester de NHS de l'acide succinique est décrite [16]. Elle procède étrangement par une activation de la N-hydroxysuccinimide (NHS), puis par une ouverture de

15 Kawaguchi, H. ; Naito, T. ; Nakagawa, S. ; Fujisawa, K.-I. *J. of Antibiotics* **1972**, 25, 695.

8 Sharma, M. N. ; Kumar, V. ; Remers, W. A. *J. of Antibiotics* **1982**, 35, 905.

16 Andreev ; Pavlova ; Dadidovich ; Rogozhin *Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim.* **1980**, 5, 1078.

Je tiens à remercier Alexander Vasiliev pour la traduction de cette publication du russe vers l'anglais.

celle-ci. La chaîne à quatre carbones provient alors d'un des équivalents de N-hydroxysuccinimide (Cf. Fig. 18).

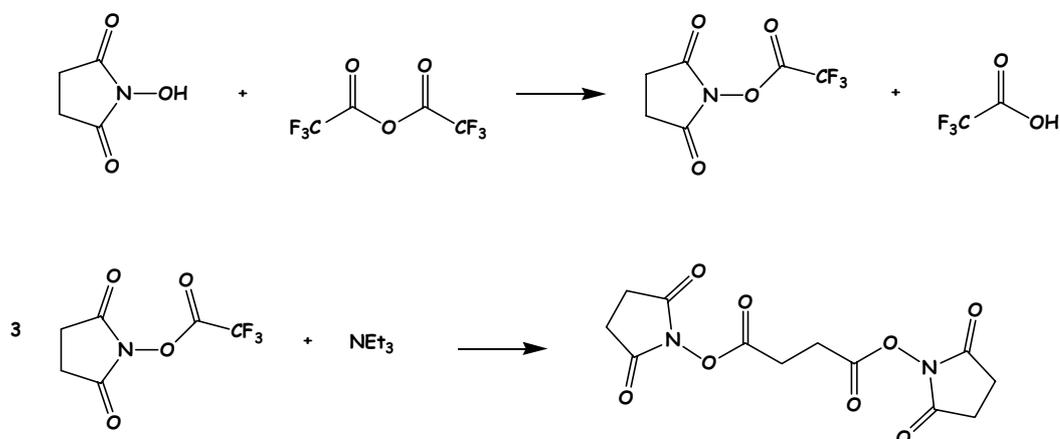


Figure 18 : Réaction de formation du diester de NHS de l'acide succinique [16].

Le mécanisme proposé par Rogozhin *et al.* est le suivant (Cf. Fig. 19). La première étape consiste en une addition-élimination du NHS sur l'anhydride trifluoroacétique qui conduit au dérivé trifluoroacétique de la NHS, qui est isolé. Ce dernier est ensuite mis en réaction en présence de 0.33 équivalents de triéthylamine. La triéthylamine, par addition élimination sur le dérivé de la NHS permet de former un peu de la base conjuguée du NHS. Celle-ci va alors effectuer une addition élimination sur un deuxième dérivé de la NHS pour l'ouvrir et créer ainsi la chaîne linéaire CH₂-CH₂. Finalement, une dernière addition élimination de la base conjuguée du NHS conduit au produit souhaité.

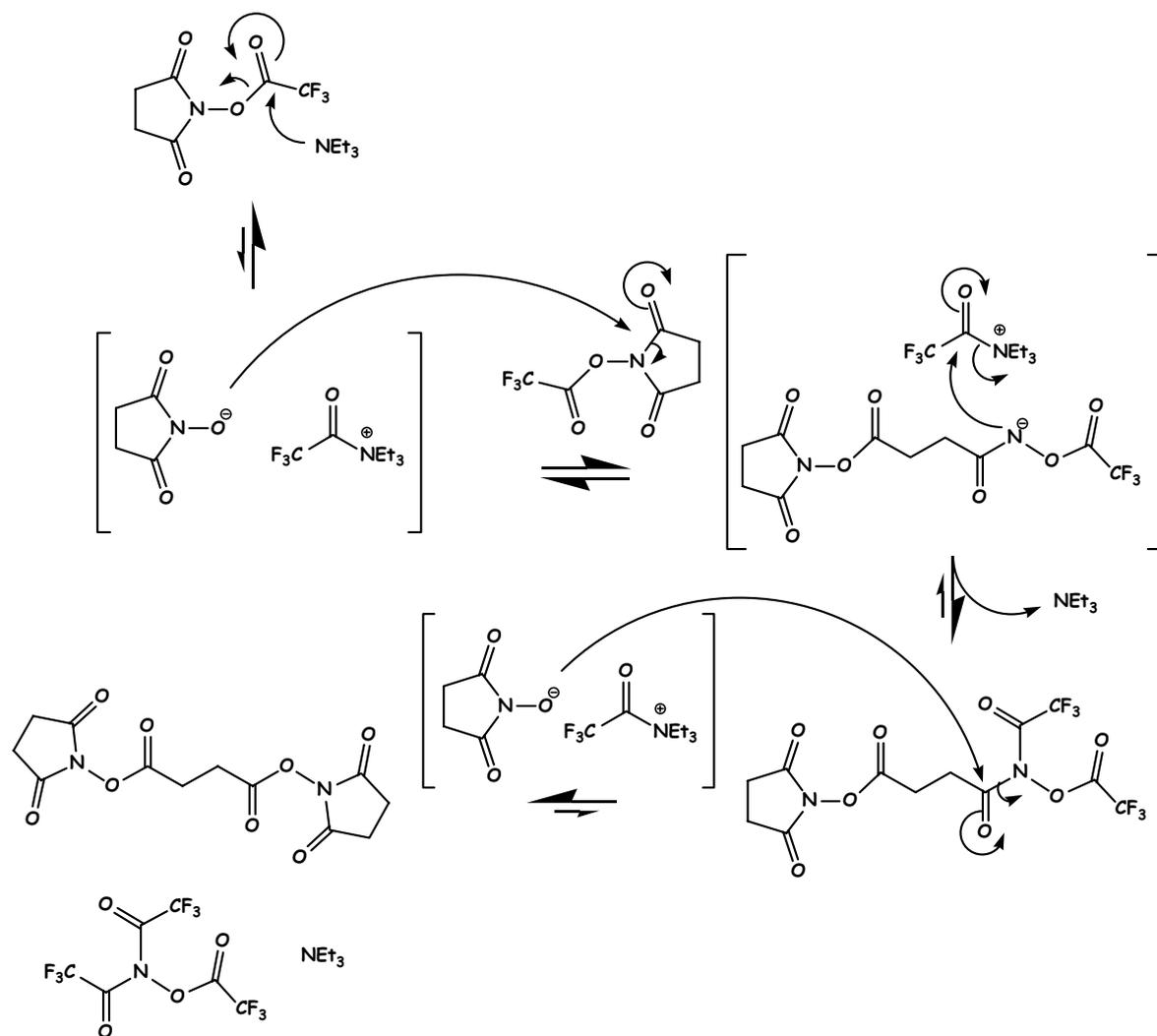


Figure 19 : Mécanisme possible de la réaction.

Cette réaction présente l'inconvénient de ne pas être transposable à la préparation des diesters des autres acides puisque la chaîne carbonée linéaire est obtenue par ouverture d'une molécule de NHS. D'autres méthodes, plus générales, existent néanmoins. Elles permettent d'obtenir également les dérivés des autres diacides. Elles sont détaillées ci-après.

II.2.3 Synthèse des diesters de N-hydroxysuccinimide par les dichlorures

C'est la méthode qui consiste à mettre en réaction un dichlorure d'acyle avec la NHS en présence de pyridine qui joue à la fois un rôle de base et de catalyseur [2] [12]. Cette méthode est toutefois présentée comme étant « moins propre » [2] que celle des trifluoroacétates, qui sera présentée plus loin (Cf. Chapitre 3 § II.2.5). Cette méthode n'a été testée que sur le dichlorure de malonyle.

Nous avons mis en réaction le dichlorure de malonyle avec la NHS en présence de pyridine dans le dichlorométhane selon les conditions classiques d'acylation, mais nous n'avons pas observé le produit souhaité. Ces mauvais résultats peuvent être interprétés soit par une trop faible réactivité du NHS soit par une énolisation du dichlorure de malonyle en présence de la pyridine.

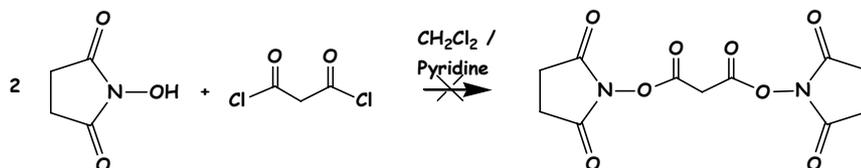


Figure 20 : Réaction testée avec le dichlorure de malonyle.

II.2.4 Synthèse des diesters de N-hydroxysuccinimide par couplage peptidique

Il est également possible de préparer les diesters de NHS par couplage peptidique [17] [18] [10]. Un article français [9] décrit la préparation des diesters suivants : oxalate de disuccinimidyle ($n = 0$), succinate de disuccinimidyle ($n = 2$), subérate de disuccinimidyle ($n = 6$), dodécane-1,12-dioate de disuccinimidyle ($n = 10$) (Cf. Fig. 21) ainsi que leur *mono*-couplage avec un dérivé aminé.

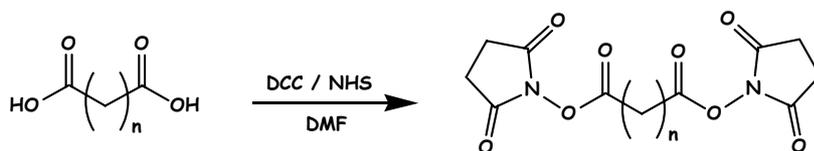


Figure 21 : Réaction de préparation de diesters par couplage peptidique (décrite pour $n = 0, 2, 6, 10$) [9].

Nous avons suivi leur mode opératoire pour la préparation des diesters de NHS à partir des acides succinique, fumarique et malonique. L'intérêt de l'acide fumarique est double : d'une part, l'identification du produit sera plus aisée par RMN puisque les protons vinyliques possèdent des signaux aux alentours de 5 ppm, zone exempte de signaux pour les diesters de NHS ; d'autre part, toute réaction intramoléculaire est exclue pour des raisons géométriques.

17 Anderson, G. W. ; Zimmerman, J. E. ; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 1839.

18 Kawaguchi, H. ; Naito, T. ; Nakagawa, S. ; Fujisawa, K.-I. *J. of Antibiotics* **1972**, 25, 695.

9 Gestin, J. F. ; Benoist, E. ; Loussouarn, A. ; Mishra, A. K. ; Faivre-Chauvet, A. ; Chatal, J. F. *New. J. Chem.* **1997**, 21, 1021.

8 Haddad, J. ; Kotra, L. P. ; Liano-Sotelo, B. ; Kim, C. ; Azucena, E. F. ; Meizheng, J. L. ; Vakulenko, S. B. ; Chow, C. S. ; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3229.

Dans le cas des acides succiniques et fumariques, nous avons obtenu les diesters souhaités, par contre nous n'avons jamais réussi à les séparer complètement de l'urée de la dicyclohexylcarbodiimide (DCU) qui co-précipite avec eux, que ce soit par recristallisation ou par chromatographie (Cf. Fig. 22).

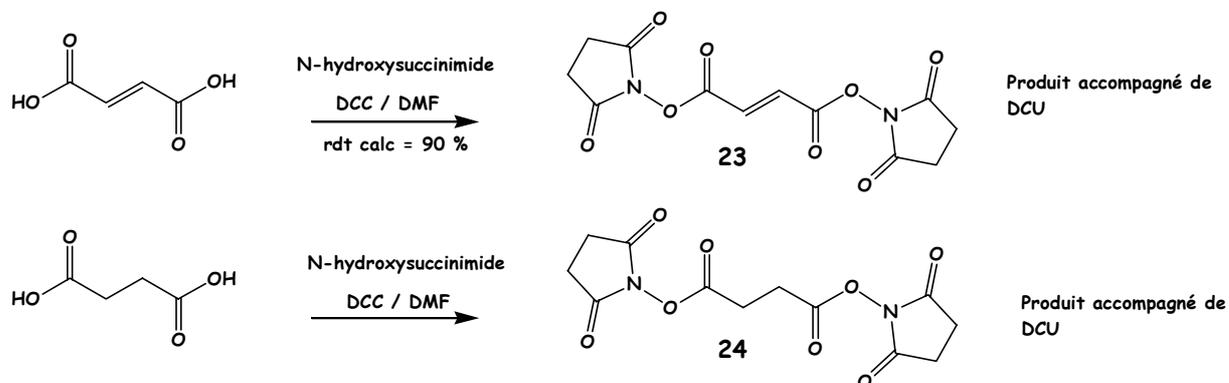


Figure 22 : couplages peptidiques pour former les diesters de NHS des bras à quatre atomes

Nous avons ensuite suivi le même mode opératoire que précédemment pour la préparation du diester de NHS de l'acide malonique, mais dans ce cas-ci, nous n'avons pas obtenu le diester souhaité. Il semble que la DCC ait réagi puisque nous récupérons la DCU, par contre nous récupérons beaucoup de NHS qui n'a visiblement pas réagi. L'échec de cette réaction reste un mystère.

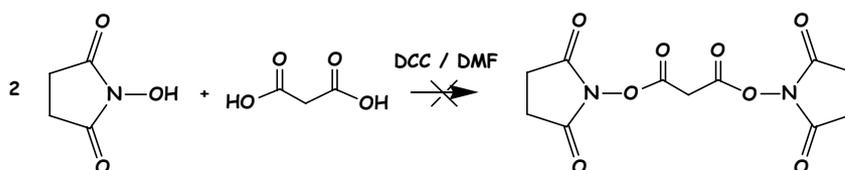


Figure 23 : Couplage peptidique échouant pour l'acide malonique.

II.2.5 Synthèse des diesters de N-hydroxysuccinimide par la méthode des trifluoroacétates

II.2.5.1 Préparation du diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide fumarique

La méthode des trifluoroacétates repose sur une activation des réactifs par l'anhydride trifluoroacétique. Elle est citée à deux reprises dans la littérature [2] [12], toutefois, elle n'est

décrite que dans une publication écrite en russe [19] pour la préparation des esters de NHS des acides succiniques, adipiques et isophthaliques. Nous l'avons appliquée à l'acide fumarique.

Le NHS et l'acide fumarique ont été placés dans un ballon. Le chlorobenzène puis la pyridine ont été ajoutés à ces deux solides. Le mélange est resté hétérogène. L'anhydride trifluoroacétique a été ajouté au goutte à goutte à 0°C et le mélange est devenu rouge foncé. Le mélange a été agité ensuite à TA pendant 2h puis laissé une nuit à 4°C. Après filtration et rinçage à l'éthanol, puis recristallisation dans l'acétonitrile, nous avons obtenu le diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide fumarique pur, avec un rendement de 66 % (Cf. Fig. 24). C'est la seule méthode qui ait permis l'obtention d'un diester de N-hydroxysuccinimide pur.

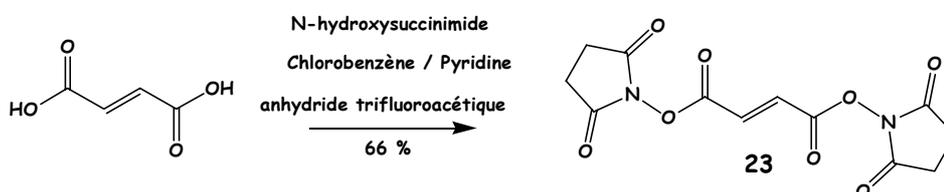


Figure 24 : Préparation du diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide fumarique.

II.2.5.2 Mécanismes réactionnels proposés

Le mécanisme que nous proposons est basé sur une succession de réactions d'addition-élimination favorisées par le pouvoir nucléofuge des ions trifluoroacétates. Nous nous sommes servis de l'échelle des pKa (Cf. Fig. 25) afin de déterminer la stabilité des groupements partants ainsi que les réactions acido-basiques favorables.

12 Katsarava, R. D. ; Kharadze, D. P. ; Avalishvili, L. M. *Makromol. Chem.* **1986**, 187, 2053.

19 Katsarava, R. D. ; Kharadze, D. P. ; Avalishvili, L. M. ; Zaalishvili, M. M. *Vysokomol. Soed. SerA.* **1984**, 26, 1489. Je tiens à remercier A. Varneck pour la traduction de cette publication du russe vers l'anglais.

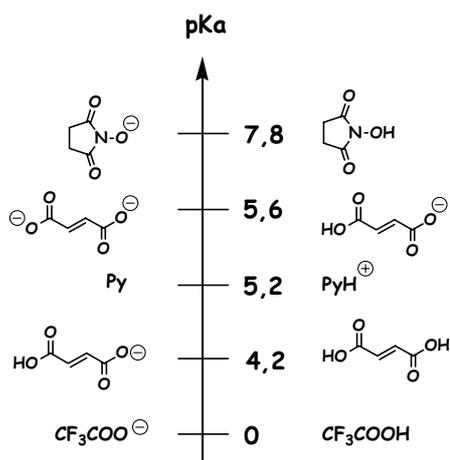


Figure 25 : pKa des acides mis en jeu dans la réaction.

La pyridine et le chlorobenzène ont été ajoutés au mélange d'acide fumarique et de NHS. Compte tenu des pKa des espèces en présence à ce stade, nous supposons qu'une réaction acido-basique entre l'acide fumarique (acide le plus fort présent) et la pyridine (base la plus forte présente) intervienne en premier lieu.

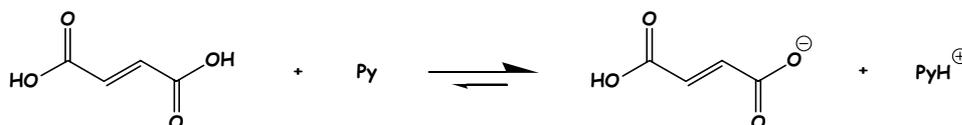


Figure 26 : Equilibre acido-basique intervenant en premier lieu.

L'ion carboxylate ainsi formé est l'espèce la plus nucléophile présente dans le milieu, c'est donc lui qui réagit par addition-élimination sur l'anhydride trifluoroacétique lorsque celui-ci est ajouté pour former un anhydride mixte et libérer un ion trifluoroacétate. La stabilité de l'ion trifluoroacétate libéré déplace l'équilibre de cette réaction vers la formation de l'anhydride mixte (Cf. Fig. 27).

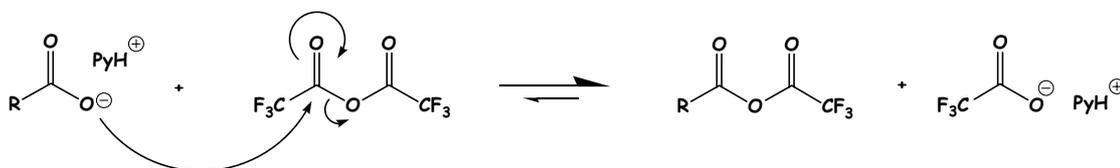


Figure 27 : Activation de l'acide par l'anhydride trifluoroacétique.

Le N-hydroxysuccinimide vient ensuite s'additionner sur l'anhydride mixte formé et un ion trifluoroacétate est à nouveau éliminé. Un échange de proton peut alors s'effectuer avec la pyridine pour conduire à l'ester de N-hydroxysuccinimide (Cf. Fig. 28).

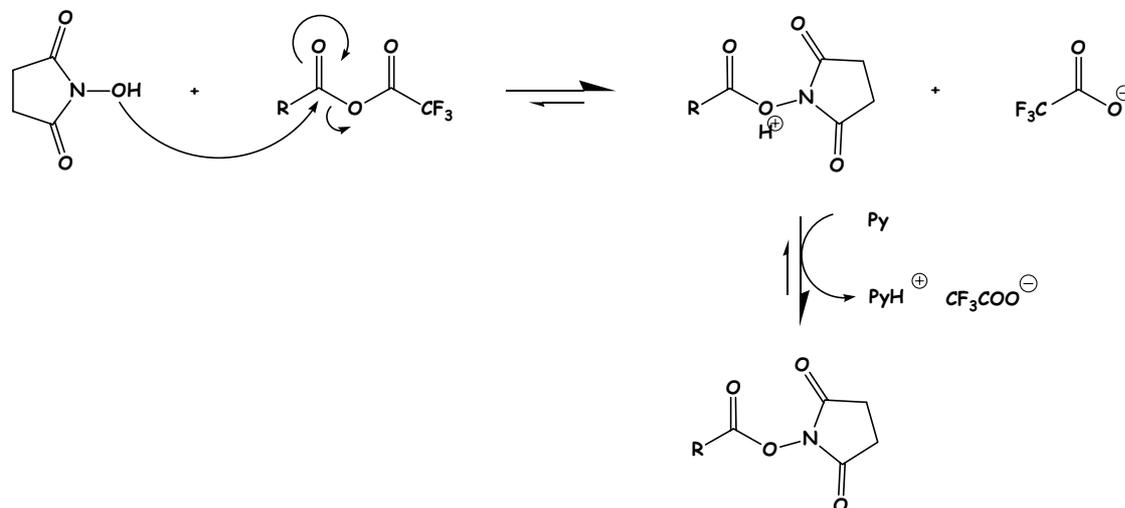


Figure 28 : Mécanisme de formation de l'ester de N-hydroxysuccinimide à partir de l'acide activé.

Dans cette séquence, l'intermédiaire réactionnel de la première addition-élimination possède trois groupements partants possibles (CF_3^- , RCOO^- et CF_3COO^-) (Cf. Fig. 29).

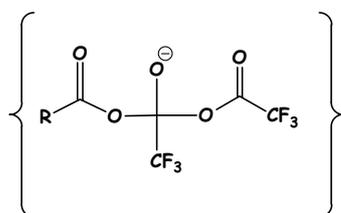


Figure 29 : intermédiaire réactionnel de la première réaction d'addition-élimination

Le meilleur groupe partant est celui qui est le plus stable, or ce sont des anions, c'est donc celui qui a le pKa le plus faible. (Ceci est une version simplifiée de la réalité, cependant, elle permet ici d'interpréter le résultat de la réaction). C'est à ce niveau que se situe l'étape clef de la réaction. En effet, il est mentionné que cette réaction ne marche pas pour l'acide oxalique [20]. Ceci s'expliquerait par le fait que la différence de pKa entre l'acide oxalique (pKa = 1,2) et l'acide trifluoroacétique (pKa = 0) est insuffisante pour que l'équilibre soit suffisamment déplacé dans le bon sens.

20 Katsarava, R. D. ; Kharadze, D. P. ; Avalishvili, L. M. ; Zaalishvili, M. M. *Chem. Abs.* **1982**, 97, 216751w.

Ce mécanisme semble probable pour la réaction et il permet d'interpréter l'échec de la réaction mettant en jeu l'acide oxalique. Cependant, un autre mécanisme est possible et ne peut être écarté. Nous le présentons donc également.

La préparation des esters activés à base de nitro, dinitro et pentachlorophénols est décrite en deux étapes [21] et met en jeu les mêmes réactifs (pyridine et anhydride trifluoroacétique). Cette réaction d'activation d'acide repose sur un mécanisme différent, mais qui pourrait également être celui de notre réaction « one-pot » au vu de la grande similitude entre le nitrophénol et le NHS (ils ont des pKa très proches : 7,2 pour le nitrophénol et 7,8 pour le NHS) et des conditions réactionnelles.

La première étape consiste en la préparation du trifluoroacétate de p-nitrophényle, qui est isolé et caractérisé (Cf. Fig. 30). Ce dernier est ensuite mis en réaction dans la pyridine avec l'acide carboxylique à activer. La réaction conduit à l'acide activé en 10 min.

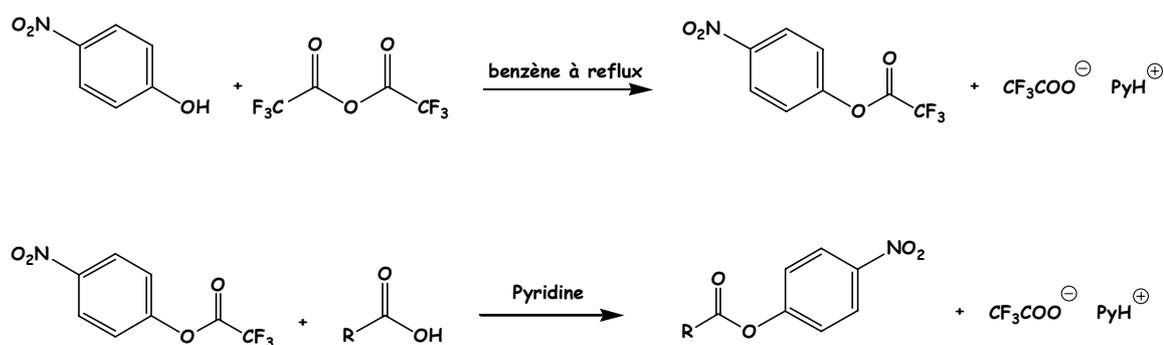


Figure 30 : Les deux étapes réactionnelles de la préparation d'un acide activé par un groupement p-nitrophenoxy.

Un mécanisme possible de la première réaction consiste en une addition-élimination du p-nitrophénol sur l'anhydride trifluoroacétique suivie d'une déprotonation par la pyridine (Cf. Fig. 31).

21 Sakakibara, S. ; Inukai, N. *Bull. Chem. Soc. Jn.* **1964**, 37, 1231.

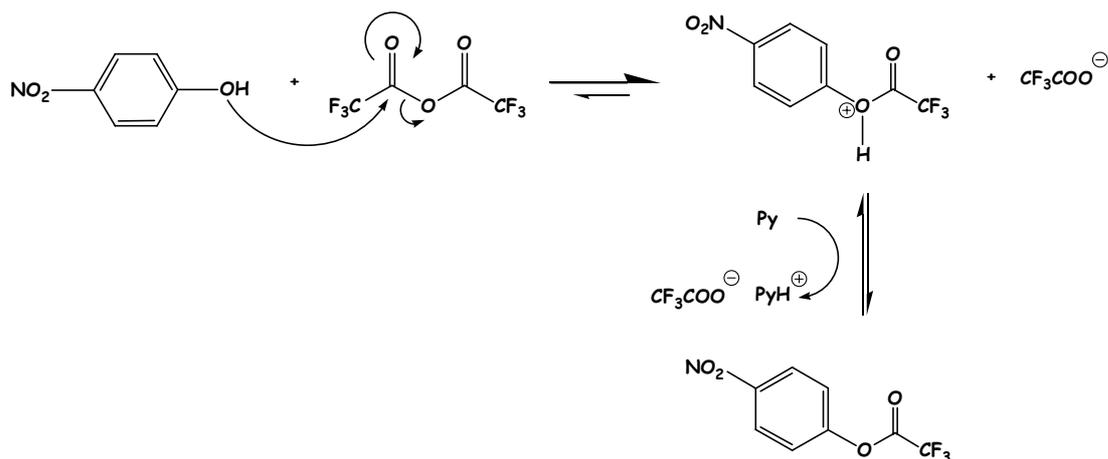


Figure 31 : Mécanisme de la première réaction.

La seconde réaction mettrait en jeu une transestérification dont le mécanisme se déroulerait en deux étapes d'addition-élimination (Cf. fig. 32).

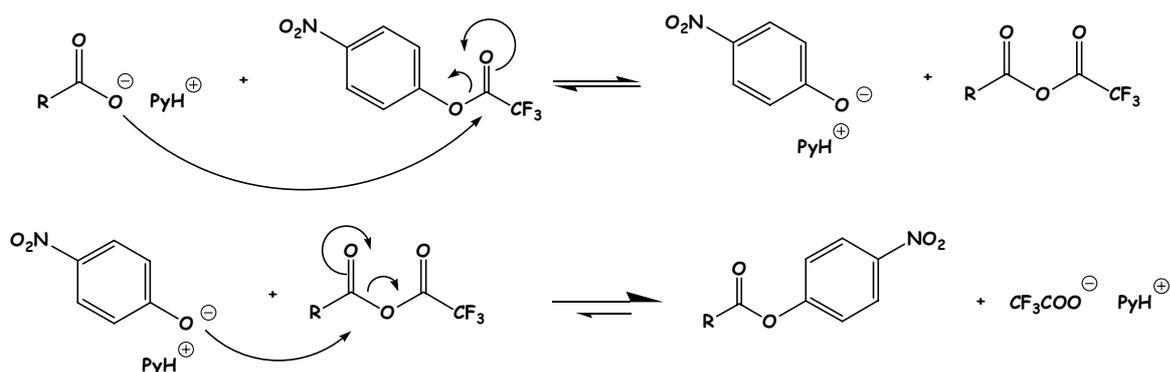


Figure 32 : Mécanisme de la réaction de transestérification.

Cette préparation d'ester activé passe par le composé intermédiaire trifluoroacétate de p-nitrophényle. Il est possible que notre réaction de préparation de l'ester de NHS passe également par un intermédiaire trifluoroacétate de NHS. L'ester activé de l'acide fumarique serait ensuite formé par une réaction de transestérification (Cf. Fig. 33).

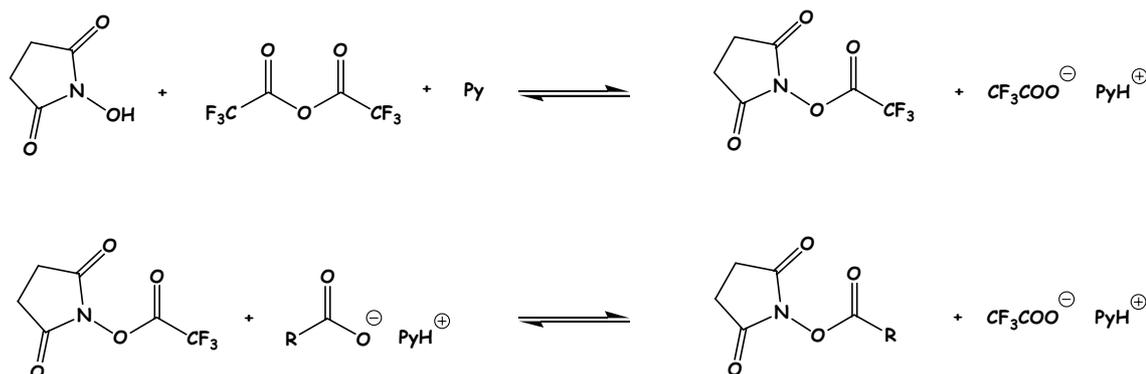


Figure 33 : Transposition des réactions précédentes au NHS

Cette dernière ne serait alors déplacée vers l'ester de NHS que si l'ion trifluoroacétate est beaucoup plus stable que la base conjuguée de l'acide. Dans ce mécanisme, ce serait cette transestérification qui serait à l'origine de la limitation de cette réaction.

En effet, il est décrit (pour des diesters activés à base de nitro, dinitro et pentachlorophénols) [20] que la méthode des trifluoroacétates n'est pas possible pour l'acide oxalique. Les auteurs expliquent que l'équilibre de la *trans*-acylation est déplacé vers l'intermédiaire trifluoroacétate du phénol, plutôt que vers le produit (Cf. Fig. 33), lorsque la différence de pKa entre l'acide dicarboxylique et l'acide trifluoroacétique diminue. Il est énoncé que la réaction n'est pas possible pour l'acide oxalique, car son pKa de 1,2 est trop proche de celui de l'acide trifluoroacétique (pKa = 0).

II.2.5.3 Préparation du diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide malonique

Comme la méthode des trifluoroacétates était la méthode de choix pour l'acide fumarique, nous l'avons appliquée à l'acide malonique. Nous n'avons pas obtenu de solide fin comme précédemment, mais un mélange visqueux contenant du NHS ainsi qu'un peu d'un produit mono-NHS non identifié (présence en RMN ¹H de deux singulets dont l'un a une intégration correspondant à 2H et l'autre à 4H, mais impossibilité de déterminer sa nature d'après le spectre de masse) avec un rendement inférieur à 10 %. Par contre, le filtrat contenait du NHS, du chlorobenzène ainsi que du malonate de diéthyle.

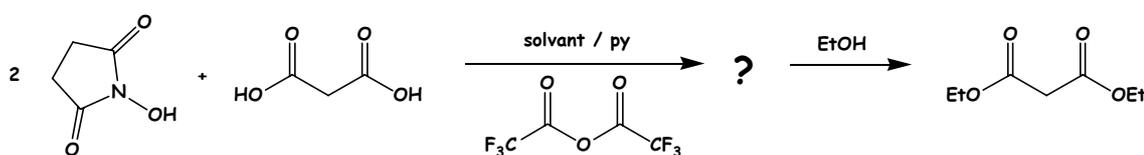


Figure 34 : Application de la réaction à l'acide malonique.

Nous avons alors échangé le solvant (chlorobenzène) par le dichlorométhane, le THF et le DMF, sans succès. Nous avons retrouvé les mêmes produits. Il semblerait que l'acide malonique ait été majoritairement transformé en malonate de diéthyle. Ce dernier s'est sans doute formé lors de l'ajout d'éthanol pour faire précipiter le « produit » (Cf. Fig. 34). Or le diester souhaité ne peut pas être détruit par l'éthanol, puisque les diesters de NHS sont réputés pour être stables même dans l'eau. Nous supposons donc que c'est un intermédiaire réactionnel qui est détruit par l'éthanol et que, par conséquent, la réaction n'était pas achevée et qu'elle était bloquée au niveau d'un intermédiaire. Lorsque nous avons répété la réaction dans le THF sans effectuer le traitement à l'éthanol (rinçage du précipité uniquement au THF anhydre), nous avons observé en RMN la présence d'un nouveau produit. Il pourrait s'agir du dianhydride trifluoroacétique de l'acide malonique.

Le fait que la réaction s'arrête au niveau d'un intermédiaire réactionnel pourrait s'expliquer, comme nous l'avons vu précédemment, par le fait que la réaction de transestérification n'est déplacée vers le produit que lorsque les pKa de l'acide sont suffisamment éloignés. La réaction échoue pour l'acide oxalique dont le premier pKa est de 1,2. Or le premier pKa de l'acide malonique est de 2,8, valeur à peine plus faible que celle du premier pKa de l'acide fumarique (pKa = 3) pour lequel cette réaction a bien marché. Cette explication n'est donc pas suffisante.

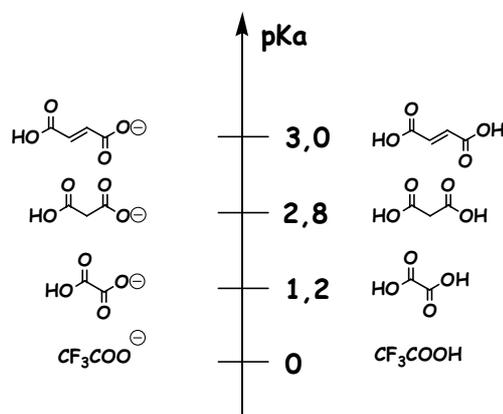


Figure 35 : pKa des différents acides carboxyliques.

Deux autres explications de l'échec de cette réaction ont été trouvées dans la littérature [22]. Lors de la préparation d'anhydrides trifluoroacétiques d'acides maloniques disubstitués, il est énoncé, qu'en présence de pyridine, la réaction intramoléculaire entre une fonction acide

22 Duckworth, A. C. *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 3146.

et une fonction anhydride a lieu de façon quantitative et conduit à un anhydride cyclique (Cf. Fig. 36).

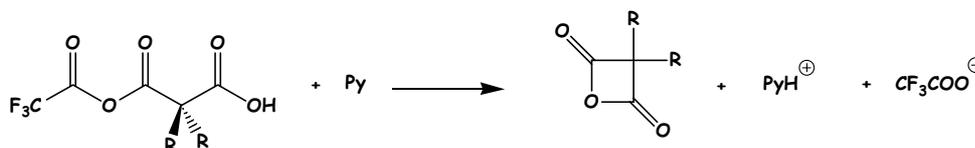


Figure 36 : Réaction intramoléculaire observée par Duckworth *et al.*

Il est possible que cette réaction soit moins favorisée dans le cas de l'acide malonique, car il ne bénéficie pas de l'effet de décompression stérique (répulsion des groupements alkyles), favorisant la formation d'un cycle tendu. Néanmoins, cette réaction parasite reste une éventualité.

Par ailleurs, les auteurs ont constaté qu'il n'est pas possible d'obtenir les mono et dianhydrides trifluoroacétiques ni même l'anhydride cyclique avec les acides maloniques monosubstitués. Que se passe-t-il alors sans aucun groupement alkyle sur l'acide malonique ? Les dérivés de l'acide malonique semblent être des composés capricieux. Par ailleurs, l'absence de données dans la littérature concernant le bis-NHS de l'acide malonique laisse présumer des difficultés de sa préparation. Il est référencé dans la littérature, cependant, les publications le concernant renvoient à deux publications où il n'est pas décrit [23] [24]. Nous n'avons même pas trouvé ses caractéristiques physiques. Il existe également un brevet [25] qui ne le décrit pas non plus.

II.3 Bilan

La synthèse du dianhydride de pivaloyle de l'acide fumarique a été réalisée, mais ce composé n'a pas été isolé, il doit être mis en réaction tout de suite après sa formation.

23 Anderson, G. W. ; Zimmermann, J. E. ; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 1839.

24 *Ber. deutsch. Chem. Ges.* **1896**, 29, 1560.

25 FR 2013139

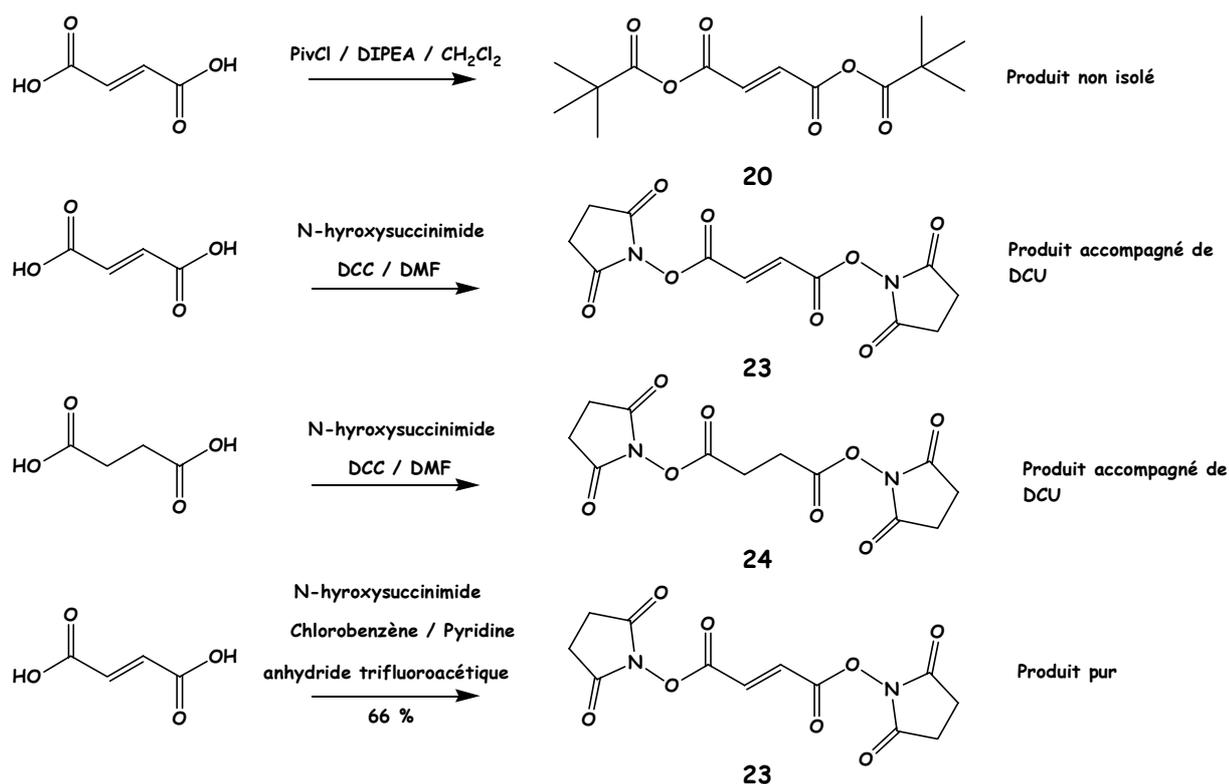


Figure 37 : les différentes réactions de préparation d'acides activés qui se sont avérées efficaces.

Par contre, les diesters de NHS sont des composés stables, qui peuvent être isolés et stockés plusieurs mois. Diverses méthodes de préparation des diesters de NHS ont été testées. Des couplages peptidiques ont permis la préparation des diesters de NHS des acides succiniques et fumariques. Cependant, ces composés n'ont pas pu être purifiés convenablement. Ils restent accompagnés de DCU. Il pourrait être envisagé de remplacer la DCC par la diisopropylcarbodiimide ou la cyclohexylcarbodiimide sur support solide [26].

En revanche, la synthèse du diester de NHS de l'acide fumarique par la voie des trifluoroacétates s'est avérée meilleure par son meilleur rendement mais aussi par la pureté du produit obtenu.

Par contre, aucun composé dérivé de l'acide malonique n'a pu être obtenu. Le diester de NHS n'a jamais été observé, que ce soit par réaction avec le chlorure de malonyle, par couplage peptidique ou par la méthode des trifluoroacétates. Le dianhydride de pivaloyle n'a pas non plus été formé. Il semblerait que la chimie de l'acide malonique comporte de nombreuses subtilités et qu'il ne soit pas possible de transposer à l'acide malonique les réactions ayant réussi avec d'autres acides.

26 Sucheck, S. J.; Greenberg, W. A.; Tolbert, T. J.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1080.

III DIMERE A CHAINE DE 4 ATOMES

Plusieurs méthodes de dimérisation ont été testées afin de préparer le dimère ayant une chaîne de quatre atomes. Elles sont présentées ci-dessous. Les réactions de déprotection du dimère obtenu seront également décrites.

III.1 Les réactions de dimérisation

III.1.1 Dimérisation par réaction avec des anhydrides de pivaloyle

Comme nous l'avons vu précédemment, les anhydrides mixtes de pivaloyle correspondent aux besoins de l'étape de dimérisation, puisqu'ils sont sélectifs des fonctions amines par rapport aux fonctions alcools [1].

Comme nous l'avons décrit au paragraphe II.1.2, le dianhydride mixte de l'acide succinique n'a pas été formé, par contre, celui de l'acide fumarique a été préparé. Il a été facilement obtenu à partir de l'acide fumarique et du chlorure de pivaloyle dans le dichlorométhane en présence de DIPEA. Trop instable pour être isolé, le dianhydride de pivaloyle en solution a ensuite été ajouté au goutte à goutte à la solution d'aminoalcool dans le dichlorométhane en présence de DIPEA.

Dans un premier temps, nous avons testé la réactivité de l'anhydride mixte de pivaloyle de l'acide fumarique sur la molécule modèle. Le dimère correspondant a bien été obtenu avec un rendement de 65 % (Cf. Fig. 38). Il a été caractérisé par spectrométrie de masse et RMN (présence en RMN ^1H du proton vinylique et déblindage du proton au pied de l'amine ; présence en RMN ^{13}C du carbonyle et du carbone vinylique).

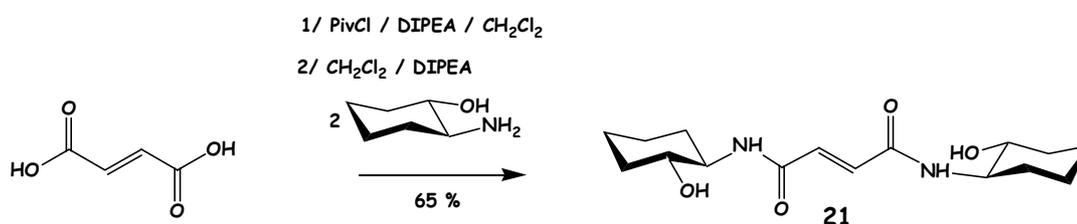


Figure 38 : Dimérisation de la molécule modèle par réaction avec l'anhydride mixte de pivaloyle de l'acide fumarique.

Au vu de cette réussite, cette réaction a été effectuée sur le dérivé 16 et le dimère correspondant a été isolé avec un rendement de 68 % (Cf. Fig. 39). Etant donné la faible solubilité de ce dimère dans le dichlorométhane, il est préférable de ne pas faire d'extraction liquide-liquide mais plutôt de passer directement le brut réactionnel sur une colonne de gel de silice, après avoir stoppé la réaction avec un peu d'eau et évaporé les solvants.

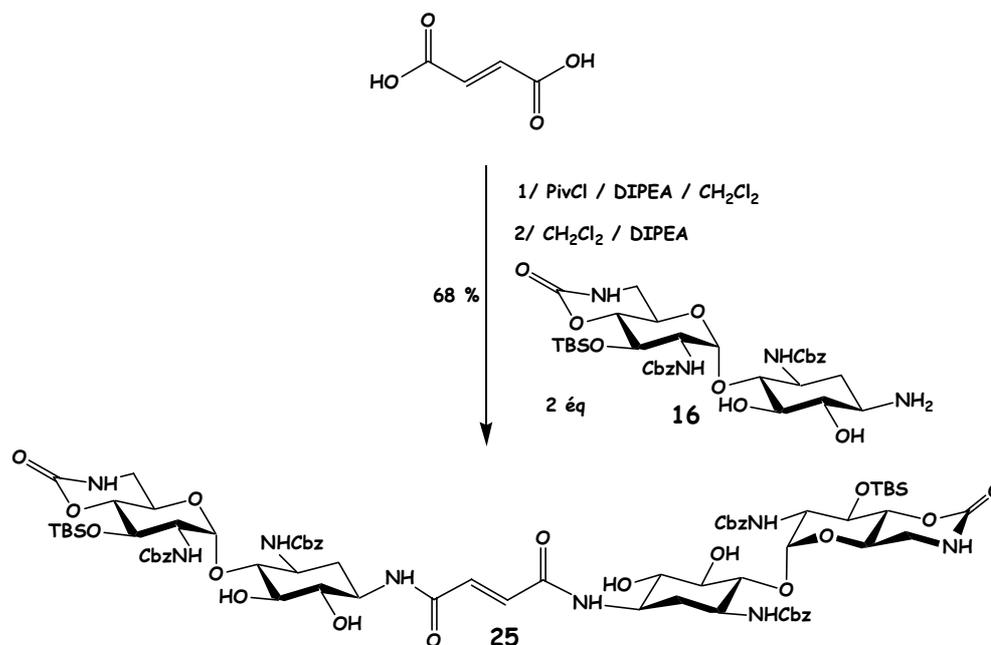


Figure 39 Réaction de dimérisation avec le dianhydride de pivaloyle de l'acide fumarique.

La structure du dimère de la néamine a été vérifiée par spectrométrie de masse et RMN dans la pyridine-d₅ (faible solubilité dans le méthanol). Le spectre de masse en mode électrospray positif (ES⁺) nous a confirmé que la dimérisation avait bien eu lieu. Les spectres RMN ¹H et ¹³C ont permis de montrer la présence des différents groupements.

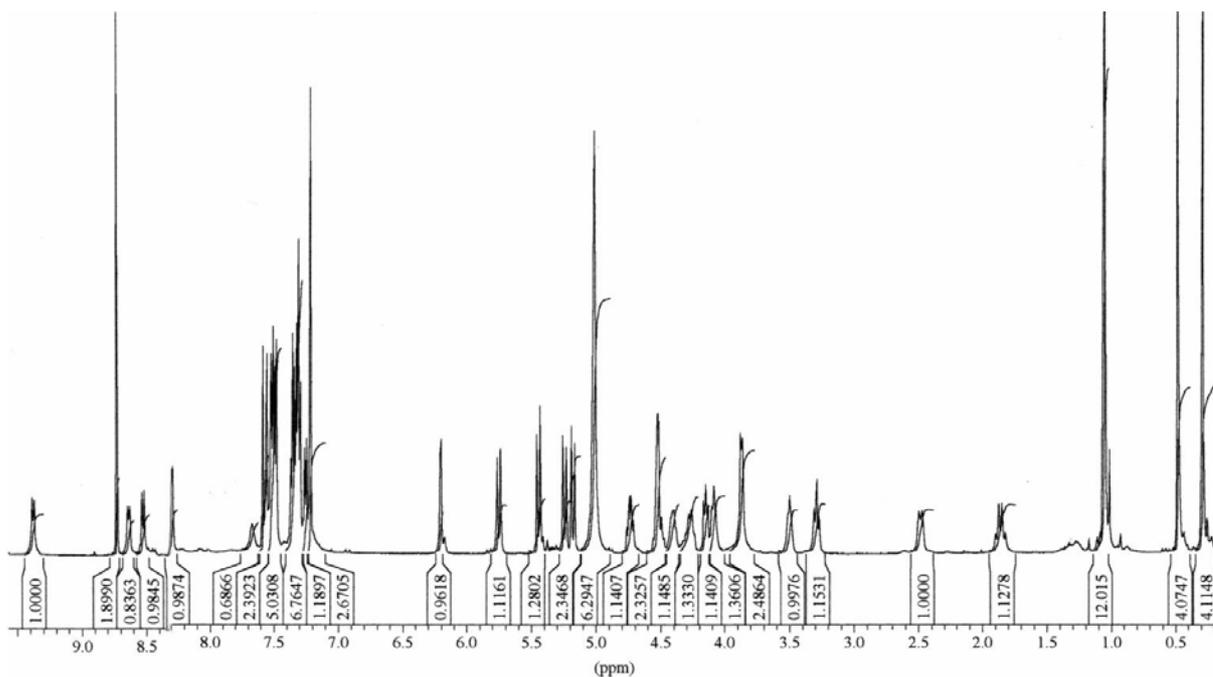


Figure 40 : Spectre ^1H dans la pyridine- d_5 du dimère 25.

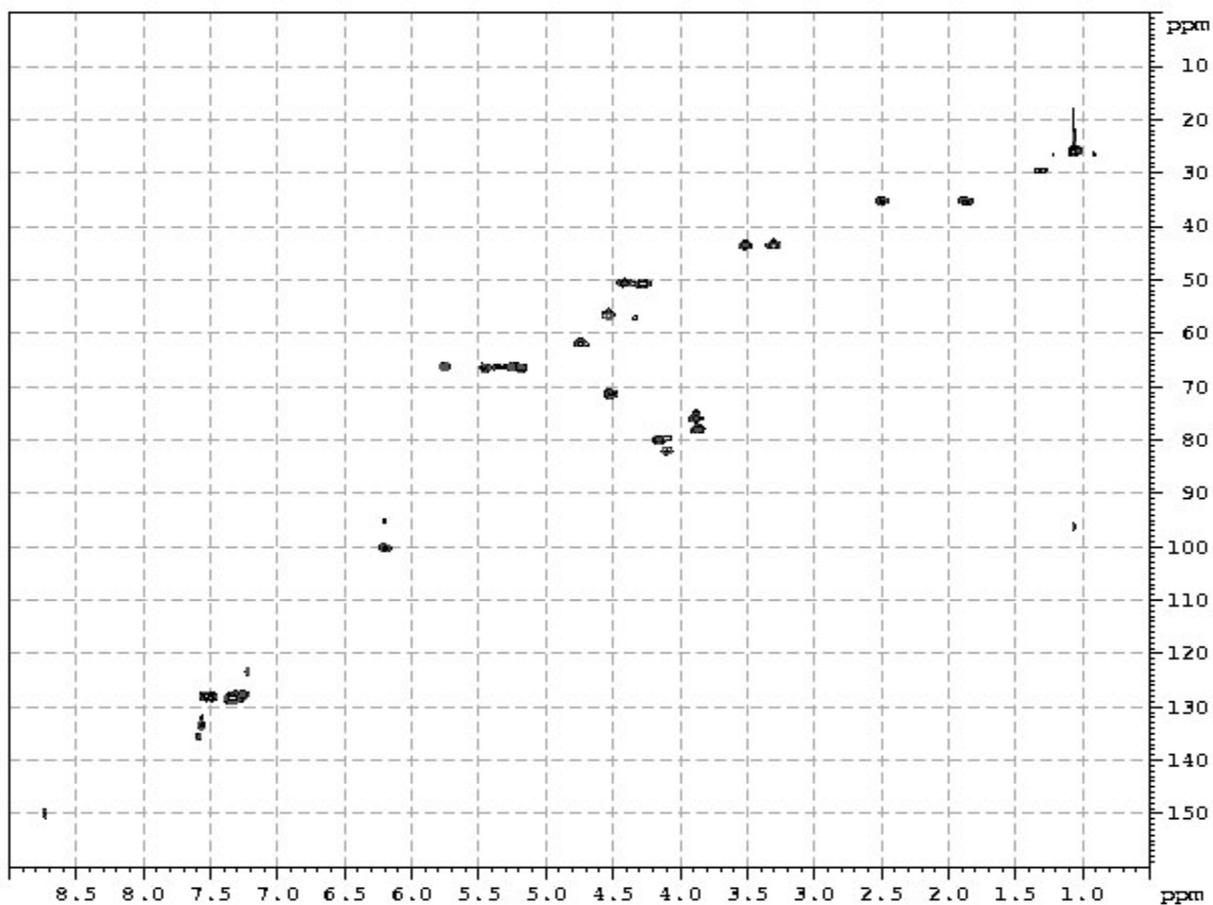


Figure 41 : Spectre HSQC du dimère 25

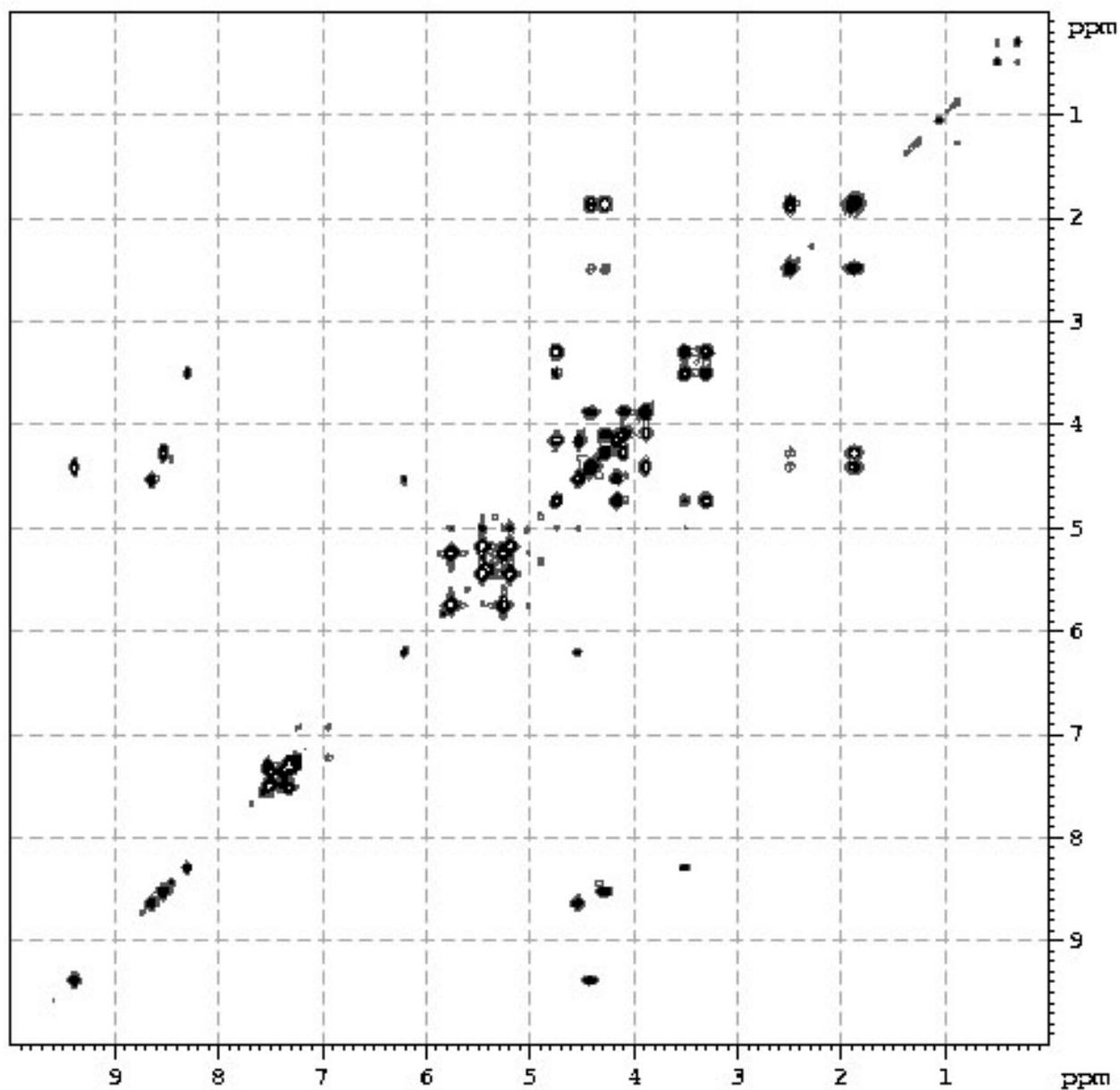


Figure 42 : Spectre COSY du dimère 25

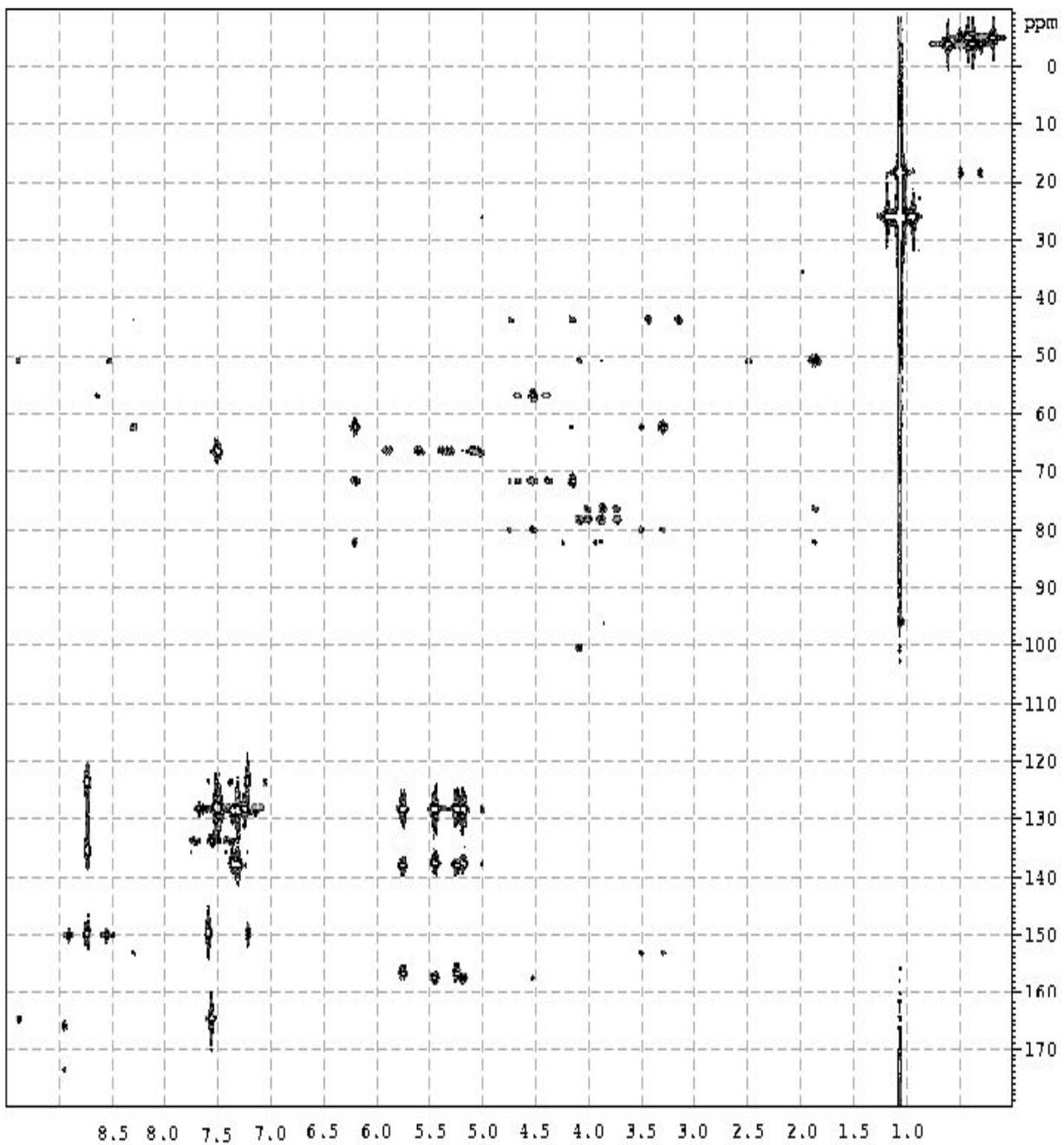


Figure 43 : Spectre HMBC du dimère 25

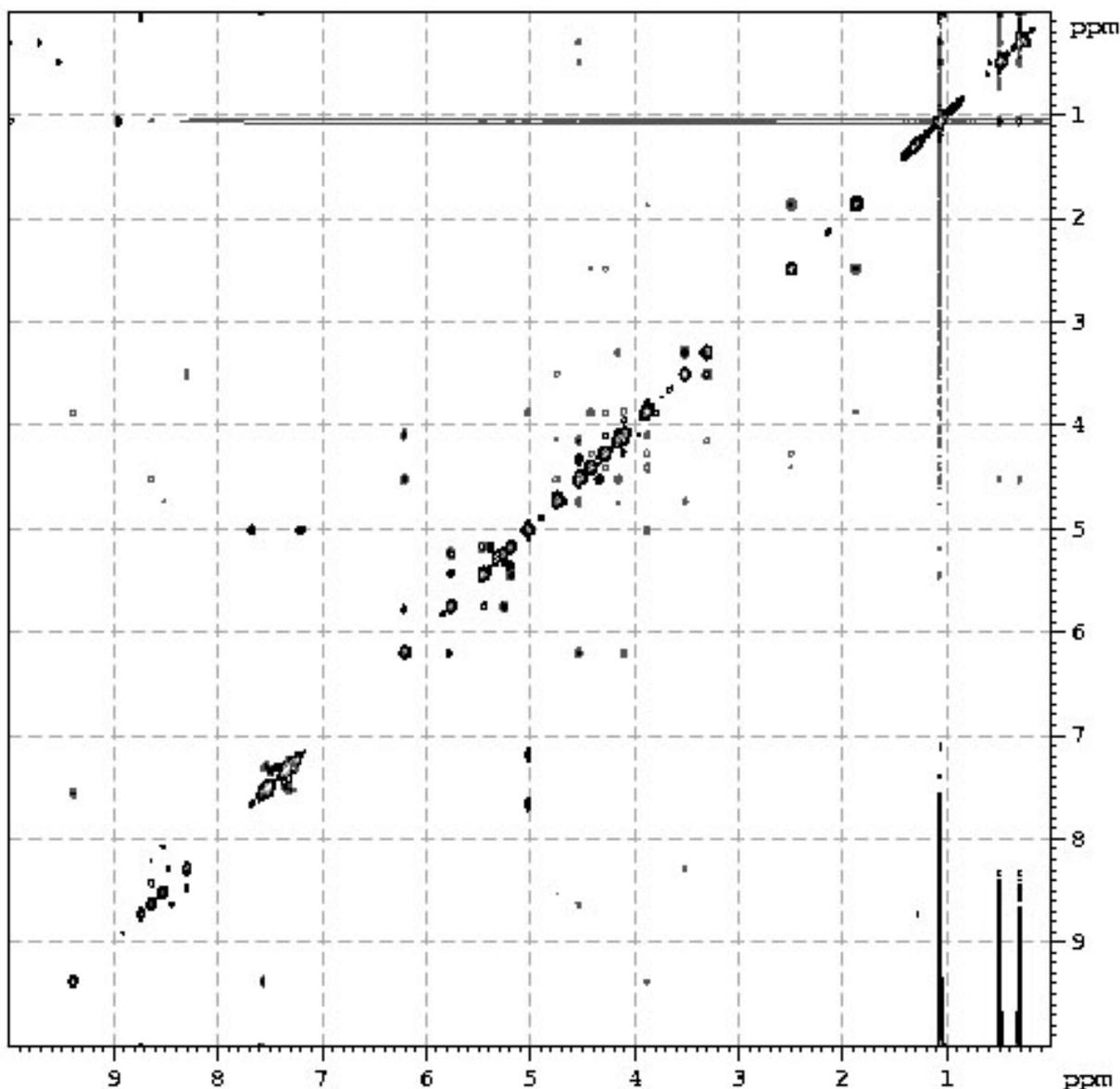


Figure 44 : Spectre ROESY du dimère 25

Dans un deuxième temps, les spectres COSY, HSQC et HMBC nous ont permis d'attribuer tous les signaux des protons et carbones de la molécule, et de vérifier le positionnement des différents groupements. En effet, le spectre HMBC montre les corrélations entre les carbonyles des groupements Cbz et les amines en position 3 et 2'. De même, le carbonyle du carbamate cyclique est corrélé aux protons en position 6', et le carbonyle du bras est corrélé à la fois au proton vinylique du bras et au proton en position 1. Le spectre ROESY montre par une corrélation entre le proton 3' et des protons du groupement TBS que le groupement silylé protège toujours l'alcool en position 3'.

Ce spectre donne également des informations concernant la conformation de la molécule et en particulier du bras espaceur (Cf. Fig. 45). De nombreuses corrélations entre les différents protons des deux groupements Cbz ($\underline{\text{NH}}$, $\underline{\text{CH}_2}$) montrent qu'ils sont proches dans l'espace et que leurs phényles interagissent sûrement par π -stacking. Ce positionnement est en accord avec d'autres corrélations observées entre les protons des deux cycles.

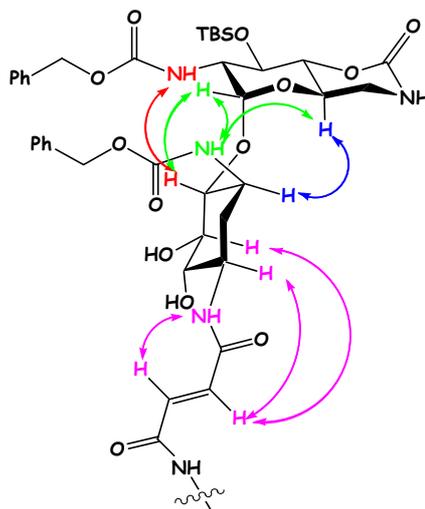


Figure 45 : Conformation probable du dimère 25 en solution d'après le spectre ROESY.

III.1.2 Dimérisation par couplage peptidique direct

La méthode la plus classique pour coupler une amine à un acide est le couplage peptidique. Celui-ci peut également s'effectuer en présence d'alcools. De tels couplages peptidiques ont d'ailleurs été effectués sur des dérivés d'antibiotiques de la famille de la néamine [6] [7].

Ces couplages peptidiques directs décrits sur des aminoglycosides dérivés de la famille de la néamine mettent en jeu un acide carboxylique, la N-hydroxysuccinimide (NHS) et la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans du THF (Cf. Fig. 46). Le dérivé aminé à coupler est ajouté par la suite. La réaction passe par l'intermédiaire d'un diester activé, qui est ici le diester de N-hydroxysuccinimide. Il existe de nombreuses autres sortes d'esters activés comme les nitrophénoxy-esters et chlorophénoxy-esters. Nous avons choisi d'utiliser les diesters du N-hydroxysuccinimide, car ils sont solubles et stables dans l'eau et le méthanol, et qu'ils sont *a priori* les plus sélectifs et donnent de meilleurs rendements [1].

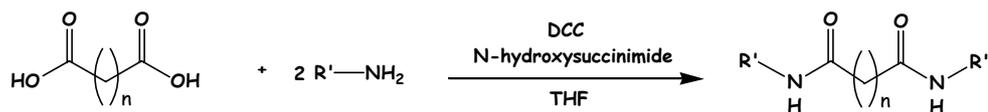


Figure 46 : Objectif : dimérisation par couplage peptidique.

La DCC et le NHS servent à activer l'acide carboxylique. La réaction se déroule selon le mécanisme suivant pour cet ordre d'addition des réactifs (Cf. Fig. 47).

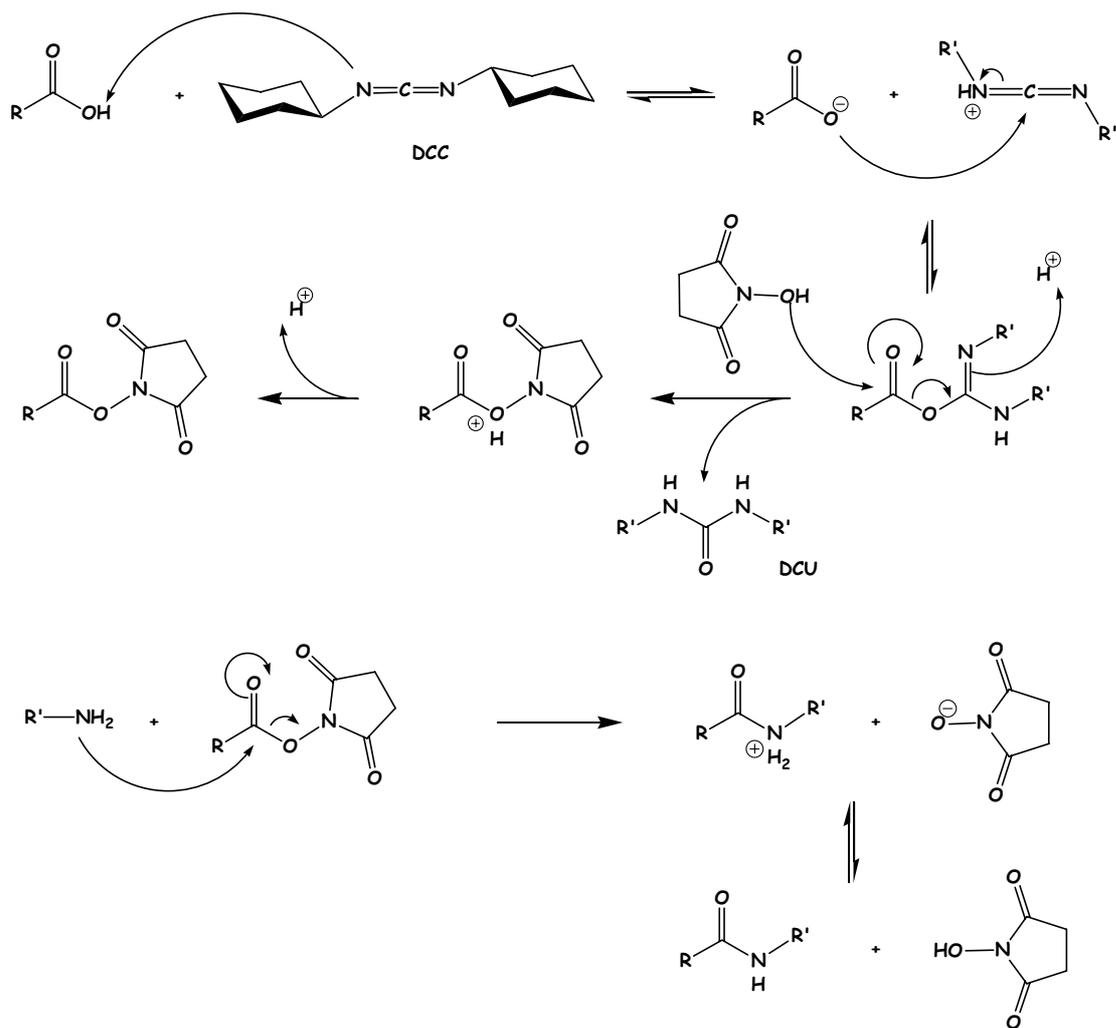


Figure 47 : Mécanisme du couplage peptidique.

Après une réaction acido-basique, la DCC sert à activer l'acide par la formation d'un ester activé. La N-hydroxysuccinimide effectue alors une addition-élimination sur cet ester de la DCC pour conduire à un ester de N-hydroxysuccinimide, ce qui libère la dicyclohexylurée (ou DCU). La force motrice est ici l'élimination de la DCU qui est un très bon groupe partant

car très stable. L'amine réagit alors sur cet ester de N-hydroxysuccinimide pour conduire à l'amide.

Des couplages peptidiques directs selon ces conditions ont été testés sur le *trans*-aminocyclohexanol avec l'acide succinique, mais n'ont jamais conduit à l'isolement du dimère correspondant.

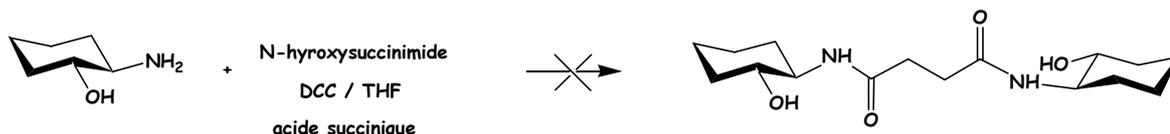


Figure 48 : Echec du couplage peptidique entre le *trans*-aminocyclohexanol et l'acide succinique.

Les problèmes sont multiples. Le premier est le fait que la DCU traîne sur la colonne (tout comme la N-hydroxysuccinimide), bien qu'une majeure partie de la DCU ait été éliminée préalablement par filtration. Toutes les fractions contiennent un peu de DCU et de N-hydroxysuccinimide. Par ailleurs, les protons de l'acide succinique apparaissent en RMN dans la zone (~2,5 ppm) où se situent déjà de nombreux pics. Il est donc difficile de pouvoir identifier le produit. Nous pouvons tout de même assurer que le produit était absent, par une comparaison faite *a posteriori* avec le spectre du dimère souhaité, obtenu par une autre méthode.

Il est à noter que de très nombreux réactifs de couplage peptidique existent [27] [28] (Cf. Fig. 49) : agent de couplage + HOBt ou HOAt ou réactifs de type acides hydroxamiques, des sels d'amidiniums dérivés de HOBt et HOAt, des sels de phosphonium dérivés de HOBt et HOAt, des haluroniums ou halophosphoniums, des sels d'uronium basés sur des acides hydroxamiques...

27 Amino acids and peptide synthesis ISBN 019 855668 3 (livre de JM)

28 Bailen, M. A. ; Chinchilla, R. ; Dodsworth, D. ; Najera, C. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 8936.

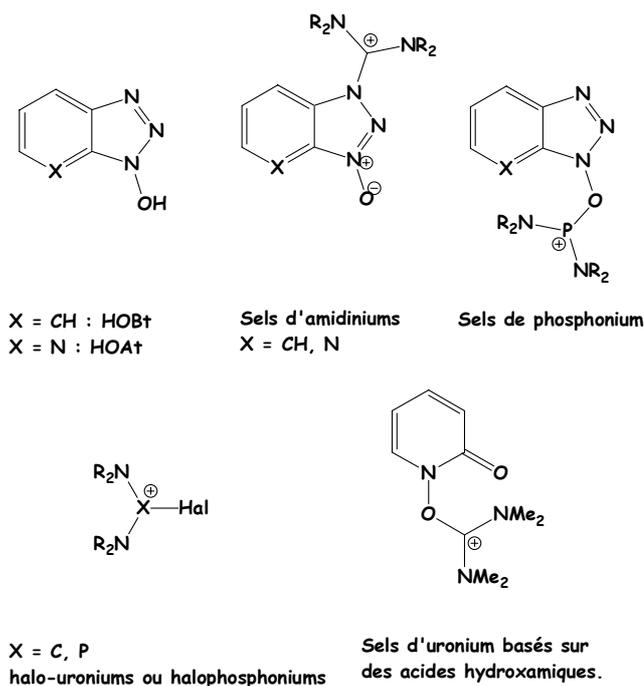


Figure 49 : Exemples d'additifs de couplages peptidiques.

Leur multiplicité reflète bien toute la complexité des couplages peptidiques, qui doivent être mis au point au cas par cas.

Comme toutes ces méthodes de couplage peptidique mettent en jeu de nombreuses espèces, et conduisent à des sous-produits pas forcément faciles à éliminer, il nous a semblé préférable de préparer dans un premier temps l'ester de la N-hydroxysuccinimide, de le purifier, puis de le mettre en réaction avec le *trans*-aminocyclohexanol. Un tel protocole ne devrait donner qu'un seul sous-produit : le NHS.

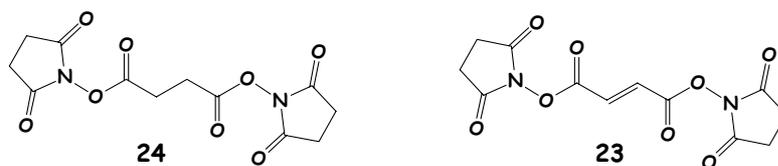


Figure 50 : Diesters de N-hydroxysuccinimide des acides succinique et fumarique.

III.1.3 Dimérisation par réaction sur les diesters de N-hydroxysuccinimide

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe II.2, les diesters de N-hydroxysuccinimide des acides succinique et fumarique ont été préparés. Leur couplage avec le *trans*-aminocyclohexanol a alors pu être testé. Dans la publication décrivant la préparation de

diesters activés par couplage peptidique ainsi que leur réaction avec une cyclohexylamine [9], le couplage est effectué dans du DMSO. Nous avons choisi d'utiliser du DMF, pour des raisons pratiques (température d'ébullition plus faible), mais aussi parce que la dimérisation d'un dérivé de l'acide glutamique est décrite à partir du diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide succinique (dont la préparation n'est pas décrite) dans le DMF [29] (Cf. Fig. 51).

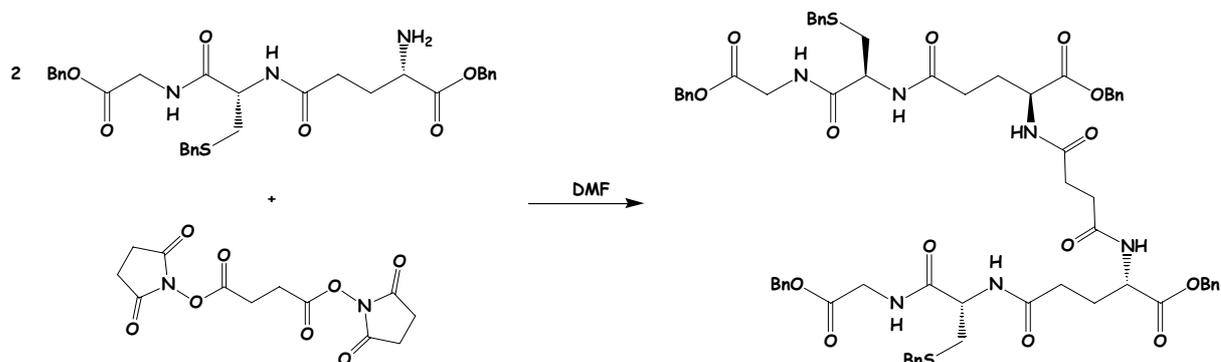


Figure 51 : Réaction de dimérisation décrite avec le diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide succinique [29]

Nous avons alors solubilisé le mélange de *trans*-aminocyclohexanol et de diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide succinique dans du DMF. Après une nuit de réaction à température ambiante, nous avons obtenu l'imide cyclique, produit de la réaction intramoléculaire (Cf. Fig. 52).

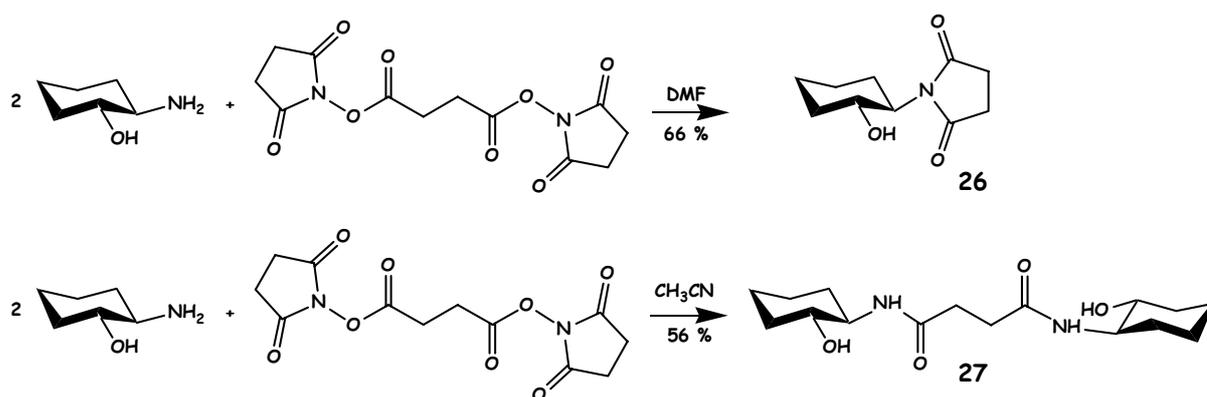


Figure 52 : Réaction du *trans*-aminocyclohexanol sur le diester activé de l'acide succinique.

9 Gestin, J. F. ; Benoist, E. ; Loussouarn, A. ; Mishra, A. K. ; Faivre-Chauvet, A. ; Chatal, J. F. *New. J. Chem.* **1997**, 21, 1021.

29 Bhargava, K. K. ; Sarin, V. K. ; Le Trang, N. ; Cerami, A. ; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 3247.

Nous avons alors effectué la même réaction dans de l'acétonitrile, solvant ayant un pK_{HB} inférieur ($pK_{HB}(\text{acétonitrile}) = 1,05$; $pK_{HB}(\text{DMSO}) = 2,53$; $pK_{HB}(\text{DMF}) = 2,06$) et nous avons obtenu le dimère souhaité avec un rendement de 56 %. Ces résultats sont en accord avec la théorie énoncée dans la publication [12] (Cf. § I.3 : « la réaction intramoléculaire ne devrait pas avoir lieu à condition de ne pas utiliser des électrophiles trop réactifs et de se placer dans des solvants ayant des faibles pK_{HB} (traduit la capacité d'effectuer des liaisons H), tels que le benzène, le chlorobenzène, mais également l'acétonitrile et le dioxane »).

La structure de ce dimère a été confirmée par obtention de ce même produit par une méthode différente : préparation du dimère par couplage du *trans*-aminocyclohexanol avec le dianhydride de pivaloyle de l'acide fumarique (Cf. Chapitre 3 § II.1.2) puis hydrogénation.

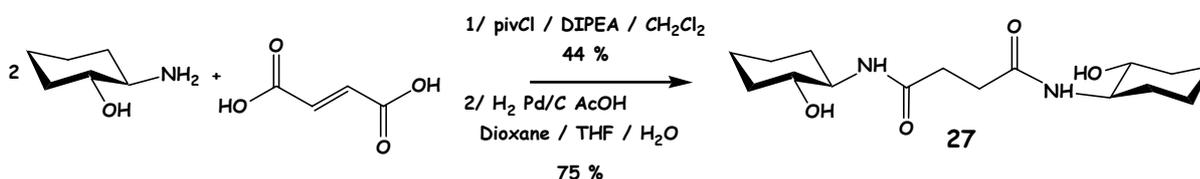


Figure 53 : Autre réaction conduisant au même produit.

Nous avons également préparé le diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide fumarique. Ce dernier présente deux avantages. D'une part, seule la réaction intermoléculaire peut avoir lieu à cause de la géométrie E de la double liaison, et d'autre part, les protons vinyliques apparaissent clairement en RMN puisqu'ils sont situés dans une zone distincte de la zone des protons du *trans*-aminocyclohexanol et de la néamine protégée.

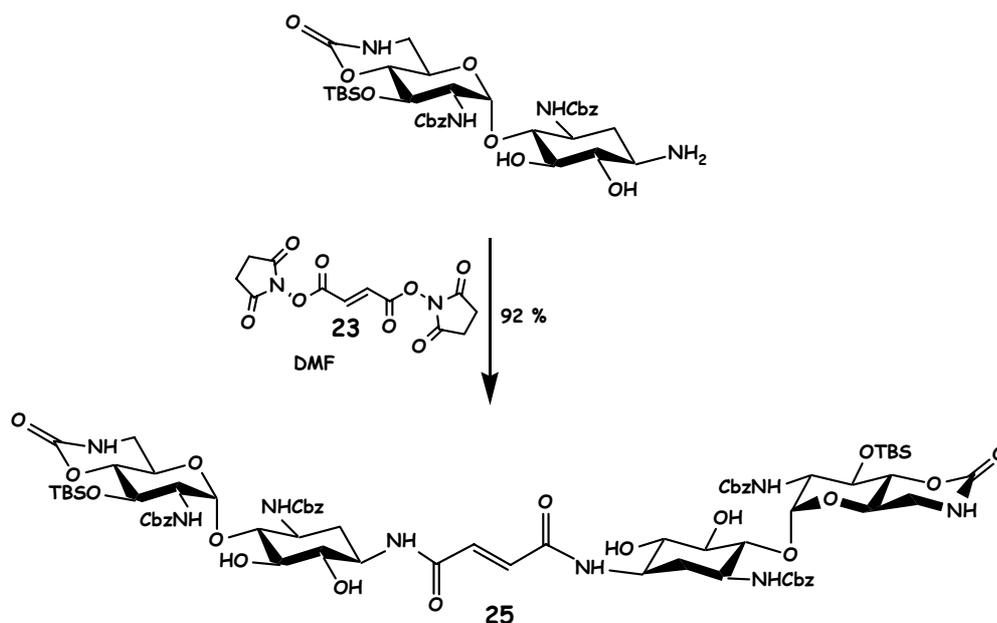


Figure 54 : Formation du dimère dérivé de la néamine grâce au diester de NHS de l'acide fumarique.

Le diester de NHS de l'acide fumarique a été mis en réaction avec le dérivé protégé de la néamine **16** dans le DMF. Après purification, le dimère **25** a été obtenu avec un excellent rendement de 92 %. Les analyses de ce dimère sont identiques à celles du produit **25** obtenu par dimérisation à l'aide du dianhydride de pivaloyle de l'acide fumarique. C'est donc du même produit qu'il s'agit, comme nous l'attendions. En revanche, le rendement est nettement meilleur à partir du dérivé bis-N-hydroxysuccinimide de l'acide fumarique (68 % ; Cf Chapitre 3 § III.1.1).

III.2 Bilan de la dimérisation pour une chaîne de quatre atomes

Deux méthodes ont conduit finalement à la formation du dimère de la néamine protégée ayant un bras à chaîne de quatre atomes. L'acide fumarique a été privilégié par rapport à l'acide succinique comme précurseur du bras, car la réaction de dimérisation a lieu sans ambiguïté. En effet, toute réaction intramoléculaire est interdite par la géométrie E de la double liaison.

Les deux méthodes de dimérisation utilisées mettent en jeu un dianhydride de pivaloyle de l'acide fumarique ou un diester de NHS de l'acide fumarique. Le dimère a été obtenu la première fois par réaction sur le dianhydride mixte de pivaloyle avec un rendement de 68 % sur les deux étapes (Cf. Fig. 55).

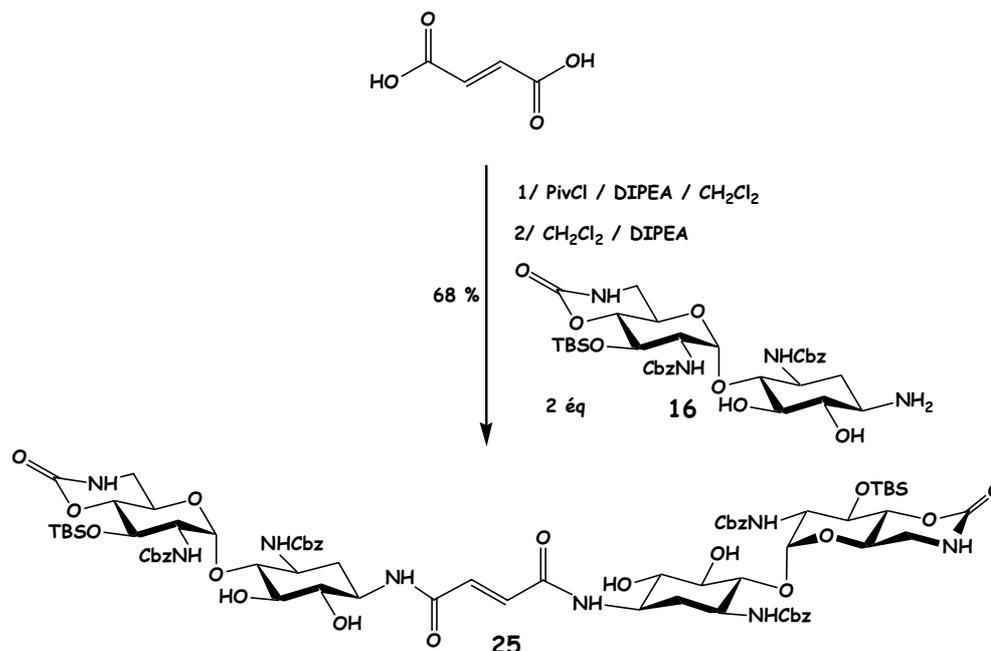


Figure 55 : Obtention du dimère 25 par réaction sur le dianhydride de pivaloyle de l'acide fumarique.

Le même dimère a ensuite été obtenu par réaction du diester de NHS sur la néamine protégée avec un rendement de 92 % (Cf. Fig. 56).

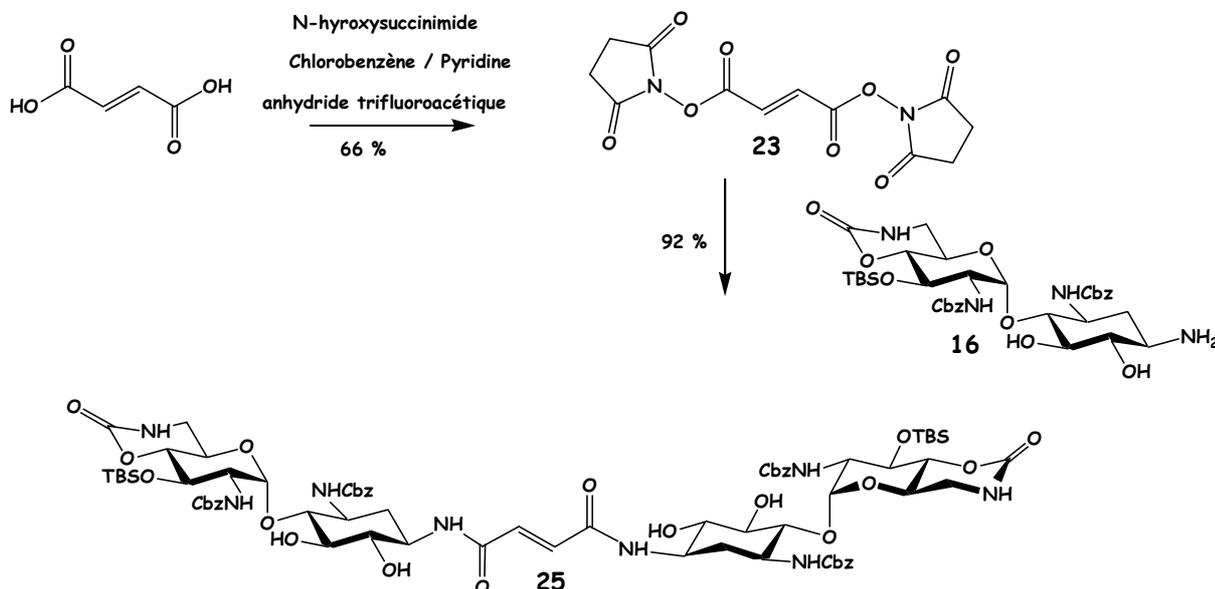


Figure 56 : Obtention du dimère 25 par réaction sur le diester de NHS de l'acide fumarique.

Même si cette dernière méthode présente un moins bon rendement sur les deux étapes (61 %) que la dimérisation par le dianhydride de pivaloyle (68 %), nous préférons tout de même la méthode du diester de NHS car son étape clef, mettant en jeu le dérivé néaminique

ayant une forte valeur ajoutée, présente un rendement de 92 %. Le rendement de la préparation de l'acide activé importe peu, car seule la réaction mettant en jeu le dérivé de la néamine est critique pour la suite. Par ailleurs, les diesters de NHS présentent l'avantage d'être stables et de pouvoir être stockés. Ils sont donc plus faciles à manipuler que les dianhydride mixtes.

III.3 Déprotections

Le dimère obtenu comporte trois types de groupes protecteurs. Deux alcools sont protégés par un groupement TBS, quatre amines sont protégées par des groupements Cbz et deux aminoalcools sont protégés par un carbamate cyclique. La première idée a été d'essayer de déprotéger en une étape à la fois les groupements Cbz et TBS.

III.3.1 Déprotection des groupements Carbobenzyloxy

La méthode classique de déprotection des groupements carbobenzyloxy consiste en une hydrogénation en présence de palladium sur charbon [30] ou de dihydroxyde de palladium sur charbon [31] en quantité catalytique en milieu acide. De telles conditions permettent de réduire également des doubles liaisons. Or, le bras espaceur contient une double liaison conjuguée avec deux carbonyles, dont la réduction peut permettre de rendre le bras moins rigide.

La réduction a été testée sur le dimère obtenu avec la molécule modèle et a permis également de vérifier la structure d'un produit (Cf. Chapitre 3 § III.1.3). La double liaison a été réduite avec un rendement de 75 %.

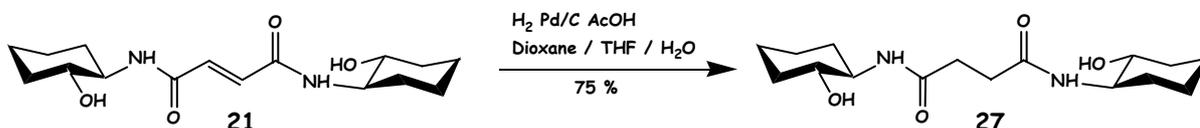


Figure 57 : Réduction par H₂ en présence de Pd/C en quantité catalytique.

Comme nous souhaitons déprotéger également l'alcool, nous avons alors choisi le mélange AcOH / THF / H₂O 3/1/1 comme solvant pour la réaction d'hydrogénation du

30 Kumar, V. ; Remers, W. A. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 3327.

31 Takamoto, T. ; Ogawa, T. ; Hanessian, S. *Can. J. Chem.* **1978**, 56, 1500.

dimère de la néamine protégée. Ce mélange de solvant est en effet connu pour déprotéger le groupement TBS [32]. Nous avons testé cette méthode sur le dimère sans succès (Cf. Fig. 58).

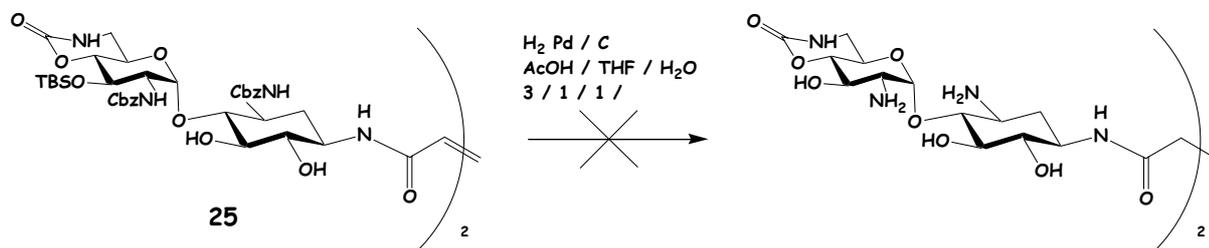


Figure 58 : Essai d'hydrogénation en présence de palladium sur charbon.

Nous n'avons pas observé la disparition du réactif en suivant l'évolution de la réaction par CCM pendant 24 h sous atmosphère d'hydrogène en présence de palladium sur charbon. Nous avons alors rajouté du catalyseur et attendu encore 6 h sans amélioration. Nous avons alors placé le mélange réactionnel dans une autoclave sous une pression d'hydrogène de 7 bars sans amélioration notable. Il est possible que notre composé empoisonne le palladium sur charbon, à cause de ses fonctions amines, les amines étant connues pour leur capacité à empoisonner le palladium [33]. Nous avons alors cherché une autre méthode.

Remers *et coll.* [34] ont utilisé une réduction par du sodium dans l'ammoniac liquide pour déprotéger des groupements Cbz ainsi que deux carbamates cycliques (Cf. Fig. 59). Un des carbamates cycliques est placé exactement comme le nôtre, entre l'amine en 6' et l'alcool en 4', et le second est un cycle à 5 chaînons.

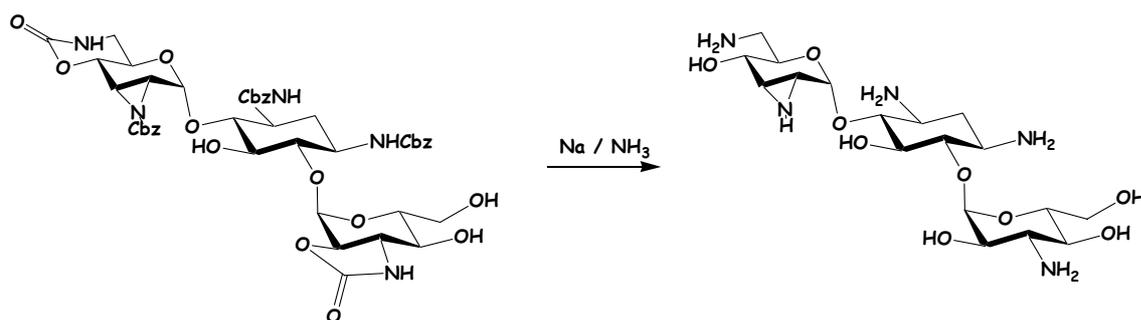


Figure 59 : Réduction décrite par Remers *et coll.* [34]

Cette réaction, similaire à la réaction de Birch, présente l'inconvénient de la manipulation de l'ammoniac liquide. Il existe néanmoins des variantes sans ammoniac. L'une

32 Nelson, T. D. ; Crouch, R. D. *Synthesis* **1996**, 1031.

33 Albers, P. ; Pietsch, J. ; Parker, S. F. *J. Moléc. Cat. A* **2001**, 173, 275.

34 Kumar, V. ; Jones, G. S. ; Blacksberg, I. ; Remers, W.A. *J. Med. Chem.* **1980**, 23, 42.

d'elles consiste à remplacer l'ammoniac liquide par des petites amines [35] [36] [37] [38] [39] telles que la méthylamine, l'éthylamine ou la propylamine, plus faciles à manipuler. Le métal utilisé est alors le lithium. Par contre, dans ces conditions, les fonctions ester [40] [41], thioester [42] et amide sont touchées. Les thioesters sont réduits en aldéhyde et thiol et les esters sont réduits en alcane et carboxylate correspondants. Une autre version de la réaction de Birch consiste à utiliser du sodium dans du naphthalène [43] [44] mais, en présence d'amines, des réactions d'amination réductrice du naphthalène peuvent avoir lieu [45] [46].

Nous n'avons donc pas testé ces deux variantes de la réaction de Birch, au profit des conditions décrites par Remers *et coll.* En effet, l'hydrogénation par le sodium dans l'ammoniac liquide nous a semblé intéressante puisqu'elle devrait permettre d'effectuer deux types de déprotections (Cbz et carbamate cyclique) en une seule étape, mais aussi d'hydrogéner la double liaison. Cela permettrait ainsi d'obtenir un dimère plus flexible que celui ayant une insaturation au niveau du bras espaceur. Cependant, les conditions fortes (électrons solvatés) de cette réduction pourraient ne pas être compatibles avec la fonction amide de notre bras. Un examen de la littérature nous a révélé que ce type de réduction est connu en présence d'une fonction amide [47] [48] [49]. Dans les trois seuls exemples décrits, il n'y a pas d'alcool libre vicinal à l'amide. Or il est connu que les amides sont stables en présence de bases et acides, sauf dans le cas où il y a un alcool libre adjacent [50]. En effet, dans ce cas-ci, il peut y avoir une assistance de l'alcool pour l'ouverture de l'amide.

Conscients du risque de perte du bras espaceur, nous avons tout de même tenté cette réaction. Nous avons alors effectué la réaction, dans les mêmes conditions que Remers *et coll.* à savoir, sans autre solvant que NH₃. Nous avons obtenu avec un rendement de 73 % le

35 Benkeser, R. A. ; Schroll, G. ; Sauve, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 3378.

36 Burgstahler, A. W. ; Worden, L. R. ; Lewis, T. B. *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 2918.

37 Kwart, H. ; Conley, R.A. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 2011.

38 Benkeser, R. A. ; Schroll, G. ; Sauve, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 3230.

39 Smith, M. B. ; March, J. *March's advanced Organic Chemistry 5th ed.* Wiley inter-science p 1012. ISBN 0-471-58589-0.

40 Smith, M. B. ; March, J. *March's advanced Organic Chemistry 5th ed.* Wiley inter-science p 529. ISBN 0-471-58589-0.

41 Barret, A. G. M. ; Godfrey, C. R. A. ; Hollinshead, D. M. ; Prokopiou, P. A. ; Barton, D. H. R. ; Boar, R. B. ; Joukhadar, L. ; McGhie, J. F. ; Misra, S. C. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I* **1981**, 1501.

42 Penn, J. H. ; Owens, W. H. *Tet. Lett.* **1992**, 33, 3737.

43 Hamann, L. G. ; Guider, A. M. ; Koreeda, M. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3507.

44 Vaillancourt, V. ; Albizati, K. F. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3627.

45 Eisenbraun, E. J. ; Bansal, R. C. ; Hertzeler, D. V. ; Duncan, W. P. *J. Org. Chem.* **1970**, 35, 1265.

46 Vliieger, J. J. ; Kieboom, A. P. G. ; Van Bekkum, H. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 1389.

47 Schultz, A. G. ; Green, N. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4931.

48 Donohoe, T. J. ; Helliwell, M. ; Stevenson, C. A. *Tet. Lett.* **1998**, 39, 3074.

49 Byun, H.-S. ; Sadlofsky, J. A. ; Bittman, R. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2561.

produit hydrogéné et déprotégé (perte des groupements Cbz). Par contre, la fonction carbamate entre l'amine 6' et l'alcool 4' était toujours présente (Cf. Fig. 60).

La disparition des groupements Cbz et l'hydrogénation de la double liaison sont visibles sur le spectre ^1H (disparition du multiplet aromatique, des CH_2 benzyliques aux alentours de 5 ppm, et du proton alcène, et apparition d'un signal à 2,5 ppm intégrant pour 2H). Le spectre ^{13}C confirme ces informations mais révèle la présence du carbonyle du carbamate cyclique ($\text{C}=\text{O}$ à 174,8 ppm).

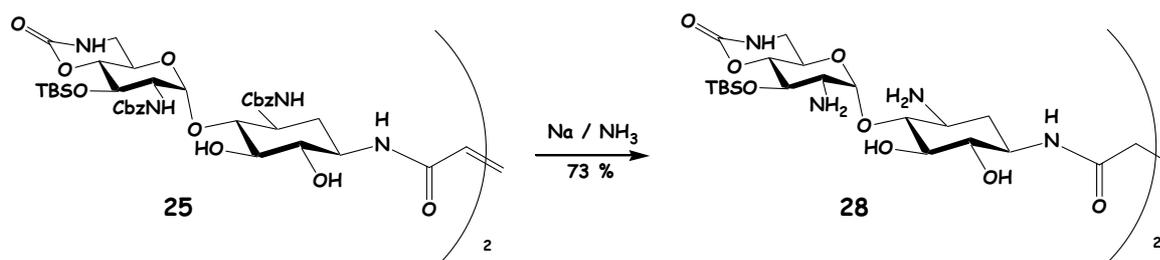


Figure 60 : Réaction d'hydrogénation de la double liaison et de déprotection des groupements Cbz.

Nous avons supposé que le carbamate cyclique n'avait pas été ouvert dans ces conditions à cause du groupement TBS. Il est peut-être nécessaire d'avoir un alcool libre adjacent afin qu'il puisse effectuer une assistance à l'ouverture du carbamate. C'est pourquoi nous souhaitons déprotéger l'alcool au préalable.

III.3.2 Déprotection de l'alcool silylé

Dans un premier temps, nous avons testé les méthodes de déprotections classiques basées sur l'emploi d'ions fluorure sur le dimère 25. La déprotection à l'aide du TBAF dans le THF s'est avérée lente (environ 20 h). Divers essais ont montré que la réaction nécessitait 3 équivalents de TBAF par fonction protégée, et qu'elle conduisait bien à une déprotection. Par contre, nous n'avons pas réussi à séparer le produit des sels de tétrabutylammonium. Ceci est dû à la solubilité du dimère : il n'est pas soluble dans les solvants non miscibles à l'eau (impossibilité d'effectuer une extraction liquide-liquide du produit) et il est suffisamment soluble dans l'eau pour interdire une évaporation des solvants suivie d'une filtration avec rinçage à l'eau dans le but de retirer les sels de tétrabutylammonium. Par ailleurs, des triturations à l'acétone avec filtration n'ont pas permis de retirer ces sels. Une purification par

chromatographie sur colonne de silice ne s'est pas non plus montrée efficace, car elle n'a permis d'isoler que 6 % de produit pur, le reste étant mélangé aux sels de tétrabutylammonium.

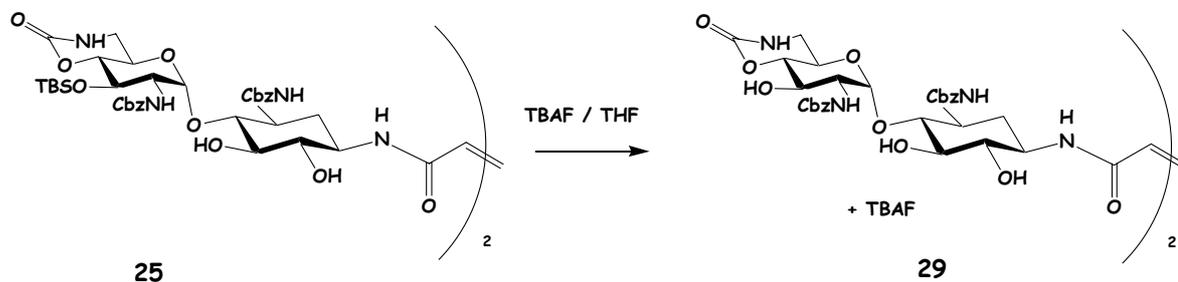


Figure 61 : Déprotection du dérivé 25 par le TBAF.

Cette déprotection au TBAF a également été testée sur le produit issu de la réduction (28), sans amélioration de la purification, malgré une solubilité différente du produit.

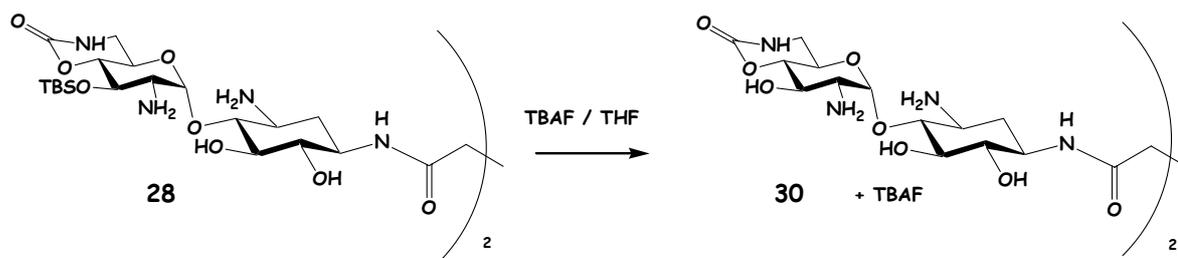


Figure 62 : Déprotection du dérivé 28 par le TBAF.

Afin de résoudre ce problème de purification, nous avons changé la nature du contre-ion. Le choix s'est porté sur l'ion potassium qui devrait présenter une affinité pour les solvants organiques moins forte que celle de l'ion tétrabutylammonium. Nous avons testé la désilylation par le fluorure de potassium dans un mélange DMF/eau pendant 4 jours. Le produit présentait une très faible solubilité dans la plupart des solvants et la chromatographie sur colonne de silice a nécessité finalement une élution au DMF. Il a été possible d'isoler le produit avec un rendement de 39 %, mais le spectre RMN ¹H montrait la présence en faible quantité du groupement TBS (Cf. Fig. 63).

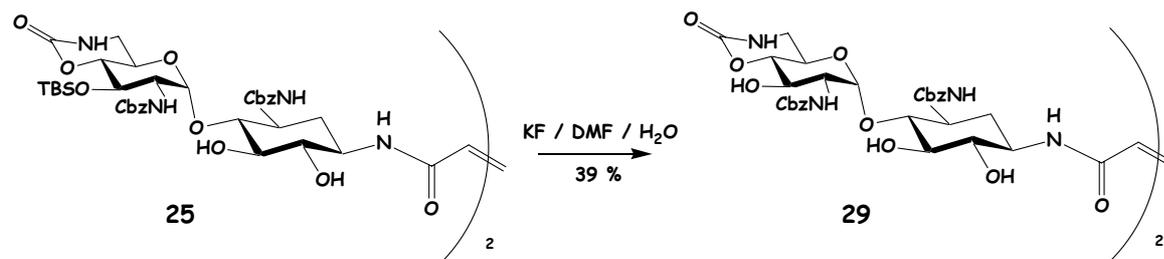


Figure 63 : Réaction de désilylation par KF.

Une alternative aurait été d'utiliser du fluorure de potassium sur alumine [51]. La purification serait alors une simple filtration, mais notre produit qui est très polaire risquerait de s'adsorber également sur la silice.

Nous avons alors testé la résine A26(F⁻), l'idée étant de purifier le produit par simple filtration de la résine, mais nous n'avons pas observé de déprotection. Peut être que les ions fluorures ne sont pas assez accessibles. L'utilisation de cette résine n'est cependant pas documentée pour des déprotections. Elle est généralement utilisée pour effectuer des échanges d'halogène [52] [53] [54] [55].

Nous en sommes alors venu aux conditions acides, au risque de toucher la fonction amide. Les conditions acides sont assez intéressantes, car c'est en milieu acide que les désilylations s'effectuent le plus vite [56] [32]. On peut donc espérer accélérer la réaction de déprotection du groupement TBS (les désilylations précédentes étaient très lentes). Après plusieurs essais de combinaisons de solvants, nous avons trouvé que la méthode la plus simple et la plus efficace était la suivante. Il faut placer le composé en suspension dans un minimum de méthanol avec de l'acide chlorhydrique molaire pendant une dizaine de minutes (Cf. Fig. 64). Il suffit ensuite d'évaporer sans chauffer le mélange pour obtenir le produit déprotégé pur (29), puisque tous les sous-produits et réactifs en excès sont volatils. Les spectres RMN ¹H et ¹³C montrent la présence d'un seul produit et l'absence du groupement TBS.

51 Blass, B.E. ; Harris, C. L. ; Portlock, D. E. *Tet. Lett.* **2001**, 42, 1611.

52 Cainelli, G. ; Manescalchi, F. *Synthesis* **1976**, 472.

53 Cousseau, J. ; Albert, P. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 5380.

54 Yoshida, Y. ; Kimura, Y. *Tet. Lett.* **1989**, 30, 7199.

55 Sierakowski, T. ; Kiddle, J. J. *Tet. Lett.* **2005**, 46, 2215.

56 Cunico, R. F. ; Bedell, L. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 4797.

32 Nelson, T. D. ; Crouch, R. D. *Synthesis* **1996**, 1031.

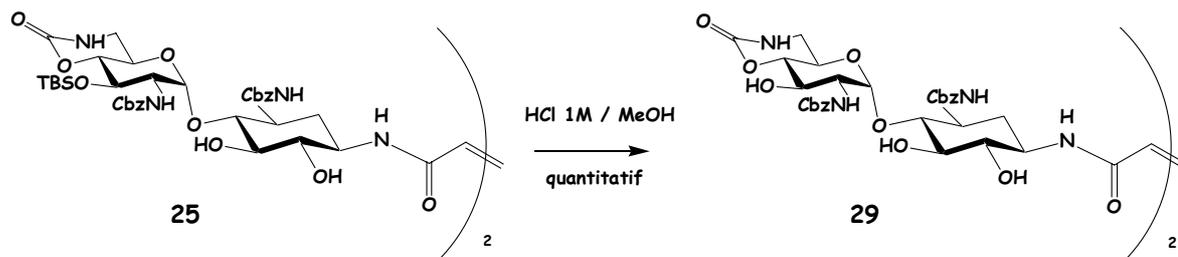


Figure 64 : Désilylation du composé **25** en milieu acide.

Cette méthode a été également testée sur le produit issu de la réduction (**28**) avec comme seule différence le fait que ce dernier est soluble dans le méthanol et que la réaction se fait en milieu homogène, contrairement à la réaction précédente. La réaction est à nouveau quantitative et elle conduit au produit propre (Cf. Fig. 65).

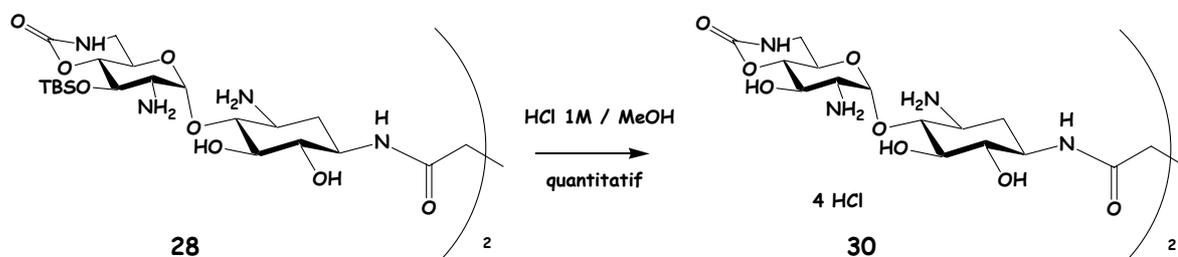


Figure 65 : Désilylation du composé **28** en milieu acide.

III.3.3 Test des conditions réductrices en présence de l'alcool libre

Comme nous avons obtenu le dimère **29** ayant l'alcool 3' déprotégé, nous l'avons placé les conditions utilisées par Remers *et coll.*, en espérant décarboxyler le carbamate cyclique grâce à une assistance de l'alcool libre adjacent. Nous avons obtenu avec un rendement de 67 % le produit hydrogéné et déprotégé, cependant, nous n'avons pas observé d'ouverture du carbamate cyclique, comme le montre son signal à 155,2 ppm en RMN du ^{13}C (Cf. Fig. 66).

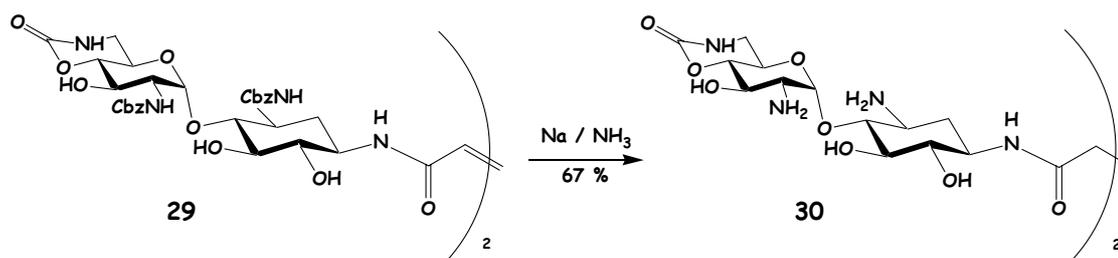


Figure 66 : Conditions réductrices en présence de l'alcool 3' libre.

Ceci nous amène à penser que l'ouverture du carbamate cyclique a été possible dans le cas de la molécule de Remers *et coll.* uniquement car elle avait une configuration plus tendue liée à la présence du cycle à trois chaînons de l'aziridine à côté du carbamate cyclique (Cf. Fig. 67).

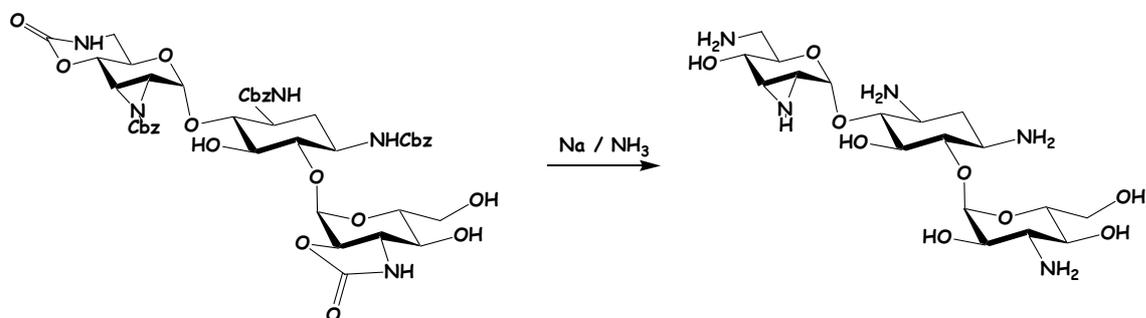


Figure 67 : Réduction des groupements Cbz et carbamate cyclique décrite par Remers et Coll. [34]

Au vu de ce résultat, il ne semble pas nécessaire d'effectuer la déprotection de l'alcool avant l'étape de réduction. Nous avons alors opté pour une déprotection de l'alcool après la réduction pour des questions de solubilité des molécules. En effet, la molécule **28** est soluble dans le méthanol contrairement à **25**, ce qui permet d'effectuer la déprotection de l'alcool en milieu homogène plutôt qu'hétérogène. En effet, avec un produit en suspension, il y a plus de risques de rencontrer des problèmes de réactivité à plus grande échelle. D'autre part, les solvants utilisés pour la purification par chromatographie après réduction sont plus faciles à évaporer (dioxane/MeOH/NH₃ pour **28** plutôt que dioxane/H₂O/NH₃ pour **30**) pour la molécule **28**. L'ordre réactionnel optimal est donc le suivant avec un rendement de 70 % sur les deux étapes :

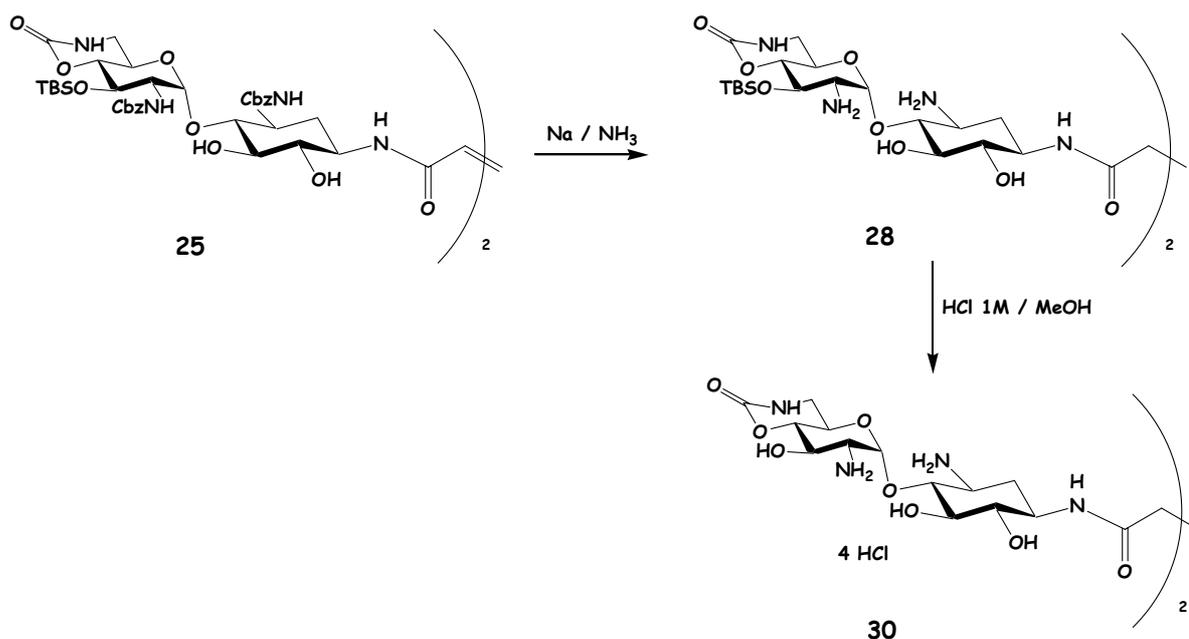


Figure 68 : Ordre réactionnel optimal pour la déprotection des groupements Cbz et TBS.

III.3.4 Déprotection du carbamate cyclique

L'ouverture classique des carbamates se fait par des ions hydroxyde. Plus précisément, des ouvertures sélectives par la soude en présence d'amides sont référencées [57] [58]. De même, l'ouverture du carbamate cyclique entre les positions 6' et 4' de dérivés de la néamine se fait par l'hydroxyde de baryum dans un mélange de dioxane et d'eau à 50-60°C même en présence d'une fonction amide, plus stable [8] [30]. Cependant, dans toutes ces références, l'alcool vicinal de l'amide n'est pas libre : soit il est protégé par un THP soit, il porte un sucre. Dans notre cas, l'amide se situe à côté d'un alcool libre, qui peut assister une éventuelle ouverture [50]. Nous avons donc voulu tester la stabilité de notre bras espaceur dans les conditions basiques nécessaires à la déprotection du carbamate.

Pour ce faire, nous avons traité le dimère modèle par deux équivalents d'hydroxyde de baryum à 40°C. Nous avons trouvé que la moitié du réactif s'était dégradée en 19 h (Cf. Fig. 69).

57 EP 635493 1995-01-25 Process for the preparation of a beta-aminoalcohol.

58 Norman, B. H. ; Morris, M. L. *Tet. Lett.* **1992**, 33, 6803.

8 Kumar, V. ; Remers, W. A. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 3327.

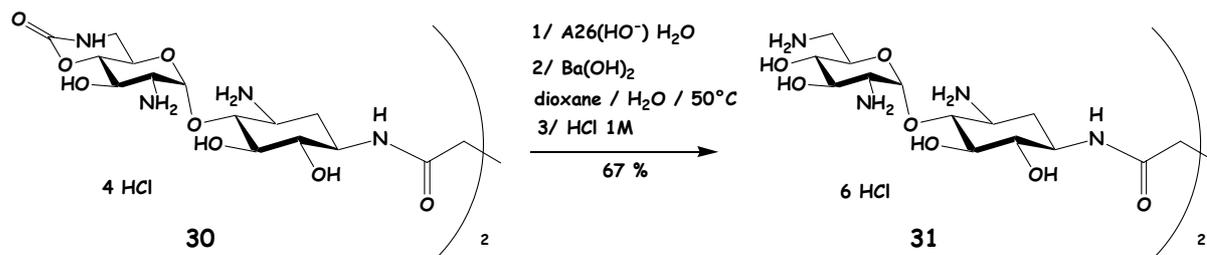


Figure 71 : réaction de déprotection de l'aminoalcool en position 4' et 6'.

Ce produit a été purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : dioxane/H₂O/NH₃ 5/5/0,5 puis 8/2/1). Cet éluant, contenant de l'eau, entraîne un peu de silice. Pour s'en débarrasser, il suffit de triturer le produit avec un minimum d'une solution molaire d'acide chlorhydrique, de filtrer la silice et d'évaporer à froid pour obtenir le produit protoné. Le produit entièrement déprotégé et six fois chlorhydraté a ainsi été obtenu avec un rendement de 67%.

Cette réaction de déprotection illustre bien la différence de stabilité entre une fonction amide et un carbamate, sans laquelle il aurait été impossible d'effectuer cette dernière étape. Elle montre également le rôle d'assistance des alcools vicinaux. L'alcool libre adjacent au carbamate cyclique a été nécessaire pour décarboxyler ce dernier. Par contre, il fallait éviter l'assistance de l'alcool vicinal de l'amide (amide liant la néamine au bras espaceur) en arrêtant la réaction à temps.

III.3.5 Schéma final de déprotection

En résumé, les réactions de modification et de déprotection du dimère ayant un bras à quatre atomes doivent être effectuées dans l'ordre suivant (Cf. Fig. 72). La déprotection des groupements Cbz et l'hydrogénation de la double liaison sont menées dans les conditions réductrices de type « Birch ». La désilylation est ensuite effectuée en milieu acide à l'aide d'acide chlorhydrique qui présente l'avantage d'être volatil et de conduire à une purification par simple évaporation des solvants et sous-produits (TBSOH qui est également volatil). Finalement, une décarboxylation par de l'hydroxyde de baryum permet de libérer l'aminoalcool qui était protégé sous forme d'un carbamate cyclique.

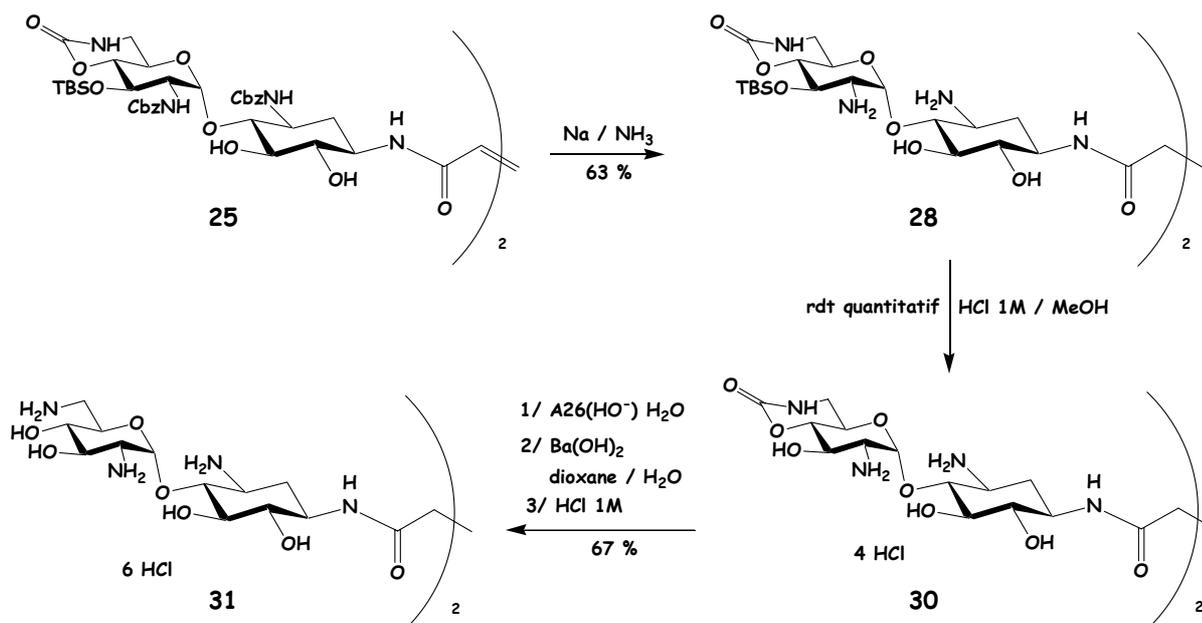


Figure 72 : Schéma final de déprotection du dimère à chaîne de quatre atomes.

III.3.6 Vérification de la structure du produit final par RMN

Les spectres RMN ¹H, COSY, HSQC, HMBC et ROESY du composé 31 hexa-chlorhydraté ont été effectués dans D₂O à température ambiante en présence de *tert*-butanol pour les calibrer.

L'observation du spectre ¹H (cf. Fig. 73) montre l'absence des groupements protecteurs TBS et Cbz. La disparition du carbamate cyclique qui protégeait l'amine et l'alcool en position 6' et 4' est visible sur les spectres ¹³C, HMBC (disparition de la corrélation avec les protons en 6') et peut être suspectée sur le spectre ¹H par la modification des constantes de couplages du proton dit « 6'ax ». Ce proton résonne à 3.3 ppm sous forme d'un doublet dédoublé ayant une grande constante de couplage ($J_{6'ax-6'éq} = 13.5$ Hz) et une plus petite ($J_{6'ax-5'} = 6.8$ Hz), alors qu'il apparaissait sous forme d'un pseudo triplet ($J_{6'ax-6'éq} = J_{6'ax-5'}$) sur tous les spectres des produits ayant le carbamate cyclique à 6 chaînons. De plus, la molécule est entièrement symétrique, ce qui traduit le fait que ses deux carbamates cycliques ont été décarboxylés. En effet, le produit intermédiaire d'ouverture d'un seul des deux carbamates cycliques peut être isolé en cours de réaction, et il est dissymétrique.

Par ailleurs, les protons du bras sont toujours présents (CH₂ à 2.6 ppm) et corrélient en longue distance avec le carbonyle porté par l'amine en position 1 (Cf. Fig. 76).

Les spectres à deux dimensions permettent d'attribuer les différents signaux en ^1H et ^{13}C de chaque proton et chaque carbone de la molécule, de la même façon que pour les produits précédents.

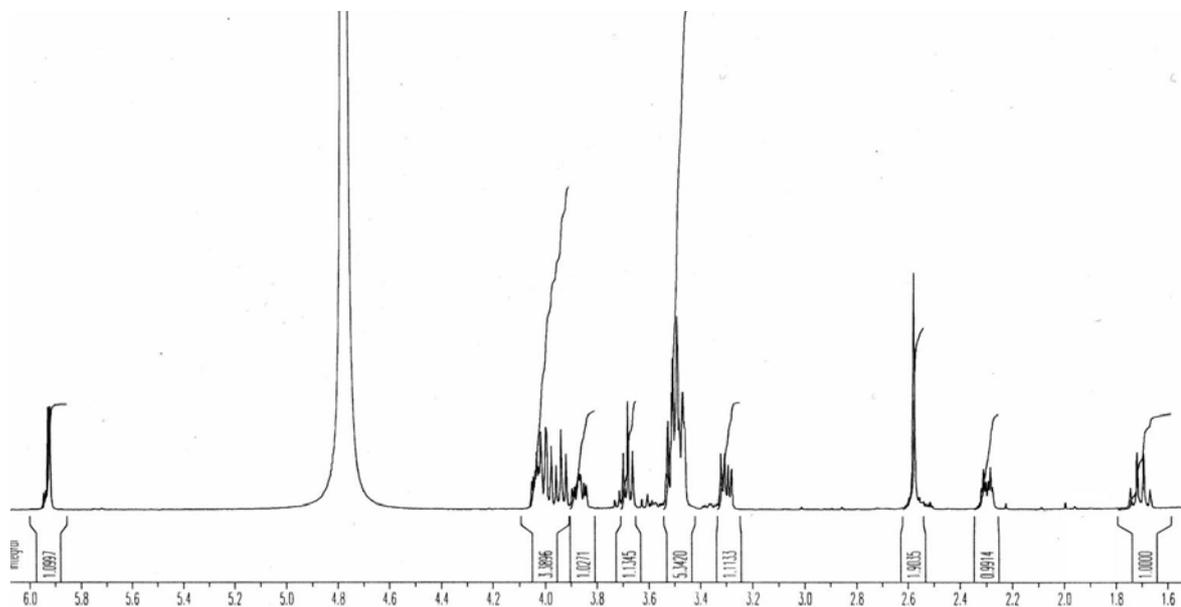


Figure 73 : Spectre ^1H du composé 31 dans D_2O .

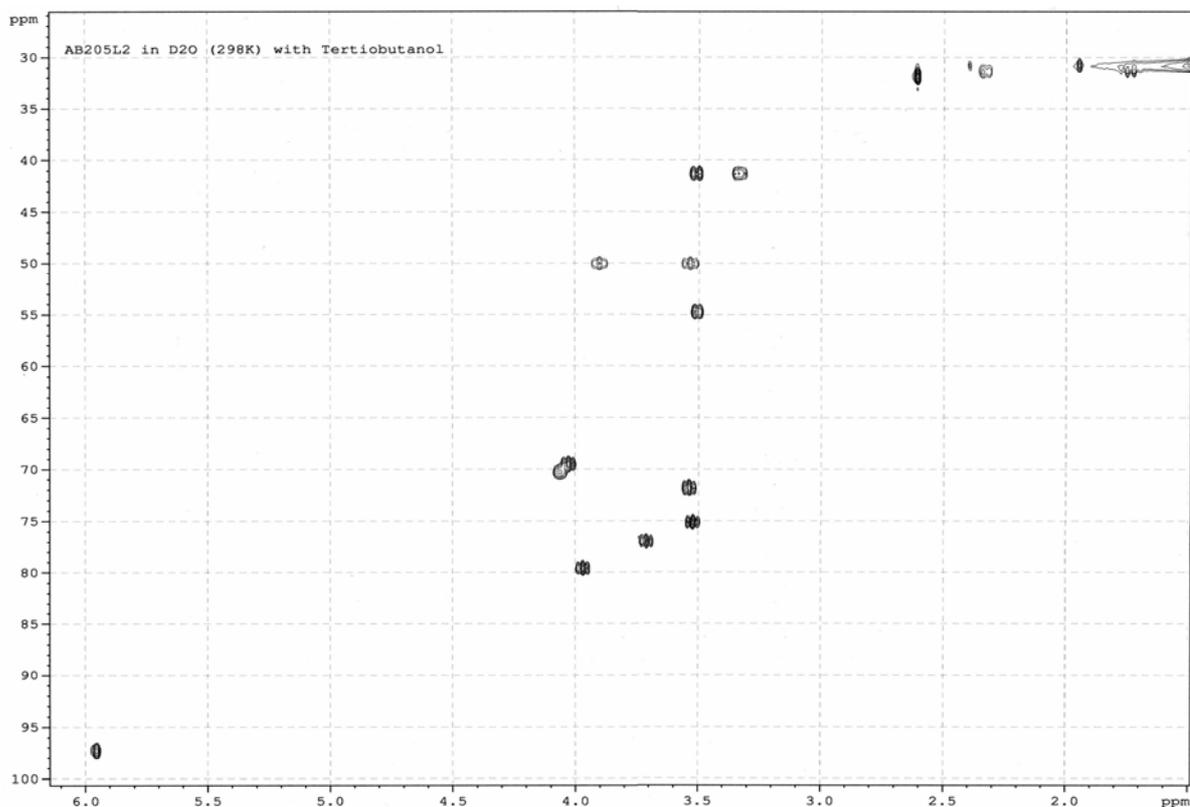


Figure 74 : Spectre HSQC du composé 31 dans D_2O .

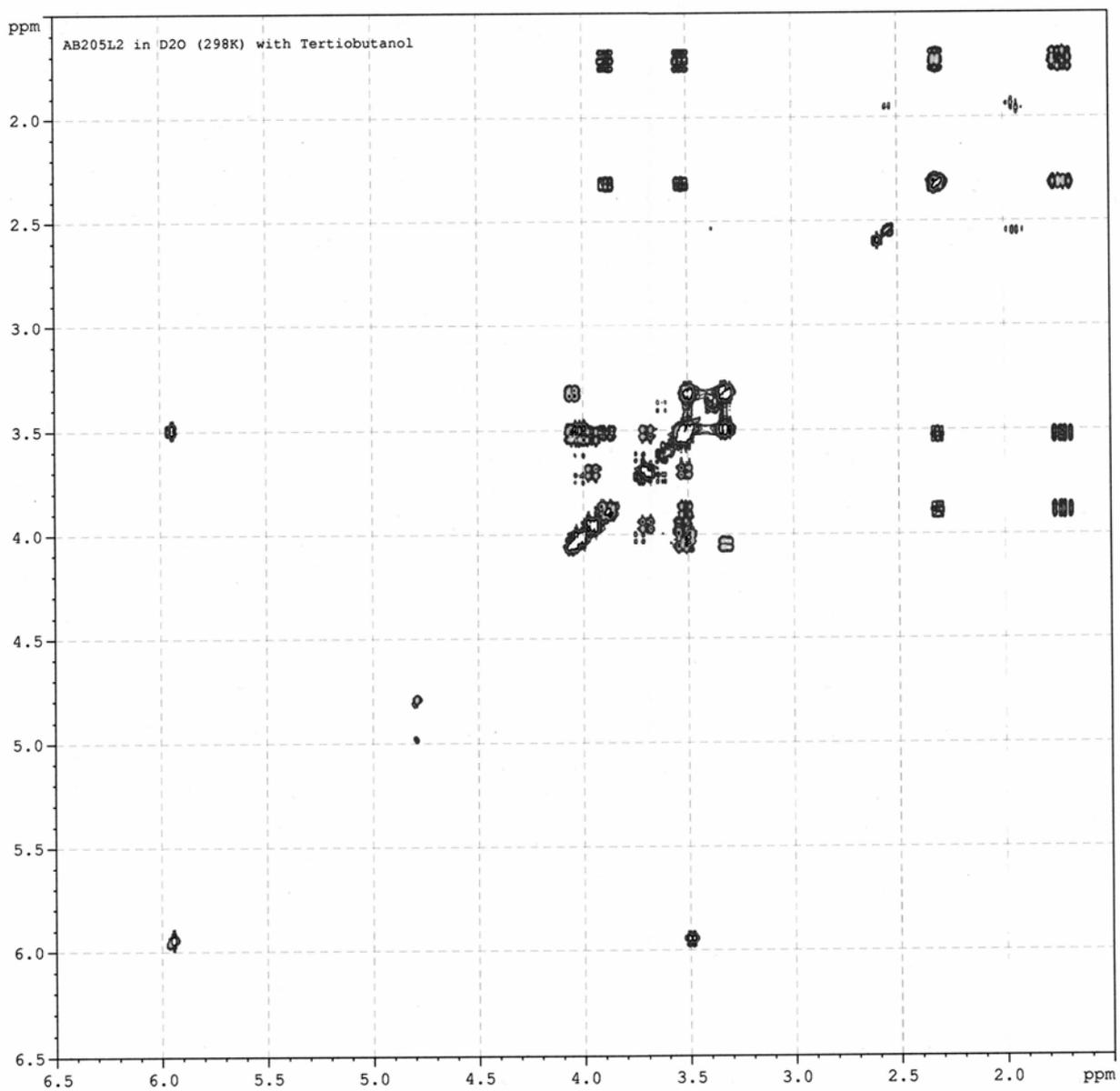


Figure 75 : Spectre COSY du composé 31 dans D₂O.

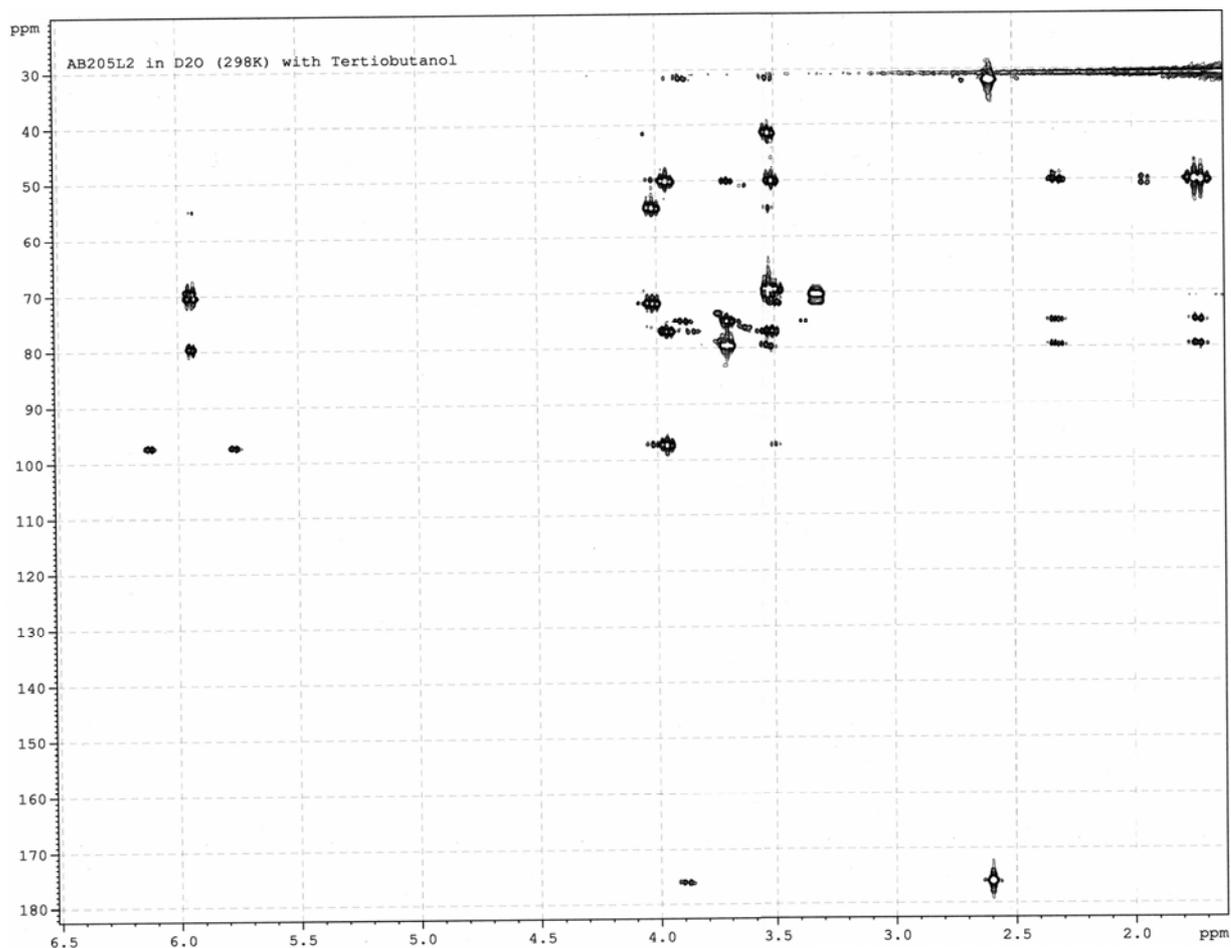


Figure 76 : Spectre HMBC du composé 31 dans D₂O.

IV DIMERE A CHAINE DE 3 ATOMES

IV.1 Dimérisation par le dichlorure de malonyle

Dans le cas des dimères à chaîne de quatre atomes, nous ne nous étions pas intéressés à la dimérisation par le dichlorure de succinimidyle, car les chlorures, très réactifs, sont décrits comme étant moins sélectifs que les diesters ou dianhydrides [1] et que le risque de réaction intramoléculaire est plus élevé (Cf. Chapitre 3 § I.3). Cependant, comme la réaction

avec dichlorure de malonyle est utilisée pour préparer un dimère de la glucosamine avec un bon rendement [60], nous avons tout de même voulu la tester sur notre composé.

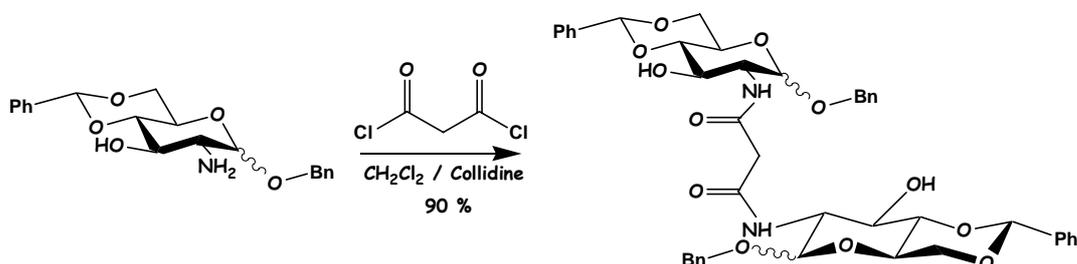


Figure 77 : Réaction de dimérisation d'un dérivé de la glucosamine par le dichlorure de malonyle [60].

Dans cet exemple, la réaction est conduite, dans un premier temps, à basse température afin de favoriser la chimiosélectivité, puis dans un deuxième temps, la température est augmentée progressivement jusqu'à 20°C. Le rendement observé est de 90 %. Il est possible nous observions à la fois la formation de l'ester et de l'amide. Cependant, l'ester formé est moins stable que l'amide formé. L'équilibre d'estérification devrait alors être déplacé vers la disparition de l'ester au profit de l'amide.

Nous avons donc testé ces conditions de réaction directement sur le composé **16**, qui est soluble dans le dichlorométhane plutôt que sur la molécule test qui elle, est peu soluble dans ce solvant. Nous n'avons pas obtenu le dimère souhaité, mais nous avons récupéré, après purification, le composé **16** protoné. On peut noter que la protonation n'est pas liée à l'extraction ou la purification, puisque le mélange a été solubilisé dans le méthanol, adsorbé sur silice, évaporé, puis purifié par chromatographie. Suite à cet échec nous avons décidé d'utiliser notre composé en tant que base à la place de la collidine. Cinq équivalents du composé **16** ont été mis en réaction : 2 éq. pour le dimère, 2 éq. pour déprotoner, 1 éq. supplémentaire pour déprotoner au cas où 1 éq. aurait été perdu dans la déprotonation du proton acide de la chaîne malonique. Les temps de réaction ont été augmentés sans succès, un chauffage n'a pas non plus conduit au dimère. Dans tous ces essais, le réactif **16** est récupéré en plus de petites quantités de dérivés non identifiés. Ces résultats restent inexplicables.

60 Seymour, F. R. ; Gross, P. H. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 1079.

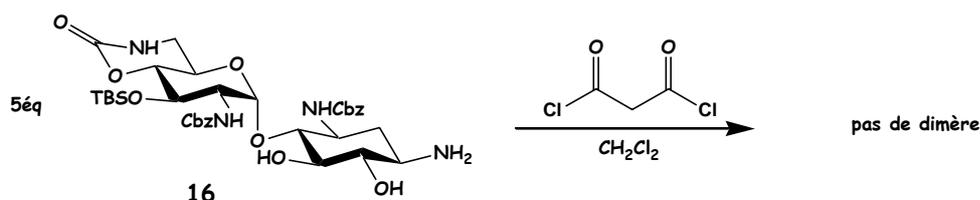


Figure 78 : Echec de la dimérisation du dérivé 16 par le dichlorure de malonyle.

IV.2 Dimérisation par couplage peptidique direct

Le couplage peptidique direct a été testé sur l'acide malonique. Comme pour l'introduction de l'acide succinique via cette méthode, nous nous sommes heurtés aux mêmes problèmes de purification (séparation de la DCU) et de lecture des spectres RMN (conclusions difficiles à tirer au vu des nombreux pics. Nous n'avons jamais isolé le dimère souhaité.



Figure 79 : Essais de couplage peptidique avec l'acide malonique sur la molécule modèle.

Nous nous sommes alors penchés sur une approche similaire à celle du dimère à chaîne de 4 atomes, qui consiste à faire réagir l'aminoalcool sur le diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide malonique ou le dianhydride de pivaloyle de l'acide malonique. Malgré de nombreux essais, nous n'avons jamais formé les réactifs désirés (Cf. Chapitre 3 § II.1.3 et II.2.5.3). Il semblerait que la chimie de l'acide succinique ne puisse pas se transposer à celle de l'acide malonique. Suite à ces échecs, nous nous sommes intéressés à d'autres approches.

IV.3 Dimérisation par transestérification

Cette dimérisation met en jeu le diméthylmalonate dont les deux esters peuvent réagir avec deux amines pour former deux fonctions amides. Le principe de cette réaction repose sur le fait qu'un amide est plus stable qu'un ester. En se plaçant dans les conditions thermodynamiques (c.a.d. à haute température avec des temps de réaction suffisants), la

réaction va avancer jusqu'à atteindre l'équilibre thermodynamique reflétant la différence de stabilité entre l'amide et l'ester : la transestérification conduira donc majoritairement à l'amide. Plusieurs exemples de transestérifications à partir des esters éthyliques ou méthyliques de l'acide malonique sont référencés pour des 1,2-aminoalcools, notamment dans le cadre de synthèses de ligands ayant des motifs *bis*-oxazoles [61] [62]. En particulier, la transestérification du diéthylmalonate par le *trans*-aminocyclohexanol est décrite [63]. Elle s'effectue à reflux dans le diéthylmalonate, ce qui signifie vers 200°C. Cette réaction risque d'être trop violente pour notre composé. Par contre, la transestérification du diméthylmalonate est décrite en deux étapes pour un dérivé de la glucosamine [60] et nécessite des températures moins élevées (Cf. Fig. 80). Il est précisé que les esters méthyliques sont considérablement plus réactifs que les éthyliques. Leur utilisation permet de travailler à température moins élevée et de diminuer les temps de réaction.

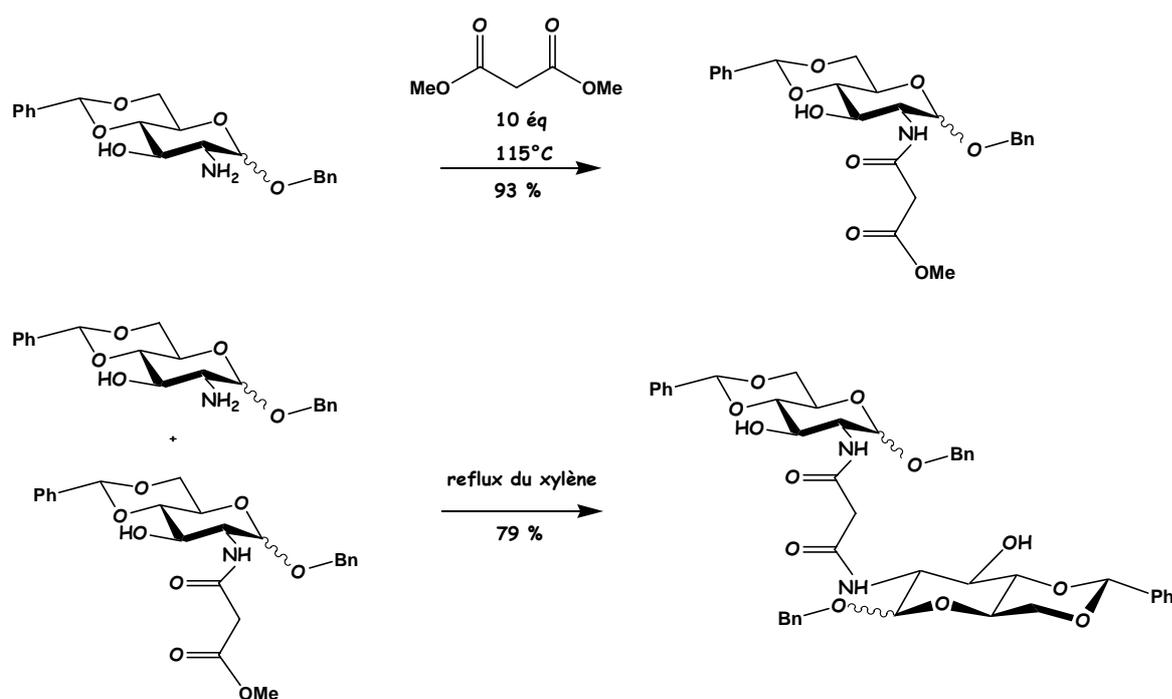


Figure 80 : Synthèse d'un dimère par transestérification [60]

Dans la première étape de la transestérification du dérivé de la glucosamine, le diméthylmalonate sert à la fois de réactif et de solvant. Il est placé en excès (10 éq.). Nous nous sommes donc placés dans ces conditions avec le *trans*-aminocyclohexanol. Notre

61 Helmchen, G. ; Krotz, A. ; Ganz, K.-T. ; Hansen, D. *Synlett* **1991**, 257.

62 Müller, D. ; Umbricht, G. ; Weber, B. ; Pfaltz, A. *Helv. Chimica. Acta* **1991**, 74, 232.

63 Ried, W. ; Draibach, A. *Ann. Chem.* **1958**, 616, 82.

60 Seymour, F. R. ; Gross, P. H. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 1079.

mélange restait hétérogène (l'homogénéité n'a pas non plus pu être obtenue avec du THF). Il a été chauffé à 115°C puis à 130°C pendant 24 h sans que le *trans*-aminocyclohexanol ne disparaisse mais trois autres spots (en plus du diméthylmalonate) étaient déjà présents sur la CCM. Nous avons alors ajouté une quantité catalytique d'acide acétique et poursuivi le chauffage pendant 7 h. Nous avons noté que le mélange était devenu homogène et jaunâtre au bout de 5h30. Cependant, c'est le composé bis acylé qui a été obtenu après purification (Cf. Fig. 81).

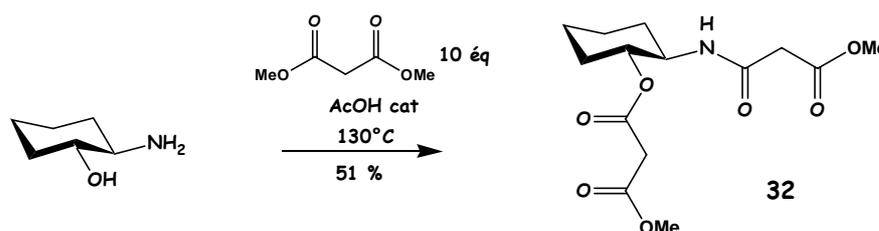


Figure 81 : Bis acylation obtenue par transestérification avec le *trans*-aminocyclohexanol.

Ceci est en contradiction avec ce qui était décrit. Il serait possible de saponifier ensuite l'ester, cependant, l'étape de dimérisation serait alors ramenée à trois étapes. De plus, ces réactions nécessitent des températures élevées, qui risquent d'affecter le dérivé de la néamine. Nous n'avons donc pas poursuivi les recherches dans ce domaine.

IV.4 Dimérisation par amination réductrice

Une amination réductrice met en jeu une amine et un aldéhyde ou une cétone en présence d'un réducteur de type hydrure. La réaction est conduite à un pH de l'ordre de 5-7. L'amine s'additionne sur le carbonyle, puis une élimination d'eau conduit à un iminium. Celui-ci est alors réduit *in situ* dès sa formation par le réducteur présent dans le milieu. L'hydrure utilisé généralement est le cyanoborohydrure de sodium [64] [65], qui est stable en milieu légèrement acide. En effet, le groupement cyano, électroattracteur, décroît la réactivité des hydrures et le rend ainsi relativement stable en milieu acide mais également sélectif. Au pH de la réaction, il va réduire rapidement les iminiums sans toucher aux carbonyles, dont la réduction est très lente. Les carbonyles ne sont réduits par le cyanoborohydrure de sodium

64 Aldrich-Bornes *Synthesis* **1975**, 135.

65 Borch, R. F. ; Bernstein, M. D. ; Dupont Durst, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 3030.

qu'à pH 3-4 (ils sont alors activés par l'acide). On comprend que la réaction nécessite un contrôle du pH.

Par ailleurs, les aminations réductrices peuvent avoir lieu en présence de fonctions alcool libres. Par exemple, une amination réductrice est décrite sur la valioline, un aminocyclohexane polyhydroxylé ayant un motif aminoalcool [66] (Cf. Fig. 82).

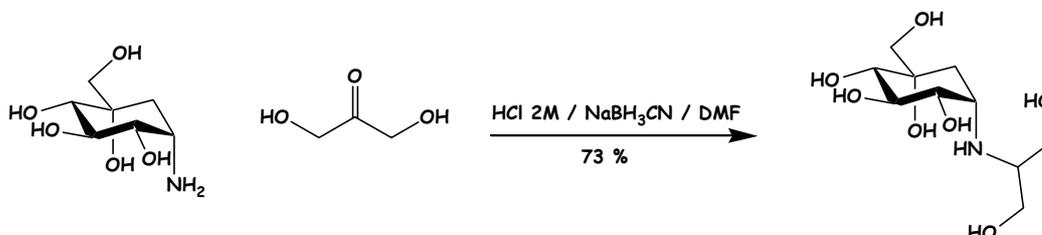


Figure 82 : Amination réductrice décrite sur la valioline.

L'amination réductrice conduisant à un bras de trois atomes nécessite l'utilisation d'un dialdéhyde, le malonaldéhyde. Ce composé n'est pas commercial, car il est très instable. Il se condense sur lui-même pour conduire à des oligomères dont certains ont pu être identifiés et isolés [67]. Ces réactions sont très dépendantes du pH. Le malonaldéhyde est classiquement préparé *in situ* en milieu acide (HCl 1M) à partir du 1,1,3,3-tetraméthoxypropane (TMP) [68]. Il existe sous la forme énol conjuguée, dont les deux isomères (Z et E) sont obtenus (Cf. Fig. 83). Il est généralement utilisé immédiatement.

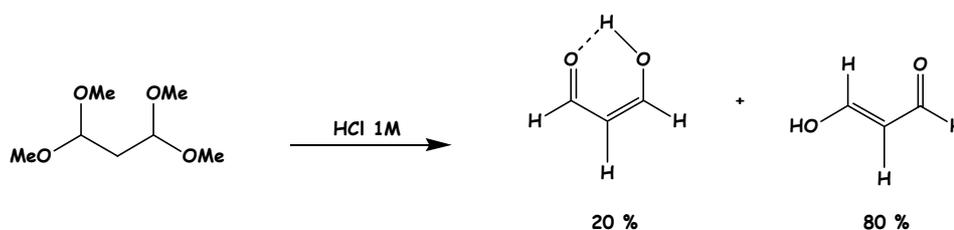


Figure 83 : Préparation du malonaldéhyde par Bertz *et coll.* [68]

Il faut noter que le rapport des deux isomères varie avec le solvant [69]. En règle générale, la forme E énol (liaisons hydrogènes intermoléculaires) prédomine dans des solvants tels que l'eau, l'éthanol, le diéthyl éther. Par contre, la forme Z énol (liaison hydrogène intramoléculaire) prédomine dans l'hexane, le dichlorométhane et le tétrachlorure

66 Horii, S. ; Fukase, H. ; Matsuo, T. ; Kameda, Y. ; Asano, N. ; Matsui, K. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1038.

67 Gomez-Sanchez, A. ; Hermosin, I. ; Lassaletta, J.-M. ; Maya, I. *Tetrahedron* **1993**, 49, 1237 .

68 Bertz, S.H. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 3585.

69 Bertz, S. H. ; Dabbagh, G. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5161.

de carbone. Dans le cas du chloroforme, la forme Z est convertie en E par des impuretés contenant des groupements méthoxy (MeOH, diméthoxypropanal) [69].

Nous avons suivi ce mode opératoire, mais le résultat n'a pas été concluant. Nous n'avons pas pu obtenir proprement le malonaldéhyde. Il restait encore du 1,1,3,3-tetraméthoxypropane et il y avait de nombreux autres signaux en plus des deux isomères souhaités.

Nous nous sommes donc intéressés au sodiomalonaldéhyde, qui est isolable et peut être stocké. Ce dernier est également amplement décrit, mais une publication compare les différentes méthodes et aboutit à la méthode « la plus simple et la plus propre » [70]. Cet article se réfère beaucoup à un autre article de Nair *et al.* [71]. Il met en valeur l'importance de l'échelle (2 g de TMP), des températures, du pH et du temps de réaction. Le 1,1,3,3-tetraméthoxypropane (TMP) est traité par de l'acide chlorhydrique exactement 1M pendant 24 h à 4°C, puis la solution est neutralisée par de la soude 5M jusqu'à pH 7,8. Le mélange est ensuite lyophilisé, le produit est extrait à partir du solide par de l'éthanol anhydre puis l'évaporation de l'éthanol conduit au produit propre.

En suivant ce protocole, nous avons obtenu le sodiomalonaldéhyde avec un rendement de 58 % (Cf. Fig. 84), tout à fait honorable puisque la publication mentionne un rendement de l'ordre de 60 % [70] et que Nair *et al.* avaient obtenu un rendement de 47 % [71].

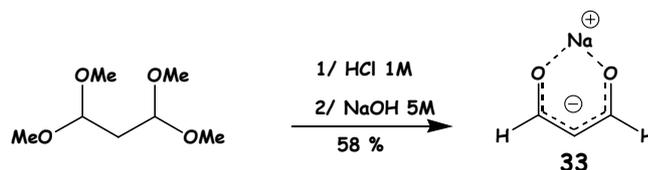


Figure 84 : Préparation du sodiomalonaldéhyde.

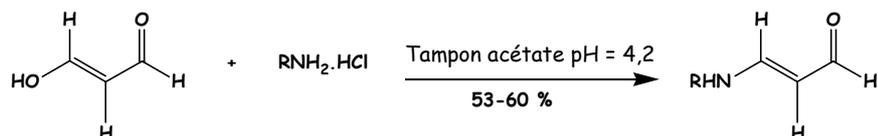
Ayant le sodiomalonaldéhyde entre nos mains, nous souhaitons effectuer une amination réductrice avec le *trans*-aminocyclohexanol. Nous n'avons pas trouvé de références bibliographiques concernant des aminations réductrices avec le sodiomalonaldéhyde, par contre la formation d'énamines et de 1-amino-3-iminopropènes est décrite.

Nair *et al.* [71] décrivent de façon précise les conditions de formation d'énamines à partir du sodiomalonaldéhyde avec différents amino-acides (Cf. Fig. 85). Les critères sont les suivants. L'utilisation du sodiomalonaldéhyde plutôt que le malonaldéhyde formé *in situ* par hydrolyse de *bis*-acétals, permet de limiter la quantité de polymères formés. D'autre part, il

70 Lacombe, A. ; Kermasha, S. ; Van de Voort, F. R. ; Mills, B. L. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 418.

71 Nair, V. ; Vietti, D.E. ; Cooper, C.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 3030.

est préconisé de travailler avec des solutions diluées (~0,05 M) en malonaldehyde et à pH de 4,2 (obtenu par une solution tampon acide acétique –acétate de sodium), pH auquel la vitesse de réaction est la plus rapide, afin de limiter encore les polymérisations. Le pKa du malonaldehyde est de 4,5, donc à pH 4,2 la forme énol E est majoritaire. Enfin, c'est le chlorhydrate des amino-acides qui est mis en réaction.



RNH₂ = ester méthylique de la glycine, de l'aniline et du triptophane

Figure 85 : Formation d'énaminals à partir du sodiomalonaldehyde avec différents amino-acides [71].

Le suivi de la réaction est réalisé par spectrométrie UV. La réaction est arrêtée lorsque l'absorbance du produit a atteint un maximum. La disparition du malonaldehyde est suivie à 249 nm et l'apparition de l'énaminal est suivie à 279 nm.

Nous avons procédé de la même façon en effectuant la réaction dans ces conditions sur le chlorhydrate du *trans*-aminocyclohexanol. Le suivi a été effectué par spectrométrie UV. La bande d'absorption du malonaldehyde à 250 nm (Cf. Fig. 86) a disparu progressivement en parallèle de l'apparition de deux bandes d'absorption, l'une à 284 nm et l'autre à 244 nm avec un point isobestique à 264 nm (Cf. Fig. 87).

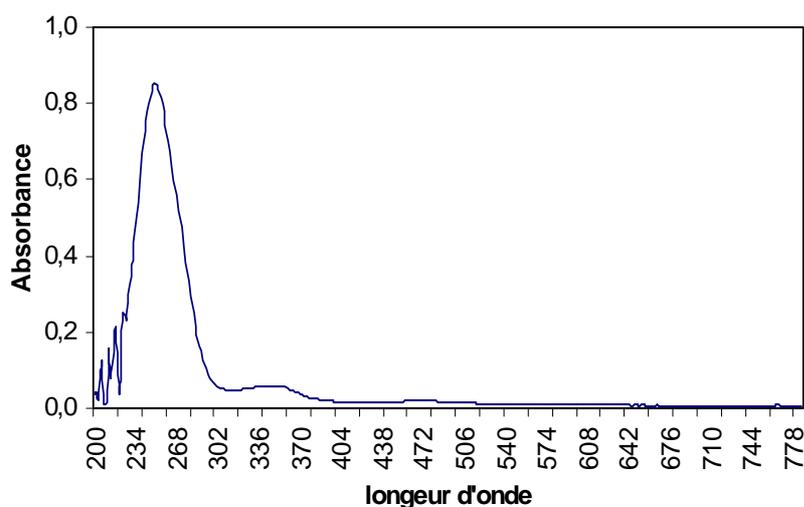


Figure 86: Spectre d'absorption du sodio- malonaldehyde.

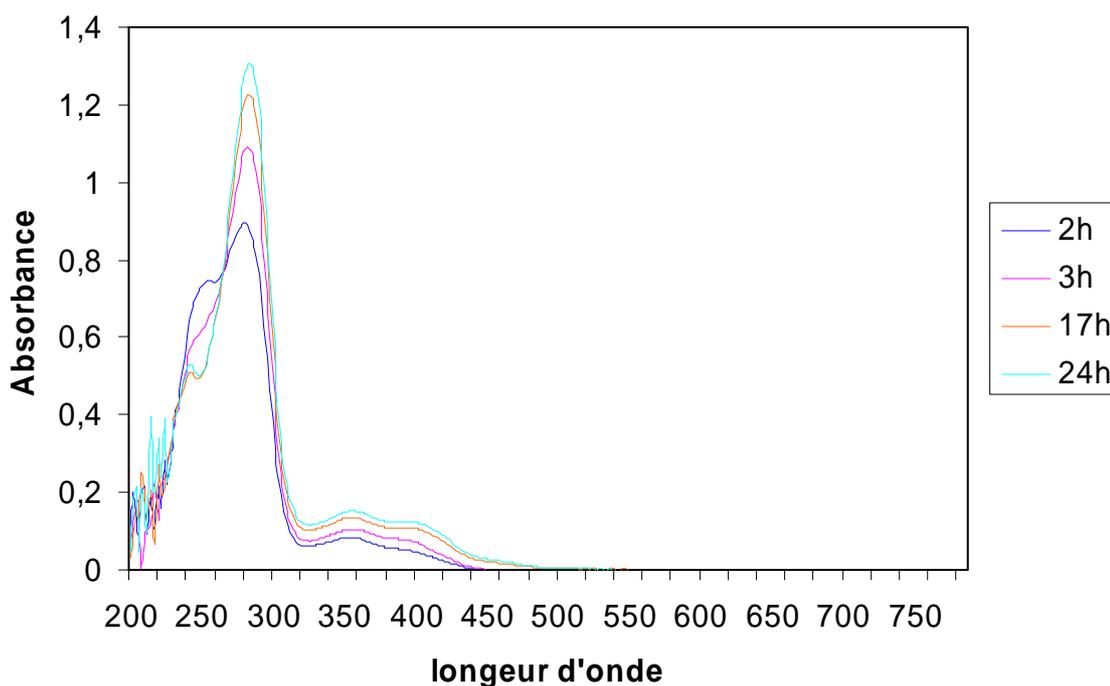


Figure 87 : Suivi UV de la réaction du *trans*-aminocyclohexanol sur le malonaldehyde.

La réaction a été traitée et les produits formés ont été séparés. Malheureusement, aucun spectre en RMN ne correspondait ni au produit énaminal ni au produit oxazolidine (non visible *a priori* en UV) (Cf Fig. 88).

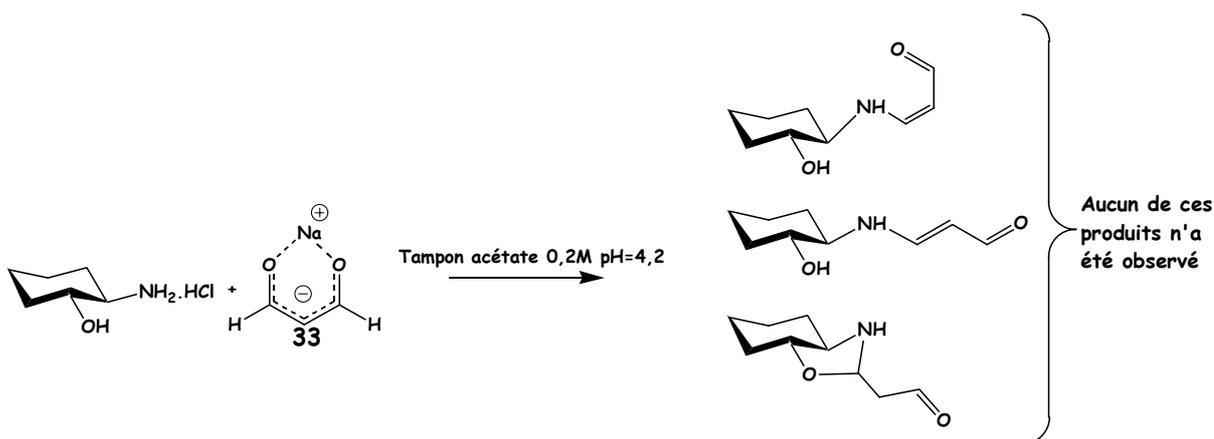


Figure 88 : Réaction du *trans*-aminocyclohexanol sur le malonaldehyde.

D'autres conditions sont décrites pour des réactions entre le chlorhydrate de la glucosamine et le sodio- malonaldehyde [72] (Cf. Fig. 89). Etrangement, la réaction a lieu en milieu plus concentré (~1M) et sans milieu tampon.

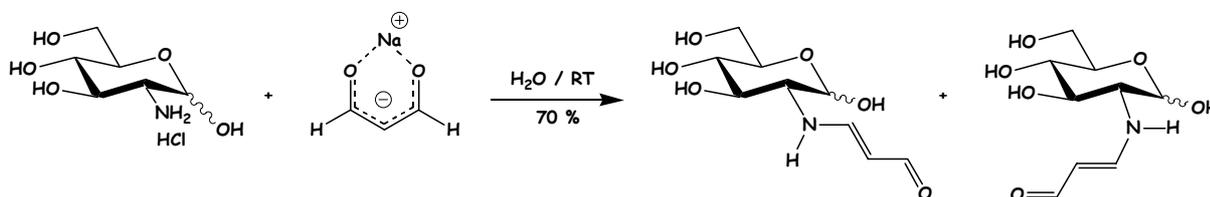


Figure 89 : Réaction entre la glucosamine et le malonaldehyde [72].

Nous avons alors testé leur mode opératoire et obtenu, après séparation des nombreux sous-produits, un mélange des deux isomères Z et E dans un rapport 34 / 66 respectivement, cependant, le rendement n'est que de 25 % (Cf. Fig. 90). Ces deux produits présentent deux signaux vinyliques à 5 et 7 ppm et un proton aldehyde à 9 ppm. Les constantes de couplage permettent de relier les signaux entre eux et montrent la stéréochimie : grandes constantes de couplage ($J = 12.8$ Hz et $J = 8.6$ Hz) pour la forme E, et plus petites constantes de couplage ($J = 7.1$ Hz et $J = 2.4$ Hz) pour la forme Z.

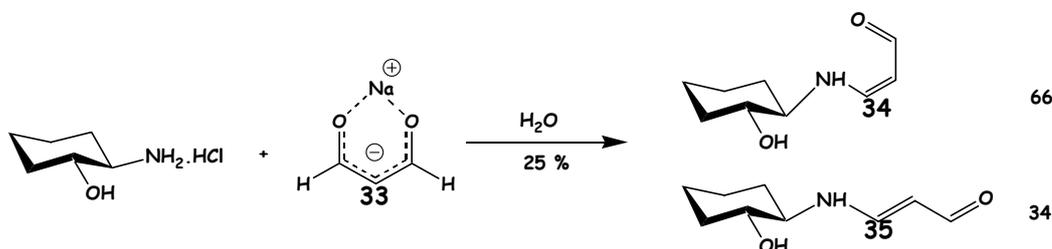


Figure 90 : formation d'énamines du *trans*-aminocyclohexanol.

Ce mélange présente deux pics en UV à 284 et 316 nm (Cf. Fig. 91). Le maximum à 284 nm avait déjà été observé pour la réaction en milieu tamponné (Cf Fig. 87 et 88), mais aucun spectre RMN ne correspondait à l'un de ces isomères.

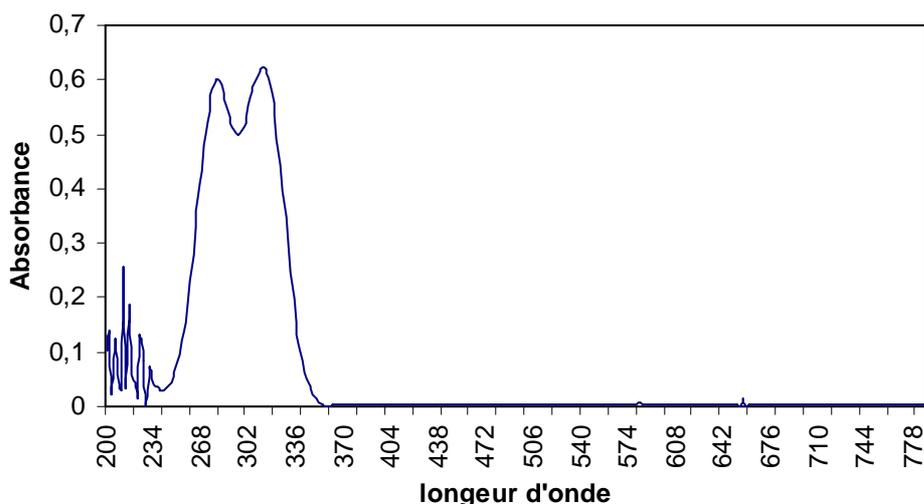


Figure 91 : Spectre UV du mélange d'isomères.

Le suivi de cette réaction n'était pas évident, car il y avait de nombreux spots en CCM. Par contre nous avons sensiblement amélioré le rendement en augmentant le temps de réaction : 25 % en 16h20 ; 37 % en 66h30 ; 41 % en 113h. Il est remarquable ici que l'énamine se soit formée malgré la présence d'un alcool vicinal (possibilité de formation d'une oxazolidine). La formation de l'énaminal se fait sans doute préférentiellement à celle d'une oxazolidine, à cause de la stabilité du produit conjugué formé.

Il s'agissait ensuite de faire réagir ce mélange d'isomères avec le *trans*-aminocyclohexanol afin d'obtenir le dimère ayant le motif 1-amino-3-iminopropène. Cette réaction n'est pas décrite pour des aminoalcools, mais pour des amines aromatiques [73] [74] [75]. Elle a lieu avec l'amine libre dans du méthanol (Cf. Fig. 92).

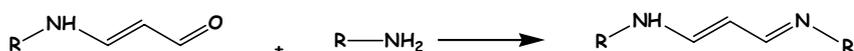


Figure 92 : Réaction conduisant au motif 1-amino-3-iminopropène.

Nous avons donc fait réagir notre mélange d'isomères avec le *trans*-aminocyclohexanol dans le méthanol en présence d'une quantité catalytique d'acide acétique, mais aucun produit de condensation ne s'est formé au bout de 96 h.

73 Ono, M. ; Tamura, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, 30, 1443.

74 Tamura, S. ; Yabe, E. *Chem. Pharm. Bull.* **1973**, 21, 2105.

75 Tamura, S. ; Takeda, E. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, 28, 2356.

Etant donné que cette stratégie nécessite deux étapes, que la première n'a pas un rendement encourageant, et que la seconde n'est pas au point, nous nous sommes intéressés à la préparation de 1-amino-3-iminopropènes en une seule étape. Plusieurs références utilisent la préparation *in situ* du malonaldéhyde par hydrolyse acide du 1,1,3,3-tétraméthoxypropane, avec tous les soucis que cela peut poser [76][77][78]. Suite à l'échec du mode opératoire proposé dans la première publication, et connaissant les risques de très nombreuses réactions parasites lors de l'hydrolyse acide, nous nous sommes tournés vers une hydrolyse du 1,1,3,3-tétraméthoxypropane catalysée par LiBF_4 [79] (Cf. Fig. 93).

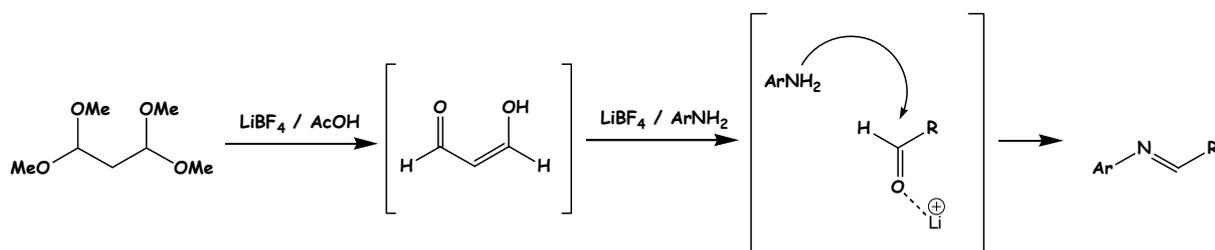


Figure 93 : Catalyse par LiBF_4 de l'hydrolyse du TMP et de la formation de l'imine.

Les conditions de réaction sont optimisées pour les amines aromatiques dans la publication. Comme les amines aromatiques sont moins nucléophiles, nous avons pensé que dans notre cas il ne serait pas nécessaire de chauffer. Nous avons effectué la réaction en 96 h à TA. Elle est censée conduire au composé protoné, un sel de vinamidinium (Cf. Fig. 94). Contrairement aux dérivés des amines aromatiques, notre produit n'a pas précipité. Comme, une déprotonation conduirait à deux isomères, nous avons choisi de réduire le système vinamidinium *in situ* à l'aide de cyanoborohydrure de sodium, hydrure stable en milieu acide.

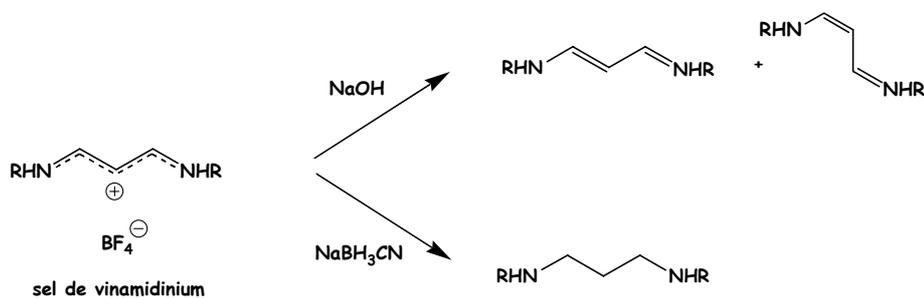


Figure 94 : Schéma prévisionnel.

76 Kikugawa, K. ; Sugimura, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, 34, 1794.

77 Tee, O. S. ; Endo, M. *J. Heterocyclic Chem.* **1974**, 11, 441.

78 Chio, K. S. ; Tappel, A. L. *Biochem.* **1969**, 8, 2821.

79 Zinsou, A. ; Veber, M. ; Strzelecka, H. ; Jallabert, C. ; Fourré, P. *New J. Chem.* **1993**, 17, 309.

Après 69 h de réduction, suivies d'une extraction et d'une purification, nous avons obtenu différents composés intermédiaires, mais aucun dimère (Cf. Fig. 95).

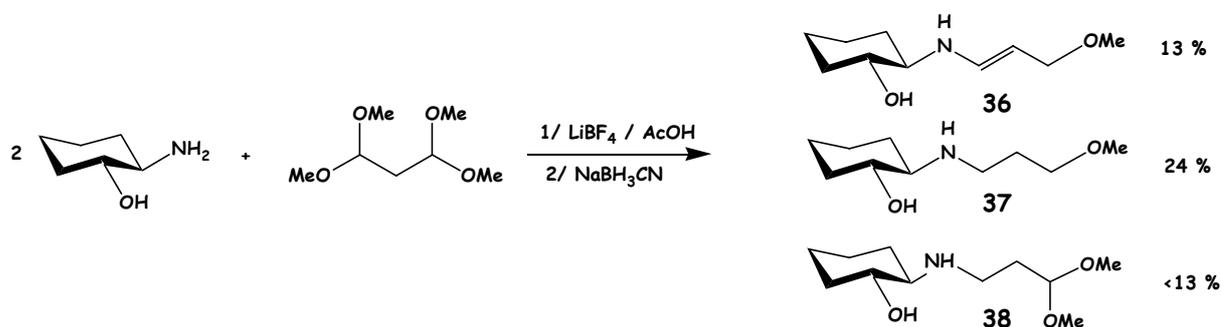


Figure 95 : Amination réductrice à partir du TMP, catalysée par LiBF₄.

Il semblerait qu'il faille forcer les conditions à la fois pour la formation du vinamidinium et pour la réduction. La réaction a alors été menée dans le THF afin de rendre le tétrafluoroborate de lithium plus réactif et le mélange réactionnel a été chauffé à reflux. Comme il restait encore du *trans*-aminocyclohexanol au bout de 9 h de reflux, deux équivalents d'acide acétique ont été ajoutés et le mélange a été encore chauffé à reflux pendant 9 h jusqu'à observer la disparition du *trans*-aminocyclohexanol sur CCM. Un peu d'acide acétique a été ajouté afin de placer la solution à pH = 4, puis le cyanoborohydrure de sodium a été ajouté. Le mélange a été agité 76 h à température ambiante, puis traité et purifié. Parmi les nombreux produits formés, le composé majoritaire était le composé **37** (rdt = 30 %). Ces essais n'ont pas été poursuivis du fait de la formation de trop nombreux produits.

IV.5 Dimérisation par réaction sur le tosylate de glycidol

Comme il est connu que les amines peuvent ouvrir des époxydes [**80**] [**81**], nous avons envisagé d'effectuer une dimérisation par ouverture de l'époxyde du glycidol tosylé (Cf. Fig. 96). Une première amine ouvrirait l'époxyde, ce qui conduirait à un alcoolate qui déplacerait alors le groupement tosylé, reformant ainsi un second époxyde. Cet époxyde pourrait à son tour être ouvert par une seconde amine, ce qui conduirait à un dimère ayant une chaîne de trois atomes, portant un alcool au milieu. La présence de cet alcool ne devrait pas nuire à la

80 Koning, C. B. ; Hancock, R. D. ; van Otterlo, W. A. L. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1261.

81 Masubuchi, M. ; Ebiike, H. ; Kawasaki, K. ; Sogobe, S. ; Morikami, K. ; Shiratori, Y. ; Tsujii, S. ; Fujii, T. ; Sakata, K. ; Kayase, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 4463.

fixation d'un tel dimère sur le complexe boucle-boucle, il pourrait même apporter de nouvelles interactions.

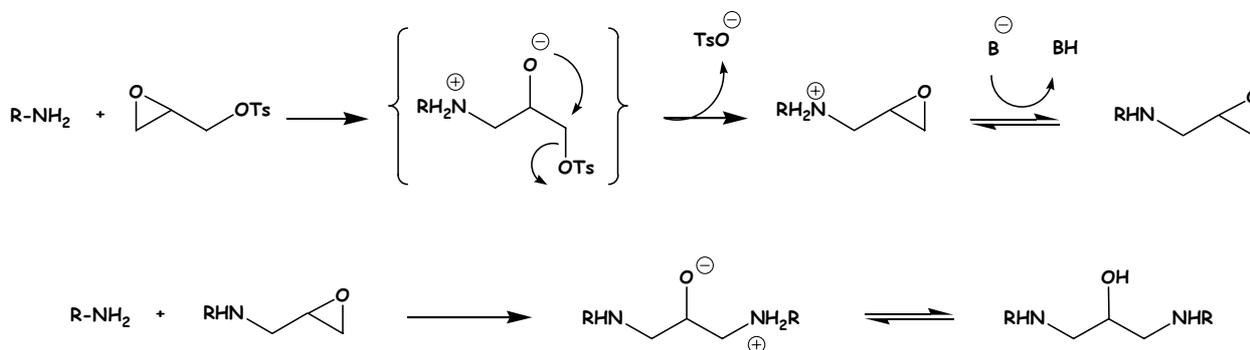


Figure 96 : Dimérisation attendue en présence du glycidol tosylé.

Nous avons donc préparé avec un rendement de 94 % le glycidol tosylé par simple tosylation du glycidol racémique commercial [82] (Cf. Fig. 97).

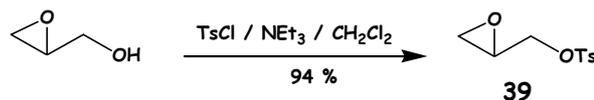


Figure 97 : Préparation du glycidol tosylé.

Le glycidol tosylé a ensuite été mis en réaction avec deux équivalents de *trans*-aminocyclohexanol dans un mélange acétonitrile / eau, en présence de quatre équivalents de carbonate de potassium. La solution a été chauffée 23 h à 40°C (Cf. Fig. 98).

Dans ces conditions réactionnelles, la substitution nucléophile du groupement tosylo par l'amine serait également possible [83]. Par conséquent, même si le deuxième époxyde ne se formait pas, l'amine pourrait se substituer au groupement tosylo pour conduire au produit souhaité.

Les deux diastéréomères du *trans*-aminocyclohexanol dont l'amine porte le substituant glycidyle ont été isolés et correspondent à 79 % d'alkylation par rapport au glycidol tosylé. Ils ont été caractérisés par la présence en RMN ¹H à la fois des signaux du *trans*-aminocyclohexanol dont le proton au pied de l'amine est plus déblindé, du système AB dédoublé du N-CH₂ et des signaux caractéristiques de l'époxyde.

82 Klunder, J. M. ; Ko, S. Y. ; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 3710.

83 Picot, A. ; Gabbai, F. P. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 11.

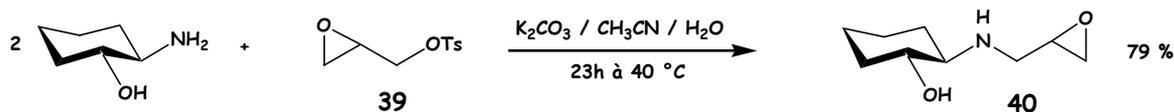


Figure 98 : Réaction de deux équivalents de *trans*-aminocyclohexanol sur un équivalent de glycidol tosylé.

La formation des deux diastéréomères **40** peut être due soit à une ouverture de l'époxyde suivie de la formation d'un nouvel époxyde par une réaction de type S_N2 sur le groupement tosylé, soit par substitution du tosylé par l'amine.

Le composé **40** a ensuite été placé en présence d'un nouvel équivalent de *trans*-aminocyclohexanol dans le méthanol à reflux. L'absence de réactivité au bout de 23h nous a conduit à remplacer le méthanol par l'éthanol (absence de réactivité en 72h de reflux) puis finalement par l'eau. La réaction n'avait toujours pas avancé au bout de 24h de reflux à 100°C. Ces expériences montrent que cet époxyde est peu réactif et qu'il nécessite sans doute une activation par un acide de Lewis.

Différents acides de Lewis sont utilisés dans la littérature pour des ouvertures d'époxydes par des amines (LiCl, LiClO₄, Zn(OTf)₂, Mg(ClO₄)₂, CaCl₂, (Al(OiPr)₃), SnCl₂, (Ti(OiPr)₄, Yb(OTf)₃...) [84] [85] [86]. Un essai a été mené avec l'un d'entre eux (le tétra-isopropylate de titane en quantité stoechiométrique) à reflux dans l'isopropanol, et a conduit à un mélange très peu soluble (insoluble dans l'eau, le méthanol, CH₂Cl₂, mais soluble dans le DMSO) rendant la purification impossible. Nous n'avons pas pu poursuivre cette voie en testant d'autres acides de Lewis par manque de temps.

IV.6 Perspectives

La synthèse du dimère ayant un bras à trois atomes ne s'est pour l'instant pas révélée fructueuse. La réactivité du dichlorure de malonyl semble capricieuse, la transestérification n'est pas sélective de l'amine et nécessite des températures très élevées, et l'amination réductrice met en jeu un dialdéhyde fortement instable. Par contre, par amination réductrice et par réaction sur le glycidol tosylé, il y a eu réaction sur un des deux côtés du bras. C'est le composé dérivé du glycidol qui laisse les meilleures perspectives, car il a été obtenu avec un

84 Chini, M. ; Crotti, P. ; Macchia, F. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5939.

85 Chini, M. ; Crotti, P. ; Favero, L. ; Macchia, F. ; Pineschi, M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 433.

86 Canas, M. ; Poch, M. ; Verdager, X. ; Moyano, A. ; Pericas, M. A. ; Riera, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6931.

rendement satisfaisant, contrairement au dérivé d'amination réductrice sur l'un des côtés du bras. Le dimère pourrait ensuite être formé lors d'une seconde étape par l'ouverture de l'époxyde par une seconde amine. Il pourrait être envisagé de tester toute une panoplie d'acides de Lewis afin de favoriser l'ouverture de l'époxyde (Cf. Fig. 99).

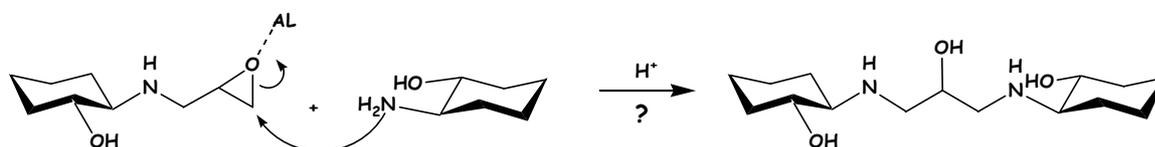


Figure 99 : Assistance par un acide de Lewis à l'ouverture de l'époxyde par une amine.

Il serait également possible d'explorer les réactions mettant en jeu l'acide de Meldrum. En effet, la réaction suivante est décrite pour des alcools [87].

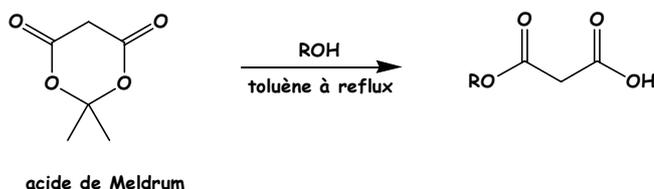


Figure 100 : Réaction d'un alcool sur l'acide de Meldrum [87].

Il s'agirait de transposer cette réaction pour le *trans*-aminocyclohexanol, en jouant sur la plus forte nucléophilie de l'amine par rapport à l'alcool, puis il resterait à effectuer un couplage peptidique avec une seconde molécule de *trans*-aminocyclohexanol pour conduire au dimère.

Une autre approche possible, toujours basée sur la chimie de l'acide de Meldrum, serait de transformer l'amine en isocyanate pour pouvoir ensuite exploiter la réaction suivante [88] (Cf. Fig. 101):

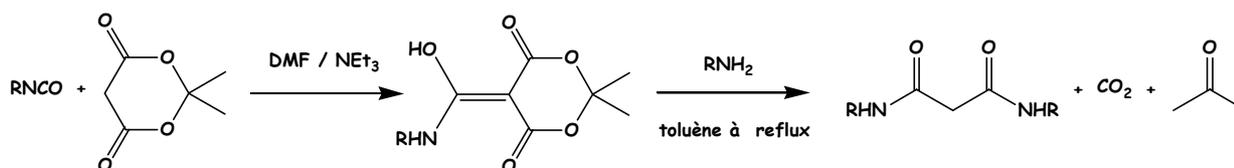


Figure 101 : Réaction des isocyanates sur l'acide de Meldrum [88].

87 Ryu, Y. ; Scott, A. I. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7499.

88 Kyu Lee, H. ; Pyo Lee, J. ; Hyeong Lee, G ; Siek Pak, C. *Synlett* **1996**, 1209.

L'acide de Meldrum ($pK_a = 7$) est déprotoné par la triéthylamine et l'énolate formé réagit alors sur l'isocyanate pour conduire à un composé activé. Ce dernier peut réagir avec une amine pour conduire à un dimère ayant une chaîne diacycle à trois atomes, du dioxyde de carbone et de l'acétone.

V DIMERE A CHAINE DE 2 ATOMES

V.1 Introduction

Suite aux problèmes rencontrés pour le bras à trois atomes, liés probablement à l'acidité des protons en alpha des carbonyles, nous nous sommes intéressés aux dimères ayant une chaîne de deux atomes, pour lesquels ce problème n'existe plus. Ce type de dimère pourrait également être testé ultérieurement sur l'ARN dans le but d'amorcer des relations structure-activité. Nous nous sommes essentiellement concentrés sur les aminations réductrices, dans le but de mettre au point la réaction et de pouvoir ensuite éventuellement la transposer au dimère à chaîne de 3 atomes.

V.2 Amination réductrice « one-pot »

Dans un premier temps, l'amination réductrice « one pot », possible avec le cyanoborohydrure de sodium a été envisagée. Il y a cependant un risque de *bis*-alkylation, ce qui est tout à fait classique pour les amines [11], puisque l'amine secondaire formée est plus réactive que l'amine primaire de départ. Nous pensions cependant pouvoir faire le composé de simple alkylation car deux groupes ont décrit des composés de mono-alkylation [89] [90]. Dans le premier article, les auteurs préparent des pipérazines disubstituées en deux étapes à

11 Baxter E. W. ; Reitz, A. B. *Org. React.* **2002**, 59.

89 Watanabe, M. ; Kojima, Y. ; Kawabe, K. ; Hatamoto, E. ; Tsuru, E. ; Miyake, H. ; Yamashita, T. *Synthesis* **1996**, 452.

90 Yoshikawa, Y ; Kawabe, K. ; Tadokoro, M. ; Suzuki, Y. ; Yanagihara, N. ; Nakayama, A. ; Sakurai, H. ; Kojima, Y. *Bull. Chem. Soc. Jn.* **2002**, 75, 2423.

partir de différents (S)- α -acides aminés protégés : ils effectuent d'abord une *mono*-alkylation avec 2 éq d'amine pour 1 éq de glyoxal, puis la deuxième alkylation est effectuée sur le produit de *mono*-alkylation purifié (Cf. Fig. 102).

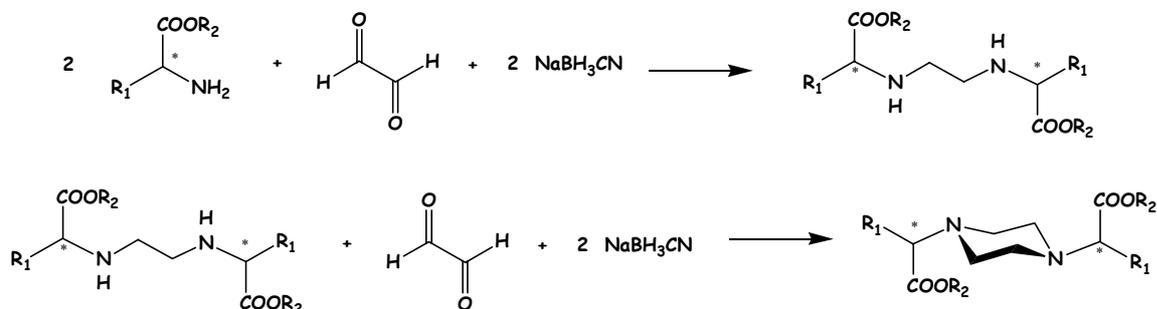


Figure 102 : Préparation de piperazines passant par une *mono*-alkylation.

Nous avons alors suivi leur mode opératoire et nous avons directement obtenu le composé de *bis*-alkylation avec un rendement de 32 % ainsi que le composé de *mono*-alkylation avec un rendement de 7 % (Cf. Fig. 103). Dans les deux cas, les protons du bras sont visibles en RMN ^1H sous la forme de deux multiplets entre 2,4 et 2,9 ppm, par contre les ^{13}C ne sont bien résolus qu'à -80°C (pour le produit de *di*-alkylation) ou $+80^\circ\text{C}$ (pour le produit de *mono*-alkylation) à cause de l'inversion de l'azote. Les deux composés se distinguent en RMN ^1H par l'intégration des deux massifs correspondants aux protons du bras, mais également par leur spectre de masse.

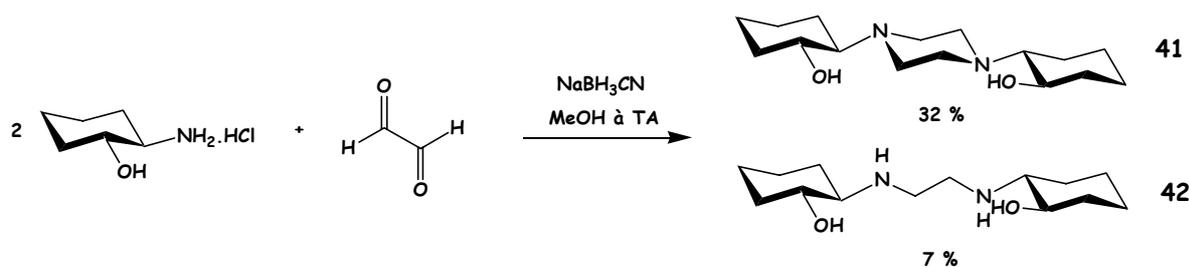
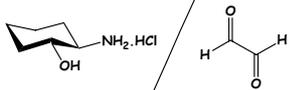


Figure 103 : Amination réductrice avec le glyoxal et le *trans*-aminocyclohexanol.

Nous avons alors testé différentes conditions réactionnelles (Cf. Tableau) afin d'optimiser le rendement en composé monoalkylé, voire en composé dialkylé. En effet, le composé dialkylé pourrait également être testé sur l'ARN, puisqu'il présente une certaine souplesse au niveau du cycle central due à l'inversion des amines.

entrée		Température et temps de réaction	Rendement en produit <i>di</i> -alkylé ^(a)	Rendement en produit <i>mono</i> -alkylé ^(b)
1	1 / 1	6h30 de reflux	22 %	5 %
2	1 / 1	25h de reflux	31 %	7 %
3	2 / 1	22 h à TA	32 %	7 %
4	4 / 1	75 h à TA	46 %	25 %
5	4 / 1	24 h de reflux	46 %	24 %

(a) rendement calculé par rapport à 0,5 éq. de glyoxal

(b) rendement calculé par rapport à 1 éq. de glyoxal

Tableau récapitulatif des essais d'optimisation de l'amination réductrice.

Le temps de réaction était insuffisant dans le premier cas (comparaison des entrées 1 et 2). Ceci est dû au fait que la réaction est difficile à suivre en CCM, car il y a de très nombreux produits. Dans le cas de l'entrée 1, il n'y avait plus d'évolution visible en CCM entre 4h30 et 6h30, pourtant une prolongation du temps de réaction a permis d'augmenter les rendements (entrée 2). On peut remarquer qu'à température et temps de réaction équivalents (entrées 2 et 5), le rendement en produit *di*-alkylé est nettement supérieur lorsqu'on utilise un excès d'amine. Or, l'augmentation du nombre d'équivalents d'amine devrait favoriser le produit *mono*-alkylé au dépend du produit *di*-alkylé. Le résultat de l'entrée 3 va aussi dans ce sens, s'il est comparé à l'entrée 2 : l'augmentation du nombre d'équivalents a le même effet qu'un chauffage à temps de réaction équivalents. Par ailleurs, des rendements semblables sont observés que l'on travaille à reflux pendant une « courte » durée ou que l'on laisse la réaction plus longtemps à température ambiante (entrées 4 et 5).

Une augmentation du rendement du composé de *mono*-alkylation est observée en excès d'amine. Cependant, au lieu d'obtenir majoritairement le produit de *mono*-alkylation, nous constatons que le rendement en produit de *di*-alkylation a également été augmenté. Cela laisse penser que pour favoriser le produit de *mono*-alkylation, il faudrait utiliser un très fort excès d'amine (5 à 6 éq. d'amine par fonction aldéhyde soit 10 à 12 éq. de *trans*-aminocyclohexanol par éq. de glyoxal). Ceci est possible puisque l'amine en excès peut être récupérée, mais n'est pas très pratique.

Globalement, il semble que le point le plus important soit l'excès d'amine, ce qui est fort gênant, lorsque l'amine a la plus grande valeur ajoutée, ce qui est notre cas. Il faut

néanmoins noter que quelles que soient les conditions, les deux types de composés sont formés et les rendements n'excèdent pas 50 %.

Cette réaction a tout de même été testée sur le composé **16** dérivé de la néamine. Quatre équivalents du composé **16** ont été placés en présence d'un équivalent de glyoxal et de 2,5 équivalents de cyanoborohydrure de sodium dans le méthanol à reflux pendant 25 h. Le seul produit obtenu était le produit de *di*-alkylation, reconnaissable en RMN ^1H par ses deux multiplets à 2,55 et 2,75 ppm. La *di*-alkylation a été confirmée par le spectre de masse. Le reste isolé s'est avéré être le réactif de départ (**16**) sous forme protonée (Cf. Fig. 104). Les spectres RMN 2D n'apportent aucun renseignement supplémentaire concernant le bras espaceur, car les carbones du bras (et par conséquent leurs corrélations) ne sont pas visibles à température ambiante, comme cela avait été le cas pour le dimère **41** du *trans*-aminocyclohexanol. Comme les carbones du bras n'étaient pas visibles à température ambiante, il a fallu effectuer le spectre ^{13}C à d'autres températures pour les observer. Les spectres ^{13}C à -40°C et -80°C montrent encore la présence de plusieurs structures en équilibre. Par contre, le spectre ^{13}C à $+80^\circ\text{C}$ montre une seule structure, parfaitement symétrique, dont tous les carbones du bras espaceur sont équivalents et apparaissent à 42,4 ppm.

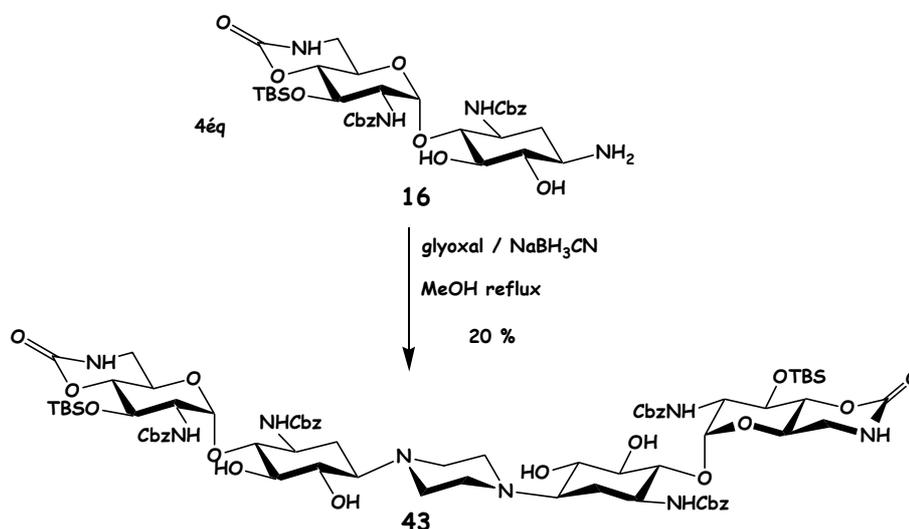


Figure 104 : Amination réductrice « one-pot » conduisant au dimère *di*-alkylé à deux atomes.

Cette réaction n'est cependant pas satisfaisante car elle ne conduit qu'à 20 % de produit et qu'elle consomme tout de même 4 équivalents du composé **16**. Si l'on met en réaction 200 mg du composé **16**, on obtient environ 20 mg de dimère !

Il faut noter que dans ces réactions d'amination réductrice « one pot », nous n'avons pas observé la formation de composés de type oxazolidine par la réaction de l'alcool vicinal sur l'imine formée. Cette réaction n'a sans doute pas eu lieu puisque l'imine formée peut être réduite rapidement par le cyanoborohydrure, présent dans le milieu. Par contre, en absence de réducteur, l'alcool vicinal peut réagir sur l'imine pour former une oxazolidine. Cette réaction a été explorée et elle est décrite dans le paragraphe suivant.

V.3 Amination réductrice avec intermédiaire *bis*-oxazolidine

Il nous a semblé intéressant d'exploiter la présence de l'alcool vicinal. L'idée est alors de préparer le composé *bis*-oxazolidine, qui devrait bloquer toute *di*-alkylation, puis de l'ouvrir par un hydruure (Cf. Fig. 105). Cette approche est décrite pour des *mono*-oxazolidines [11].

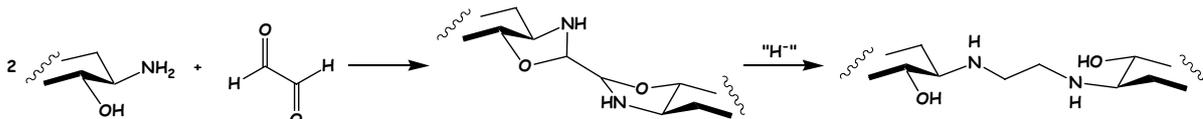


Figure 105 : Perspectives de dimérisation en exploitant l'alcool vicinal.

La formation de *bis*-oxazolidines à partir du glyoxal est déjà décrite [91]. Nous avons alors testé la préparation de la *bis*-oxazolidine sur le *trans*-aminocyclohexanol avec du glyoxal dans le méthanol en présence de tamis moléculaire (Cf. Fig. 106).

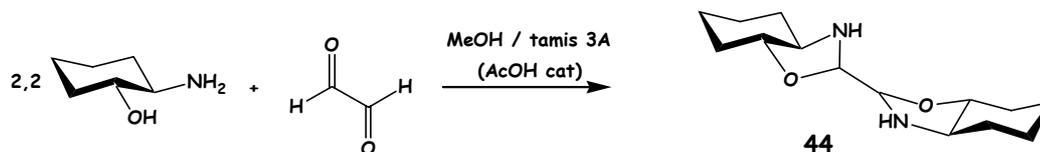


Figure 106 Formation de la *bis*-oxazolidine du *trans*-aminocyclohexanol avec le glyoxal.

Comme le suivi de la réaction n'est pas évident sur CCM, nous avons effectué un suivi par RMN de la réaction dans le méthanol deutérié avec et sans acide acétique. Les spectres ont été effectués au bout de 40 min, 5 h, 6h45 et 23 h respectivement.

91 Dieck, H. T. ; Dietrich, J. *Chem. Ber.* **1984**, 117, 694.

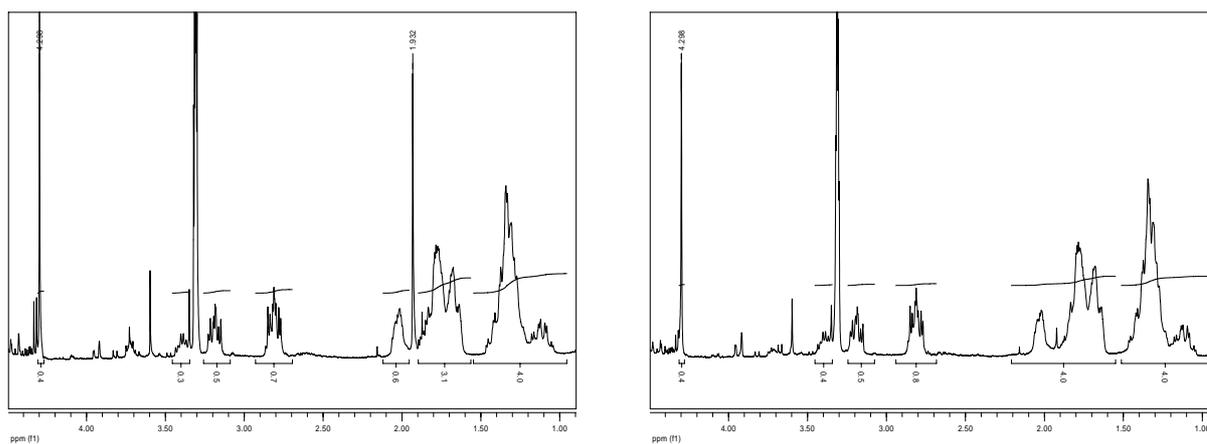


Figure 107 : Spectres RMN ^1H du suivi de la réaction de formation de la *bis*-oxazolidine en présence ou non d'acide acétique.

Dans cette réaction, le spectre RMN ^1H des CH_2 de la partie cyclohexyle reste inchangé. Il nous sert de référence pour l'intégration. Le massif compris entre 1 et 1,5 ppm intègre pour 4H et les deux massifs présents entre 1,6 et 2,1 ppm intègrent pour 4H également.

Les protons au pied de l'amine et de l'alcool du produit résonnent sous forme de multiplets placés respectivement à 2,8 et 3,2 ppm et ceux du *trans*-aminocyclohexanol respectivement à 2,8 et 3,4 ppm. Comme les protons au pied de l'amine du *trans*-aminocyclohexanol et du produit résonnent au même déplacement chimique, ils ne donnent pas d'information. Par contre, au cours de la réaction, on observe une légère augmentation de l'intégration du proton au pied de l'alcool du produit avec une légère diminution de celle de ce même proton attribué au réactif, mais leur quantification est imprécise à cause du pic du méthanol, et du fait que la *mono*-oxazolidine puisse avoir ses protons correspondants aux mêmes déplacements chimiques.

En revanche, la formation du produit *bis*-oxazolidine est facilement caractérisable avec l'apparition d'un singulet à 4,3 ppm correspondant au proton de la chaîne du dimère *bis*-oxazolidine. Son intégration rapportée à celle du massif à 2,8 ppm a permis de tracer un graphique montrant l'avancement de la réaction (Cf. Fig. 108).

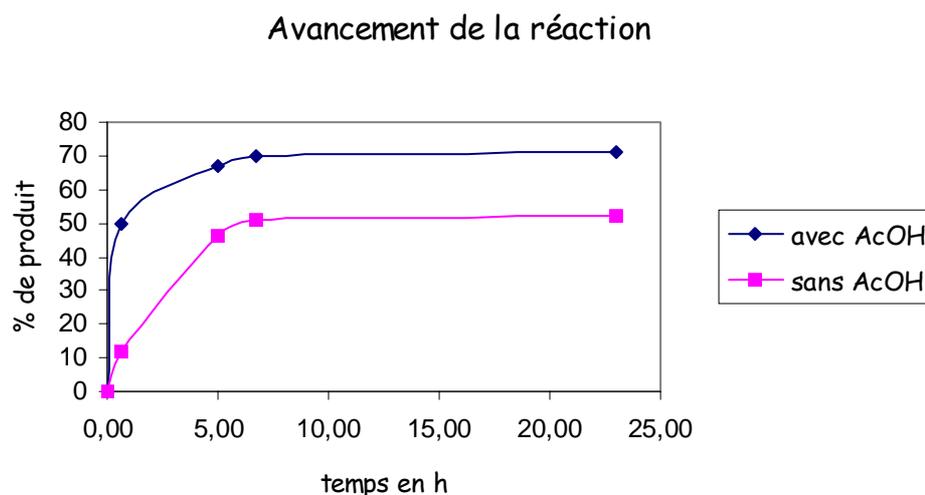


Figure 108 : Avancement de la réaction avec et sans acide acétique

Le rôle de l'acide acétique est ainsi clairement mis en évidence : il accélère très nettement la réaction. Les spectres RMN montrent également qu'il permet de limiter la formation de sous-produits. Par ailleurs, on peut remarquer que la réaction n'est pas finie au bout de 23 h. L'augmentation du temps de réaction nous a permis d'améliorer encore le rendement (rdt : 80 % en 42 h).

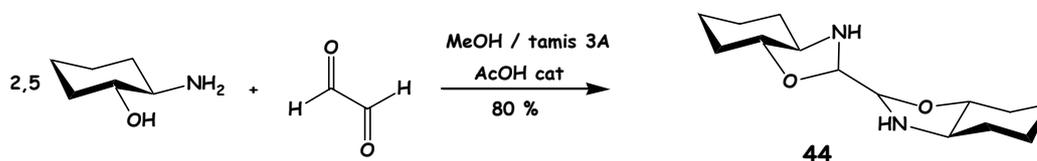


Figure 109 : Réaction de formation de la bis-oxazolidine optimisée.

En revanche, l'ouverture de cette bis-oxazolidine au niveau de l'alcool a été moins évidente. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'ouverture de composés bis-oxazolidine, alors que l'ouverture par les hydrures de mono-oxazolidines est bien référencée.

Il semblerait que le composé bis-oxazolidine soit extrêmement stable. En effet, les conditions suivantes ont conduit à la récupération du réactif :

- le cyanoborohydrure de sodium (3 éq.) dans le méthanol 15h30 à TA selon le mode opératoire décrit [92] (réactif récupéré à 90 %)

92 McCarthy, Wiedeman, P. E. ; Schuster, A. J. ; Whitten, J. ; Barbuch, R. J. ; Huffman, J. C. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 3095.

- le triacétoxyborohydrure de sodium (2.5 éq.) dans le méthanol en présence d'acide acétique en quantité catalytique 4 jours à TA (réactif récupéré à 95 %)
- le borohydrure de sodium (6 éq. + ajout de 12 éq.) dans le méthanol à TA pendant 20h (réactif récupéré à 70 %) alors que les *mono*-oxazolidines sont réduites à 0°C ou TA [93] [94] [95]
- le borohydrure de sodium (3éq × 4ajouts) dans l'éthanol à 80°C pendant une trentaine d'heures selon le mode opératoire publié [96] conduit au mélange du réactif (présent à 50 %) et d'autres produits, mais sans la présence du produit de réduction, alors que les *mono*-oxazolidines peuvent être réduites à TA [97].

Par contre le cyanoborohydrure dans le méthanol en présence d'une quantité catalytique d'acide acétique, conduit à des produits de dégradation sans que le produit souhaité ne soit présent alors qu'il reste encore de la *bis*-oxazolidine.

Il semblerait que l'ion sodium soit insuffisant pour activer l'ouverture. Nous avons alors envisagé d'utiliser un acide de Lewis : le lithium. Il a donc été tout naturel de tester le borohydrure de lithium. La réaction d'ouverture de la *bis*-oxazolidine du *trans*-aminocyclohexanol a donc été réalisée dans le THF avec ce réactif (Cf. Fig. 110). Nous avons obtenu, avec un rendement de 33 %, le produit souhaité dont les analyses spectrales se sont avérées identiques à celles du produit obtenu par amination réductrice. L'utilisation d'un solvant mixte THF/MeOH selon les conditions préconisées dans une publication [98] n'a pas permis d'améliorer ce rendement, puisque le produit a été isolé avec un rendement équivalent.

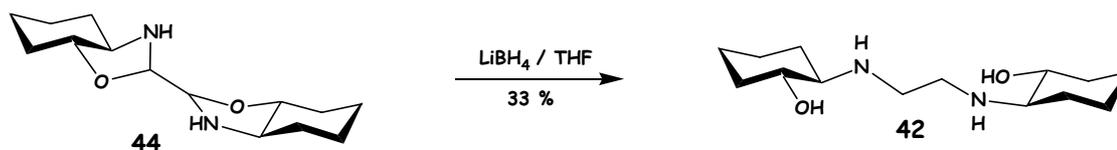


Figure 110 : Réduction de la *bis*-oxazolidine par LiBH₄.

Nous n'avons pas encore de rendement satisfaisant sur cette étape, mais elle restait prometteuse, d'autant plus que le borohydrure de lithium ne devrait toucher ni les

93 Janin, Y. L. ; Aubertin, M. A. ; Chiaroni, A. ; Riche, C. ; Monneret, C. ; Bisagni, E. ; Grierson, D. *S. Tetrahedron* **1996**, 52, 15157.

94 Jian, L. S. ; Aiqiao, M. ; Guishu, Y. ; Yaozhong, Y. *Synthetic Com.* **1992**, 22, 1497.

95 Saaveda, J. E. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 2271.

96 Guerrier, L. ; Royer, J. ; Gierson, D. S. ; Husson, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 7754.

97 Marco, J. L. ; Royer, J. ; Husson, J. P. *Synthetic. Com.* **1987**, 17, 669.

98 Soai, K. ; Ookawa, A. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 4000.

groupements Cbz [99] [100], ni oxazolidine [101]. Nous avons donc testé ces deux étapes sur notre composé dérivé de la néamine.

Dans un premier temps, le composé *bis*-oxazolidine du dérivé de la néamine a été synthétisé. Il a été obtenu avec un rendement de 56 % en suivant les mêmes conditions que pour la molécule modèle avec cependant un temps de réaction beaucoup plus court (7 h au lieu de 42 h pour le *trans*-aminocyclohexanol) pour une conversion complète (Cf. Fig. 111). Par contre, le rendement n'était que de 56 %, car des sous-produits (non identifiés) se sont formés.

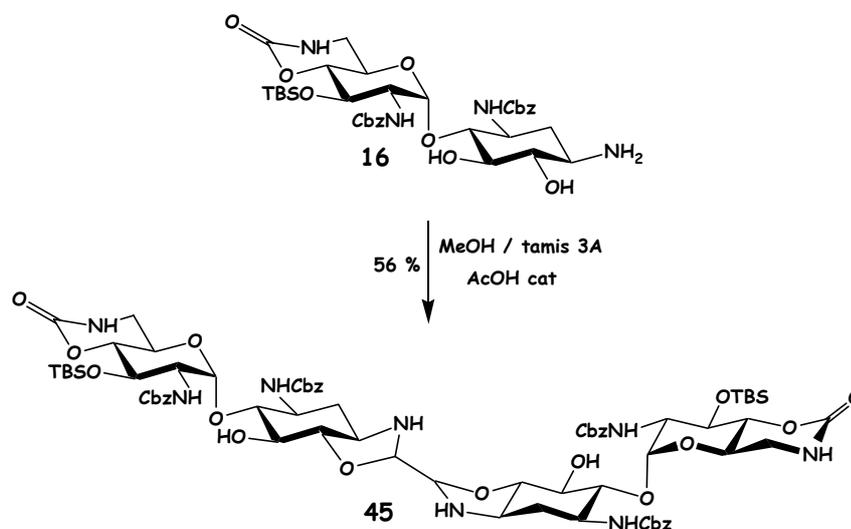


Figure 111 : Formation du dimère *bis*-oxazolidine dérivé de la néamine.

L'ouverture du composé *bis*-oxazolidine a ensuite été effectuée dans le THF avec un excès de LiBH₄. Deux produits ont été isolés et ils possèdent tous les deux le même spectre de masse et un bras espaceur (système CH₂ entre 2,5 et 3,0 ppm). Ces deux produits se distinguent par des déplacements chimiques légèrement différents pour les protons en position 2ax, 2éq, 3 et CH₂ du bras. De plus l'absence de corrélation longue distance entre le bras et la néamine rend l'identification des produits délicate. Le premier a un R_f proche du réactif 45 et n'a pas pu être attribué. Il s'agit soit d'un composé d'ouverture dissymétrique, soit du dimère ayant le bras porté par l'alcool en position 6 (46). Le second est beaucoup plus polaire, et a pu être identifié *a posteriori* : il s'agit du dimère souhaité 47 (Cf. Fig. 112). En effet, ses spectres

99 Bartoli, G. ; Bartolacci, M. ; Cortese, M. ; Marcantoni, E. ; Massaccesi, M. ; Pela, R. ; Sambri, L. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2359.

100 Lee, B. H. ; Clothier, M. F. ; *Tetrahedron. Lett.* **1999**, 40, 643.

101 Penning, T. D. ; Djuric, S. W. ; Haack, R. A. ; Kalish, V. J. ; Miyashiro, J. M. ; Rowell, B. W. ; Yu, S. *S. Synthetic. Com.* **1990**, 20, 307.

RMN ^1H et ^{13}C sont identiques à ceux du produit de mono-alkylation obtenu ultérieurement par amination réductrice avec le glyoxal.

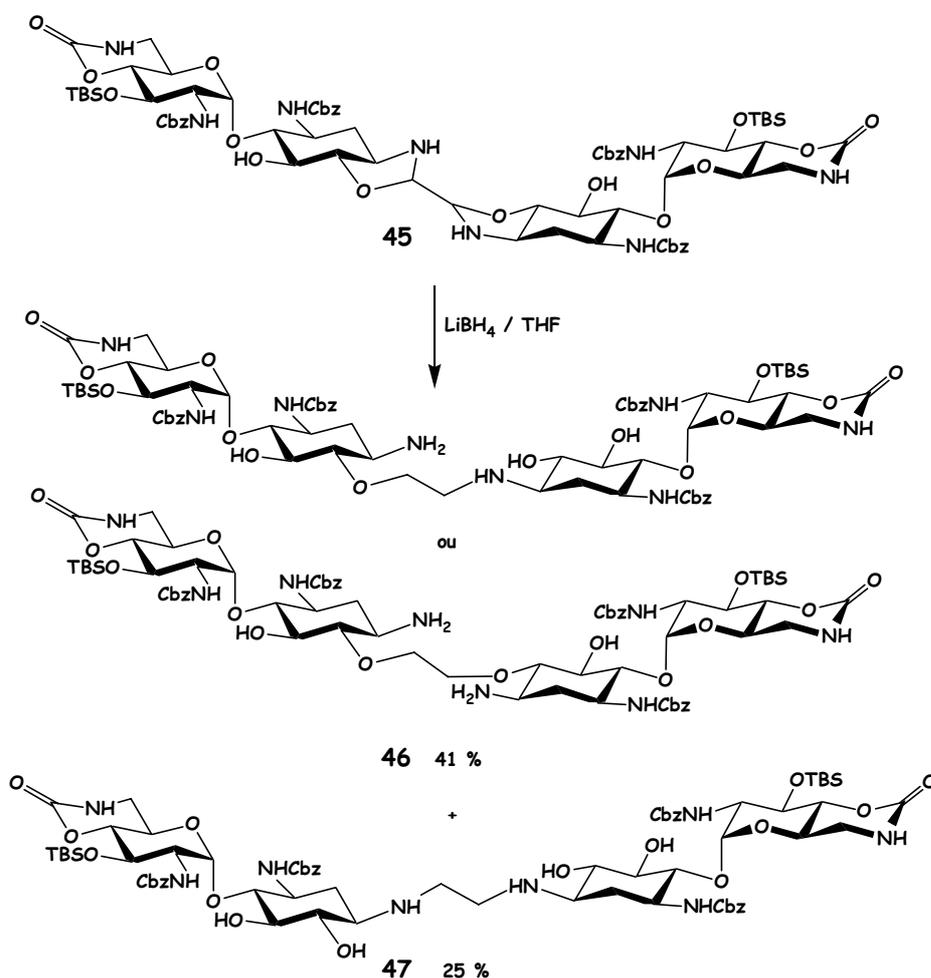


Figure 112 : Réduction de la *bis*-oxazolidine dérivée de la néamine par LiBH_4 .

Cette réaction laisse de bonnes perspectives quant à la formation possible d'un dimère ayant un bras à deux atomes, mais cette approche présente deux inconvénients : elle nécessite deux étapes et l'identification des produits formés reste ambiguë.

V.4 Bilan

Les réactions effectuées sur le glyoxal montrent à nouveau la difficulté de la mise en oeuvre de deux aminations réductrices sur un même bras. L'exploitation de l'entourage de l'amine par la formation de *bis*-oxazolidines a été peu fructueuse sur le dérivé de la néamine,

car l'ouverture des *bis*-oxazolidines peut se faire soit au niveau de l'alcool soit au niveau de l'amine.

En revanche, le dimère C₂ souhaité a pu être obtenu par une amination réductrice « one-pot », mais avec un rendement qui reste pour l'instant assez modeste (20 %).

VI DIMERE A CHAINE DE 6 ATOMES

VI.1 Découverte d'une nouvelle méthode de dimérisation et synthèse d'un nouveau dimère

Dans le cadre des essais de déprotection du carbamate cyclique du dimère à chaîne de quatre atomes, nous voulions tester une ouverture par l'éthylène diamine. En effet, il a été montré que cette diamine ouvre les oxazolidinones pour former des aminoalcools vicinaux et une urée cyclique, très stable [102], la force motrice de la réaction étant certainement la formation de cette urée cyclique très stable (Cf. Fig. 113).

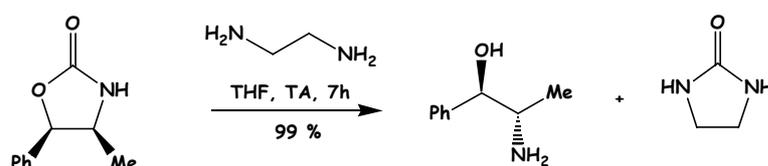


Figure 113 : Méthode douce d'ouverture des oxazolidines [102].

Dans un premier temps, nous avons fait réagir l'éthylène diamine sur le composé **14**, qui contient deux carbamates cycliques, tout simplement parce que ce composé a moins de valeur ajoutée que le dimère à déprotéger. Nous avons isolé avec un rendement de 62 % un nouveau produit portant une chaîne (deux CH₂ en RMN ¹H à 2.74 et 3.22 ppm) et un motif urée (C=O à 161.2 ppm en ¹³C) qui ne corrèle qu'avec le proton en position 1 et le CH₂ à 3.22 ppm. Il s'agit donc bien d'une chaîne linéaire issue de l'ouverture du carbamate cyclique à 5 chaînons par l'éthylène diamine (Cf. Fig. 114). Cette structure a été confirmée par le spectre de masse.

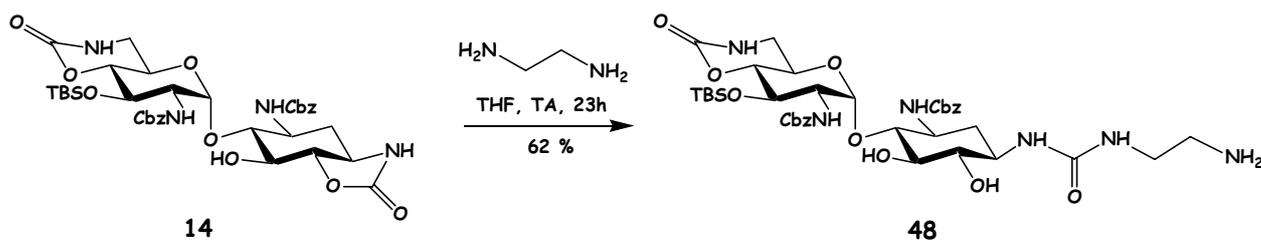


Figure 114 : Réactivité comparée des deux carbamates cycliques en présence d'éthylène diamine.

Cette réaction met en valeur et confirme la différence de réactivité des deux carbamates cycliques. Le plus réactif est le carbamate formant un cycle à 5 chaînons, puisqu'il est plus tendu mais aussi plus accessible que le carbamate inclus dans le cycle à 6 chaînons qui est encombré par un groupement TBS. En effet, le carbamate du cycle à 5 chaînons a été ouvert du côté de l'alcool pour former une urée linéaire, très stable (**48**), alors que le carbamate du cycle à 6 chaînons n'a pas été ouvert.

L'urée linéaire formée semble très stable puisque la libération de l'amine n'a pas eu lieu dans ces conditions. En effet, pour libérer l'aminoalcool qui était protégé par le carbamate, il s'agit d'ouvrir une urée linéaire, pour en former une cyclique. Il faudrait sans doute chauffer fortement pour casser l'urée linéaire et obtenir l'aminoalcool.

Au vu de ce résultat, il nous a semblé intéressant d'exploiter cette différence de réactivité pour ouvrir sélectivement le carbamate du cycle à 5 chaînons et dimériser la molécule, en une seule étape. En effet, l'amine en bout de chaîne du composé **48**, peut réagir sur un carbamate cyclique à 5 chaînons d'une autre molécule. Nous avons donc fait réagir un équivalent d'éthylène diamine avec 2,2 équivalents du composé **14** dans le THF à température ambiante en 97 h. L'apparition puis la disparition du composé intermédiaire **48** est visible sur CCM. Nous avons ensuite isolé le dimère **49** avec un rendement de 98 % (Cf. Fig. 115). Sa structure a été vérifiée par analyse des spectres RMN ^1H , ^{13}C et 2D ainsi que par spectrométrie de masse. Le spectre de masse montre bien la présence du dimère, et la corrélation en HMBC entre le carbonyle de l'urée et les protons du bras et de la position 1 prouvent que la molécule est dimérique et que le bras est bien situé entre les deux amines en position 1.

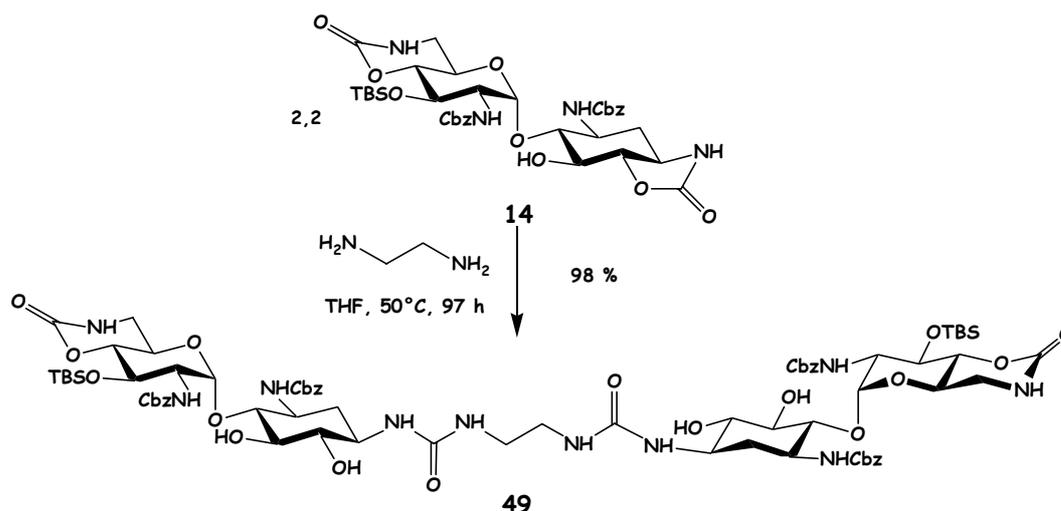


Figure 115 : Réaction de dimérisation sur le composé 14 par ouverture sélective du carbamate à 6 chaînons par l'éthylène diamine.

Nous avons ainsi mis au point une nouvelle méthode de dimérisation qui nous fait gagner une étape réactionnelle, puisqu'il n'est plus nécessaire d'effectuer l'ouverture du carbamate à 5 atomes avec l'hydroxyde de baryum. Cette nouvelle méthode pourra donner accès de façon plus simple à toute une panoplie de dimères ayant des chaînes longues et stables (puisque de type urée). Il suffira d'utiliser des diamines. La longueur de la chaîne sera alors celle de la diamine + 2 atomes.

Pour la synthèse de dimères à longue chaîne, cette méthode devient une méthode de choix, puisque, contrairement aux autres méthodes, elle ne présente pas de risque de réaction intramoléculaire. En effet, avec les autres méthodes de dimérisation, à partir des longueurs de chaîne de plus de 4 atomes, et à cause de la double réactivité des amines, la réaction intramoléculaire devient très favorable. Dans le cas de cette nouvelle méthode, la réaction intramoléculaire n'existe pas.

VI.2 Déprotection du dimère à chaîne de 6 atomes

Ayant synthétisé ce dimère protégé, nous avons voulu le déprotéger de la même façon que pour le dimère ayant une chaîne de 4 atomes puisqu'il possède les mêmes groupements protecteurs. Il fallait donc le traiter avec le sodium dans l'ammoniac liquide. Le dimère à chaîne de 6 atomes, pourtant bien soluble dans le méthanol, n'est pas soluble dans l'ammoniac liquide (contrairement aux autres produits qui avaient des solubilités pourtant plus capricieuses). Un ajout de THF n'a pas permis de le solubiliser davantage. Au vu de ces

difficultés, nous avons décidé de déprotéger l'alcool avant la réduction. Le traitement à l'acide chlorhydrique a conduit, comme précédemment au composé désilylé avec un rendement quantitatif. Il a ensuite été possible d'effectuer la déprotection des groupements Cbz par le sodium dans l'ammoniac liquide, puisque le produit désilylé est soluble dans ce solvant. Le produit a été ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice et acidifié. Cette dernière étape a permis de se débarrasser de la silice et d'obtenir un produit d'une meilleure pureté (Cf. Fig. 116).

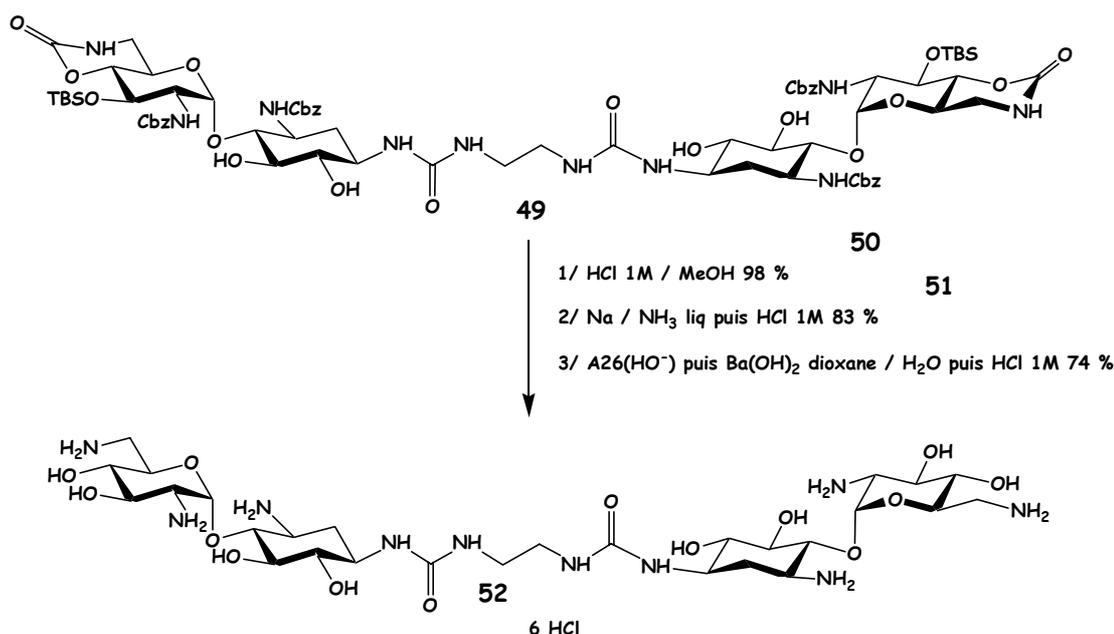


Figure 116 : Les réactions de déprotection pour obtenir le dimère à chaîne de 6 atomes.

Comme le produit était tétrachlorhydraté, il a dû être déprotoné par la résine A26(HO⁻) avant le traitement par l'hydroxyde de baryum. Cette dernière étape d'ouverture du carbamate s'est déroulée comme prévu et a donné le produit entièrement déprotégé avec un rendement de 74 % (Cf. Fig. 116).

VI.3 Vers une synthèse encore plus courte ?

A ce stade, nous nous sommes demandés si la présence du groupement TBS était indispensable à la sélectivité de la réaction de dimérisation par les diamines. En effet, la réaction est envisageable déjà sur le composé **7** et permettrait de gagner encore une étape. Cependant, ce dernier n'est pas soluble dans le THF, et la réaction n'est pas possible dans le

DMF (possibilité de réaction de l'éthylène diamine sur le DMF). Nous l'avons alors testée dans le méthanol et nous avons obtenu, avec un rendement de 83%, après réaction sur l'éthylène diamine, un produit très peu soluble (**50**). Il n'est soluble ni dans le méthanol, ni dans des mélanges dioxane/méthanol ou dioxane/eau. Il est seulement soluble dans le DMF. Ceci explique les difficultés que nous avons rencontrées pour le purifier. Nous n'avons pu le purifier que par trituration dans l'acétone et filtration. Il n'a donc pas été obtenu avec une pureté satisfaisante. De ce fait, il persistait un doute quant à sa structure, car le spectre RMN était mal résolu. L'étape de déprotection avec du sodium dans l'ammoniac liquide a alors été effectuée. Elle a conduit, avec un rendement de 89 %, au même produit que celui obtenu précédemment par la méthode plus longue (**51**). Cependant, même après purification par chromatographie, nous n'avons pas obtenu une pureté aussi bonne que celle du produit obtenu par la voie plus longue (Cf. Fig. 117).

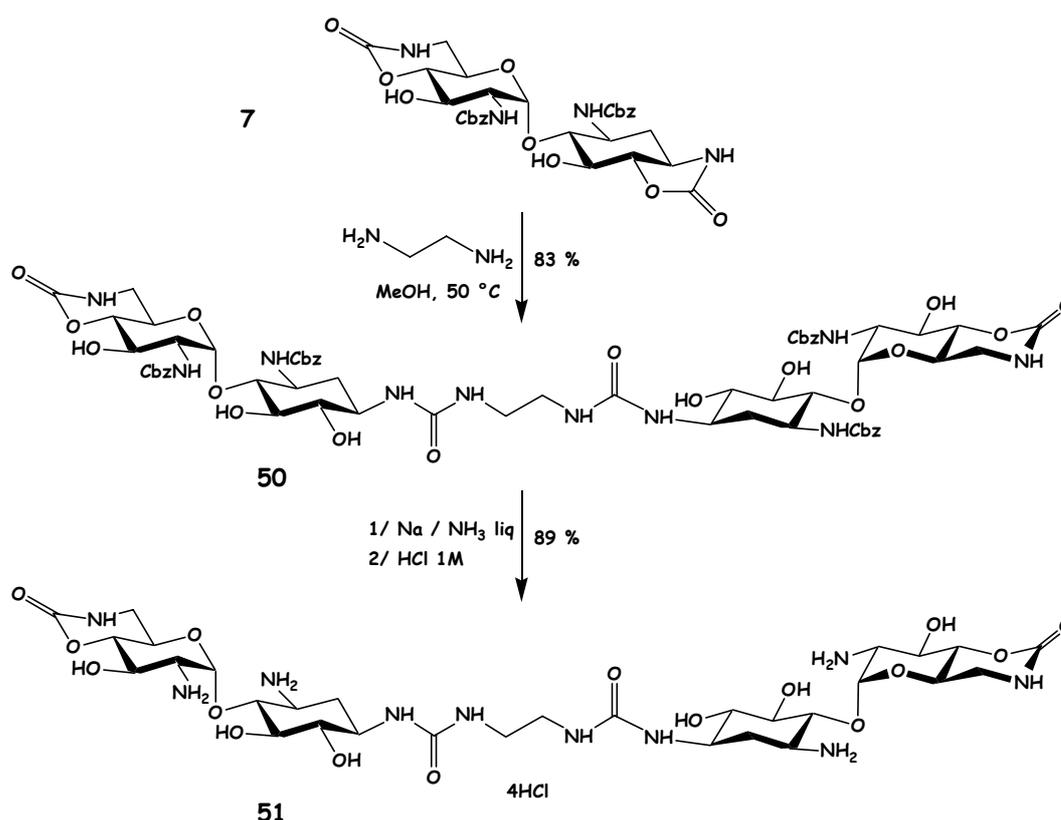


Figure 117 : Réaction de dimérisation par l'éthylène diamine en absence de groupement TBS sur l'alcool adjacent au carbamate à 6 chaînons.

Cette méthode est plus rapide et présente de bons rendements, mais la pureté des produits n'est pas optimale. Ceci est dû au fait que nous ne savons pas purifier correctement le composé **7**, qui a une solubilité complexe. Ce produit était généralement purifié *a posteriori*,

lorsqu'il était protégé par le groupement TBS et qu'il retrouvait alors une solubilité « classique ». Nous avons donc retenu la méthode passant par la protection de l'alcool par le groupement TBS, même si elle nécessite une étape de plus. Nous avons favorisé la pureté des produits par rapport au rendement, puisque ces produits sont destinés à des tests biologiques.

VII BILAN ET PERSPECTIVES

Un certain nombre de réactions permettant une dimérisation du dérivé de la néamine protégée à l'exception de l'amine en position 1 et de deux alcools ont été étudiées. Les dimérisations par réaction sur des diacides activés sous forme d'ester de N-hydroxysuccinimide ou d'anhydride de pivaloyle ont été possibles dans le cas du bras espaceur à quatre atomes. Par contre, ces deux méthodes n'ont pu être transférées au bras de trois atomes. D'autres réactions ont alors été testées afin d'obtenir ce dimère plus court, néanmoins, aucune d'entre elles n'a pour l'instant abouti. En revanche, un dimère ayant un bras espaceur encore plus court (à deux atomes), a été obtenu par amination réductrice, mais son rendement, encore faible, doit encore être amélioré.

Des travaux de déprotection du dimère à chaîne de 4 atomes ont permis de découvrir une nouvelle réaction de dimérisation. Elle permet d'obtenir des dimères à chaînes plus longues fondée sur l'ouverture sélective du carbamate le plus tendu par une diamine. Cette réaction, contrairement aux autres, ne présente aucun risque de réaction parasite intramoléculaire, puisque ce n'est plus l'amine de la néamine qui joue le rôle de nucléophile. Cette méthode a conduit par réaction avec l'éthylène diamine à un dimère protégé ayant un bras espaceur de six atomes. Après déprotection adéquate un nouveau dimère à chaîne de 6 atomes a été obtenu.

Deux dimères de la néamine ont ainsi été synthétisés : le premier possède un bras espaceur de 4 atomes, et le second, un bras de 6 atomes. Leur activité a été évaluée sur le complexe boucle-boucle de l'ARN du VIH-1. Les différentes expériences et leurs résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Tests biologiques

L'activité des produits synthétisés peut être testée de plusieurs façons sur le complexe DIS-DIS. D'une part, des expériences de cristallogénèse et de résolution des cristaux par diffraction aux rayons X peuvent permettre de visualiser l'interaction entre une molécule et le complexe DIS-DIS. En effet, si un dimère est capable de se fixer sur le complexe DIS-DIS, et que l'on prépare des cristaux du complexe DIS-DIS fixant le dimère, leur interaction doit pouvoir être visualisée en cristallographie. La structure issue de la diffraction des RX de ces cristaux peut montrer le positionnement du dimère au sein du complexe boucle-boucle et leurs interactions.

La fixation des dimères sur le complexe DIS-DIS peut également être évaluée *in vitro* par un test de protection contre une coupure spécifique lors du traitement au plomb^{II}, mais aussi par un test protection contre une méthylation par le sulfate de diméthyle (DMS). En cas d'activité *in vitro* des dimères, le test de protection contre une coupure au DMS et un test de toxicité peuvent également être menés sur le virus (tests *ex vivo*).

Il est important de noter que la partie cristallographique et les tests effectués sur l'ARN DIS-23 ont été réalisés par Eric Ennifar de l'équipe de Philippe Dumas à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC). Les tests de protections contre des coupures sur l'ARN DIS-615 ainsi que les tests de stabilisation ont été réalisés par Jean-Christophe Paillart de l'équipe de Rolland Marquet à l'IBMC. Finalement, les tests de toxicité et d'inhibition ont été effectués par Anne-Marie Aubertin à l'Institut de Virologie de Strasbourg.

I CRISTALLISATION ET DIFFRACTION DES RAYONS X

Des cristaux du complexe DIS-DIS en interaction avec différents antibiotiques (néomycine, ribostamycine, lividomycine) avaient déjà été obtenus et résolus. De la même façon, la néamine et les dimères portant un bras à 4 et 6 atomes ont co-cristallisé avec l'ARN du VIH-1 de sous-type F. Les cristaux obtenus sont présentés sur la Figure 1.

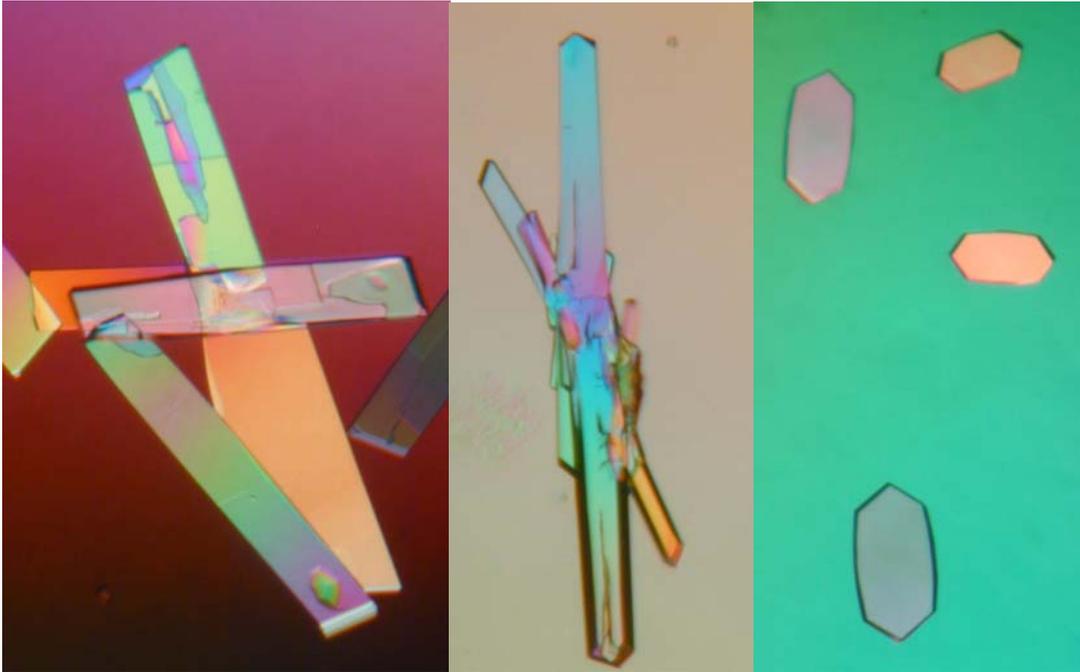


Figure 1 : Les cristaux du complexe DIS-DIS en interaction avec la néamine, le dimère à chaîne de 4 atomes et le dimère à chaîne de 6 atomes respectivement.

La structure aux rayons X des cristaux du complexe DIS-DIS en interaction avec la néamine a pu être résolue et a montré la présence des deux molécules de néamine au sein des deux cavités du complexe DIS-DIS. Les cristaux du complexe DIS-DIS contenant la néamine présentent un réseau orthorhombique (groupe d'espace : $C222_1$), et la structure a pu être déterminée avec une résolution de 2,0 Å (Cf. Fig. 2).

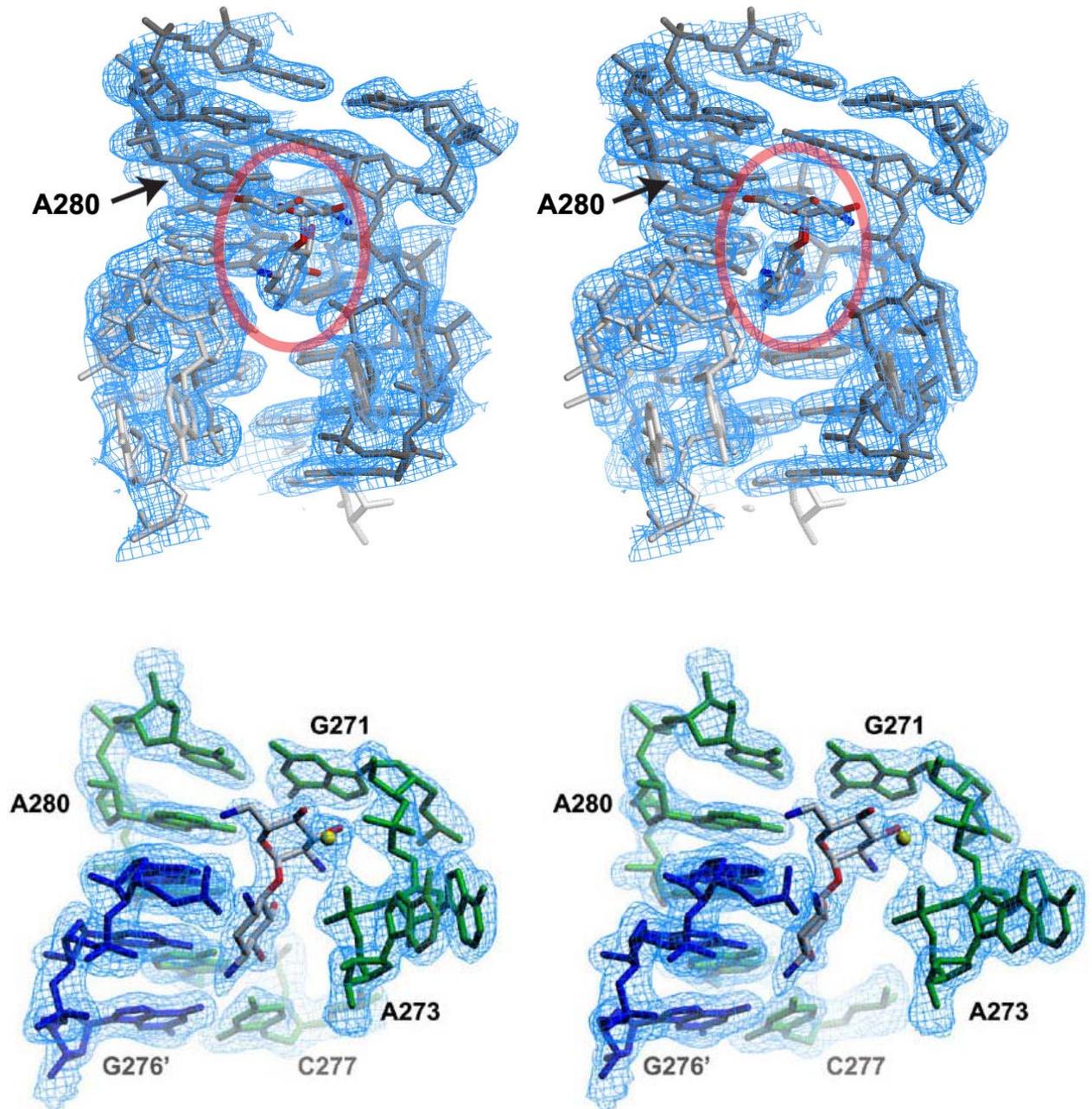


Figure 2 : Structures tridimensionnelles du complexe DIS-DIS en interaction avec les deux molécules de néamine à une résolution de 2,0 Å.

La structure du complexe DIS-DIS avec la néamine est conforme au modèle qui avait été construit par superposition des coordonnées cristallographiques de la structure du complexe DIS-DIS avec celles de la paromomycine au sein du site A (Cf. Chapitre 1 § III.3.2). La néamine se situe à l'endroit prévu par le modèle et l'ARN subit le même changement de conformation (inversion du ribose 271) que celui qui avait été nécessaire afin

d'éviter une gêne stérique entre le cycle I de la néomycine et le ribose 271. Ce résultat extraordinaire valide pleinement le modèle proposé, base de ce projet.

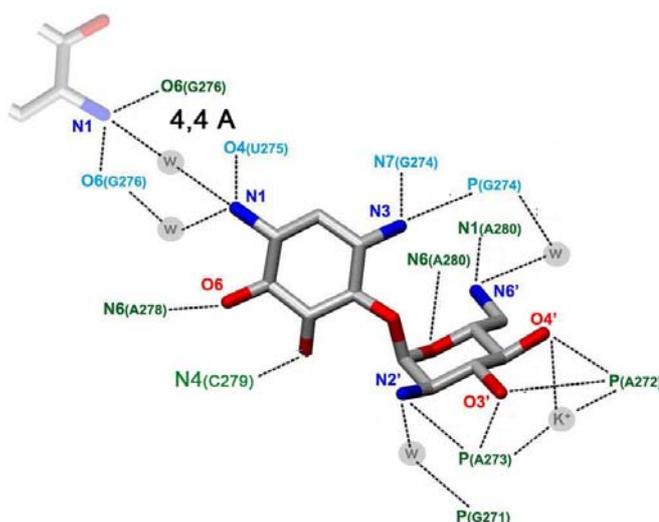


Figure 3 : Résumé des interactions entre les deux molécules de néamine et le complexe DIS-DIS.

La résolution des cristaux de néamine au sein du complexe DIS-DIS permet cependant de donner avec une meilleure précision la distance entre les deux amines en position 1 de la néamine qui se font face au sein du complexe DIS-DIS : elle est de 4,4 Å (Cf. Fig. 3). Cette précision concernant la longueur du bras espaceur laisse penser que le dimère idéal serait le dimère ayant un bras espaceur de 3 atomes, que nous n'avons malheureusement pas encore réussi à synthétiser.

Par ailleurs, les différentes interactions peuvent être observées. Les ammoniums en position 1, 3 et 6' participent à des interactions spécifiques, alors que celui en 2' interagit avec un phosphate. De même, les oxygènes de la position 6 et du cycle I interagissent avec des adénines, alors que les oxygènes des positions 3' et 4' contribuent aux interactions non spécifiques.

Par contre, les cristaux du complexe DIS-DIS avec chaque dimère présentent quelques difficultés quant à leur résolution. Seul leur empilement cristallin est connu. Leur groupe d'espace n'est pas encore complètement déterminé et leur structure n'est pas encore résolue.

II TESTS IN VITRO

II.1 Test de coupure au plomb^{II} sur le petit ARN DIS-23

L'ARN DIS-23 correspond à la séquence de 23 nucléotides formant la tige-boucle, c'est à dire le site d'initiation à la dimérisation lui-même. Le test a été effectué avec la séquence de nucléotides de l'ARN du VIH-1 du sous-type A (Cf. Fig. 4).

Le principe du test de coupure au plomb II (diacétate de plomb) est le suivant. Le plomb^{II} est très sensible à la structure de l'ARN. Dans le cas du complexe boucle-boucle, les ions métalliques Pb²⁺ se positionnent spécifiquement au sein des poches du DIS, ce qui entraîne une coupure de l'ARN. Un mécanisme de coupure par le plomb^{II} est proposé par *Brown et al.* [1]. Lorsque le mélange des brins d'ARN obtenus est déposé sur le gel dénaturant de polyacrylamide, les ARN migrent par électrophorèse différemment selon leur taille et sont ainsi distingués.

Par contre, si l'ARN fixe un aminoglycoside, il est protégé par ce dernier et n'est alors pas coupé par le plomb^{II}. Le contrôle positif du test est l'ARN sans plomb^{II}: dans ce cas, il n'y a pas de coupure et l'autoradiographie présente majoritairement la tache correspondant à l'ARN entier. Le contrôle négatif du test est l'ARN sans aminoglycoside en présence de plomb^{II}: une partie des brins d'ARN est alors coupée, et ses fragments sont visibles sur le gel d'électrophorèse en plus de l'ARN entier.

Différents antibiotiques (néomycine, néamine, paromomycine, apramycine, lividomycine, ribostamycine et hygromycine) ainsi que le dimère portant un bras à 4 atomes 31 (noté ici AB 205) ont été testés à des concentrations variables.

1 Brown, R. S. ; Hingerty, B. E. ; Dewan, J. C.; Klug, A. *Nature* **1983**, 303, 543.

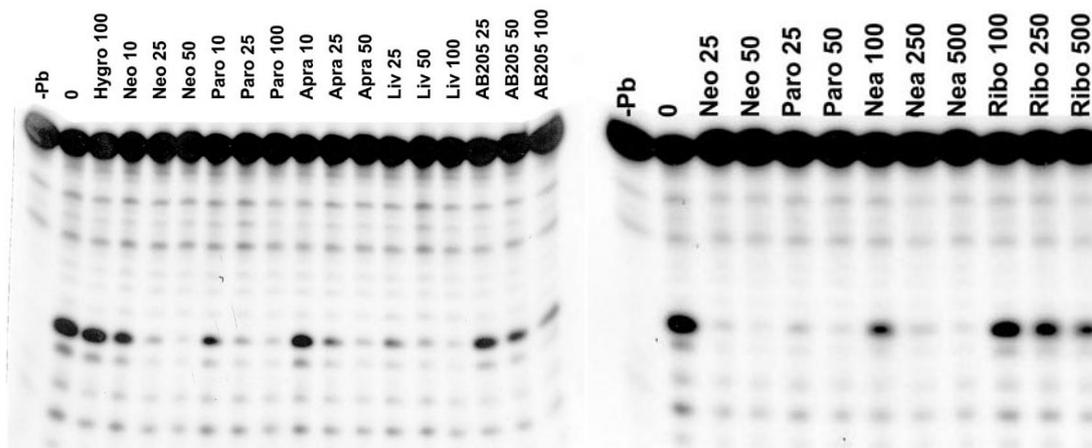


Figure 4 : Autoradiographies du test de coupure au plomb^{II} sur le DIS-23. Les concentrations sont données en $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et notées après l'abréviation de chaque aminoglycoside.

Lorsqu'un aminoglycoside se fixe sur l'ARN, l'inhibition de la coupure au plomb^{II} augmente avec la concentration en antibiotique. Un aminoglycoside est d'autant mieux fixé sur l'ARN qu'il inhibe fortement la coupure au plomb^{II} à une faible concentration. L'aminoglycoside qui se fixe le mieux sur le DIS-23 est la néomycine : elle inhibe totalement la coupure au plomb^{II} à $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La paromomycine l'apramycine et la lividomycine sont à peine moins bien fixés puisque ces trois antibiotiques présentent une inhibition totale à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Le composé AB 205 (dimère **31** portant un bras de 4 atomes) présente une affinité intermédiaire pour le DIS avec une inhibition de la coupure au plomb^{II} pour une concentration de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Finalement, la néamine inhibe la coupure au plomb^{II} à $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et, étrangement, la ribostamycine ne présente pas encore d'inhibition totale de la coupure au plomb^{II} à $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

La fixation moins forte de la néamine par rapport à la néomycine était prévisible puisque la néamine ne bénéficie pas des interactions entre l'ARN et les cycles III et IV de la néomycine. En revanche, le dimère à chaîne de quatre atomes présente une meilleure interaction avec l'ARN que la néamine. L'ajout d'un bras espaceur entre deux molécules de néamine renforce donc l'interaction avec l'ARN, soit par de nouvelles interactions, soit en rendant la molécule plus rigide et en la positionnant mieux au sein de la cavité.

Le dimère à chaîne de 4 atomes interagit mieux avec l'ARN que deux molécules de néamine, mais il se fixe moins bien que deux molécules de néomycine. Il a été évalué que sa fixation correspond à 70-80 % de celle de la néomycine. La meilleure fixation de deux molécules de néomycine par rapport au dimère repose sur le fait que les cycles III et IV

apportent trois interactions spécifiques et deux interactions non spécifiques, dont le dimère ne profite pas.

La protection contre une coupure spécifique par le plomb^{II} a également été testée sur le dimère portant un bras de 6 atomes (composé **52**). Ce dimère protège l'ARN moins bien que la néomycine et le dimère portant un bras de 4 atomes, mais mieux que la néamine. Sa fixation sur le complexe boucle-boucle a été évaluée à 20 % de celle de la néomycine. Il semble donc que le bras de 6 atomes soit trop long. La longueur du bras du dimère est donc très importante.

II.2 Test de modification au plomb^{II} sur l'ARN DIS-615

Ce test a été effectué pour le dimère C4 de la même façon que pour l'ARN DIS-23, mais cette fois-ci sur l'ARN DIS-615 pour le sous-type A. L'ARN DIS-615 contient les 615 premiers nucléotides de l'ARN génomique du VIH-1 et comprend, par conséquent, le domaine TAR, mais pas RRE, deux autres zones ciblées par des dérivés aminoglycosidiques. Effectuer un test sur une grande séquence d'ARN permet d'évaluer la spécificité d'une molécule pour le site du DIS par rapport aux autres sites possibles de fixation d'aminoglycosides.

L'activité du dimère ayant un bras de 6 atomes n'a pas pu être testée de cette façon, car l'introduction de ce dernier dans le milieu a fait agréger l'ARN DIS-615.

Il est possible d'identifier la base au niveau de laquelle la coupure au plomb^{II} a eu lieu par comparaison du rapport frontal du fragment obtenu à ceux des petits fragments d'ARN obtenus lors du séquençage de référence (pistes A U G C). Chaque piste (U, A, C, G) du séquençage est obtenue par traitement à la transcriptase inverse d'ARN synthétiques portant de façon aléatoire un nucléotide ayant un ribose didésoxy pour le nucléotide à séquencer (par exemple, pour la piste « A » seules les adénosines pouvaient comporter un ribose didésoxy). Les nucléotides portant un didésoxyribose provoquent un arrêt de la transcriptase inverse au niveau de ce ribose et engendrent donc des ADN de taille différente, qui migrent différemment par électrophorèse. Grâce à ce séquençage, il est possible d'identifier la position des nucléotides finaux des petits ARN obtenus après coupure de l'ARN DIS-615.

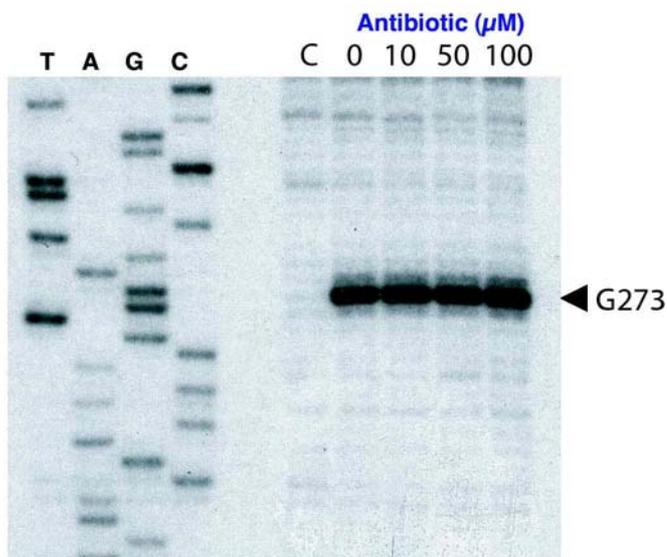


Figure 5 : Autoradiographie du test de protection contre la modification au diacétate de plomb sur l'ARN DIS-615 avec le dimère portant un bras de 4 atomes.

Les résultats montrent que la coupure au plomb^{II} a lieu au niveau de la purine G 273 (entre A 272 et G273) et qu'elle n'est pas atténuée par une concentration croissante en dimère à chaîne de 4 atomes. Le test de protection contre une coupure spécifique au plomb^{II} indique donc que le dimère à chaîne de 4 atomes ne protège pas la position G 273 de l'ARN DIS-615. Le dimère ne s'est pas fixé de façon spécifique sur le DIS. Etant donné que ce même test effectué sur le DIS-23 montrait une fixation de ce dimère, le manque d'activité observé sur l'ARN DIS-615 peut être attribué à la fixation de l'aminoglycoside dimérique sur d'autres sites de l'ARN.

II.3 Test de modification de l'ARN DIS-615 par le DMS

Le test de modification par le DMS, difficile à effectuer sur des petits fragments, a pu être réalisé en revanche sur l'ARN DIS-615.

Le DMS est un agent méthylant ciblant les amines N1 des adénines et les amines N3 des cytosines (positions de Watson Crick) ainsi que les amines N7 des guanines. Ces amines sont méthylées à condition qu'elles ne soient pas impliquées dans des liaisons avec d'autres molécules (liaison de type Watson Crick avec une autre base ou interaction avec une petite molécule).

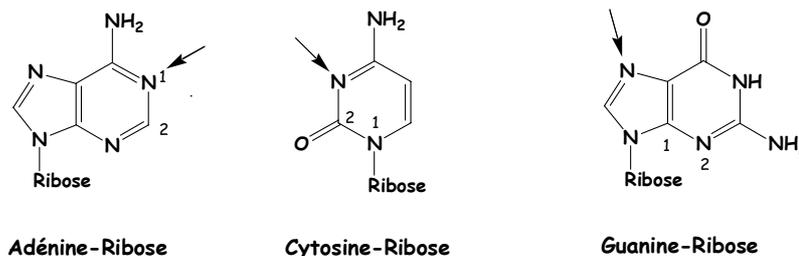


Figure 6 : Indication des positions qui peuvent être méthylées par le DMS

En présence d'aminoglycosides, certaines positions pourront être protégées vis-à-vis de la méthylation par le DMS.

Après traitement par le DMS, l'ARN est lavé (les aminoglycosides sont retirés) puis est rétrotranscrit en ADN par la transcriptase inverse (Cf. Fig. 7). Si aucune position n'est méthylée, l'ARN est entièrement rétrotranscrit en ADN. Par contre, si une position est méthylée (N1-A, N3-C) [2], la transcriptase inverse s'arrête au niveau de la base méthylée, et l'ADN formé, plus court, migre différemment sur le gel dénaturant de polyacrylamide. Lorsqu'une tache (correspondant à un ADN raccourci) sur le gel disparaît à forte concentration en aminoglycoside, cela signifie que la base correspondante participe à la fixation de l'aminoglycoside.

Remarque: la méthylation des positions N7 des guanines n'entraîne pas d'arrêt de la transcriptase inverse. Pour mettre en évidence ces positions, il faut effectuer un traitement à l'aniline afin d'effectuer la coupure de l'ARN.

La comparaison des petits fragments d'ARN obtenus avec les fragments du séquençage de référence (colonnes A U G C), permet d'identifier la position des bases méthylées.

2 Il faut noter que la méthylation doit avoir lieu en condition statistique : chaque brin d'ARN ne doit être méthylé qu'en une seule position, voire aucune. La méthylation s'effectue alors de façon aléatoire sur le brin d'ARN. En effet, si plusieurs méthylations pouvaient avoir lieu, les méthylations sur les bases les plus éloignées des premières rencontrées par la transcriptase inverse ne seraient jamais décelées.

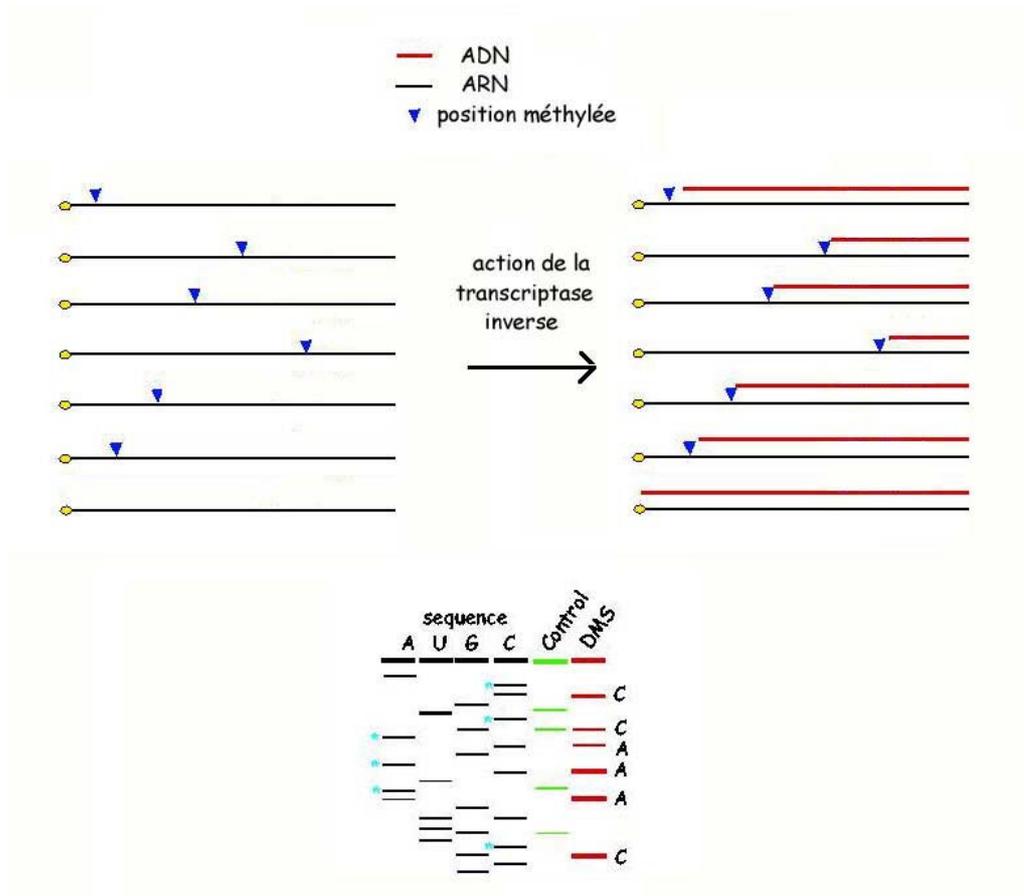


Figure 7 : Action de la transcriptase inverse et allure d'un gel. La transcriptase inverse transcrit les brins d'ARN jusqu'à être stoppée par une base méthylée. Les brins d'ADN ainsi formés sont de taille différente, selon la position de la base méthylée. Ils migrent ensuite par électrophorèse d'autant plus loin qu'ils sont longs.

Ce test a été effectué sur l'ARN-615 pour le composé 31 (dimère à chaîne de 4 atomes). Lorsqu'il a été effectué avec le dimère à chaîne de 6 atomes, l'ajout du dimère a fait agréger l'ARN-615 et a donc rendu le test impossible. Les résultats des gels pour le dimère à chaîne de 4 atomes sont présentés sur la Figure 8.

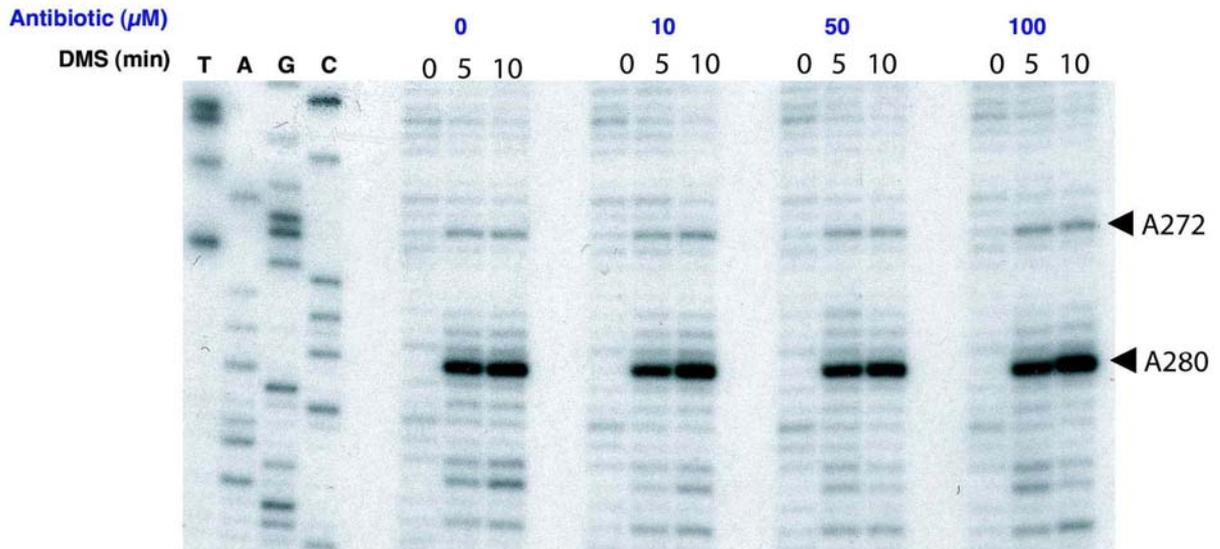


Figure 8 : Autoradiographie du test de protection par le dimère à chaîne de 4 atomes contre la modification au DMS sur l'ARN DIS-615.

Pour des concentrations en DMS et en antibiotique données, lorsque le temps d'incubation augmente (0, 5, et 10 min), l'intensité des spots correspondants aux arrêts de la transcriptase inverse au niveau des purines A272 et A280 augmente. Ce phénomène était attendu : en augmentant le temps de réaction du DMS, le nombre de méthylations est plus important et les ADN correspondants à l'arrêt de la transcriptase inverse sont nombreux.

En revanche, lorsque la concentration en antibiotique augmente, aucun effet d'atténuation de la coupure n'est observé. Il semblerait donc que le dimère à chaîne de 4 atomes ne protège pas de façon spécifique les positions N1-A272 et N1-A280 du DIS-615.

II.4 Tests de stabilisation du complexe DIS-DIS

Dans le but de comprendre plus en détail l'interaction entre les aminoglycosides et le DIS, le rôle stabilisateur des aminoglycosides sur les dimères d'ARN 1-615 du VIH-1 a été étudié *ex vivo*. Deux approches ont été développées en parallèle : La première a visé à mettre en évidence le déplacement d'un dimère d'ARN donné par un ARN compétiteur de plus petite taille en absence ou en présence d'une concentration croissante en aminoglycoside (Cf. Fig. 9). De façon complémentaire, la deuxième technique a consisté à mener la cinétique de ce même déplacement par un ARN compétiteur mais en présence d'une concentration fixe en aminoglycoside.

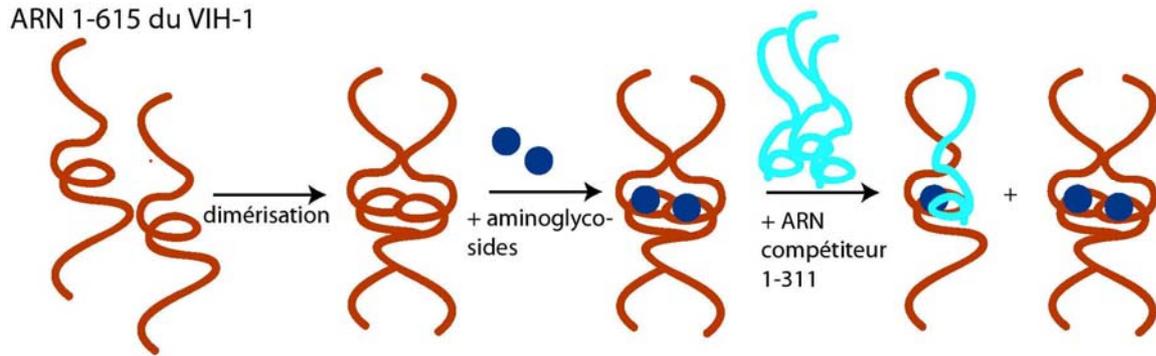


Figure 9 : Principe du test de stabilisation de dimères d'ARN par des aminoglycosides

II.4.1 Etude du déplacement de dimères d'ARN en présence d'aminoglycosides

Cinq équivalents d'un petit fragment d'ARN non marqué (ici ARN-311 contenant les 311 premiers nucléotides) est ajouté au milieu contenant l'homodimère d'ARN-615 radiomarqué, dont le complexe DIS-DIS est incubé en présence d'aminoglycoside (Ab). Si l'homodimère n'est pas stabilisé, un de ses brins peut s'échanger avec un brin de l'ARN-311 pour former un hétérodimère 1-615/1-311. Le gel montre les espèces présentes (homodimère d, hétérodimère h et monomère d'ARN-615 m) au bout de 15 min. Le témoin négatif est le dimère sans antibiotique ($C = 0$). C'est le cas où l'échange de l'un des brins de l'homodimère (d) avec un brin du petit ARN pour former un hétérodimère (h) est maximal. Par contre, si l'aminoglycoside est bien fixé au complexe DIS-DIS et qu'il le stabilise fortement, il n'y aura pas de formation d'hétérodimère.

Sur le gel (Cf. Fig. 10), la première colonne correspond au dimère seul, sans le petit ARN. La seconde correspond au test négatif sans antibiotique, et les colonnes suivantes montrent les résultats pour différentes concentrations en aminoglycoside.

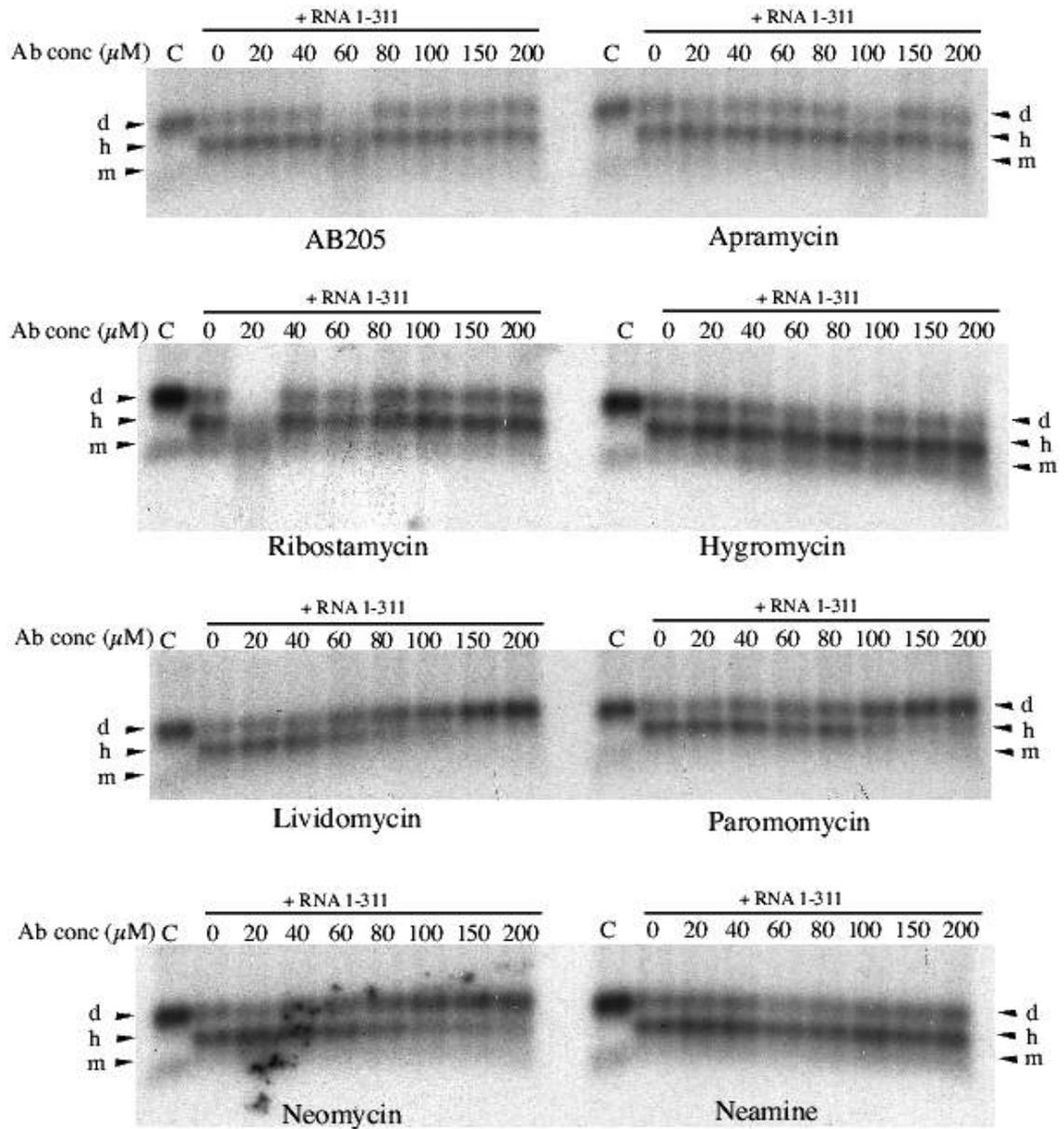


Figure 10 : Expérience de stabilisation des dimères DIS-615 par des aminoglycosides à des concentrations variables.

Les aminoglycosides qui stabilisent le plus l'homodimère sont la lividomycine et la paromomycine. Lorsque leur concentration augmente, la concentration en hétérodimère décroît. Une stabilisation complète de l'homodimère (hétérodimère non formé) par la lividomycine est observée à partir de $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La néomycine et la paromomycine montrent une stabilisation progressive qui est presque complète à $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Les autres aminoglycosides (néamine, apramycine, ribostamycine, hygromycine et dimère C4) ont peu d'effet. Quelle que soit leur concentration, un mélange d'homodimère et d'hétérodimère dans les mêmes proportions est observé au bout de 15 min.

La mesure de l'intensité des spots a permis de représenter les résultats sous forme graphique (Cf. Fig. 11).

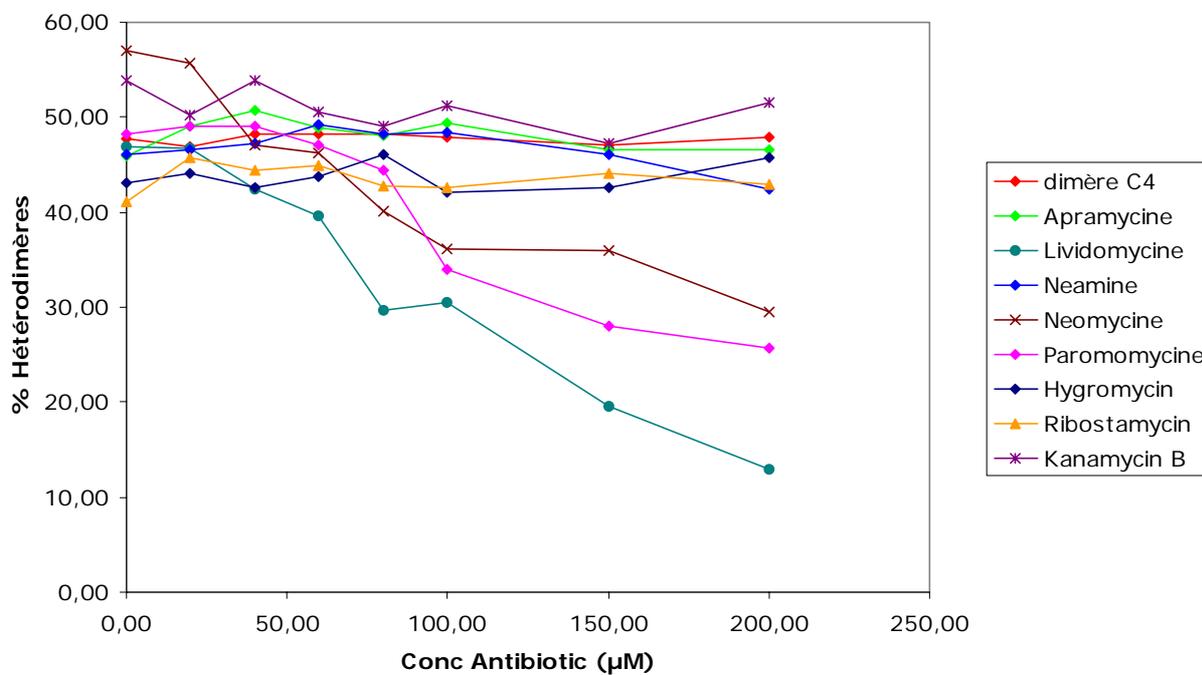


Figure 11 : Représentation graphique des résultats de la stabilisation des dimères DIS-615 par des aminoglycosides.

La lecture du graphique montrant le pourcentage d'hétérodimère en fonction de la concentration en antibiotique remontre les mêmes tendances en distinguant cependant mieux les différents antibiotiques. Les antibiotiques ont tous un effet de stabilisation du dimère similaire à faible concentration, mais ils se distinguent plus à plus forte concentration. C'est la lividomycine qui présente la plus forte stabilisation, suivie de la paromomycine et néomycine. Finalement, les autres antibiotiques présentent tous une faible stabilisation.

II.4.2 Cinétique du déplacement des dimères de DIS-615 par un ARN-311

L'expérience précédente a été complétée par une expérience de cinétique permettant d'évaluer, pour une concentration donnée ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) en aminoglycoside, le temps au bout duquel l'hétérodimère se forme (Cf. Fig. 12). Les autoradiographies ont ensuite été

quantifiées afin de permettre une présentation de la cinétique sous forme d'un graphique (Cf. Fig. 13).

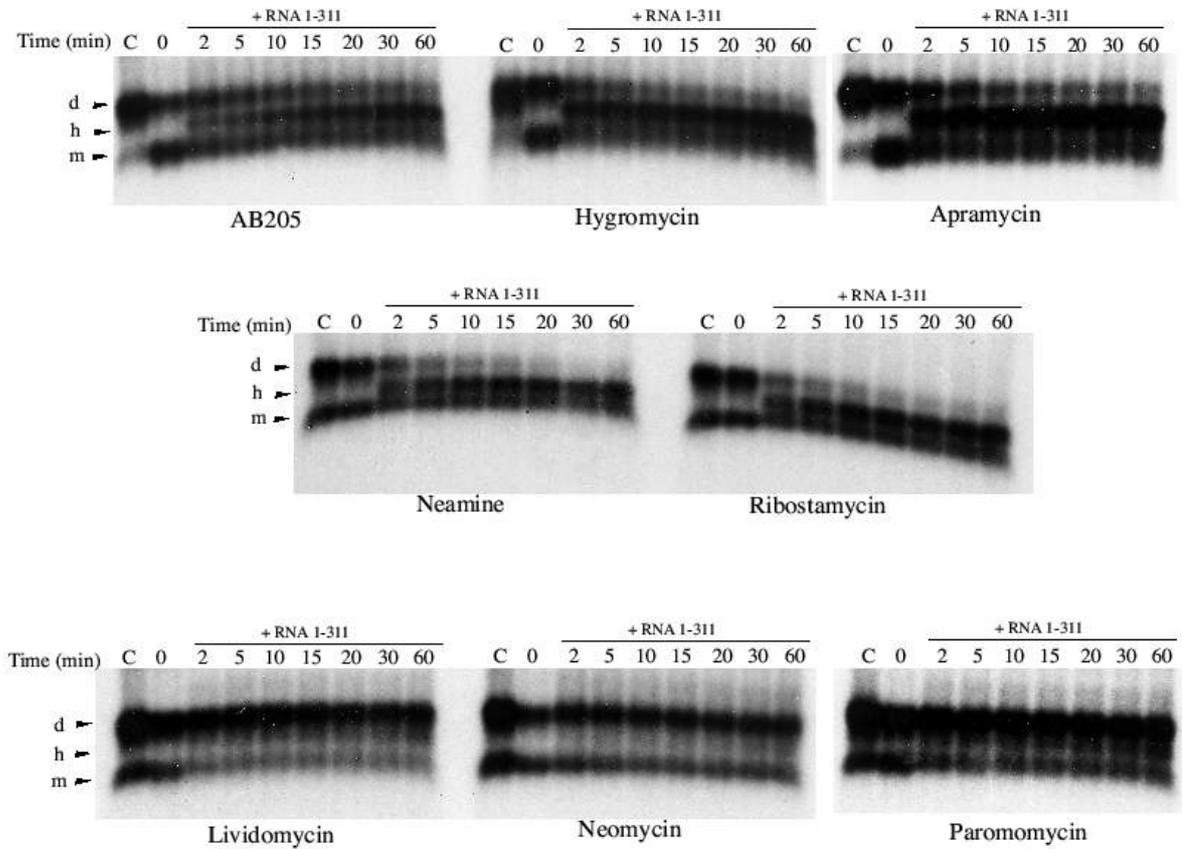


Figure 12 : Autoradiographies de la cinétique.

L'expérience de cinétique confirme le fait que la néomycine, la lividomycine et la paromomycine stabilisent fortement le dimère. En effet, l'hétérodimère ne se forme pas en moins de 60 min. Seuls les homodimères sont présents. A l'opposé, pour la néamine et la ribostamycine, de l'hétérodimère et du monomère sont déjà présents dès les premières minutes et l'homodimère a presque totalement disparu au bout de 30 min pour la néamine et au bout de 60 min pour la ribostamycine. Finalement, les composés AB 205 (dimère à chaîne de 4 atomes), hygromycine et apramycine présentent un résultat intermédiaire. La disparition de l'homodimère est plus lente et se fait de façon progressive en 60 min. Au bout d'une heure, une quantité non négligeable d'homodimère est encore présente.

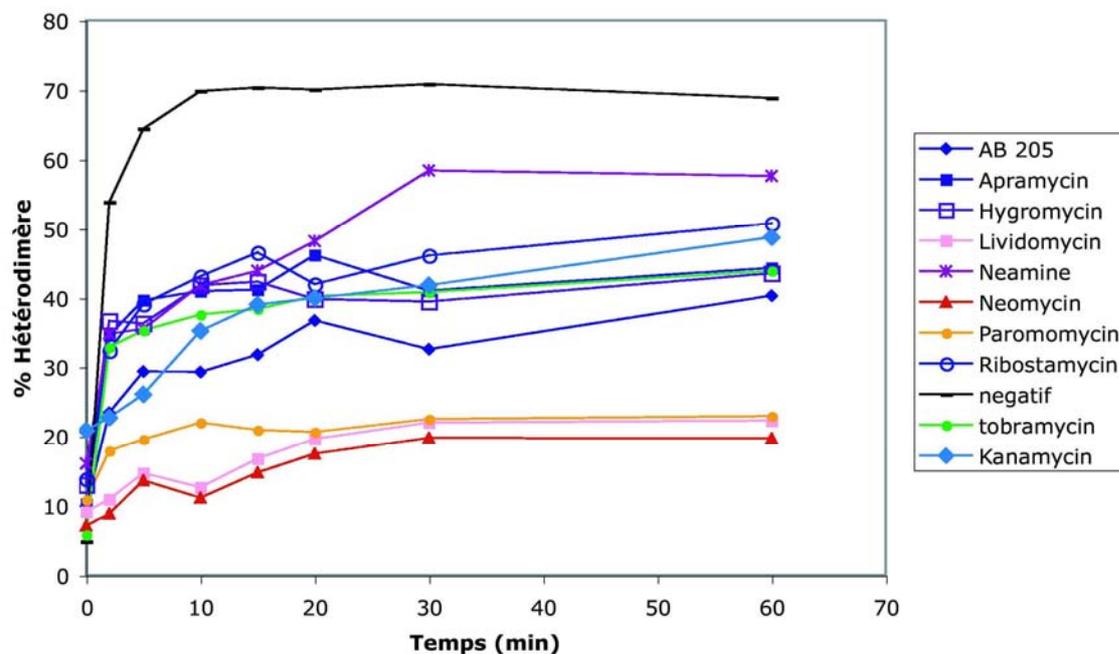


Figure 13 : Quantification de la cinétique : présentation du pourcentage d'hétérodimère formé en fonction du temps en présence des différents antibiotiques.

Cette expérience montre à nouveau que le dimère à chaîne de 4 atomes présente des résultats de stabilisation meilleurs que ceux de la néamine, mais moins bons que ceux de la néomycine.

II.4.3 Bilan des expériences de stabilisation

Ces expériences de stabilisation permettent de nuancer l'échec des expériences de protection contre une modification au DMS et de protection contre une coupure au diacétate de plomb sur l'ARN-615. L'activité du dimère à chaîne de 4 atomes est faible, mais pas nulle. Les expériences de stabilisation menées sur l'ARN-615 montrent qu'une légère stabilisation du complexe DIS-DIS a lieu. Ces résultats sont encourageants et montrent que le dimère à chaîne de 4 atomes doit être modifié afin de gagner encore en sélectivité et capacité à stabiliser le dimère DIS-DIS.

III TESTS EN CULTURE CELLULAIRE

III.1 Principe des tests *ex vivo*

L'approche expérimentale est la suivante. Des virions actifs sont préparés par transfection transitoire de cellules HeLa [3], puis ils sont placés en présence de cellules à infecter porteuses de récepteurs CD4⁺. Les cellules infectées sont ensuite traitées en fonction du test à effectuer.

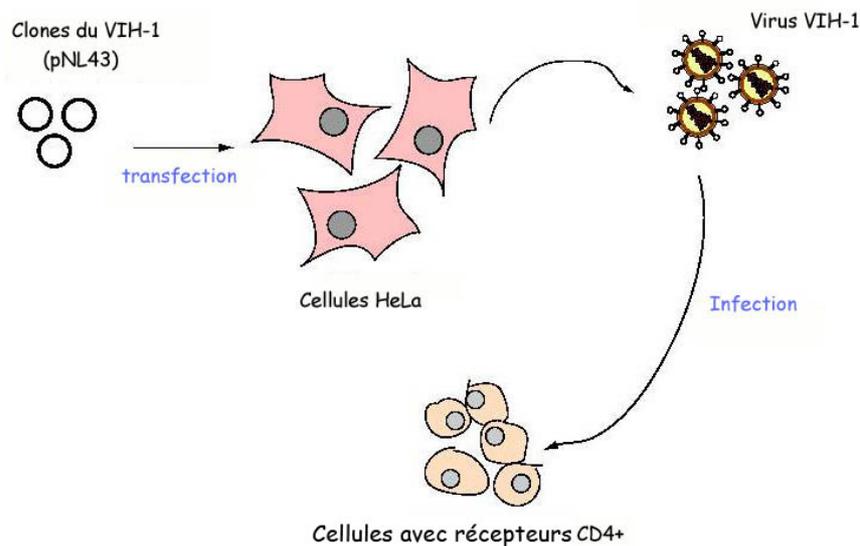


Figure 14 : Schéma de l'approche expérimentale.

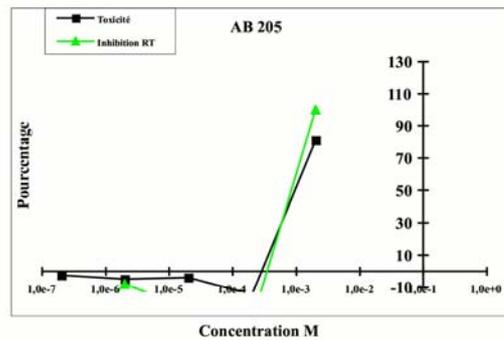
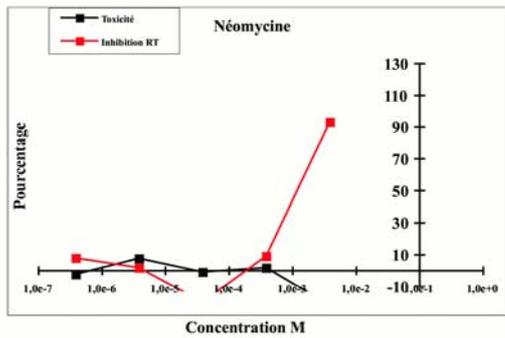
III.2 Test de toxicité et d'inhibition.

Des tests de toxicité et d'inhibition du dimère à chaîne de 4 atomes ont également été effectués en parallèle de ceux de la néomycine. Le pouvoir inhibiteur a été mesuré et comparé à la toxicité de l'aminoglycoside.

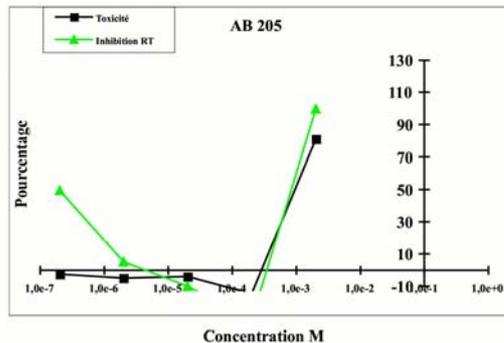
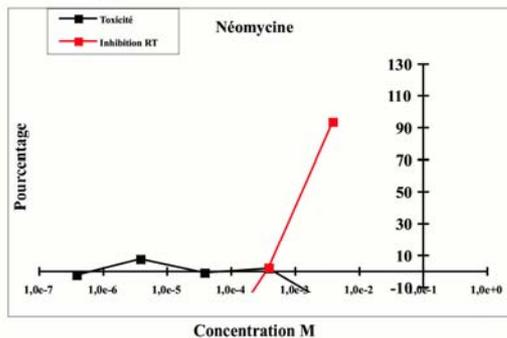
Des cellules (MT4 ou CEM-SS) porteuses de récepteurs CD4⁺ ont été infectées par le virus en présence de l'aminoglycoside dont on voulait mesurer le pouvoir inhibiteur. L'activité virale a ensuite été mesurée par quantification de l'activité de la transcriptase inverse, puisque celle-ci est proportionnelle à la concentration en particules virales.

Parallèlement, la toxicité de chaque aminoglycoside a été évaluée en le mettant en présence de cellules non infectées (MT4 ou CEM-SS). Le nombre de cellules vivantes restantes a ensuite été évalué en mesurant la concentration d'une enzyme mitochondriale, dont la concentration est proportionnelle à la concentration en cellules vivantes. En effet, comme cette enzyme a besoin d'ATP pour être active, si un antibiotique cause l'apoptose, l'enzyme « meurt » en même temps que la cellule.

sous-type B



sous-type A



sous-type F

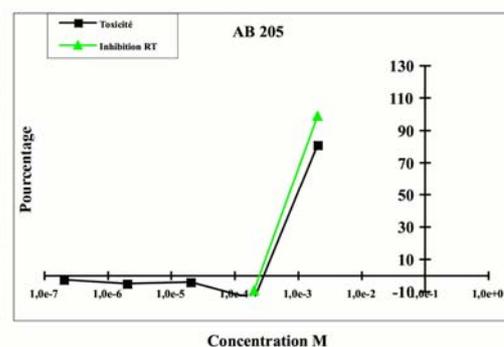
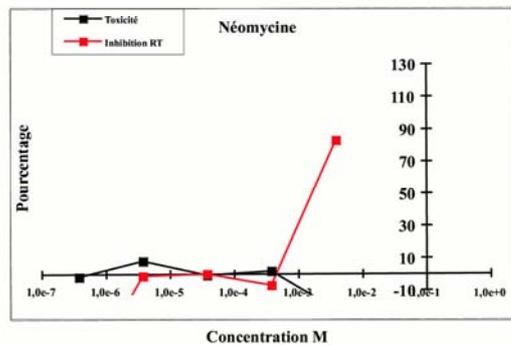


Figure 15 : Corrélation entre l'inhibition et la toxicité pour les différents sous-types. Dans le cas de la toxicité, la concentration en enzyme mitochondriale des cellules en présence d'aminoglycoside est évaluée par rapport à celle de cellules sans aminoglycoside. Parallèlement, l'inhibition de la RT (transcriptase inverse) par l'aminoglycoside est évaluée par rapport à l'activité de la RT sauvage.

3 Les cellules HeLa sont des cellules épithéliales de lignée stable adhérentes à un support.

L'observation des résultats montre pour les deux aminoglycosides testés que l'inhibition est presque totale pour des concentrations de l'ordre du mmolaire, par contre, le dimère à chaîne de 4 atomes est plus cytotoxique que la néomycine. L'effet inhibiteur mesuré pour AB 205 correspond en fait à la mort cellulaire. Les antibiotiques aminoglycosidiques sont en effet connus pour leur forte toxicité, mais également leur faible pénétration des membranes eucaryotes. La plus forte toxicité du dimère serait-elle liée à une plus forte perméabilité membranaire ?

IV BILAN DES TESTS BIOLOGIQUES

Les résultats de cristallographie les plus récents montrent que la longueur de chaîne optimale serait plutôt de 3 atomes. Par ailleurs, les structures cristallographiques de l'interaction de la néomycine et néamine avec le complexe boucle-boucle montrent les fonctionnalités importantes pour l'interaction spécifique avec le complexe boucle-boucle (Cf. Fig. 16).

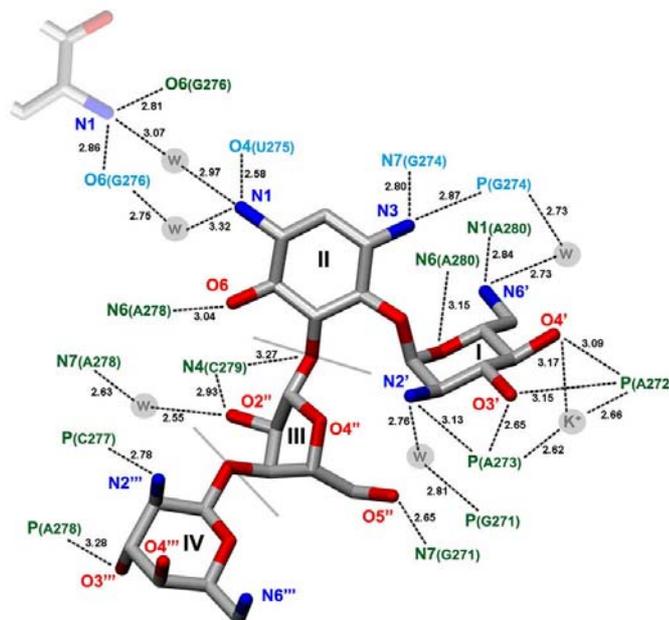


Figure 16 : Schéma récapitulatif des interactions entre la néomycine et le complexe DIS-DIS.

Les fonctionnalités importantes pour une reconnaissance spécifique sont présentées sur la Figure 17. Ce sont celles qui participent à des liaisons hydrogène avec des bases de l'ARN. Il s'agit d'une part des ammoniums en position N1, N3, N6' qui sont donneurs d'hydrogène, et d'autre part des oxygènes en position 6 et 5 ainsi que de l'oxygène cyclique du cycle I qui sont accepteurs de liaison hydrogène.

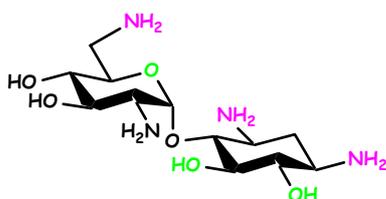


Figure 17 : Schéma récapitulatif des fonctionnalités importantes pour la fixation du dimère sur le complexe DIS-DIS. La couleur rose correspond aux donneurs de liaison hydrogène et la couleur verte correspond aux accepteurs d'hydrogène.

Par ailleurs, les tests de protection contre une coupure au diacétate de plomb et de protection contre une modification au DMS sur les ARN DIS-23 et DIS-615 montrent que le passage de la néamine à des dimères de cette dernière est bénéfique pour la fixation sur le DIS. Le rôle du bras espaceur est sûrement d'imposer une contrainte structurale supplémentaire positionnant mieux les deux molécules de néamine au sein de l'ARN mais il est peut-être également impliqué dans de nouvelles interactions.

Ainsi, le dimère à chaîne de 4 atomes interagit mieux avec l'ARN que deux molécules de néamine, mais il se fixe moins bien que deux molécules de néomycine. La meilleure fixation de deux molécules de néomycine par rapport au dimère repose sur le fait que les cycles III et IV de la néomycine apportent trois interactions spécifiques et deux interactions non spécifiques, dont le dimère de la néamine ne profite pas.

Ces premiers résultats se sont avérés très encourageants et confortent l'idée de l'approche consistant à synthétiser des dimères. A ce stade il faut encore faire varier la longueur du bras afin de trouver la longueur optimale pour le positionnement du dimère dans la cavité du complexe DIS-DIS

Chapitre 5

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons réussi à sélectionner la fonction amine en position 1 parmi les autres fonctionnalités portées par la néamine, ce qui a permis de synthétiser des dimères de la néamine ayant un bras espaceur ancré de part et d'autre sur cette amine. Ces dimères sont tout à fait nouveaux.

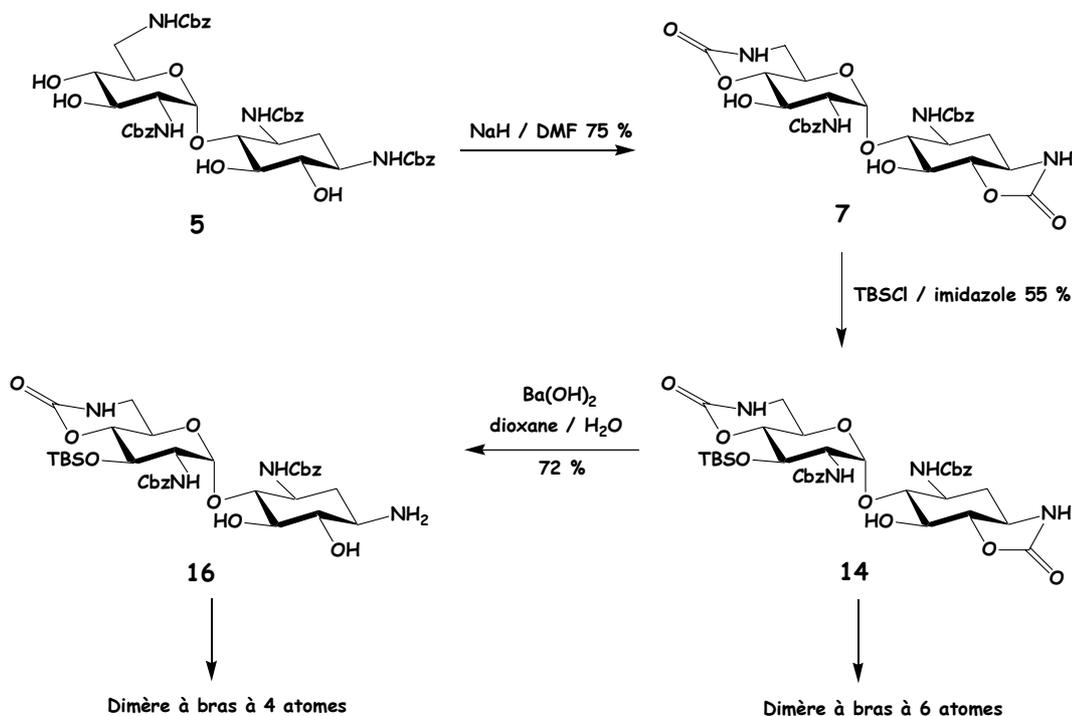


Figure 1 : Approche synthétique des dimères de la néamine portant le bras sur l'amine en position 1.

C'est par un jeu de groupements protecteurs que l'amine en position 1 a pu être sélectionnée parmi les autres fonctions. Le voisinage des amines a été exploité par la formation de carbamates cycliques entre des α et β aminoalcools. Le carbamate porté par l'amine en position 1 et l'alcool en position 6 a ensuite pu être ouvert de façon sélective par rapport à celui placé entre les fonctionnalités en positions 4' et 6', car il est plus tendu. Ce carbamate peut être ouvert soit par un bras espaceur nucléophile, soit par de l'hydroxyde de baryum pour conduire à l'amine libre qui peut réagir ensuite sur les fonctionnalités du bras (Cf. Fig. 1).

Un dimère de deux molécules de néamine protégée reliées par un bras espaceur acyle à 4 atomes de carbone a ensuite pu être préparé par acylation de l'amine libre en position 1 par réaction sur l'acide succinique activé par deux groupements N-hydroxysuccinimide. Après trois étapes de déprotection, le dimère de la néamine libre a été obtenu.

La méthode utilisée pour synthétiser le dimère ayant un bras de 4 atomes n'a cependant pas pu être appliquée à la préparation du dimère ayant un bras de 3 atomes. Il semblerait que la réactivité des précurseurs de ce bras ne soit plus la même. Diverses autres méthodes ont été testées et il est à présent possible d'en écarter certaines, afin de se consacrer aux autres approches possibles. Au cours de ces essais, et afin de mettre au point la réaction d'amination réductrice sur un dialdéhyde plus simple que le malonaldéhyde, nous avons été amenés à tester également des réactions d'amination réductrice avec le glyoxal. Les résultats ne sont pas encore pleinement satisfaisants, puisque le dimère ayant un bras alkyle à deux carbones n'a été obtenu qu'avec un rendement de 20 %, mais quelques essais supplémentaires devraient permettre de rendre cette dimérisation plus efficace avec le glyoxal. Cette dernière sera peut-être transposable au malonaldéhyde. Une autre méthode de préparation du dimère ayant un bras à deux atomes a été développée. Elle repose sur l'ouverture par un hydrure de la bis-oxazolidine dérivée du glyoxal. Cette approche n'est cependant pas plus efficace que l'amination réductrice.

Par ailleurs, une nouvelle méthode de préparation de dimères reposant sur la formation de fonctions urée par ouverture du carbamate cyclique à cinq chaînons par une diamine (éthylène diamine) a été mise au point et peut donner accès à toute une panoplie de dimères ayant des bras plus longs sans que se posent des problèmes de réaction intramoléculaire empêchant la dimérisation (Cf. Fig. 2).

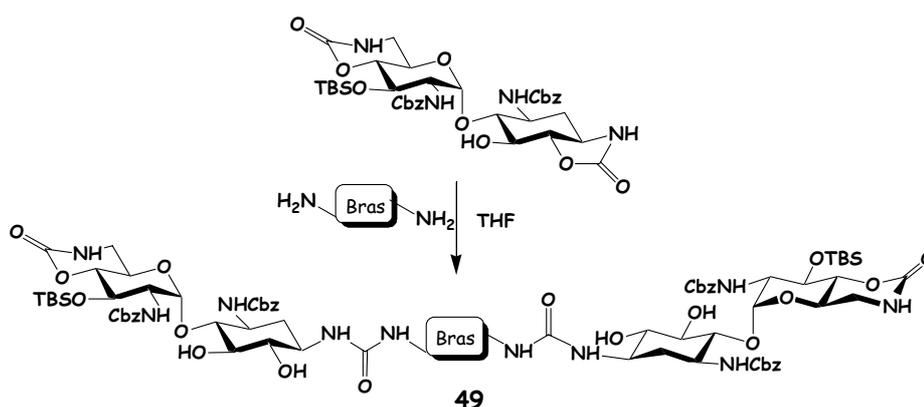


Figure 2 : Synthèse de dimères à partir de diamines par ouverture d'un carbamate cyclique.

Les deux dimères synthétisés (Cf. Fig. 3) ont ensuite été testés sur le site de l'ARN du VIH-1 que l'on souhaitait cibler : le complexe DIS-DIS. Les résultats sont très encourageants. En effet, les structures cristallographiques obtenues ont montré que le modèle de l'interaction

sur lequel nous nous sommes basés pour la conception des molécules était parfaitement fidèle à la réalité.

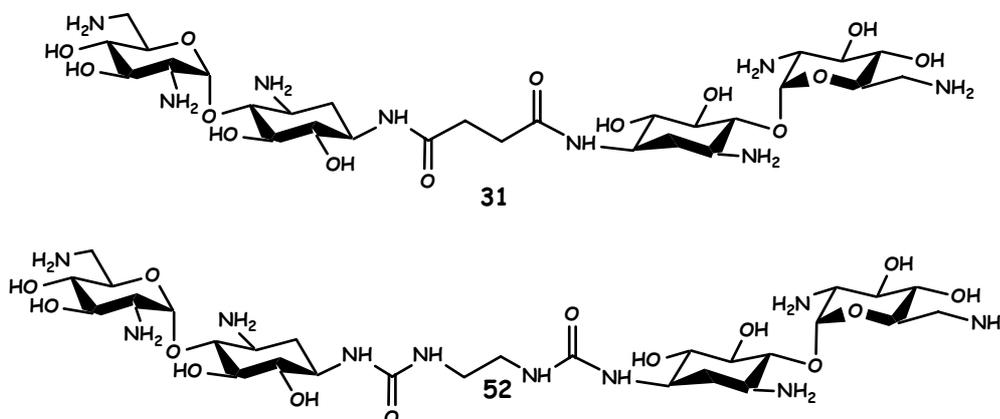


Figure 3 : Les deux dimères testés : dimères portant respectivement un bras espaceur de 4 et de 6 atomes.

D'autre part, il a été vérifié par deux tests distincts sur des ARN de différentes tailles que des dimères de la néamine sont plus spécifiques du complexe DIS-DIS que deux molécules de néamine séparées. L'idée de synthétiser des dimères se révèle donc être judicieuse, puisqu'un bras espaceur apporte une contrainte structurale supplémentaire, rendant ainsi les dimères plus spécifiques du site en jouant sur la complémentarité de forme entre l'ARN et le dimère.

La spécificité des dimères doit encore être améliorée, mais nous posséderons bientôt les structures cristallographiques de l'interaction dimère-ARN, qui permettront de prévoir les modifications à effectuer pour cibler ce site de façon encore plus spécifique.

Par exemple, il serait intéressant de synthétiser des dimères à chaîne alkyle plutôt qu'acyle. En effet, l'amine N1 restera ainsi basique et pourra être protonée afin d'interagir spécifiquement avec l'oxygène O6 de la base G 276 et l'oxygène O4 de la base U275.

Par ailleurs, comme les différents tests biologiques montrent que la néamine reste l'aminoglycoside qui se lie le mieux au complexe boucle-boucle, une idée pourrait être de tester des dimères de la néomycine. Cependant, de tels dimères auraient une masse molaire de 1675,95 g.mol⁻¹ (dimère de néomycine ayant un bras en C4 : C₅₀H₁₀₄Cl₁₀N₁₂O₂₈) qui est bien trop élevée pour un médicament selon les règles de Lipinski [1]. Il faudrait donc compenser la perte des interactions des cycles III et IV par de nouvelles interactions, si possible spécifiques.

1 Les règles de Lipinski donnent quelques critères de base pour la conception de molécules oralement bioactives. L'une de ces règles énonce que la molécule doit avoir un poids moléculaire inférieur à 500 g.mol⁻¹.
Lipinski, C. A. *Adv. Drug del.* **1997**, 23, 3.

Pour ceci, il faudrait modifier le dimère judicieusement. On pourrait rajouter le cycle III de la néomycine (responsable de 3 interactions spécifiques) de part et d'autre du dimère de la néamine, ce qui conduirait à un dimère de la ribostamycine. Cependant, le test de protection contre une coupure au diacétate de plomb montre que la ribostamycine se fixe mal sur le DIS. Ce résultat est en contradiction avec le fait que le cristal du complexe DIS-DIS contenant la ribostamycine a été obtenu, ce qui signifie que les deux cavités du complexe DIS-DIS sont suffisamment grandes pour accueillir deux molécules de ribostamycine. Une solution intermédiaire pourrait donc être l'ajout d'un mime du cycle III de la ribostamycine. Ce mime devrait apporter les interactions spécifiques que présentaient le cycle III, mais en étant moins volumineux ou plus souple.

Dans l'hypothèse de l'ajout d'un mime du cycle III de la ribostamycine judicieusement choisi en position 5 sur le 2-DOS, notre approche synthétique resterait possible. Il faudrait effectuer une glycosidation sur le composé 14 (Cf. Fig. 4). Pour ceci, nous pourrions tester les conditions de la glycosidation de la synthèse de la butyrosine de Remers *et al.* qui met en jeu une glycosidation d'un ribose sur la néamine protégée [2].

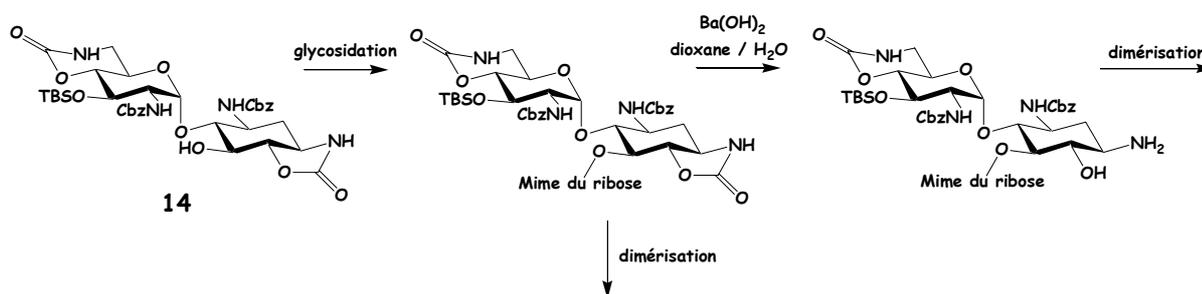


Figure 4 : Introduction possible d'un mime du cycle III de la ribostamycine

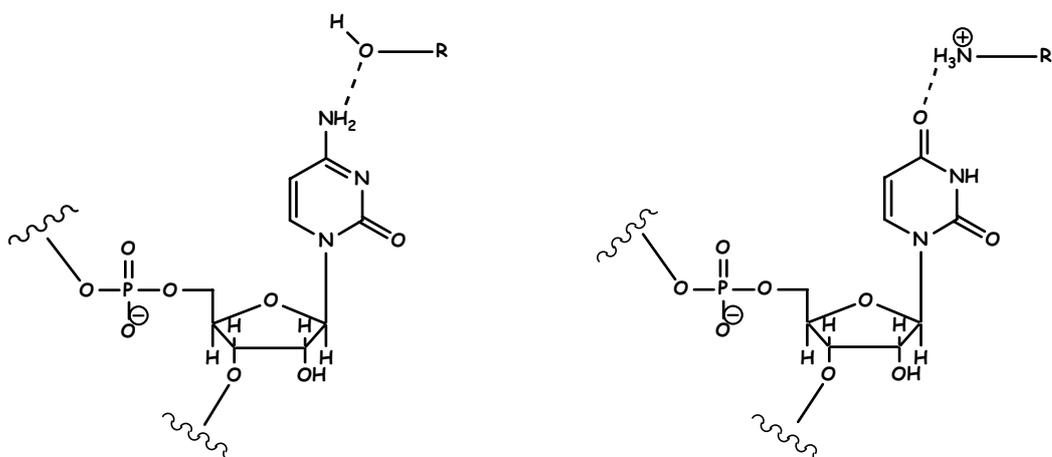
Il serait également possible d'augmenter la charge totale, donc l'affinité, en retirant les hydroxyles en position 3' et 4', puisqu'ils n'interviennent pas dans des interactions spécifiques et que leur retrait rendrait peut être les amines adjacentes plus basiques [3].

Il pourrait aussi être intéressant d'introduire de nouvelles interactions spécifiques en greffant des bras fonctionnalisés sur certains hydroxyles en se guidant à l'aide de la structure tridimensionnelle de l'interaction de la néamine avec le complexe DIS-DIS.

2 Kumar, V. ; Remers, W. A. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 3327.

3 Demeunynck, M. ; Bailly, C. ; Wilson, W.D. *DNA and RNA binders* Ed. Wiley-vch **2003** ; 1 ; 18. ISBN : 3-527-30244-1.

Un autre point important serait de remplacer l'amine en position 1 sur le 2-DOS par un alcool, car le dimère ainsi formé pourrait également cibler les souches de sous-type B, contrairement aux dimères de la néamine. En effet, le complexe boucle-boucle du sous-type B contient une cytosine (C275) à la place de l'uracyle U275 présent dans les autres sous-types, et par conséquent, il ne fixe pas la paromomycine et la néomycine. En revanche, la cytosine C275, donneuse de liaison hydrogène (NH₂ en position 4), peut interagir avec un alcool (Cf. Fig. 5). C'est pourquoi, il « suffirait » de remplacer l'amine en position 1 de la néamine par un alcool pour cibler les souches de sous-type B.



L'alcool reçoit une liaison hydrogène de la cytosine 275

L'ammonium donne une liaison hydrogène à l'uracile 275

Figure 5 : Interaction clef entre l'aminoglycoside et la purine 275 selon le sous-type.

La substitution d'une amine par un alcool n'est cependant pas évidente et peu utilisée. Ce type d'approche nécessiterait la mise au point d'une nouvelle réaction. En revanche, une approche de synthèse totale pourrait s'avérer plus souple et permettrait de choisir la fonctionnalité souhaitée lors de la réaction de dimérisation, par exemple. En effet, il est beaucoup plus simple d'effectuer la dimérisation par réaction d'une diamine ou d'un diol sur un carbonyle ou un groupement partant (Cf. Fig. 6), que par réaction de l'amine de la néamine sur un bras espaceur, puisqu'une amine a deux réactivités et qu'elle peut donc conduire à des réactions parasites.

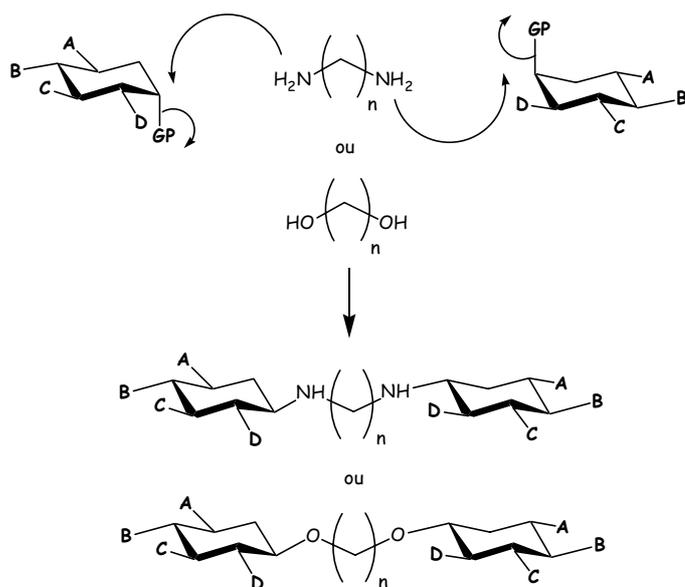


Figure 6 : Autre approche de la dimérisation dans le cadre d'une synthèse totale.

De plus, une approche de synthèse totale pourrait apporter une très grande souplesse à la synthèse d'une série variée de nouveaux dimères. Si les différentes positions des deux cycles sont fonctionnalisées soit par des précurseurs de fonctionnalités diverses soit par des alcools (il est possible de transformer facilement un alcool en bon groupement partant, afin de le substituer par une autre fonctionnalité) protégés par des groupements protecteurs orthogonaux, il devrait être possible de modifier à volonté chaque position des deux cycles pour rendre le dimère encore plus spécifique.

Il est également envisageable de faire intervenir des interactions de type « π -stacking» entre la molécule et des bases d'ARN. Ce type d'approche sera également possible par synthèse totale.

Par ailleurs, une approche par synthèse totale permettrait d'intégrer des molécules mimes, moins toxiques et de diminuer peut-être la toxicité des dimères, tout en gardant les propriétés importantes pour une reconnaissance spécifique de l'ARN.

Chapitre 6

Partie Expérimentale

Techniques expérimentales :

➤ **Milieu réactionnel**

La plupart des réactions ont été menées sous atmosphère inerte (argon), à l'exception des hydrogénations et des réactions dans l'ammoniac liquide.

De nombreuses réactions ne nécessitaient pas de solvants anhydres. Les solvants de qualité analytique ont alors été utilisés directement sans purification.

Par contre, lorsque des conditions anhydres étaient nécessaires, les composés étaient séchés longuement (entre une nuit et 4 jours selon les produits) sous vide en présence de P_2O_5 . Les solvants et réactifs liquides ont été distillés sous atmosphère d'argon avec les déshydratants suivants :

<i>Solvant ou réactif</i>	<i>Déshydratant</i>
<i>CH₂Cl₂</i>	<i>CaH₂</i>
<i>DMF</i>	<i>CaH₂ pression réduite</i>
<i>THF</i>	<i>Na / Benzophénone</i>
<i>EtOH</i>	<i>Mg</i>
<i>chlorobenzène</i>	<i>P₂O₅</i>
<i>pyridine</i>	<i>CaH₂</i>
<i>DIPEA</i>	<i>CaH₂</i>
<i>NEt₃</i>	<i>CaH₂</i>
<i>PivCl</i>	-
<i>Ethylène diamine</i>	<i>Na</i>

Les réactions dans l'ammoniac liquide ont été effectuées dans un bicol, placé sous un réfrigérant à -78°C et dans un bain à -78°C. L'ammoniac a été introduit par l'un des cols du ballon bicol et condensé grâce au double système de refroidissement.

➤ **Suivi des réactions**

Le suivi des réactions a été effectué par chromatographie sur couche mince avec les plaques MERCK d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 F₂₅₄. Après élution, et séchage, les plaques ont été observées en lumière UV à 254 nm et éventuellement 265 nm, puis révélées, selon les produits, avec le révélateur correspondant et un chauffage.

Les différents révélateurs sont :

- KMnO₄ dans l'acétone

- Acide phosphomolybdique en présence de sels de Ce^{IV} : 25 g d'acide phosphomolybdique

10 g de Ce(SO₄)₂.4 H₂O

60 mL H₂SO₄ conc.

940 mL H₂O

- Ninhydrine dans l'éthanol : 200 mg de Ninhydrine

100 mL EtOH

➤ **Purifications**

Les purifications des bruts réactionnels ont été effectuées par chromatographie « éclair » (arrivée d'air comprimé et débit de solvant de 3 cm.min⁻¹) sur colonne de gel de silice à l'aide de la silice MERCK 60 de granulométrie 40-63 µm et ont été éluées avec les solvants indiqués. Certains produits étaient peu solubles dans les éluants, et il a fallu les adsorber sur un peu de silice en présence d'un bon solvant, puis le solvant a été évaporé et la silice déposée sur le dessus de la colonne de gel de silice.

➤ **Eluants**

Les éluants utilisés ont été préparés de façon classique avec les proportions volumétriques des différents solvants. Ceux qui sont ammoniaqués ont été préparés à partir d'ammoniaque concentré.

Techniques analytiques

➤ **Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

Les échantillons ont été préparés selon les produits dans les solvants deutériés suivants : CD₃OD, D₂O, DMSO-d₆, Py-d₅ et CDCl₃. Les spectres RMN ont été réalisés sur des appareils BRUCKER AC-300 AC-400 et AC-500. Les déplacements chimiques (δ) sont

exprimés en parties par million (ppm) par rapport au signal du solvant pris comme référence interne et les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz). Les abréviations suivantes sont utilisées pour désigner la multiplicité des signaux utilisés : singulet (s), doublet (d), doublet dédoublé (dd) et doublet deux fois dédoublé (ddd).

Les spectres du proton (^1H) ont été réalisés à une fréquence de 300, 400 ou 500 MHz selon le spectromètre utilisé (BRUCKER AC-300 ou AC-400 ou AC-500) et les spectres du carbone (^{13}C) ont été réalisés aux fréquences respectives de 75, 100 et 125 MHz.

Les expériences de corrélation en deux dimensions COSY, HSQC, HMBC et ROESY ont été nécessaires pour l'attribution des différents signaux.

Notre approche expérimentale ayant conduit à des dimères symétriques (axe C2) du fait de leurs bras symétriques, les molécules se composent de deux parties équivalentes. La symétrie se retrouve sur les spectres RMN. C'est pourquoi, nous avons décrit les spectres RMN en donnant l'intégration de la moitié de la molécule.

➤ *Spectrométrie de masse*

Les spectres de masse ont été enregistrés depuis une plateforme Fisons VG de type électrospray.

➤ *Analyses élémentaires*

L'analyse élémentaire (C, H, N) a été effectuée pour les premières molécules et il s'est avéré que cette technique est délicate pour les produits hygroscopiques et de masse molaire élevée que nous avons.

➤ *Polarimétrie*

Le pouvoir rotatoire a été mesuré à 20°C à l'aide d'un polarimètre équipé d'une lampe émettant à une longueur d'onde de 546 nm, et le pouvoir rotatoire spécifique a été calculé selon l'expression suivante : $[\alpha]_D = \alpha_{lu} / l.C$

$[\alpha]_D$: pouvoir rotatoire spécifique

α_{lu} : pouvoir rotatoire mesuré

l : longueur de la cellule en dm (l = 1dm)

C : Concentration de l'échantillon en g.mL^{-1}

Le pouvoir rotatoire spécifique est noté ensuite sous la forme suivante :

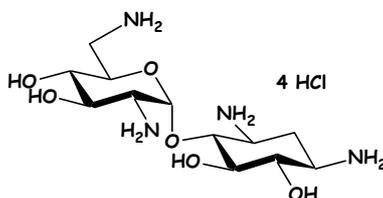
$[\alpha]_D = \dots^\circ$ (C = .., solvant) où la concentration C est alors exprimée en g. 100mL^{-1}

➤ ***Spectroscopie d'absorption Infra-rouge***

Les échantillons ont été préparés sous forme de pastille de KBr. Les spectres ont été mesurés dans un domaine de fréquence de 400 à 4000 cm^{-1} à l'aide d'un appareil PERKIN ELMER 1600 FT-IR ou d'un appareil BRUCKER.

➤ ***Points de fusion***

La mesure des points de fusion a été effectuée sur un appareil Stuart Bibby Stierlin à bain d'huile. De nombreux produits n'ont pas de point de fusion, mais un point de décomposition.

Composé 1 : la néamine tétrachlorhydratée

Poudre blanche extrêmement hygroscopique

Une solution d'acide chlorhydrique méthanolique est préparée par une addition lente à 0°C de chlorure d'acétyl (33 ml ; 35 éq.) dans du méthanol (240 ml) sous atmosphère d'argon. La solution est agitée pendant 30 min à 0°C, puis est ajoutée à une solution de sulfate de néomycine (12 g ; 13,2 mmol) dans le méthanol (1080 ml) sous argon. Le sulfate de néomycine n'est pas entièrement soluble dans ce solvant à température ambiante. Le mélange est porté à reflux en présence de quelques morceaux de pierre ponce pendant 4 h afin d'obtenir une solution limpide légèrement jaunâtre. La moitié du solvant est ensuite évaporée sous pression réduite ce qui entraîne une précipitation partielle de la néamine. Le solide blanc ainsi formé est rapidement filtré, rincé avec de l'éther anhydre et séché sous vide (4,029 g). Le solvant de rinçage est jeté. La moitié de la solution méthanolique est à nouveau évaporée puis les opérations de filtration, rinçage et séchage sont répétées pour récupérer le reste de produit (1,560 g). Les deux lots sont rassemblés afin d'obtenir une poudre blanche de néamine pure (5,589 g ; rdt : 90 %).

CCM : dioxane / H₂O / NH₃ Conc. 5 / 5 / 1 ; révélateur : KMnO₄

Néamine : R_f = 0,31

Néobiosamine : R_f = 0,58

Point de fusion : Litt. : T° dec. 222°C [1]

Exp. : T° dec. 223°C

Pouvoir rotatoire :

Litt. : $[\alpha]_{546}^{25} + 84^\circ$ (c ; H₂O) [1]

RMN ¹H (500 MHz, D₂O, pH = 4,4) :

1.96 (ddd, 1H, J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = J_{2ax-2éq} = 12.5 Hz, 2ax), 2.57 (ddd, 1H, J_{2éq-2ax} = 4.2 Hz, J_{2éq-1} = J_{2éq-3} = 12.7 Hz, 2éq), 3.36 (dd, 1H, J_{6'ax-6'éq} = 13.6 Hz, J_{6'ax-5} = 6.7 Hz, 6'ax), 3.41 (ddd, 1H, J_{1-2éq} = 4.4 Hz, J₁₋₆ = 10.5 Hz, J_{1-2ax} = 12.4 Hz, 1), 3.52 (dd, 1H, J_{2'-1'} = 4.0 Hz, J_{2'-3'} = 10.8 Hz, 2'), 3.54 (dd, 1H, J_{6'éq-6'ax} = 11.7 Hz, J_{6'éq-5} = 3.0 Hz, 6'éq), 3.57 (dd, 1H, J_{4'-3'} = J_{4'-5'} = 9.3 Hz, 4'), 3.61 (ddd, 1H, J_{3-2éq} = 4.0 Hz, J₃₋₄ = 10.3 Hz, J_{3-2ax} = 12.5 Hz, 3), 3.65 (dd, 1H, J₆₋₁ = J₆₋₅ = 10,4 Hz, 6), 3.76 (dd, 1H, J₅₋₄ = J₅₋₆ = 9.3 Hz, 5), 4.03 (dd, 1H, J₄₋₃ = J₄₋₅ = 9.5 Hz, 4), 4.05 (dd, 1H, J_{3'-4'} = J_{3'-2'} = 10.7 Hz, 3'), 4.09 (ddd, 1H, J_{5'-6'éq} = 3,3 Hz, J_{5'-6'ax} = 6.7 Hz, J_{5'-4'} = 9.9 Hz, 5'), 5.79 (d, 1H, J_{1'-2'} = 3.9 Hz, 1').

1 Dutcher, J. D. ; Donin, M. N. ; *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 3420.

RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) : attribution selon la publication [2]

30.4 (2), 42.2 (6'), 50.6 (3), 51.9 (1), 55.8 (2'), 70.5 (3'), 71.5 (5'), 72.8 (4'), 74.8 (6), 77.1 (5), 79.9 (4), 98.0 (1')

IR (film KBr) cm^{-1} :

3100-3600 cm^{-1} O-H ; N-H ν

2800-3100 cm^{-1} C-H ν

1605 cm^{-1}

1495 cm^{-1}

1087 cm^{-1}

Analyse élémentaire : molécule di-hydratée

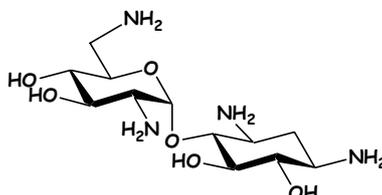
% calculé C : 28.58 ; H : 6.80 ; Cl : 28.12 ; N : 11.11 ; O : 25.38

% expérimental C : 28.38 ; H : 6.71 ; N : 10.58 ;

Préparation de la résine : Amberlyst A26 (HO^-) ou IRA 400 (HO^-)

La résine (10g ; 4,2 méq/g) est ajoutée à une solution de soude molaire préparée fraîchement (100 mL). Le mélange est agité doucement pendant 30 min, puis la résine est filtrée et rincée abondamment à l'eau (vérification du pH du filtrat) puis au méthanol. La résine n'est pas séchée complètement, elle doit rester humide pour ne pas se désactiver.

Composé 2 : la néamine libre



$\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6$: 322,36 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Solide blanc

La néamine tétrachlorhydratée (600 mg ; 1,28 mmol) est solubilisée dans du méthanol (50 mL). La résine A26(HO^-) (2,44 g ; 8 équ.) est ajoutée et le mélange est agité doucement pendant 30 min. La résine est retirée par filtration. Elle est rincée au méthanol. Le filtrat est ensuite évaporé puis séché 24 h sous vide. Le séchage est ensuite poursuivi en présence de P_2O_5 . Le solide obtenu est blanc.

RMN ^1H (300 MHz, D_2O) : le spectre est calibré sur CH_3CN , ajouté dans le milieu

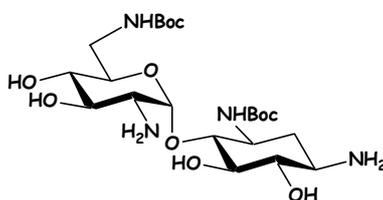
1.18 (ddd, 1H, $J_{2\text{ax}-1} = J_{2\text{ax}-3} = J_{2\text{ax}-2\text{éq}} = 12.3$ Hz, 2ax), 1.95 (ddd, 1H, $J_{2\text{éq}-2\text{ax}} = 12.3$ Hz, $J_{2\text{éq}-1} = J_{2\text{éq}-3} = 4.2$ Hz, 2éq), 2.65-2.88 (m, 5H), 2.98 (dd, 1H, $J = 2.7$ Hz, $J = 13.7$ Hz), 3.13 (dd, 1H, $J = 9.7$ Hz), 3.26 (dd, 1H, $J = 9.3$ Hz), 3.49 (dd, 1H, $J = 9.1$ Hz), 3.57 (dd, 1H, $J = 4.6$ Hz), 3.74 (ddd, 1H, $J = 2.7$ Hz, $J = 7.2$ Hz), 5.25 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 3.8$ Hz, 1').

2 K. F. Koch ; J.A. Rhoades ; E. W. Hagaman ; E. Wenkert ; *J. Am. Chem. Soc.* ; **1974**, 3300.

Préparation de la résine CG-50 (NH_4^+)

La résine Amberlite CG-50 (5 g ; 50 mmol) 200-400 mesh est lavée à l'eau (25 mL). La suspension est agitée pendant 20 min, puis laissée décanter pendant 30 min. Le liquide et la mousse surnageants sont alors prélevés. Cette opération est ensuite répétée encore 5 fois avec de l'eau (6 mL). La résine est alors filtrée sur Büchner, avant d'être mise en suspension dans de l'acétone (20 mL) pendant 3 h. La résine est filtrée et rincée à l'acétone jusqu'à ce que le filtrat soit limpide. Elle est ensuite remise en suspension dans l'eau, agitée jusqu'à la disparition de bulles, et filtrée sur Büchner. Suite à ces lavages, la résine doit être chargée par des ions Na^+ . Après avoir été placée dans de l'eau (10 mL), une solution de soude (1,984 g de NaOH dans 10 mL d'eau) est ajoutée lentement (20 min). Le mélange est ensuite agité jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement de chaleur (3h30). La résine est alors lavée par décantation et pipetage du liquide surnageant cinq fois à l'eau (7 mL). Elle est alors placée dans la colonne pour être encore rincée avec de l'eau (40 mL) (Il faut utiliser une pompe péristaltique pour ne pas colmater la résine, très fine, et avoir tout de même un débit non nul). Comme l'échange $\text{Na}^+ / \text{NH}_4^+$ se fait mal, il faut d'abord charger la résine par des ions H^+ afin de pouvoir ensuite échanger les ions H^+ par des ions NH_4^+ . Nous avons donc fait passer lentement sur la colonne de l'acide chlorhydrique 3M (20 mL). Finalement, la résine est chargée par les ammoniums en faisant passer une solution d'acétate d'ammonium (4 g de NH_4OAc dans 15 mL d'eau) à pH 7 ($\text{pH} = (\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a2})/2 = (4,75 + 9,25)/2$). Après un dernier rinçage à l'eau, la résine est prête.

Composé 3



$\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{10}$: 522,59 g.mol⁻¹
Solide blanc

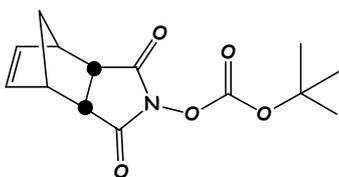
La néamine (175,5 mg ; 0,544 mmol) est dissoute dans le DMSO (19 mL). L'acétate cuivrique (435 mg ; 2,18 mmol ; 4 éq.) est ajouté et la solution est agitée 2h à TA. Le Boc_2O (238 mg ; 1,09 mmol ; 2éq) est alors ajouté et la solution est agitée la nuit à TA. La solution est de couleur vert menthe légèrement bleutée. Le DMSO est retiré à l'éther : de l'éther (~ 40 mL) est ajouté, la solution est agitée vigoureusement pendant 30 min. Une huile verte se sépare de la phase étherée vert turquoise. Les deux phases sont séparées, l'huile est récupérée puis mélangée encore deux fois à l'éther pour obtenir une huile visqueuse foncée. Elle est alors diluée dans un mélange MeOH / H_2O 4/1 (110 mL) pour donner une solution turquoise. Du sulfure de sodium nonahydraté (Na_2S) (523 mg ; 2,18 mmol ; 4éq) est ajouté et le mélange est agité 2h30 à TA. Les sels de cuivre sont filtrés sur célite, rincés au méthanol. La solution légèrement jaunâtre est évaporée sous pression réduite pour conduire au produit brut (736 mg) qui est alors purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice ($\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{NH}_3$: 4 / 2 / 0,5) pour conduire à un solide blanc (44 mg ; rdt : 15 %).

CCM : CHCl₃ / MeOH / NH₃ : 4 / 2 / 0,5 ; révélateur : KMnO₄
Rf = 0,42

RMN ¹H (300 MHz, D₂O)

1.24 (ddd, 1H, J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = J_{2ax-2éq} = 12.4 Hz, 2ax), 1.32 (s, 18H, t-Bu), 1.90 (ddd, 1H, 2éq), 2.63-2.68 (m, 1H), 3.06 (dd, 1H), 3.18 (dd, 1H), 2.29-3.45 (m, 7H), 3.58-3.62 (m, 1H), 5.10 (d, 1H, J_{1'-2'} = 3.7 Hz, 1').

Composé 4 : N-(*t*-butoxycarbonyloxy)-5-norbornène-endo-2,3-dicarboximide



C₁₄H₁₇NO₅ : 279,29 g.mol⁻¹
Solide blanc

L'hydroxy-5-norbornene-endo-2,3-dicarboximide (2g ; 11,16 mmol) est solubilisé dans de l'éthanol anhydre (55 mL) puis la solution est évaporée pour retirer les traces d'eau. Le résidu est redissout dans de l'éthanol (33 mL) fraîchement distillé, puis de l'éthoxyde de thallium (0,8 mL ; 11,16 mmol ; 1 éq.) est ajouté au goutte à goutte sous une bonne agitation. Un précipité blanc apparaît dès le début. L'agitation est poursuivie pendant 3h à TA, puis une nuit à 4°C. Le précipité blanc est filtré et rincé à l'éthanol froid puis séché sous vide. Il est ensuite placé en suspension dans du dichlorométhane fraîchement distillé (55 mL) et du Boc₂O (2,43 g ; 11,16 mmol ; 1éq) est ajouté. Le mélange est agité 24h à TA. L'ajout d'un équivalent supplémentaire de Boc₂O ne semble pas améliorer l'avancement de la réaction en 19h supplémentaires. La phase organique est lavée à l'eau (2 X 50 mL), est séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour donner un solide blanc. Le solide est placé en suspension dans de l'éther anhydre (33 mL) pendant 2h puis il est filtré et rincé à l'éther pour conduire à un solide pur (1,082 g). Le filtrat est laissé une nuit à -30°C, pour précipiter plus de solide. Ce dernier est filtré et rincé comme précédemment (0,286 g). Ces deux solides sont rassemblés (1,368 g ; rdt : 44 %).

CCM : Toluène / Et₂O : 1 / 1 ; révélateur : KMnO₄
Rf = 0,63

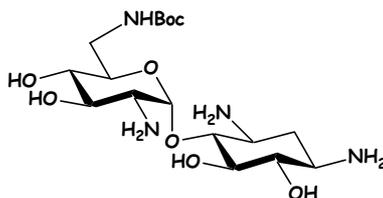
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

1.52 (s, 9H, t-Bu), 1.53 (m, 1H, CH₂), 1.77 (ddd, 1H, CH₂), 3.29 (dd, 2H, J = 2.78 Hz, J = 1.5 Hz, CH-CH₂), 3.45 (dd, 2H, J = 1.7 Hz, J = 2.7 Hz, CH-CO), 6.18 (s, 2H, CH=CH).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

27.4 (CH₃), 43.1 (CH-CH₂), 44.7 (CH-CO), 51.2 (CH₂), 62.6 (C(CH₃)₃), 134.7 (CH=CH), 183.1 (C=O).

Essai de réaction avec N-tBND



$C_{17}H_{34}N_4O_8$: 422,47 g.mol⁻¹
Solide blanc

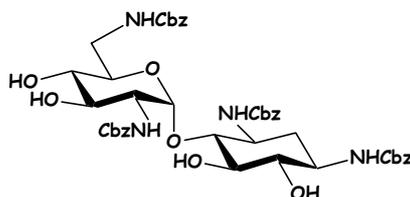
La néamine (160 mg ; 0,50 mmol) est dissoute dans un mélange dioxane / H₂O 1/1 (15 mL). Le N-(t-butoxycarbonyloxy)-5-norbornene-*endo*-2,3-dicarboximide (138 mg ; 0,50 mmol ; 1 éq.) en solution dans du dioxane (10 mL) est ajouté très lentement et la solution est agitée 6h30 à TA. Le dioxane est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse restante est diluée avec de l'eau (50 mL) puis lavée deux fois avec du butanol (25 mL) présaturé dans l'eau pour retirer les produits polyprotégés. La phase de butanol est lavée à l'eau (25 mL) puis les phases aqueuses sont rassemblées et évaporées. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (CHCl₃ / MeOH / NH₃ : 5 / 3 / 1) pour conduire à un produit *di*-protégé, puis un mélange de deux produits *mono*-protégés, dont l'un est obtenu pur (7 mg ; rdt : 3 %).

CCM : CHCl₃ / MeOH / NH₃ : 5 / 3 / 1 ; révélateur : KMnO₄
Rf = 0,07

RMN ¹H (300 MHz, D₂O)

1.24 (ddd, 1H, J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = J_{2ax-2éq} = 12.4 Hz, 2ax), 1.32 (s, 9H, t-Bu), 1.96 (ddd, 1H, J_{2éq-2ax} = 12.8Hz, 2éq), 2.82-2.90 (m, 2H), 2.91-3.00 (m, 1H), 3.10-3.60 (m, 7H), 3.80-3.90 (m, 1H), 5.33 (d, 1H, J_{1'-2'} = 2.9 Hz, 1').

Composé 5 :



$C_{44}H_{50}N_4O_{14}$: 858,89 g.mol⁻¹
Poudre blanche

La Néamine tétrachlorhydratée (11 g ; 23,5 mmol) est dissoute dans un mélange de méthanol (550 ml) et d'eau (100 ml), auquel est ajoutée la triéthylamine (33 ml ; 235 mmol ; 10 éq.). Le mélange est agité 30 min à TA puis est refroidi à 0°C. Le chlorure de benzyloxycarbonyl (20 ml ; 141 mmol ; 6 éq.) est ajouté au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité pendant une nuit en laissant la température remonter de 0°C à TA pour donner une pâte blanche visqueuse. Le solvant est évaporé sous pression réduite. De l'eau est ajoutée au mélange qui

est alors bien mélangé à l'aide d'une spatule, filtré et rincé à l'eau. La même opération est effectuée ensuite avec de l'éther. Ces opérations sont répétées jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène et fine qui est alors séchée sous vide en présence de P₂O₅ (16,546 g ; rdt : 82 %). Ce produit est utilisé sans purification ultérieure.

CCM : AE / MeOH : 4 / 1 ; révélateur : acide phosphomolybdique avec Ce IV
Rf = 0,74

Point de fusion : Litt. : T dec. 259°C [3]
Exp. : T dec. 259°C

Pouvoir rotatoire :

Litt. : $[\alpha]_{546}^{22} + 51^\circ$ (c 1 ; DMF) [3]

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) : à TA présence de plusieurs rotamères

1.33 (m, 1H, 2ax), 1.77 (m, 1H, 2éq), 3.00-3.70 (m, 11H), 4.70-5.30 (m, 13H, 1', CH₂Ar, OH), 6.45 (d, 1H, NH), 6.84 (p, 1H, NH), 6.95 (p, 1H, NH), 7.17 (p, 1H, NH), 7.20-7.50 (m, 20H, Ar).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO + 4 gouttes de MeOH)

1.33 (m, 1H, 2ax), 1.77 (m, 1H, 2éq), 3.00-3.70 (m, 11H), 4.80-5.10 (m, 11H, 1'et CH₂Ar), 7.15 (d, 1H, NH), 7.30-7.37 (m, 23H, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO) :

34.9 (2), 42.0 (6'), 50.4, 51.3, 56.2, 65.2 (CH₂-Ar), 65.3 (CH₂-Ar), 65.4 (CH₂-Ar), 70.7, 71.1, 71.5, 74.2, 76.6, 81.6, 98.7 (1'), 127.4 (Ar C^{III}), 127.8 (Ar C^{III}), 128.4 (Ar C^{III}), 137.0 (Ar C^{IV}), 137.2 (Ar C^{IV}), 137.3 (Ar C^{IV}), 155.8 (C=O Cbz), 156.2 (C=O Cbz), 156.6 (C=O Cbz).

IR (film KBr) cm⁻¹ :

3100-3600 cm⁻¹ O-H ; N-H v
2943 cm⁻¹ C-H v
1693 cm⁻¹ C=O v (Cbz) (amide I)
1540 cm⁻¹ N-H δ et N-C=O v (amide II)
1455 cm⁻¹
1411 cm⁻¹ C-H ; O-H δ
1338 cm⁻¹
1279 cm⁻¹
1043 cm⁻¹

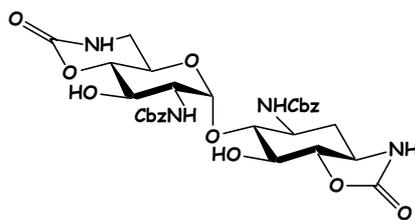
Analyse élémentaire : molécule mono-hydratée

% calculé	C : 60.27 ; H : 5.98 ; N : 6.39 ; O : 27.37
% expérimental	C : 59.84 ; H : 5.81 ; N : 6.40 ;

Spectre de masse :

MS FAB + : [M + Na⁺] 881.3 ppm ; simulation pour C₄₄H₅₀N₄O₄ 881.3

Composé 7



$C_{30}H_{34}N_4O_{12}$: 642,61 g.mol⁻¹
Solide blanc

Du NaH (742 mg ; 18,55 mmol ; 60 % ; 4,6 éq.) est ajouté à 0°C par portions à une solution du composé 5 (3,463 g ; 4,03 mmol) dans du DMF anhydre (82 ml) sous argon. La suspension est agitée 30 min à 0°C. Un second ajout de DMF (65 ml) permet de diminuer la viscosité du mélange qui est alors agitée 2h15 à 30°C pour passer d'une couleur jaunâtre à brune. La réaction est neutralisée par de l'acide acétique glacial, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. De l'eau glacée est ajoutée à l'huile résultante afin de faire précipiter un produit blanc. Au bout de 15 min à 0°C, le précipité est filtré et rincé à l'eau glacée puis Et₂O en mélangeant bien. Le solide blanc est alors séché sous vide en présence de P₂O₅ pendant une nuit pour obtenir une fine poudre blanche (1,942 g ; rdt brut : 75 %). Il reste cependant des traces d'un produit secondaire 8 retrouvé également dans les eaux de rinçage.

CCM : AE / MeOH : 4 / 1 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}

Produit 7 : R_f = 0,65

Produit secondaire 8 : R_f = 0,48

Point de fusion : Litt. : T dec. 230°C [3]

Exp. : T dec. 232°C

Pouvoir rotatoire :

Litt. : $[\alpha]_{546}^{22} + 32,6^\circ$ (c 0,7 ; DMF) [3]

Exp. : $[\alpha]_{546}^{20} + 34^\circ$ (c 1,1 ; DMF)

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) : attribution par analogie au produit 14

1.58 (ddd, 1H, J_{2ax-2éq} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 11.9 Hz, 2ax), 2.17 (ddd, 1H, J_{2éq-2ax} = 12.1 Hz; 2éq), 3.15 (dd, 1H, J_{6'ax-6'éq} = J_{6'ax-5'} = 10.2 Hz, 6'ax), 3.46 (m, 2H), 3.56-3.83 (m, 5H), 3.88-4.10 (dd, 3H, J_{3'-2'} = J_{3'-4'} = 8.5 Hz), 5.07 (dd, 2H, J = 5.1 Hz, CH₂ Ar2), 5.16 (d, 1H, J = 5.1 Hz, CH₂ Ar2), 5.30 (d, 1H, J = 5.3 Hz, CH₂ Ar1), 5.53 (d, 1H, J_{1'-2'} = 2.9 Hz, 1'), 7.32-7.39 (m, 10H, Ar).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) :

1.46 (ddd, 1H, J_{2ax-2éq} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 11.7 Hz, 2ax), 1.96 (ddd, 1H, J_{2éq-2ax} = 11.7 Hz, J_{2éq-1} = J_{2éq-3} = 3.6 Hz; 2éq), 3.03 (dd, 1H, J_{6'ax-6'éq} = J_{6'ax-5'} = 9.9 Hz, 6'ax), 3.30-3.66 (m, 8H), 3.77-3.95 (m, 2H), 4.78 (d, 1H, J = 12.4 Hz, CH₂ Ar1), 5.00 (d, 1H, J = 12.8 Hz, CH₂ Ar2), 5.06 (d, 1H, J = 12.8 Hz, CH₂ Ar2), 5.13 (d, 1H, J = 12.4 Hz, CH₂ Ar1), 5.26 (d, 1H, J_{1'-2'} = 2.7 Hz, 1'), 5.43 (d, 1H, J = 5.5 Hz, OH), 5.74 (d, 1H, J = 6.0 Hz, OH), 6.91 (d, 1H, J = 8.6 Hz, NH), 7.28-7.38 (m, 12H, Ar + 2 NH), 7.45 (d, 1H, J = 9.0 Hz, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) []:

L'attribution des carbones a été faite en supposant que l'ordre reste le même entre le composé 7 et les composés 14 et 15

33.5 (2), 44.1 (6'), 53.0 (3), 55.1 (1), 57.2 (2'), 62.8 (5'), 67.5 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$), 69.7 (3'), 74.6 (5), 80.5 (4'), 83.7 (4), 85.3 (6), 100.3 (1'), 129.0 (Ar C^{III}), 129.1 (Ar C^{III}), 129.2 (Ar C^{III}), 129.6 (Ar C^{III}), 129.6 (Ar C^{III}), 138.2 (Ar C^{IV}), 138.4 (Ar C^{IV}), 155.7 (C=O carbamate cycle à 6), 158.2 (C=O Cbz), 158.9 (C=O Cbz), 162.0 (C=O carbamate cycle à 5).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO) :

L'attribution des carbones a été faite en supposant que l'ordre des C13 est le même que pour le spectre dans le Méthanol

32.5 (2), 42.6 (6'), 51.4 (3), 53.0 (1), 55.8 (2'), 62.0 (5'), 65.4 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$), 65.5 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$), 67.7 (3'), 72.6 (5), 78.6 (4'), 83.2 (4), 83.5 (6), 99.0 (1'), 127.6 (Ar C^{III}), 127.7 (Ar C^{III}), 127.8 (Ar C^{III}), 128.3 (Ar C^{III}), 128.4 (Ar C^{III}), 136.9 (Ar C^{IV}), 137.2 (Ar C^{IV}), 152.4 (C=O carbamate cycle à 6), 155.6 (C=O Cbz), 156.3 (C=O Cbz), 160.0 (C=O carbamate cycle à 5).

IR (film KBr) cm^{-1} :

3100-3600 cm^{-1} O-H ; N-H ν

2925 cm^{-1} C-H ν

1756 cm^{-1} C=O ν (cycle à 5) (amide I)

1695 cm^{-1} C=O ν (Cbz) et C=O ν (cycle à 6) (une seule bande large) (amide I)

1539 cm^{-1} N-H δ et N-C=O ν (amide II)

1455 cm^{-1}

1417 cm^{-1} C-H ; O-H δ

1276 cm^{-1}

1045 cm^{-1}

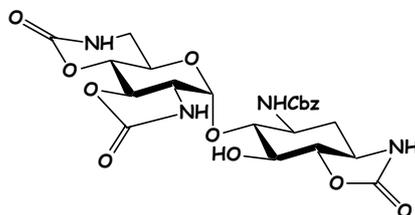
Spectre de masse :

MS FAB+ : $[\text{M} + \text{Na}^+]$ 665.2 ppm ; simulation pour $\text{C}_{74}\text{H}_{101}\text{N}_8\text{NaO}_{24}\text{Si}_2$ 665.2

Spectre de masse :

MS ES+ : $[\text{M} + \text{Na}^+]$ 665.2561 ppm ; simulation pour $\text{C}_{74}\text{H}_{101}\text{N}_8\text{NaO}_{24}\text{Si}_2$

Composé 8



$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_{11}$: 534,16 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Cristaux blancs de type paillettes

Sous produit de la réaction de formation du composé 7 : apparition de cristaux blancs dans les eaux de rinçage : ils sont filtrés, rincés à l'eau puis l'éther et enfin, séchés sous vide.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) :

1.48 (ddd, 1H, $J_{2ax-2\acute{e}q} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 11.5$ Hz, 2ax), 1.88 (ddd, 1H, $J_{2ax-2\acute{e}q} = 11.2$ Hz, 2\acute{e}q), 3.09 (dd, 1H, $J_{6'ax-6'\acute{e}q} = J_{6'ax-5'} = 10.2$ Hz), 3.23 (dd, 1H), 3.40-3.65 (m, 5H), 3.81 (m, 2H), 4.30 (dd, 1H, $J = 10.2$ Hz), 4.49 (dd, 1H, $J = 9.3$ Hz), 4.65 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, $\underline{CH_2}$ Ar), 5.12 (d, 1H, $J = 12.4$ Hz, $\underline{CH_2}$ Ar), 5.65 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz, OH), 5.66 d, 1H, $J_{1'-2'} = 3.3$ Hz, 1'), 7.15-7.34 (m, 5H, Ar) , 7.57 (s, 1H, NH), 7.58 (s, 1H, NH), 7.67 (s, 1H, NH), 7.77 (s, 1H, NH).

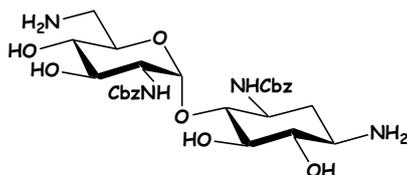
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO) : attribution par analogie avec le composé 7

32.0 (2), 42.3 (6'), 50.6 (3), 52.8 (1), 57.5 (2'), 63.5 (5'), 65.4 ($\underline{CH_2}$ Ar), 72.9 (3'), 74.6 (5), 75.0 (4'), 81.5 (4), 83.0 (6), 95.6 (1'), 127.9 (Ar C^{III}), 128.4 (Ar C^{III}), 136.8 (Ar C^{IV}), 151.3 (C=O carbamate cycle à 6), 155.5 (C=O Cbz), 158.4 (C=O carbamate entre 2' et 3'), 159.9 (C=O carbamate entre 1et 6).

Spectre de masse :

MS FAB+ : $[M + Na^+]$ 557.1 ppm ; simulation pour $C_{23}H_{26}N_4NaO_{11}$ 557.1

Composé 11



$C_{28}H_{38}N_4O_{10}$: 590,62 g.mol⁻¹
Solide blanc

A une solution du composé 7 (100 mg ; 0,15 mmol) dans du dioxane (10 ml), une solution à 0,1M de Ba(OH)₂ dans l'eau (0,75 ml) est ajoutée. Le mélange réactionnel est chauffé à 68 °C pendant 2h. De la solution à 0,1M de Ba(OH)₂ dans l'eau (10 ml) est encore ajoutée et le mélange réactionnel est chauffé à 68 °C pendant 2h15. Le mélange est refroidi à TA, puis du CO₂ est mis à buller pendant 50 min. Les sels de baryum sont filtrés sur célite, rincés au DMF, puis le filtrat est évaporé sous pression réduite. De l'éther diéthylique est ajouté et un précipité blanc fin apparaît. Le mélange est bien trituré, puis le précipité est filtré et rincé à l'éther. Ce dernier est alors purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (CHCl₃ / MeOH / NH₃ : 5 / 3 / 0,5) pour conduire, en plus d'autres produits, le produit souhaité (16 mg ; rdt : 18 %).

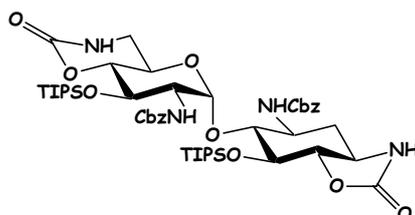
RMN ¹H (400 MHz, DMSO) :

1.24 (ddd, 1H, $J_{2ax-2\acute{e}q} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 13.5$ Hz, 2ax), 1.81 (ddd, 1H, $J_{2\acute{e}q-2ax} = 13.2$; 2\acute{e}q), 2.56 (ddd, 1H, 1), 2.62 (dd, 1H, $J_{6'ax-6'\acute{e}q} = 13.3$ Hz, $J_{6'ax-5} = 6.3$ Hz, 6'ax), 2.89 (m, 2H, 6'\acute{e}q et 6), 3.11 (m, 1H, 4'), 3.28 (dd, 1H, $J_{5-4} = J_{5-6} = 9.0$ Hz, 5), 3.36 (dd, 1H, $J_{4-5} = J_{4-3} = 9.3$ Hz, 4), 3.50 (m, 1H, 3), 3.59 (m, 1H, 5'), 4.91 (d, 1H, $J = 12.4$ Hz, $\underline{CH_2}$ Ar1), 4.99 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz, $\underline{CH_2}$ Ar2), 5.05 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, $\underline{CH_2}$ Ar2), 5.06 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz, $\underline{CH_2}$ Ar1), 5.21 (d, 1H, 1'), 7.26-7.40 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO) :

36.4 (2), 42.6 (6'), 51.0 (3), 51.3 (1), 56.8 (2'), 65.7 (CH₂-Ar), 65.8 (CH₂-Ar), 71.5 (3'), 72.3 (4'), 72.7 (5'), 76.8 (5), 77.8 (6), 82.5 (4), 99.1 (1'), 127.9 (Ar C^{III}), 128.1 (Ar C^{III}), 128.2 (Ar C^{III}), 128.3 (Ar C^{III}), 128.8 (Ar C^{III}), 137.5 (Ar C^{IV}), 137.8 (Ar C^{IV}), 156.1 (C=O Cbz), 156.7 (C=O Cbz).

Composé 13



C₄₈H₇₄N₄O₁₂Si₂ : 955,29 g.mol⁻¹

Solide blanc

Une solution du composé 7 (126 mg ; 0,20 mmol) et de 2,6-lutidine (162 µl ; 1,40 mmol ; 7 éq.) dans un mélange de CH₂Cl₂ (3 ml) et de DMF (1,2 ml) anhydres sous atmosphère d'argon est refroidie à 0°C. Le triflate de triisopropylsilyle (132 µl ; 0,49 mmol ; 2,5 éq.) est ensuite ajouté au goutte à goutte. La solution est agitée pendant 3h à 0°C. Le suivi sur CCM montre que la réaction n'est pas finie. De la 2,6-lutidine (162 µl ; 1,40 mmol ; 7 éq.) et du triflate de triisopropylsilyle (132 µl ; 0,49 mmol ; 2,5 éq.) sont rajoutés et le mélange est agité une nuit. La réaction est stoppée avec de l'eau, une solution saturée en NaHCO₃ est ensuite ajoutée. Le produit est extrait trois fois avec du CH₂Cl₂, la phase organique est lavée à l'aide d'une solution saturée en NaCl, séchée sur Na₂SO₄, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Le produit brut ainsi obtenu est purifié par flash chromatographie sur colonne de silice (CH₂Cl₂ / acétone : 9 / 1) pour conduire à un solide blanc (58 mg ; rdt : 30 %).

CCM : CH₂Cl₂ / acétone 9 / 1 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce IV

R_f = 0,1

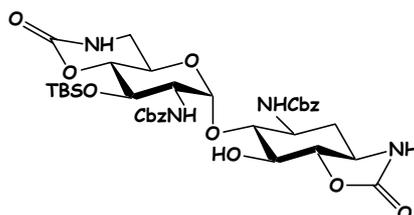
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) :

1.04 (m, 36H, CH₃ TIPS), 1.44 (m, 4H, ((CH₃)₂CH)₃Si, 2ax), 1.55 (ddd, 1H, 2éq), 2.57 (m, 1H), 2.90 (m, 1H), 3.16 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.56 (m, 3H), 3.70-4 (m, 4H), 4.86-5.10 (m, 4H, CH₂ Cbz), 5.16 (patate, 1H, 1'), 7.30-7.43 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : attribution en prenant le même ordre que pour le composé 15

12.0 (((CH₃)₂CH)₃Si), 12.8 (((CH₃)₂CH)₃Si), 18.3 (((CH₃)₂CH)₃Si), 33.7 (2), 43.5 (6'), 52.3 (3), 56.3 (1), 58.4 (2'), 62.0 (5'), 67.1 (2 X CH₂ Cbz), 70.3 (3'), 73.6 (5), 77.5 (4'), 79.6 (4), 83.3 (6), 101.1 (1'), 128.4 (Ar C^{III}), 128.7 (Ar C^{III}), 128.9 (Ar C^{III}), 136.1 (Ar C^{IV}), 136.6 (Ar C^{IV}), 152.8 (C=O carbamate cycle à 6), 155.7 (C=O Cbz), 156.6 (C=O Cbz), 161.8 (C=O carbamate cycle à 5).

Composé 14



C₃₆H₄₈N₄O₁₂Si : 756,87 g.mol⁻¹
Solide blanc

La solution du composé 7 (559 mg ; 0,87 mmol) et d'imidazole (355 mg ; 5,22 mmol ; 6 éq.) dans le DMF (6,1 ml) est agitée 2h en présence de tamis moléculaire 3 Å. Le chlorure de tertbutyldiméthylsilyle (524 mg ; 3,48 mmol ; 4 éq.) est ensuite ajouté lentement, puis le mélange réactionnel est laissé sous agitation une nuit à TA sous argon. La réaction est stoppée avec de l'eau, une solution saturée en NH₄Cl est ensuite ajoutée. Le produit est extrait trois fois avec du CH₂Cl₂, la phase organique est lavée à l'aide d'une solution saturée en NaCl, séchée sur Na₂SO₄, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Le produit brut ainsi obtenu est purifié par flash chromatographie sur colonne de silice (CH₂Cl₂ / acétone : 7 / 3) pour conduire à un solide blanc (359 mg ; rdt : 54 %).

CCM : CH₂Cl₂ / acétone 7 / 3 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
Rf = 0,19

Point de fusion : Exp. : 158 < T fus. < 164°C

Pouvoir rotatoire :

Exp. : $[\alpha]_{546}^{20} + 11^\circ$ (c 1,0 ; MeOH)

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) :

0.13 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.20 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.87 (s, 9H, tBu TBS), 1.56 (ddd, 1H, J_{2ax-2éq} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 12.0 Hz, 2ax), 2.15 (ddd, 1H, J_{2éq-2ax} = 11.3 Hz J_{2éq-1} = J_{2éq-3} = 3.5 Hz, 2éq), 3.17 (dd, 1H, J_{6'ax-6'éq} = J_{6'ax-5'} = 10.4 Hz, 6'ax), 3.45 (m, 2H, 6'éq et 1), 3.57 (dd, 1H, J₄₋₅ = 7.90 Hz. J₄₋₃ = 9.9 Hz, 4), 3.72 (m, 2H, 6 et 3), 3.76 (dd, 1H, J_{2'-3'} = 9.7 Hz. J_{2'-1'} = 3.6 Hz, 2'), 3.86 (dd, 1H, J_{3'-2'} = J_{3'-4'} = 8.5 Hz, 3'), 3.91 (dd, 1H, J_{4'-3'} = J_{4'-5'} = 8.5 Hz, 4'), 4.02 (ddd, 1H, J_{5'-4'} = J_{5'-6'ax} = 9.9 Hz. J_{5'-6'éq} = 5.9 Hz, 5'), 4.06 (dd, 1H, J₅₋₆ = 10.3 Hz. J₅₋₄ = 7.9 Hz, 5), 4.82 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂ Ar1), 5.03 (d, 1H, J = 12.2 Hz, CH₂ Ar2), 5.10 (d, 1H, J = 12.2 Hz, CH₂ Ar2), 5.32 (d, 1H, J = 12.2 Hz, CH₂ Ar1), 5.57 (d, 1H, J_{1'-2'} = 3.6 Hz, 1'), 7.28-7.42 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) :

-4.6 (CH₃ TBS), -3.8 (CH₃ TBS), 19.0 (tBu IV), 26.4 (tBu TBS), 33.4 (2), 44.2 (6'), 52.9 (3), 55.2 (1), 57.3 (2'), 62.7 (5'), 67.9 (CH₂-Ar), 71.8 (3'), 74.7 (5), 81.0 (4'), 83.2 (4), 85.6 (6), 100.4 (1'), 129.0 (Ar C^{III}), 129.1 (Ar C^{III}), 129.3 (Ar C^{III}), 129.5 (Ar C^{III}), 129.5 (Ar C^{III}), 138.0 (Ar C^{IV}), 138.0 (Ar C^{IV}), 155.4 (C=O carbamate cycle à 6), 158.4 (C=O Cbz), 158.7 (C=O Cbz), 163.0 (C=O carbamate cycle à 5).

IR (film KBr) cm⁻¹ :

3100-3600 cm^{-1} O-H ; N-H ν
 2930 cm^{-1} C-H ν
 1783 cm^{-1} C=O ν (cycle à 5) (amide I)
 1706 cm^{-1} C=O ν (Cbz) et C=O ν (cycle à 6) (une seule bande large) (amide I)
 1528 cm^{-1} N-H δ et N-C=O ν (amide II)
 1458 cm^{-1}
 1404 cm^{-1} C-H ; O-H δ
 1219 cm^{-1}
 1080 cm^{-1}

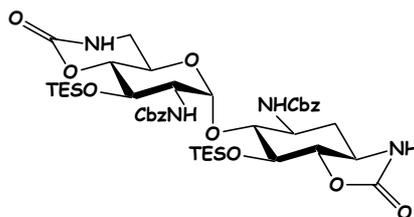
Spectre de masse :

HRMS ES⁺ : [M + Na⁺] 779.2950 ppm ; simulation pour C₃₆H₄₈N₄NaO₁₂Si 779.2930

Analyse élémentaire : molécule monohydratée

% calculé	C : 55.80 ; H : 6.50 ; N : 7.23 ; O : 26.84 ; Si : 3.62
% expérimental	C : 55.58 ; H : 6.88 ; N : 7.49

Composé 15



C₄₂H₆₂N₄O₁₂Si₂ : 871,13 g.mol⁻¹
 Solide blanc

A une solution du composé 7 (800 mg ; 1,24 mmol) dans du DMF anhydre (9 ml) sous argon, sont ajoutés de l'Imidazole (785 mg ; 11,53 mmol ; 9,3 éq.), du DMAP (91 mg ; 0,74 mmol ; 0,6 éq.), et du tamis moléculaire 3 Å. Après 2h d'agitation, NEt₃ (172 μ l ; 1,24 mmol ; 1 éq.) est ajouté suivi d'une addition au goutte à goutte du chlorure de triéthylsilyle (1,29 ml ; 7,69 mmol ; 6,2 éq.). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 3h45. La réaction est stoppée avec de l'eau. Une solution saturée en NH₄Cl est ensuite ajoutée. Après trois extractions au CH₂Cl₂, la phase organique est lavée à l'aide d'une solution saturée en NaCl puis séchée sur Na₂SO₄. La phase organique est filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le produit brut obtenu est chromatographié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / acétone : 8 / 2 puis 7 / 3) pour conduire à un solide blanc (787 mg ; rdt : 73 %).

CCM : CH₂Cl₂ / acétone 8 / 2 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce IV
 R_f = 0,19

Point de fusion : Exp. : 138 < T fus. < 140°C

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) :

0.69 (m, 12 H, SiCH₂), 0.94 (t, 9H, J = 7.9 Hz, SiCH₂CH₃), 0.98 (t, 9H, J = 7.9 Hz, SiCH₂CH₃), 1.56 (ddd, 1H, J_{2ax-2éq} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 12.0 Hz, 2ax), 2.12 (ddd, 1H, J_{2éq-2ax} = 11.9 Hz, J_{2éq-1} = J_{2éq-3} = 3.70 Hz, 2éq), 3.20 (dd, 1H, J_{6'-5'} = J_{6'-6'} = 10.3 Hz, 6'ax), 3.46 (ddd, 1H, J_{1-2ax} = 15.0 Hz, J₁₋₆ = 11.7 Hz, J_{1-2éq} = 3.39 Hz, 1), 3.49 (dd, 1H, J_{6'-5'} = J_{6'-6'} = 10.4 Hz, 6'éq), 3.63 (dd, 1H, J₄₋₃ = 10.0 Hz, J₄₋₅ = 7.4 Hz, 4), 3.72 (dd, 1H, J₆₋₁ = 11.5 Hz, J₆₋₅ = 10.2 Hz, 6), 3.76 (ddd, 1H, 3), 3.80 (dd, 1H, J_{2'-3'} = 9.7 Hz, J_{2'-1'} = 3.2 Hz, 2'), 3.85 (dd, 1H, J_{3'-2'} = J_{3'-4'} = 9.6 Hz, 3'), 3.90 (dd, 1H, J_{4'-5'} = J_{4'-3'} = 8.5 Hz, 4'), 4.05 (ddd, 1H, J_{5'-6'ax} = 15.9 Hz, J_{5'-4'} = 9.9 Hz, J_{5'-6'éq} = 6.1 Hz, 5'), 4.24 (dd, 1H, J₅₋₆ = 10.1 Hz, J₅₋₄ = 7.4 Hz, 5), 4.78 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂-Ar (Na)), 4.99 (d, 1H, J = 12.0 Hz, CH₂-Ar (Nb)), 5.12 (d, 1H, J = 12.0 Hz, CH₂-Ar (Nb)), 5.38 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂-Ar (Na)), 5.68 (d, 1H, J_{1'-2'} = 3.7 Hz, 1'), 7.34 (m, 10 H, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) :

5.9 (CH₂), 6.1 (CH₂), 7.3 (CH₃), 33.3 (2), 44.2 (6'), 52.5 (3), 55.2 (1), 56.9 (2'), 62.5 (5'), 68.1 (CH₂-Ar), 68.1 (CH₂-Ar), 72.0 (3'), 76.9 (5), 80.9 (4'), 81.3 (4), 85.5 (6), 98.9 (1'), 129.2 ; 129.5 ; 129.6 (Ar C^{III}), 137.9 (Ar C^{IV}), 155.4 (C=O carbamate cycle à 6), 158.5 (C=O Cbz), 158.6 (C=O carbamate cycle à 5).

IR (film KBr) cm⁻¹ :

3100-3600 cm⁻¹ O-H ; N-H v

2955 cm⁻¹ C-H v

1760 cm⁻¹ C=O v (cycle à 5) (amide I)

1713 cm⁻¹ C=O v (cycle à 6) ; C=O v (Cbz) (une seule bande large) (amide I)

1539 cm⁻¹ NH δ et N-C=O v (amide II)

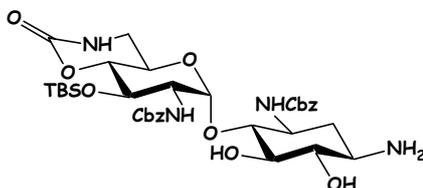
1456 cm⁻¹

1290 cm⁻¹

Analyse élémentaire :

% calculé	C : 57.91 ; H : 7.17 ; N : 6.43 ; O : 22.04 ; Si : 6.45
% expérimental	C : 57.67 ; H : 7.33 ; N : 6.05

Composé 16



C₃₅H₅₀N₄O₁₁Si : 730,88 g.mol⁻¹

Solide blanc

A une solution du composé 14 (660 mg ; 0,87 mmol) dans un mélange de dioxane (33 ml) et d'eau (17,4 ml), Ba(OH)₂ · 8H₂O (275 mg ; 0,87 mmol ; 1 éq.) est ajouté. Le mélange réactionnel est chauffé à 50 °C pendant 5h30. Le mélange est refroidi à TA, puis du CO₂ est mis à buller pendant 50 min. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Un azéotrope avec du toluène permet de retirer l'eau restante, puis du chloroforme est ajouté. Les sels de baryum sont filtrés sur célite, rincés au chloroforme, puis la phase organique est évaporée

sous pression réduite pour conduire au produit brut. Ce dernier est alors purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / acétone : 8 / 2, puis CH₂Cl₂ / MeOH : 7 / 3) pour conduire à un solide blanc (438 mg ; rdt : 69 %).

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH 7 / 3 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
Rf = 0,16

Point de fusion : Exp. : 153 < T fus. < 155°C

Pouvoir rotatoire :

Exp. : $[\alpha]_{546}^{20} + 5^\circ$ (c 1,0 ; MeOH)

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) :

0.13 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.20 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.88 (s, 9H, tBu TBS), 1.34 (ddd, 1H, J_{2ax-2éq} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 12.5 Hz, 2ax), 1.94 (ddd, 1H, J_{2éq-2ax} = 13 Hz J_{2éq-1} = J_{2éq-3} = 4 Hz, 2éq), 2.67 (ddd, 1H, J₁₋₆ = J_{1-2ax} = 9.5 Hz J_{1-2éq} = 4.0 Hz 1), 2.93 (dd, 1H, J₆₋₁ = J₆₋₅ = 9.5 Hz, 6), 3.15 (dd, 1H, J_{6'ax-6'éq} = J_{6'ax-5} = 10.5 Hz, 6'ax), 3.43 (dd, 1H, J₄₋₅ = J₄₋₃ = 9.0 Hz, 4), 3.47 (m, 2H, 6'éq et 5), 3.61 (m, 1H, 3), 3.80 (m, 1H, 2'), 3.88 (m, 2H, 3' et 4'), 4.06 (m, 1H, 5'), 4.84 (d, 1H, J = 15.0 Hz, CH₂ Ar1), 5.02 (d, 1H, J = 10.0 Hz, CH₂ Ar2), 5.10 (d, 1H, J = 10.0 Hz, CH₂ Ar2), 5.31 (d, 1H, J = 15.0 Hz, CH₂ Ar1), 5.57 (d, 1H, J_{1'2'} = 3.8 Hz, 1'), 7.25-7.41 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) :

-4.6 (CH₃ TBS), -3.8 (CH₃ TBS), 19.0 (tBu IV), 26.4 (Me tBu), 36.0 (2), 44.2 (6'), 51.5 (3), 52.1 (1), 57.3 (2'), 62.6 (5'), 67.7 (CH₂-Ar), 67.8 (CH₂-Ar), 71.9 (3'), 78.3 (5), 79.0 (6), 81.1 (4'), 82.1 (4), 100.2 (1'), 129.0 (Ar C^{III}), 129.2 (Ar C^{III}), 129.5 (Ar C^{III}), 129.5 (Ar C^{III}), 138.0 (Ar C^{IV}), 138.1 (Ar C^{IV}), 155.5 (C=O carbamate cycle à 6), 158.5 (C=O Cbz).

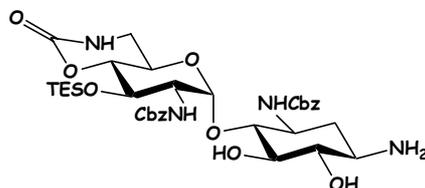
IR (film KBr) cm⁻¹ :

3100-3600 cm⁻¹ O-H ; N-H v
2928 cm⁻¹ C-H v
1720 cm⁻¹ C=O v (cycle à 6) (amide I)
1698 cm⁻¹ C=O v (Cbz) (amide I)
1525 cm⁻¹ N-H δ et N-C=O v (amide II)
1455 cm⁻¹
1408 cm⁻¹ C-H ; O-H δ
1260 cm⁻¹
1042 cm⁻¹

Spectre de masse :

HRMS ES+ : [M + H⁺] 731.3316 ppm ; simulation pour C₃₅H₅₁N₄O₁₁Si 731.3318

Composé 17



$C_{35}H_{50}N_4O_{11}Si$: 730,88 g.mol⁻¹
Solide blanc

A une solution du composé 15 (787 mg ; 0.90 mmol) dans un mélange de dioxane (34 ml) et d'eau (18 ml), Ba(OH)₂.8H₂O (285 mg ; 0.90 mmol ; 1 éq.) est ajouté. Le mélange réactionnel est chauffé à 50 °C pendant 5h. Le mélange est refroidi à TA, puis du CO₂ est mis à buller pendant 50 min. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Un azéotrope avec du toluène permet de retirer l'eau restante, puis du chloroforme est ajouté. Les sels de baryum sont filtrés sur célite, rincés au chloroforme, puis la phase organique est évaporée sous pression réduite pour conduire au produit brut. Ce dernier est alors purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / acétone : 8 / 2, puis CH₂Cl₂ / MeOH : 7 / 3) pour donner un solide blanc (131 mg ; rdt : 20 %).

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH : 6 / 4 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
Rf = 0,16

Point de fusion : Exp. : 153 < T fus. < 155°C

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) :

0.63-0.72 (m, 6 H, SiCH₂), 0.91-0.98 (m, 9H, SiCH₂CH₃), 1.36 (ddd, 1H, J_{2ax-2éq} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 12.6 Hz, 2ax), 1.94 (ddd, 1H, J_{2éq-2ax} = 13.0 Hz, 2éq), 2.68 (ddd, 1H), 3.02 (dd, 1H, J = 9.0 Hz), 3.12 (dd, 1H, J = 10.3 Hz), 3.43-3.47 (m, 3H), 3.60 (m, 1H), 3.75-3.90 (m, 3H), 4.20 (m, 1H), 5.01 (d, 1H, J = 12.5 Hz, CH₂-Ar (Nb)), 5.13 (d, 1H, J = 12.2 Hz, CH₂-Ar (Nb)), 5.29 (d, 1H, J = 12.5 Hz, CH₂-Ar (Na)), 5.45 (d, 1H, J_{1'·2'} = 3.3 Hz, 1'), 7.25-7.40 (m, 10 H, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) :

5.92 (CH₂ TES), 7.25 (CH₃ TES), 36.1 (2), 44.2 (6'), 51.5 (3), 52.1 (1), 57.4 (2'), 62.6 (5'), 67.7 (CH₂-Ar), 67.8 (CH₂-Ar), 71.9 (3'), 78.3 (5), 78.8 (6), 81.0 (4'), 82.5 (4), 100.4 (1'), 129.0 (Ar C^{III}), 129.1 (Ar C^{III}), 129.1 (Ar C^{III}), 129.4 (Ar C^{III}), 129.5 (Ar C^{III}), 138.0 (Ar C^{IV}), 138.1 (Ar C^{IV}), 155.5 (C=O carbamate cycle à 6), 158.5 (C=O Cbz), 158.7 (C=O Cbz).

IR (film KBr) cm⁻¹ :

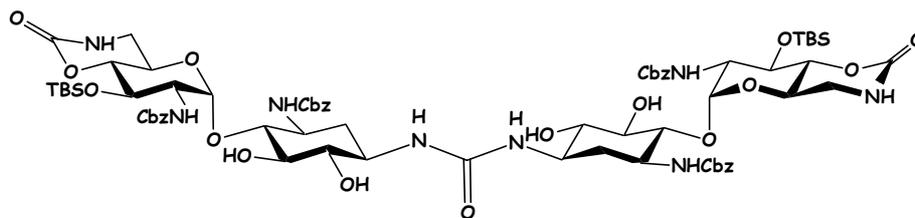
3100-3600 cm⁻¹ O-H ; N-H v
2943 cm⁻¹ C-H v
1710 cm⁻¹ C=O v (cycle à 6) (amide I)
1693 cm⁻¹ C=O v (Cbz) (amide I)
1540 cm⁻¹ N-H δ et N-C=O v (amide II)
1455 cm⁻¹

1411 cm^{-1} C-H ; O-H δ
 1281 cm^{-1}
 1044 cm^{-1}

Spectre de masse :

MS FAB+ : $[\text{M} + \text{H}^+]$ 731.2 ppm ; simulation pour $\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{Si}$ 731.3

Composé 18



$\text{C}_{71}\text{H}_{98}\text{N}_8\text{O}_{23}\text{Si}_2$: 1487,75 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Solide blanc

Sous produit obtenu lors de réaction de décarboxylation du composé 14 par $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

CCM : CH_2Cl_2 / MeOH 8 / 2 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
 Rf = 0,58

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) :

0.11 (s, 3H, CH_3 TBS), 0.19 (s, 3H, CH_3 TBS), 0.86 (s, 9H, tBu TBS), 1.39 (ddd, 1H, $J_{2\text{ax}-2\text{éq}} = J_{2\text{ax}-1} = J_{2\text{ax}-3} = 12.4$ Hz, 2ax), 2.00 (ddd, 1H, 2éq), 3.12 (dd, 2H, $J = 10.1$ Hz, 6'ax, 6), 3.40-3.55 (m, 4H, 6'éq, 5, 4 et 1), 3.59 (m, 1H, 1), 3.78 (m, 1H, 2'), 3.87 (m, 2H, 3' et 4'), 4.04 (m, 1H, 5'), 5.01 (d, 1H, $J = 12.4$ Hz, CH_2 (Cbz en N2')), 5.04 (d, 1H, $J = 12.4$ Hz, CH_2 (Cbz en N2')), 5.28 (d, 1H, $J = 12.4$ Hz, CH_2 (Cbz en N3)), 5.46 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 3.5$ Hz, 1'), 7.25-7.32 (m, 10H, Ar).

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) :

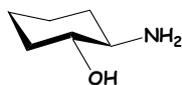
-4.6 (CH_3 TBS), -3.8 (CH_3 TBS), 19.1 (tBu IV), 26.1 (tBu TBS), 35.8 (2), 44.2 (6'), 51.4 (3), 52.0 (1), 57.3 (2'), 62.6 (5'), 67.7 (CH_2 -Ar), 67.8 (CH_2 -Ar), 71.8 (3'), 77.2 (6), 78.7 (5), 81.1 (4'), 81.8 (4), 100.2 (1'), 129.1 (Ar C^{III}), 129.2 (Ar C^{III}), 129.4 (Ar C^{III}), 129.5 (Ar C^{III}), 138.0 (Ar C^{IV}), 138.1 (Ar C^{IV}), 155.5 (C=O carbamate cycle à 6), 158.5 (C=O Cbz en N3), 158.7 (C=O Cbz en N2'), 161.0 (C=O urée).

Spectre de masse :

MS ES+ : $[\text{M} + \text{Na}^+]$ 1509.585 ppm ; simulation pour $\text{C}_{71}\text{H}_{98}\text{N}_8\text{O}_{23}\text{Si}_2\text{Na}$ 1509.618

MS ES+ : $[\text{M} + \text{H}^+]$ 1487.603 ppm ; simulation pour $\text{C}_{71}\text{H}_{99}\text{N}_8\text{O}_{23}\text{Si}_2$ 1487.636

MS ES+ : $[(\text{M} + 2\text{Na}^+)/2]$ 766.287 ppm ; simulation pour $\text{C}_{71}\text{H}_{98}\text{N}_8\text{O}_{23}\text{Si}_2\text{Na}_2$ 766.303

trans-aminocyclohexanol libre

$C_6H_{13}NO$: 115,17 g.mol⁻¹
Solide blanc

Le *trans*-aminocyclohexanol chlorhydraté (2 g ; 13 mmol) est solubilisé dans du méthanol (50 mL). La résine A26(HO⁻) (6,33 g ; 2 éq.) est ajoutée et le mélange est agité doucement pendant 30 min. La résine est retirée par filtration. Elle est rincée au méthanol. Le filtrat est évaporé et séché 24 h sous vide. Le séchage est ensuite poursuivi en présence de P₂O₅. Le solide obtenu est blanc (1,245 g ; rdt : 83 %).

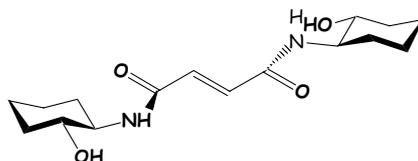
CCM : CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ : 8 / 2 / 0,1 ; révélateur : KMnO₄
Rf = 0,17

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) :

0.96-1.16 (m ; 4H ; CH₂), 1.53 (bosse ; 1H ; OH), 1.54-1.61 (m ; 2H ; CH₂), 1.67-1.73 (m ; 2H ; CH₂), 2.21-2.25 (m ; 1H ; CH-NH₂), 2.87-2.90 (m ; 1H ; CH-OH), 3.32 (bosse ; 1H ; NH), 4.51 (bosse ; 1H ; NH).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) :

1.20-1.32 (m ; 4H ; CH₂), 1.68-1.80 (m ; 2H ; CH₂), 1.86-1.99 (m ; 2H ; CH₂), 2.51-2.60 (m ; 1H ; CH-NH₂), 3.18-3.25 (m ; 1H ; CH-OH).

Composé 21 par la méthode de l'anhydride mixte

$C_{16}H_{26}N_2O_4$: 310,39 g.mol⁻¹
Solide blanc

A une solution à 0°C sous argon d'acide fumarique (100 mg ; 0,86 mmol) et de DIPEA (376 µL ; 2,16 mmol ; 2,5 éq.) dans du CH₂Cl₂ (7 ml) fraîchement distillé, est ajouté le chlorure de pivaloyle (234 µL ; 1,90 mmol ; 2,2 éq.) au goutte à goutte. Un trouble blanc apparaît puis se ressolubilise, la solution se colorant légèrement en jaune. Le mélange réactionnel est agité 10 minutes à 0°C puis 45 min à TA. La solution prend une couleur brun-rouge sombre. Elle est alors refroidie à 0°C, puis il lui est ajouté au goutte à goutte à 0°C une solution de *trans*-aminocyclohexanol (200 mg ; 0,273 mmol ; 2 éq.) séché préalablement sur

P₂O₅ et de DIPEA (752 µL ; 4,32 mmol ; 5 éq.) dans du CH₂Cl₂ (5 mL) et du DMF (1,5 mL) anhydres. La solution est agitée en laissant remonter la température pendant 3h30. La réaction est stoppée à l'aide d'un peu d'eau puis les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le solide obtenu est adsorbé sur de la silice puis purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH : 9 / 1) pour donner un solide blanc contenant le produit et de la DIPEA. Ce solide est alors repris dans un peu de chloroforme. Le solide est filtré et rincé : Il s'agit du produit pur (119 mg ; rdt : 44 %).

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH : 9 / 1 ; révélateur : KMnO₄
R_f = 0,17

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) :

1.03-1.30 (m, 4H, CH₂), 1.56-1.67 (m, 2H, CH₂), 1.72-1.90 (m, 2H, CH₂), 3.21-3.27 (m, 1H, CH-NH), 3.44-3.53 (m, 1H, CH-OH) , 4.60 (d, 1H, J = 5.1 Hz, OH), 6.84 (s, 1H, CH vinylique), 8.20 (d, 1H, J = 8.0 Hz, NH).

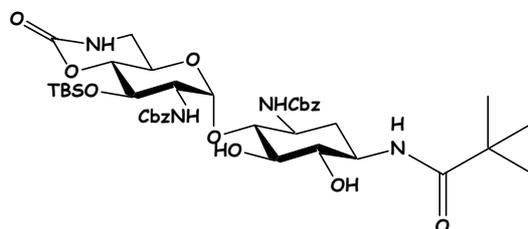
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO) :

24.1 (CH₂-CH₂-CH₂), 24.5 (CH₂-CH₂-CH₂), 31.3 (CH₂-CH-NH), 34.5 (CH₂-CH-OH), 54.8 (CH-NH), 71.5 (CH-OH), 133.3 (C vinylique), 164.0 (C=O).

Spectre de masse :

MS FAB+ : [M + H⁺] 311.3 ppm ; simulation pour C₁₆H₂₇N₂O₄ 311.2

Composé 22



C₄₀H₅₈N₄O₁₂Si : 814,99 g.mol⁻¹
Solide blanc

A une solution à 0°C sous argon d'acide malonique (14,2 mg ; 0,137 mmol) et de DIPEA (59 µL ; 0,342 mmol ; 2,5 éq.) dans du CH₂Cl₂ (1 ml) fraîchement distillé est ajouté le chlorure de pivaloyle (37 µL ; 0,301 mmol ; 2,2 éq.) au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité 10 minutes à 0°C puis 50 min à TA. La solution prend une couleur jaune foncé. Elle est alors refroidie à 0°C, puis ajoutée au goutte à goutte à 0°C à la solution du composé 16 (200 mg ; 0,273 mmol ; 2 éq.) séché préalablement sur P₂O₅ et de DIPEA (118 µL ; 5 éq.) dans du CH₂Cl₂ (6 mL) anhydre. Le ballon qui contenait l'anhydride mixte est alors rincé avec 1,5 mL de CH₂Cl₂ qui sont rajoutés au mélange réactionnel. L'agitation est poursuivie pendant 6h en laissant remonter la température. La réaction est stoppée à l'aide d'acétone technique et les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH : 95 / 5, 92 / 8, 8 / 2 puis 6 / 4) pour conduire au produit (129 mg ; rdt : 56 %). Du réactif (composé 16), qui n'a pas réagit est également récupéré (43 mg ; 21 %).

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH : 8 / 2 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
Rf = 0,72

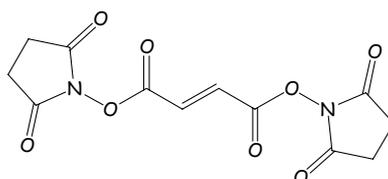
RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) : attribution par analogie

0.12 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.20 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.87 (s, 9H, tBu TBS), 1.18 (s, 9H, tBu), 1.45 (ddd, 1H, J_{2ax-2éq} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 12.5 Hz, 2ax), 1.94 (ddd, 1H, 2éq), 3.11 (dd, 1H, J_{6'ax-6'éq} = J_{6'ax-5'} = 10.3 Hz, 6'ax), 3.31 (dd, 1H), 3.38-3.95 (m, 8H), 4.06 (m, 1H, 5'), 4.82 (d, 1H, J = 12.4 Hz, CH₂ Ar1), 5.02 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂ Ar2), 5.10 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂ Ar2), 5.29 (d, 1H, J = 12.4 Hz, CH₂ Ar1), 5.47 (d, 1H, J_{1'-2'} = 3.3 Hz, 1'), 7.21 (d, 1H, J = 7.7 Hz, NH), 7.27-7.39 (m, 11H, Ar + NH).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) :

-4.6 (CH₃ TBS), -3.8 (CH₃ TBS), 19.0 (tBu IV), 26.4 (tBu TBS), 27.7 (tBu), 34.7 (2), 39.7 (C^{IV} tBu), 44.2 (6'), 51.4, 51.5, 57.3, 62.5, 67.6 et 67.8 (CH₂-Ar), 71.8, 75.9, 78.7.0, 81.0, 82.1, 100.3 (1'), 128.9 (Ar C^{III}), 129.0 (Ar C^{III}), 129.2 (Ar C^{III}), 129.4 (Ar C^{III}), 129.5 (Ar C^{III}), 137.9 (Ar C^{IV}), 138.1 (Ar C^{IV}), 155.4 (C=O carbamate cycle à 6), 158.4 (C=O Cbz), 158.7 (C=O Cbz), 181.6 (C=O en N1).

Composé 23 obtenu par couplage peptidique



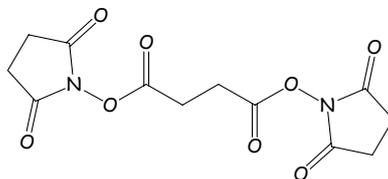
C₁₂H₁₀N₂O₈ : 310,22 g. mol⁻¹
Solide blanc

L'acide fumarique (491 mg ; 4,23 mmol) et la N-hydroxysuccinimide (1,071 g ; 9,31 mmol ; 2,2 éq.) sont dissouts dans du DMF (2 mL). La solution est refroidie à 4°C, puis une solution de DCC (1,745 g ; 8,46 mmol ; 2 éq.) dans le DMF (3,4 mL) est ajoutée au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Un précipité blanc est apparu. Le solvant est évaporé. Du chloroforme est ajouté. Le solide est filtré et rincé au chloroforme. Le liquide contient de la DCU, du DMF, du NHS des sous produits et une fraction minimale de produit souhaité. Le solide contient un mélange 52/48 de DCU et de produit. Le solide est placé en suspension dans du DME (50 mL) et est agité pendant 2 h sans amélioration de la pureté du produit (3,284 g ; rdt calculé quantitatif)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) : (Produit contaminé à 50 % par la DCU)

0.95-1.77 (m ; 11 H ; cyclohexyl de la DCU), 2.87 (s ; 4 H ; CH₂), 5.59 (d ; 1H ; NH de la DCU), 7.48 (s ; 1 H ; CH).

Composé 24 obtenu par couplage peptidique



$C_{12}H_{12}N_2O_8$: 312,23 g.mol⁻¹

Solide blanc

L'acide succinique (500 mg ; 4,23 mmol) et la N-hydroxysuccinimide (1,071 g ; 9,31 mmol ; 2,2 éq.) sont dissouts dans du DMF (1,4 mL). La solution est refroidie à 4°C, puis une solution de DCC (1,745 g ; 8,46 mmol ; 2 éq.) dans le DMF (3,4 mL) est ajoutée au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Un précipité blanc a quasiment pris en masse. Il est filtré et rincé à l'aide de 4,5 mL de DMF. Ce solide contient un mélange de DCU et de produit. Le filtrat est évaporé puis le reste de DCU et de produit est fait précipité à l'aide de chloroforme. Le solide est filtré et rincé au chloroforme. Le produit peut être purifié par extraction à l'acétonitrile. Le solide (2,587 g) est placé en suspension dans de l'acétonitrile (250 mL) et est agité pendant 2 h. Le solide restant est filtré. Il contient majoritairement de la DCU. Le filtrat est évaporé. Il contient du produit contenant 20 % en masse (32 % molaires) de DCU (610 mg ; rdt (calculé) : 34 %)

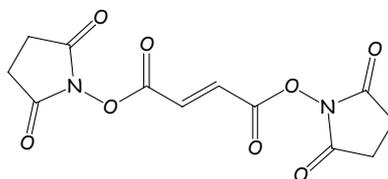
RMN ¹H (300 MHz, DMSO) :

0.95-1.80 (m ; 11 H ; cyclohexyl de la DCU), 2.81 (s ; 4 H ; CH₂), 3.07 (s ; 2H ; CH₂), 5.58 (d ; 1H ; NH de la DCU). (Produit contaminé par 32 % de DCU)

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO) :

25.7 (CH₂), 25.9 (CH₂), 168.2 (C=O), 170.5 (C=O).

Composé 23 par la méthode des trifluoroacétates



$C_{12}H_{10}N_2O_8$: 310,22 g.mol⁻¹

Solide brun

Le N-hydroxysuccinimide (1g ; 8,69 mmol ; 2éq) et l'acide fumarique (504 mg ; 4,34 mmol) préalablement bien séchés sont placés en suspension dans la pyridine (1,43 mL ; 17,38 mmol ; 4éq) et le chlorobenzène (5,4 mL) distillés fraîchement. Le mélange est refroidi à 0°C et l'anhydride trifluoroacétique (1,23 mL ; 8,69 mmol ; 2éq) est ajouté au goutte à goutte.

L'agitation est maintenue 10 min à 0°C puis 2h à TA. Le mélange est laissé une nuit au frigo puis le solide est filtré, rincé abondamment au EtOH. Le solide est alors recristallisé dans l'acétonitrile et séché sous pression réduite pour obtenir le produit souhaité (889 mg ; rdt : 66%).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) :

2.87 (s ; 4 H ; CH₂), 7.48 (s ; 1 H ; CH).

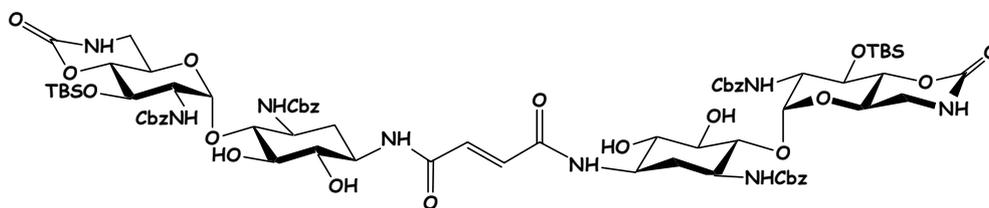
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO) :

26.0 (CH₂), 132.3 (CH=CH), 160.4 (O-CO-CH=), 170.3 (CH₂-CO-N).

Spectre de masse :

HRMS ES⁺ : [M + Na⁺] 333.0319 ppm ; simulation pour C₇₄H₁₀₁N₈NaO₂₄Si₂ 333.0329

Composé 25 par la méthode de l'anhydride mixte



C₇₄H₁₀₀N₈O₂₄Si₂ : 1541,80 g.mol⁻¹

Solide blanc

A une solution à 0°C sous argon d'acide fumarique (15,88 mg ; 0,137 mmol) et de DIPEA (59 μL ; 0,342 mmol ; 2,5 éq.) dans du CH₂Cl₂ (1,8 ml) fraîchement distillé est ajouté le chlorure de pivaloyle (37 μL ; 0,300 mmol ; 2,2 éq.) au goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité 10 minutes à 0°C puis une heure à TA. La solution prend une couleur orangée. Elle est alors refroidie à 0°C, puis ajoutée au goutte à goutte à 0°C à la solution du composé 16 (200 mg ; 0,273 mmol ; 2 éq.) séché préalablement sur P₂O₅ et de DIPEA (118 μL ; 5 éq.) dans du CH₂Cl₂ (6 mL) anhydre. Le ballon qui contenait l'anhydride mixte est alors rincé avec 1 mL de CH₂Cl₂ qui sont rajoutés au mélange réactionnel. L'agitation est poursuivie à 0°C pendant une heure puis à TA pendant 3h15. La réaction est stoppée à l'aide d'acétone technique et les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le solide obtenu est adsorbé sur de la silice puis purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH : 9 / 1 puis 8 / 2) pour conduire à un solide blanc (144 mg ; rdt : 68 %).

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH : 8 / 2 ; révélateur : KMnO₄

R_f = 0,62

Point de fusion : Exp. : T dec. 240°C

Pouvoir rotatoire :

Exp. : [α]₅₄₆²⁰ + 3° (c 1,1 ; Py)

RMN ¹H (500 MHz, pyridine-d₅) :

0.29 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.48 (s, 3H, CH₃ TBS), 1.05 (s, 9H, tBu TBS), 1.86 (ddd, 1H, J_{2ax-2éq} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 12.3 Hz, 2ax), 2.48 (m, 1H, 2éq), 3.29 (dd, 1H, J_{6'ax-6'éq} = J_{6'ax-5} = 10.1 Hz, 6'ax), 3.50 (m, 1H, 6'éq), 3.87 (m, 2H, 5 et 6), 4.08 (m, 1H, 4), 4.15 (dd, 1H, J_{4'-5'} = J_{4'-3'} = 8.7 Hz, 4'), 4.26 (m, 1H, 3), 4.40 (m, 1H, 1), 4.52 (m, 2H, 2' et 3'), 4.73 (m, 1H, 5'), 5.18 (d, 1H, J = 12.4 Hz, CH₂-Ar en 2'), 5.24 (d, 1H, J = 12.5 Hz, CH₂-Ar en 3), 5.45 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂-Ar en 2'), 5.75 (d, 1H, J = 12.7 Hz, CH₂-Ar en 3), 6.20 (large s, 1H, 1'), 7.21 (s, 1H, OH en 6), 7.33 (m, 5H, Ar), 7.50 (m, 5H, Ar), 7.56 (s, 1H, alcène), 7.67 (large s, 1H, OH en 5), 8.29 (d, 1H, J_{NH-6'} = 4.4 Hz, NH en 6'), 8.52 (d, 1H, J_{NH-3} = 9.1 Hz, NH en 3), 8.64 (d, 1H, J_{NH-2'} = 8.5 Hz, NH en 2'), 9.38 (d, 1H, J_{NH-1} = 7.8 Hz, NH en 1).

RMN ¹³C (125 MHz, pyridine-d₅) :

-4.7 (CH₃ TBS), -3.6 (CH₃ TBS), 18.6 (tBu IV), 26.2 (Me tBu), 35.8 (2), 44.0 (6'), 51.0 (1 puis 3), 57.1 (2'), 62.5 (5'), 66.5 (CH₂-Ar en N3), 66.7 (CH₂-Ar en N2'), 71.8 (3'), 76.6 (6), 78.4 (5), 80.2 (4'), 82.3 (4), 100.5 (1'), 128.1 (Ar C^{III}), 128.2 (Ar C^{III}), 128.4 (Ar C^{III}), 128.5 (Ar C^{III}), 128.8 (Ar C^{III}), 133.9 (CH alcène), 137.8 (Ar C^{IV} en N2'), 138.1 (Ar C^{IV} en N3), 153.3 (C=O carbamate cycle à 6), 156.9 (C=O Cbz), 157.6 (C=O Cbz), 165.0 (C=O bras espaceur).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO) :

-5.11 (CH₃ TBS), -4.21 (CH₃ TBS), 17.84 (tBu IV), 25.71 (CH₃ tBu), 35.00 (2), 42.54 (6'), 49.55, 49.96, 55.93, 61.43, 65.17 (CH₂-Ar), 65.52 (CH₂-Ar), 70.45, 74.01, 76.44, 82.23, 99.261', 127.67 (Ar C^{III}), 127.72 (Ar C^{III}), 128.26 (Ar C^{III}), 128.37 (Ar C^{III}), 132.77 (alcène), 136.90 (Ar C^{IV}), 136.98 (Ar C^{IV}), 151.93 (C=O carbamate cycle à 6), 155.51 (C=O Cbz), 156.10 (C=O Cbz) 163.39 (C=O bras espaceur).

IR (film KBr) cm⁻¹ :

3100-3600 cm⁻¹ O-H ; N-H v
 2950 cm⁻¹ C-H v
 1701 cm⁻¹ C=O v (cycle à 6) et C=O v (Cbz) (amide I)
 1650 cm⁻¹ C=O v (amide) et (C=C) v (amide I)
 1522 cm⁻¹ N-H δ et N-C=O v (amide II)
 1457 cm⁻¹
 1405 cm⁻¹ C-H ; O-H δ
 1259 cm⁻¹

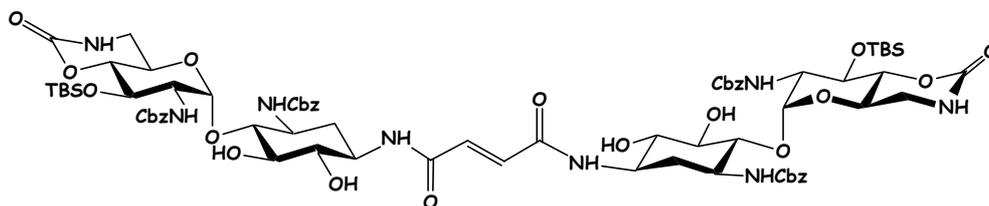
Analyse élémentaire :

% calculé	C : 57.65 ; H : 6.54 ; N : 7.27 ; O : 24.91 ; Si : 3.64
% expérimental	C : 55,39 ; H : 6,36 ; N : 6,94 ; O :

Spectre de masse :

HRMS ES+ : [M + H⁺] 1541.6456 ppm ; simulation pour C₇₄H₁₀₁N₈O₂₄Si₂ 1541.6462

Composé 25 par la méthode du diester de N-Hydroxysuccinimide

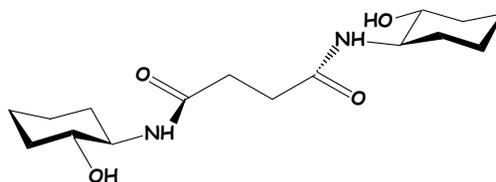

 $C_{74}H_{100}N_8O_{24}Si_2 : 1541,80 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide blanc

Le composé 25 (2,452 g ; 3,35 mmol ; 2,2 éq.) et le diester 23 (486 mg ; 1,52 mmol) sont dissouts dans du DMF anhydre (23 mL) sous atmosphère inerte. La solution est agitée pendant 3h20 à TA. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Par ajout d'eau et trituration, le produit précipite. Il est alors filtré, rincé à l'eau et séché avant d'être adsorbé sur de la silice puis purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH : 9 / 1 puis 6 / 4) pour conduire à un solide blanc (2,147 g ; rdt : 92 %).

Les analyses sont identiques à celles du produit obtenu par la méthode de l'anhydride mixte.

Composé 27


 $C_{16}H_{28}N_2O_4 : 312,40 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide blanc

Le *trans*-aminocyclohexanol (200 mg ; 1,73 mmol ; 3 éq.) est placé en suspension dans l'acétonitrile (9 mL), puis une solution du diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide succinique (composé 24) (180 mg ; 0,58 mmol) dans de l'acétonitrile (15 mL) et d'un peu de DMF (1,5 mL) est ajoutée au goutte à goutte. Le mélange est agité à température ambiante pendant 91 h. Le solide est filtré (108 mg ; *trans*-aminocyclohexanol restant) et le filtrat est évaporé puis chromatographié sur colonne de gel de silice (CH_3CN puis MeOH pour décrocher le produit) afin d'obtenir le produit souhaité (102 mg ; rdt : 56 %).

CCM : CH_2Cl_2 / MeOH : 9 / 1 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
Rf = 0,18

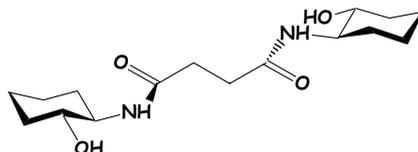
RMN 1H (300 MHz, DMSO) :

0.90-1.24 (m, 4H, CH_2), 1.56-1.60 (m, 2H, CH_2), 1.72-1.81 (m, 2H, CH_2), 2.31 (s, 2H, CH_2 -CO), 3.21-3.24 (m, 1H, CH -NH), 3.33-3.40 (m, 1H, CH -OH) , 4.29-4.90 (bosse, 1H, OH), 7.67 (dfd, 1H, J = 7.7 Hz, J = 2.7 Hz, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO) :

23.8 (CH₂-CH₂-CH₂), 24.2 (CH₂-CH₂-CH₂), 30.9 (CH₂-CH-NH ou CH₂-CO), 31.4 (CH₂-CH-NH ou CH₂-CO), 33.9 (CH₂-CH-OH), 54.3 (CH-NH), 71.4 (CH-OH), 171.6 (C=O).

Composé 27 par hydrogénation



C₁₆H₂₈N₂O₄ : 312,40 g.mol⁻¹

Solide blanc

Le composé 21 a été solubilisé dans un mélange de dioxane (3 mL), d'eau (5mL) et d'acide acétique (1 mL). Il a fallu ajouter du THF (3 mL) pour achever la solubilisation. La solution a été dégazée puis placée sous atmosphère d'hydrogène six fois sans agiter. Le Pd /C a été introduit rapidement, puis le mélange a été placé sous agitation forte pendant 22h. Le mélange a été filtré sur célite et rincé au méthanol. Après évaporation du filtrat, le produit a été chromatographié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH : 9 / 1) pour conduire au produit pur (37 mg ; rdt : 75 %).

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH : 9 / 1 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
R_f = 0,18

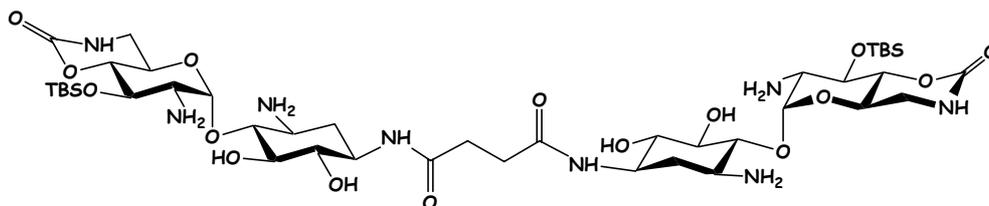
RMN ¹H (300 MHz, DMSO) :

0.90-1.24 (m, 4H, CH₂), 1.56-1.60 (m, 2H, CH₂), 1.72-1.81 (m, 2H, CH₂), 2.31 (s, 2H, CH₂-CO), 3.21-3.24 (m, 1H, CH-NH), 3.33-3.40 (m, 1H, CH-OH) , 4.29-4.90 (bosse, 1H, OH), 7.67 (d, 1H, J = 7.6 Hz, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO) :

24.2 (CH₂-CH₂-CH₂), 24.6 (CH₂-CH₂-CH₂), 31.4 (CH₂-CH-NH ou CH₂-CO), 31.8 (CH₂-CH-NH ou CH₂-CO), 34.3 (CH₂-CH-OH), 54.7 (CH-NH), 71.8 (CH-OH), 171.9 (C=O).

Composé 28



C₄₂H₇₈N₈O₁₆Si₂ : 1007,28 g.mol⁻¹

Solide blanc

Le composé 25 (300 mg ; 0,194 mmol) est placé dans un bicol à -78°C surmonté d'un réfrigérant à -78°C . De l'ammoniac gazeux est condensé (~ 40 mL), puis le sodium (210 mg ; 0,14 mmol ; 47 éq.) est ajouté par portions jusqu'à ce que la solution couleur bleu-nuit persiste. La solution est agitée à -78°C pendant 2h30, puis elle est neutralisée très lentement à l'aide d'acide acétique glacial (0,896 mL ; 15,52 mmol ; 80 éq.) sous bonne agitation jusqu'à disparition de la coloration bleue. L'ammoniac est ensuite évaporé en laissant remonter la température lentement. Le solide obtenu est adsorbé sur un peu de silice afin d'être purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (dioxane / MeOH / NH_3 : 5 / 5 / 0,5 puis 3 / 7 / 0,5). Un solide blanc est recueilli (142 mg ; rdt : 73 %).

CCM : dioxane / MeOH / NH_3 : 5 / 5 / 0,5 ; révélateur : ninhydrine
Rf = 0,19

Point de fusion : Exp. : T dec. 175°C

Pouvoir rotatoire :

Exp. : $[\alpha]_{589}^{20} + 8,7^{\circ}$ (c = 0,97 ; MeOH)

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) :

0.20 (s, 3H, CH_3 TBS), 0.24 (s, 3H, CH_3 TBS), 0.95 (s, 9H, tBu TBS), 1.26 (ddd, 1H, $J_{2\text{ax}-2\text{éq}} = J_{2\text{ax}-1} = J_{2\text{ax}-3} = 20$ Hz, 2ax), 2.01 (ddd, 1H, 2éq), 2.50 (m, 2H, CH_2 bras), 2.85 (m, 2H, 2' et 3'), 3.18 (dd, 1H, 6'ax), 3.21 (dd, 1H, 4), 3.33 (dd, 1H, 6), 3.45 (m, 1H, 6'), 3.55 (dd, 1H, $J = 7.7$ Hz, $J = 9.1$ Hz, 5), 3.76 (m, 1H, 1), 3.82 (m, 1H, 4'), 3.86 (m, 1H, 3'), 4.20 (m, 1H, 5'), 5.29 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 3.8$ Hz : 1').

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) :

-4.5 (CH_3 TBS), -3.7 (CH_3 TBS), 19.2 (tBu IV), 26.5 (CH_3 tBu), 32.6 (CH_2 du bras), 36.2 (2), 44.2 (6'), 50.9 (3), 51.3 (1), 57.8 (2'), 63.1 (5'), 74.6 (3'), 76.1 (6), 77.7 (5), 80.6 (4'), 89.6 (4), 103.1 (1'), 155.5 (C=O carbamate cycle à 6), 174.8 (C=O bras espaceur).

IR (film KBr) cm^{-1} :

3100-3600 cm^{-1} O-H ; N-H ν

2929 cm^{-1} C-H ν

1708 cm^{-1} C=O ν (cycle à 6) (amide I)

1650 cm^{-1} C=O ν (amide) (amide I)

1522 cm^{-1} N-H δ et N-C=O ν (amide II)

1462 cm^{-1}

1384 cm^{-1}

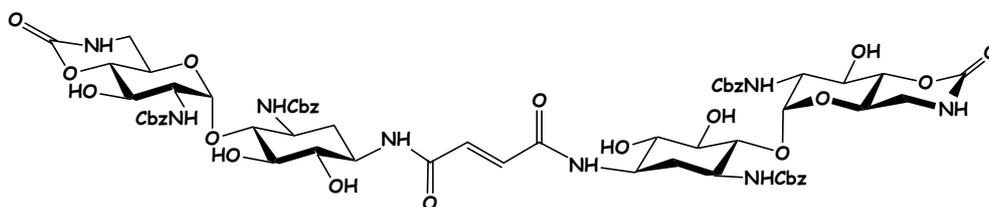
1257 cm^{-1}

1101 cm^{-1}

Spectre de masse :

HRMS ES+ : $[\text{M} + \text{H}^+]$ 1007.5151 ppm ; simulation pour $\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{N}_8\text{O}_{16}\text{Si}_2$ 1007.5147

Composé 29 obtenu par déprotection du composé 25



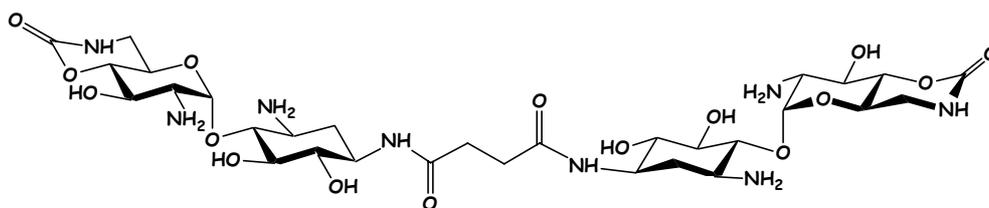
$C_{62}H_{74}N_8O_{24}$: 1315,29 g.mol⁻¹
Solide Blanc

Le composé 25 (350 mg ; 0,227 mmol) est partiellement solubilisé dans un minimum de méthanol (environ 3 mL) puis une solution d'acide chlorhydrique 1M est ajoutée (environ 3 mL). Un précipité blanc apparaît. La solution est agitée 10 min puis est placée une nuit sous le vide de la pompe pour conduire au produit souhaité (296 mg ; rdt = quantitatif).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) :

1.31 (ddd, 1H, $J_{2ax-2\acute{e}q} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 12.6$ Hz, 2ax), 1.77 (ddd, 1H, 2\acute{e}q), 3.03 (dd, 1H, $J = 9.6$ Hz), 3.14 (m, 1H), 3.25-3.65 (m, 7H), 3.80 (dd, 1H, $J = 9.6$ Hz), 3.91 (m, 1H), 4.75 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, $\underline{CH_2}$ -Ar), 4.99 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz, $\underline{CH_2}$ -Ar), 5.09 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz, $\underline{CH_2}$ -Ar), 5.13 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, $\underline{CH_2}$ -Ar), 5.16 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, 1'), 6.79 (s, 2H, alcène), 7.00 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, NH), 7.29-7.38 (m, 10H, Ar), 8.33 (d, 1H, $J_{NH-1} = 7.5$ Hz, NH).

Composé 30 obtenu à partir du composé 29



$C_{30}H_{50}N_8O_{16}$: 778,33 g.mol⁻¹
Solide blanc

Le composé 29 (435 mg ; 0,210 mmol) est placé dans un bicol à -78°C surmonté d'un réfrigérant à -78°C . L'ammoniac gazeux est condensé (~40 mL), puis le sodium (241 mg ; 10,48 mmol ; 50 \acute{e}q.) est ajouté par portions jusqu'à ce que la solution bleu nuit persiste. La solution est agitée à -78°C pendant 3h30 avec deux ajouts ultérieurs de sodium afin de retrouver la couleur bleue. La réaction est neutralisée très lentement à l'aide d'acide acétique glacial (1,7 mL) sous bonne agitation jusqu'à disparition de la coloration bleue. L'ammoniac est ensuite évaporé en laissant remonter la température lentement. Le solide obtenu est purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (dioxane / H₂O / NH₃ : 4 / 3 / 0,5 puis 5 / 5 / 0,5) pour donner un solide blanc (102 mg ; rdt : 67 %).

CCM : dioxane / H₂O / NH₃ : 5 / 5 / 0,5 ; révélateur : ninhydrine
Rf = 0,65

Point de fusion : Exp. : T dec. 168°C (sur produit 4HCl)

Pouvoir rotatoire :

Exp. : $[\alpha]_{589}^{20} + 15^\circ$ (c = 1 ; H₂O) (sur le produit libre)

RMN ¹H (500 MHz, D₂O) :

1.72 (ddd, 1H, J_{2ax-2éq} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 12.6 Hz, 2ax), 2.30 (ddd, 1H, J_{2éq-2ax} = 12.9 Hz J_{2éq-1} = J_{2éq-3} = 4.1 Hz, 2éq), 2.60 (s, 2H, CH₂ bras), 3.35 (dd, 1H, J_{6'ax-6'éq} = J_{6'ax-5'} = 10.7 Hz, 6'ax), 3.53 (dd, 1H, J₃₋₄ = J₃₋₂ = 9.6 Hz, 3), 3.53 (dd, 1H, J₆₋₅ = J₆₋₁ = 10.1 Hz, 6), 3.58 (dd, 1H, J_{2'.3'} = 10.7 Hz. J_{2'.1'} = 3.8 Hz, 2'), 3.65 (dd, 1H, J_{6'éq-6'ax} = 10.7 Hz. J_{6'éq-5'} = 5.7 Hz, 6'éq), 3.71 (dd, 1H, J₅₋₄ = J₅₋₆ = 9.3 Hz, 5), 3.88 (ddd, 1H, J_{1-2ax} = J₁₋₆ = 10.4 Hz. J_{1-2éq} = 4.3 Hz, 1), 3.93 (dd, 1H, J₄₋₃ = J₄₋₅ = 9.6 Hz, 4), 4.20 (dd, 1H, J_{4'.3'} = J_{4'.5'} = 9.3 Hz, 4'), 4.27 (dd, 1H, J_{3'.4'} = J_{3'.2'} = 9.9 Hz, 3'), 4.29 (m, 1H, 5'), 5.91 (d, 1H, J_{1'.2'} = 3.8 Hz, 1').

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) :

30.4 (2), 30.9 (CH₂ bras), 42.0 (6'), 48.7 (3), 48.8 (1), 53.4 (2'), 61.6 (3'), 66.3 (5'), 73.7 (6), 75.5 (5), 77.5 (4'), 79.2 (4), 96.7 (1'), 155.2 (C=O en N6'), 174.8 (C=O en N1).

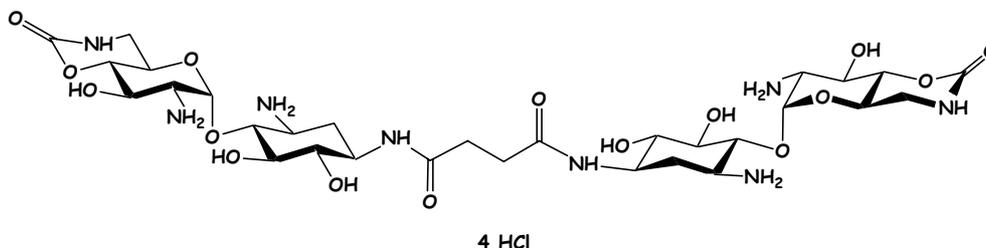
IR (film KBr) cm⁻¹ :

3240-3700 cm⁻¹ O-H ; N-H v
2500-3240 cm⁻¹ NH₂ v
1700 cm⁻¹ C=O v (cycle à 6) (amide I)
1636 cm⁻¹ C=O v (amide) (amide I)
1560 cm⁻¹ N-H δ et N-C=O v (amide II)
1408 cm⁻¹ C-H ; O-H δ
1113 cm⁻¹ C-O v ; C-N v

Spectre de masse : (sur le produit 4HCl)

HRMS ES+ : [M + H⁺] 779.338 ppm ; simulation pour C₃₀H₅₁N₈O₁₆ 779.342

Composé 30 obtenu à partir du composé 28

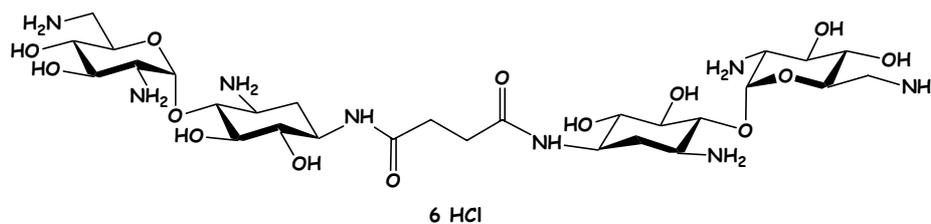


C₃₀H₅₄Cl₄N₈O₁₆ : 924,60 g.mol⁻¹
Solide Blanc

Le composé 28 (172 mg ; 0,17 mmol) est solubilisé dans un minimum de méthanol (environ 0,5 mL) puis une solution d'acide chlorhydrique 1M est ajoutée (environ 3 mL). La solution est agitée 10 min puis est placée une nuit sous le vide de la pompe pour conduire au produit souhaité (157 mg ; rdt = quantitatif).

Les analyses sont conformes à celles du composé 30 obtenu par réduction du composé 29.

Composé 31



$C_{28}H_{60}Cl_6N_8O_{14}$: 945,54 g.mol⁻¹

Solide jaune

Le composé 30 (157 mg ; 0,17 mmol) est solubilisé dans l'eau (5 mL) avec la résine A26(HO⁻) (488 mg). Le mélange est agité doucement pendant 20 min à température ambiante. La solution est filtrée et récupérée dans un ballon. La résine est ensuite rincée avec de l'eau (10 mL) et du dioxane (15 mL). A la solution ainsi obtenue est ensuite ajouté Ba(OH)₂ · 8H₂O (118 mg ; 0,37 mmol ; 2,2 éq.). Le mélange réactionnel est chauffé à 50 °C pendant 4h. Ba(OH)₂ · 8H₂O (118 mg ; 0,37 mmol ; 2,2 éq.) et de l'eau (10 mL) sont ajoutés et le mélange réactionnel est chauffé à 50 °C pendant 3h. Un nouvel ajout de Ba(OH)₂ · 8H₂O (27 mg ; 0,085 mmol ; 0,5 éq.) et d'eau (2,5 mL) est effectué et le mélange réactionnel est encore chauffé à 50 °C pendant 2h30. Le mélange est refroidi à TA, du CO₂ est mis à buller, les sels de carbonate de baryum ainsi obtenus sont filtrés sur célite et rincés au DMF. Les filtrats sont combinés et évaporés sous pression réduite. Le brut réactionnel est alors purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (dioxane / H₂O / NH₃ : 5 / 5 / 0,5 puis 2 / 8 / 1) pour conduire à un solide blanc. Ce dernier est alors solubilisé dans de l'acide chlorhydrique 1M et trituré. La solution est filtrée sur papier puis évaporée sous pression réduite sans chauffer pour conduire au produit hexachlorohydraté jaune (107 mg ; 0,11 mmol ; rdt : 67 %).

CCM : dioxane / H₂O / NH₃ : 5 / 5 / 0,5 ; révélateur : ninhydrine

Rf = 0,06

Point de fusion : Exp. : T dec. 120°C

Pouvoir rotatoire :

Exp. : $[\alpha]_{589}^{20} + 59^\circ$ (c = 1 ; H₂O)

RMN ¹H (500 MHz, D₂O) : calibration sur le *tert*-butanol ajouté

1.71 (ddd, 1H, J_{2ax-2éq} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 12.6 Hz, 2ax), 2.30 (ddd, 1H, J_{2éq-2ax} = 12.8 Hz. J_{2éq-1} = J_{2éq-3} = 4.3 Hz ; 2éq), 2.58 (s, 2H, CH₂ bras), 3.30 (dd, 1H, J_{6'ax-6'éq} = 13.5 Hz. J_{6'ax-5'} = 6.8 Hz, 6'ax), 3.46-3.54 (m, 5H, 6'éq. 3 · 2' · 6 · 4'), 3.68 (dd, 1H, J₅₋₃ = J₅₋₄ = 9.3 Hz, 5), 3.86 (ddd, 1H, J₁₋₃ = J_{1-2ax} = 12.1 Hz. J_{1-2éq} = 4.3 Hz, 1), 3.94 (dd, 1H, J₄₋₃ = J₄₋₅ = 9.8 Hz, 4), 4.00 (ddd,

1H , $J_{3-4} = J_{3-2_{\text{ax}}} = 9.1$ Hz. $J_{3-2_{\text{éq}}} = 1.7$ Hz, 3), 4.03 (ddd, 1H , $J_{5'-4'} = J_{5'-6'_{\text{ax}}} = 6.8$ Hz. $J_{5'-6'_{\text{éq}}} = 3.5$ Hz, 5'), 5.92 (d, 1H , $J_{1'-2'} = 3.9$ Hz, 1').

RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O) :

31.1 (2), 31.5 (CH_2 du bras), 40.9 (6'), 49.6 (3 et 1), 54.3 (2'), 69.1 (3'), 69.9 (5'), 71.4 (4'), 74.7 (6), 76.6 (5), 79.2 (4), 96.8 (1'), 155.7 ($\text{C}=\text{O}$ en N1).

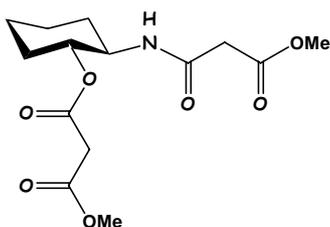
IR (film KBr) cm^{-1} :

2900-3700 cm^{-1} O-H ; N-H v
 2600-2900 cm^{-1} NH_2 v
 1651 cm^{-1} $\text{C}=\text{O}$ v (amide) (amide I)
 1504 cm^{-1} N-H δ et N-C=O v (amide II)
 1380 cm^{-1}
 1026 cm^{-1}

Spectre de masse :

HRMS ES+ : $[\text{M} + \text{H}^+]$ 727.3837 ppm ; simulation pour $\text{C}_{28}\text{H}_{55}\text{N}_8\text{O}_{14}$ 727.3832

Composé 32



$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_7$: 315,32 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 Huile qui cristallise

Le *trans*-aminocyclohexanol (150 mg ; 1,30 mmol) est placé en suspension dans le diméthylmalonate (1,486 mL ; 13 mmol ; 10 éq.). La suspension est chauffée à 130°C pendant 24h. Il reste beaucoup de *trans*-aminocyclohexanol, mais des produits sont apparus. Une quantité catalytique d'acide acétique est ajoutée (3 μL) et le mélange est chauffé à 150°C pendant 7h. Le mélange est devenu jaune limpide au bout de 5h30. Le liquide est évaporé et le produit obtenu est chromatographié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / acétone 9 / 1 puis 8 / 2) pour conduire au produit diacylé (208 mg ; rdt : 51 %).

CCM : CH_2Cl_2 / acétone 9 / 1 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
 Rf = 0,38

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) :

1.12-1.54 (m, 4H, Cy), 1.66-1.83 (m, 2H, Cy), 1.93-2.09 (m, 2H, Cy), 3.28 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, $\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})$), 3.35 (d, 2H, $J = 1.4$ Hz, $\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})$), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.93 (m, 1H, $\text{CH}-\text{NH}$), 4.72 (ddd, 1H, $J_{\text{ax-ax}} = 10.7$ Hz, $J_{\text{ax-éq}} = 4.6$ Hz, $\text{CH}-\text{O}$), 6.87 (d, 1H, NH).

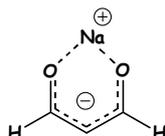
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) :

23.9 et 24.1 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 30.8 et 31.7 ($\text{CH}_2\text{-CH-}$), 41.3 ($\text{C(O)-CH}_2\text{-C(O)}$), 52.2, 52.3 et 52.4 (OCH_3 et CH-NH), 75.7 (CH-OH), 164.7 (NH-C=O), 166.7 et 167.0 (C(O)OCH_3), 169.5 (O-C=O).

Spectre de masse :

MS ES⁺ : $[\text{M} + \text{H}^+]$ 316.1359 ppm ; simulation pour $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_7$ 316.1391

Composé 33 : Sodio-malonaldéhyde



$\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_2$: 94,04 g.mol⁻¹
Solide orange

A une solution d'acide chlorhydrique exactement 1M (12,8 mL) est ajouté le 1,1,3,3-tétraméthoxypropane (2g ; 12,18 mmol). Le mélange est agité 5 min à TA, le temps que les deux liquides soient mélangés, puis la solution est placée à 4°C pendant 24h. La solution est jaune fluo. Elle est neutralisée en présence d'une électrode de pH par de la soude 5M (2mL), puis par de la soude 1M au goutte à goutte jusqu'à un pH de 7,8. Il y a un virage du jaune à l'orange. La solution est alors évaporée sans chauffer (il est recommandé de lyophiliser). Le solide orange est bien séché puis de l'éthanol anhydre est ajouté (~15 mL). Le solide est trituré, puis filtré. L'évaporation de l'éthanol sans chauffer conduit au produit pur (667 mg ; rdt : 58 %).

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) :

5.73 (t, 1H, J = 10.0 Hz, HOC-CH-CHO), 9.07 (d, 2H, J = 10.0 Hz, HOC-CH-CHO).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) :

4.64 (t, 1H, J = 9.7 Hz, HOC-CH-CHO), 8.62 (d, 2H, J = 9.7 Hz, HOC-CH-CHO).

Composés 34 et 35



$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_2$: 169,22 g.mol⁻¹
Solides blancs

Le *trans*-aminocyclohexanol chlorhydraté (100 mg ; 0,659 mmol) et le sodiomalonaldéhyde (93 mg ; 0,988 mmol ; 1,5 éq.) sont dissouts dans de l'eau (0,5 mL). La solution est agitée à TA pendant 113h, puis est évaporée sous vide. Le solide est chromatographié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / acétone 8 / 2 puis CH_2Cl_2 / MeOH 8 / 2) pour conduire au mélange des deux isomères (46 mg ; rdt : 41 %).

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ 8 / 2 / 0,1 ; révélateur : KMnO₄
Rf = 0,56 et 0,70

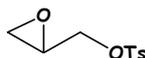
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : Composé 34 : Isomère Z

1.16-1.43 (m, 4H, Cy), 1.69-1.81 (m, 2H, Cy), 1.95-2.08 (m, 2H, Cy), 2.84 (m, 1H, 2), 2.37 (m, 1H, 1), 2.96 (large s, 1H, OH), 4.99 (dd, 1H, J₈₋₇ = 7.1 Hz, J₈₋₉ = 2.4 Hz, 8), 6.90 (ddd, 1H, J₇₋₈ = 7.0 Hz, J₇₋₉ = 3.1 Hz, 7), 9.06 (dd, 1H, J₉₋₇ = 3.1 Hz, J₉₋₈ = 2.4 Hz, 9), 9.88 (large s, 1H, NH).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : Composé 35 : Isomère E

1.16-1.43 (m, 4H, Cy), 1.69-1.81 (m, 2H, Cy), 1.95-2.08 (m, 2H, Cy), 2.84 (m, 1H, 2), 2.37 (m, 1H, 1), 2.96 (large s, 1H, OH), 5.34 (dd, 1H, J₈₋₇ = 12.8 Hz, J₈₋₉ = 8.6 Hz, 8), 6.41 (large s, 1H, NH), 7.19 (dd, 1H, J₇₋₈ = 12.3 Hz, 7), 8.93 (d, 1H, J₉₋₈ = 7.1 Hz, 9).

Composé 39 : Glycidol tosylé



C₁₀H₁₂O₄S : 228,27 g.mol⁻¹
Cristaux blancs

Le glycidol et la triéthylamine sont solubilisés dans du dichlorométhane. La solution est refroidie à -20 °C, puis une solution de chlorure de tosyle dans du dichlorométhane est ajoutée au goutte à goutte. La solution est placée à -18°C pendant 13 h, et des cristaux sont apparus (NEt₃. HCl). On a laissé revenir le mélange à température ambiante, puis les cristaux ont été filtrés et rincés au dichlorométhane. La phase organique obtenue est lavée à l'aide d'une solution d'acide citrique à pH 4, puis à l'aide d'une solution saturée en NaCl. Elle est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée, puis évaporée sous pression réduite. Le produit brut ainsi obtenu est purifié par filtration sur colonne de silice (CH₂Cl₂) pour donner un liquide qui cristallise par la suite. (1,60 g ; rdt : 94 %).

CCM : CH₂Cl₂ ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
Rf = 0,74

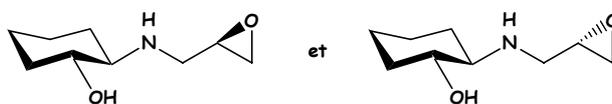
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) :

2.44 (s, 3H, CH₃), 2.58 (dd, 1H, J₂ = 4.8 Hz, CH₂(époxyde)), 2.80 (dd, 1H, J₂ = J₃ = 4.5 Hz, CH₂(époxyde)), 3.18 (dddd, 1H, CH(époxyde)), 3.93 (dd, 1H, J₂ = 11.4 Hz, J₃ = 6.0 Hz, CH₂-OTs), 4.25 (dd, 1H, J₂ = 11.4 Hz, J₃ = 3.6 Hz, CH₂-OTs), 7.34 (d, 2H, J = 7.8 Hz, Ar), 7.79 (d, 2H, J = 8.4 Hz, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) :

21.8 (CH₃), 44.7 (CH₂(époxyde)), 49.0 (CH(époxyde)), 70.6 (CH₂-OTs), 128.1 (Ar C^{III}), 130.0 (Ar C^{III}), 132.8 (Ar C^{IV}), 145.3 (Ar C^{IV}).

Composés 40



$C_9H_{17}NO_2$: 171,24 g.mol⁻¹
Solide blanc

Le *trans*-aminocyclohexanol libre (100 mg ; 0,86 mmol ; 2 \acute{e} q) est dissout dans un mélange acétonitrile / eau 4 / 2 (6 mL). Du carbonate de potassium (239 mg, 1,73 mmol, 4 \acute{e} q) et le composé 39 (98 mg ; 0,43 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée à 40 °C pendant 23h, puis est évaporée sous vide. Le solide est chromatographié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ puis CH₂Cl₂ / MeOH 95 / 5 puis 9 / 1) pour conduire successivement à deux isomères (24 mg de l'isomère 1, et 34 mg de l'isomère 2) (58 mg ; rdt : 79 %).

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH 9 / 1 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
Isomère 1 : R_f = 0,40
Isomère 2 : R_f = 0,33

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) : isomère 1

1.22-1.43 (m, 3H, Cy), 1.44-1.60 (m, 1H, Cy), 1.70-1.83 (m, 3H, Cy), 1.99-2.09 (m, 1H, Cy), 3.42 (m, 1H, CH₂(époxyde)), 1.46 (dd, 1H, J² = 8.8 Hz, J³ = 5.9 Hz, CH₂(époxyde)), 3.55 (m, 1H, CH-NH), 3.66 (dd, 1H, J₂ = J₃ = 8,8 Hz, CH₂(époxyde)), 3.66 (dd, 1H, J² = 12.2 Hz, J³ = 4.7 Hz, NH-CH₂-époxyde), 3.75 (dd, 1H, J² = 12.2 Hz, J³ = 3.7 Hz, NH-CH₂-époxyde), 4.61 (m, 1H, CH-OH).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) : isomère 2

1.22-1.43 (m, 3H, Cy), 1.44-1.60 (m, 1H, Cy), 1.67-1.83 (m, 3H, Cy), 1.99-2.10 (m, 1H, Cy), 3.38-3.80 (m, 6H, CH-NH, NH-CH₂, CH₂(époxyde) et CH(époxyde)), 4.62 (m, 1H, CH-OH).

Composés 41 et 42



$C_{16}H_{30}N_2O_2$: 282,42 g.mol⁻¹

Solide blanc

$C_{14}H_{28}N_2O_2$: 256,38 g.mol⁻¹

Solide blanc

Le *trans*-aminocyclohexanol chlorhydraté (150 mg ; 0,989 mmol ; 4 \acute{e} q) est solubilisé dans du méthanol (6 mL) (pH = 5-6). Le cyanoborohydrure de sodium (39 mg ; 0,617 mmol ; 2,5 \acute{e} q.), puis le glyoxal (28 μ L ; 0,247 mmol) sont ajoutés. La solution est chauffée à reflux pendant 24h. La solution réactionnelle est évaporée puis purifiée sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ /

MeOH / NH₃ 9 / 1 / 0,1 puis dioxane / MeOH / NH₃ 5 / 5 / 0,5) pour conduire aux produits 41 (16 mg ; rdt : 46 %) et 42 (15 mg ; rdt : 24 %).

Composé 41 : produit de di-alkylation

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ 9 / 1 / 0,1 ; révélateur : KMnO₄
Rf = 0,78

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) :

1.14-1.27 (m, 5H, 3ax, 4ax, 5ax, 6ax), 1.56-1.72 (m, 1H, 5éq), 1.73-1.85 (m, 2H, 3éq, 4éq), 2.06-2.15 (m, 2H, 6éq), 2.16-2.28 (m, 1H, CH-NH), 2.43 (m, 2H, Chax du bras), 2.72 (m, 2H, CH éq du bras), 3.36 (m, 1H, CH-OH), 3.94 (large s, 1H, OH).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, à -80°C) :

22.0 (CH₂), 23.7 (CH₂), 25.1 (CH₂), 32.7 (CH₂), 44.4 (CH₂ bras), 44.7 (CH₂ bras), 51.9 (CH₂ bras), 52.1 (CH₂ bras), 68.1 (2), 68.2 (2'), 69.4(1), 69.5 (1').

Spectre de masse :

HRMS ES+ : [M + H⁺] 283.2384 ppm ; simulation pour C₁₆H₃₁N₂O₂ 283.2380

Composé 42 : produit de mono-alkylation

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ 9 / 1 / 0,1 ; révélateur : KMnO₄
Rf = 0,10

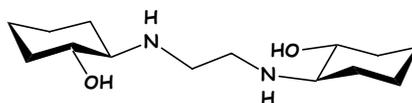
RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) :

1.02-1.41 (m, 4H, Cy), 1.63-1.79 (m, 2H, Cy), 1.90-2.09 (m, 2H, Cy), 2.34 (m, 1H, CH-NH), 2.70 (m, 1H, CH₂ bras), 2.91 (m, 1H, CH₂ bras), 3.28 (m, 1H, CH-OH).

Spectre de masse :

MS ES+ : [M + H⁺] 257.2205 ppm ; simulation pour C₁₄H₂₉N₂O₂ 257.2224

Composé 42 par ouverture du composé 44



C₁₄H₂₈N₂O₂ : 256,38 g.mol⁻¹
Solide blanc

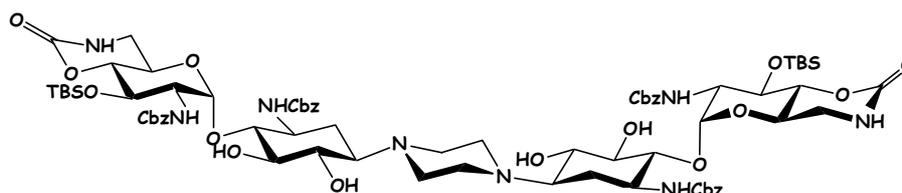
Le produit 44 (100 mg ; 0,396 mmol) est solubilisé dans du THF distillé fraîchement (6 mL). Du borohydrure de lithium 2M dans le THF (396 μL ; 0,792 mmol ; 2éq) est ajouté. Le mélange est agité à TA pendant 17h30. Un autre équivalent de borohydrure de lithium (200 μL ; 0,396 mmol ; 1éq) est ajouté et le mélange est encore agité 47h. Un solide fin est apparu. Du méthanol est ajouté (le solide se ressolubilise) et la solution est agitée 10 min. Après évaporation des solvants, de la soude 1 M est ajoutée et la phase aqueuse est extraite trois fois au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée. Le produit brut

est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ 8 / 2 / 0,1) pour conduire à un solide blanc (34 mg ; rdt : 33 %).

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH / NH₃ 8 / 2 / 0,1 ; révélateur : KMnO₄
Rf = 0,10

Les Analyses de ce produit sont conformes à celles du produit 42 de *mono*-alkylation.

Composé 43



C₇₂H₁₀₂N₈O₂₂Si₂ : 1513,83 g.mol⁻¹
Solide blanc

Le composé 16 (200 mg ; 0,274 mmol ; 4éq) est solubilisé dans le méthanol (6 mL). Une solution d'acide chlorhydrique molaire est ajoutée au goutte à goutte (200 µL) jusqu'à ce que le pH soit de l'ordre de 5-6. Le cyanoborohydrure de sodium (11 mg ; 0,17 mmol ; 2,5 éq.), puis le glyoxal à 40 % dilué 10 fois (78 µL ; 0,068 mmol) sont ajoutés. La solution est chauffée à reflux pendant 25 h. La solution réactionnelle est évaporée puis purifiée sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH 9 / 1 puis 8 / 2 puis 6 / 4) pour conduire au produit 43 (20 mg ; rdt : 20 %).

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH 8 / 2 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
Rf = 0,75

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) :

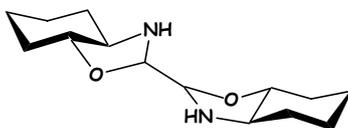
0.05 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.06 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.87 (s, 9H, tBu TBS), 1.38 (ddd, 1H, 2ax), 1.92 (ddd, 1H, 2éq), 2.49 (ddd, 1H, 3), 2.56 (m, 2H, CH₂ bras), 2.76 (m, 2H, CH₂ bras), 3.13 (dd, 1H, 6'), 3.37-3.68 (m, 4H, 6'éq, 6, 5 et 1), 3.78 (m, 1H, 2'), 3.88 (m, 2H, 3' et 4'), 4.04 (m, 1H, 5'), 5.02 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂ Ar2), 5.09 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂ Ar2), 5.30 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂ Ar1), 5.45 (d, 1H, J = 3.5 Hz, 1'), 7.22-7.39 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO à + 80°C) :

-5.3 (CH₃ TBS), -4.6 (CH₃ TBS), 17.4 (tBu IV), 25.4 (tBu TBS), 30.9 (2), 42.4 (CH₂ bras), 48.3 (6'), 50.7 (3), 55.9 (1), 61.2 (2'), 62.5 (5'), 64.9 (CH₂-Ar), 65.2 (CH₂-Ar), 70.3 (3'), 71.3 (5), 75.0 (4'), 76.4 (6), 78.5 (4), 99.0 (1'), 127.2 (Ar C^{III}), 127.3 (Ar C^{III}), 127.8 (Ar C^{III}), 127.9 (Ar C^{III}), 136.7 (Ar C^{IV}), 136.8 (Ar C^{IV}), 151.5 (C=O carbamate cycle à 6), 155.1 (C=O Cbz).

Spectre de masse :

MS ES⁺ : [M + H⁺] 1513.6832 ppm ; simulation pour C₇₄H₁₀₅N₈O₂₂Si₂ 1513.6876
[M + K⁺] 1551.6388 ppm ; simulation pour C₇₄H₁₀₄N₈O₂₂Si₂K 1551.6435

Composé 44

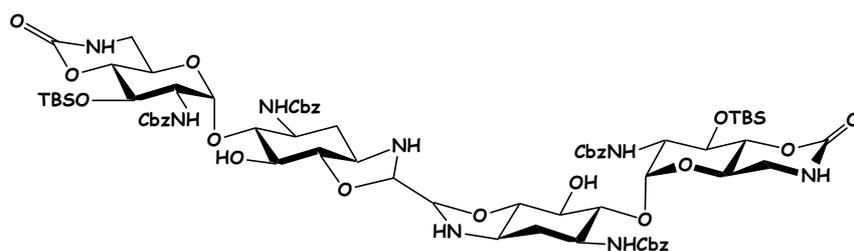
$C_{14}H_{24}N_2O_2$: 252,35 g.mol⁻¹
Solide blanc

Le *trans*-aminocyclohexanol (600 mg ; 5,19 mmol ; 2,15éq) est solubilisé dans du méthanol (20 mL). Du tamis moléculaire 3 Å (10 g), de l'acide acétique (28 µL ; 0,48 mmol ; 0,2éq) et du glyoxal (276 µL ; 2,41 mmol) sont ajoutés. Le mélange est agité à TA pendant 42h puis filtré sur célite et rincé au méthanol et au dichlorométhane. Le filtrat est évaporé puis repris dans un minimum de méthanol. Un précipité blanc se sépare d'un liquide jaune. Le précipité est filtré et rincé au méthanol froid. Cette opération est répétée trois fois pour conduire au produit pur (337 mg ; rdt : 55 %). Le reste de produit est obtenu par purification du filtrat restant sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH 9 / 1) éluée par gravitation. Les deux produits sont rassemblés (487 mg ; rdt : 80 %).

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH 9 / 1 ; révélateur : KMnO₄
Rf = 0,46

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) :

1.12-1.52 (m, 4H, Cy), 1.53-1.69 (m, 2H, Cy), 1.70-1.89 (m, 2H, Cy), 2.18 (large s, 1H, NH), 2.87 (m, 1H, CH-NH), 3.21 (m, 1H, CH-O), 4.40 (s, 1H, CH bras).

Composé 45

$C_{72}H_{98}N_8O_{22}Si_2$: 1483,76 g.mol⁻¹
Solide blanc

Le composé 16 (106 mg ; 0,145 mmol ; 2,1éq) est solubilisé dans du méthanol (1 mL). Du tamis moléculaire 3 Å (0,29 g), de l'acide acétique (0,8 µL ; 0,014 mmol ; 0,2éq) et du glyoxal (7,9 µL ; 0,069 mmol) sont ajoutés. Le mélange est agité à TA pendant 7h puis filtré sur célite et rincé au méthanol et au dichlorométhane. Le filtrat est évaporé puis purifié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH 9/1 puis 8/2 puis 6/4) pour conduire au produit pur (57 mg ; rdt : 56 %).

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH 9/1 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
Rf = 0,15

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) :

0.14 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.21 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.88 (s, 9H, tBu TBS), 1.31 (ddd, 1H, 2ax), 1.75 (ddd, 1H, 2éq), 2.98 (m, 2H), 3.15 (dd, 1H, J = 10.2 Hz), 3.46 (m, 2H), 3.58-3.83 (m, 3H), 3.84-3.94 (m, 2H), 4.05 (m, 1H), 4.22 (s, 2H, CH bras), 4.82 (d, 1H, J = 12.2 Hz, CH₂ Ar1), 5.03 (d, 1H, J = 12.2 Hz, CH₂ Ar2), 5.09 (d, 1H, J = 12.2 Hz, CH₂ Ar2), 5.32 (d, 1H, J = 12.2 Hz, CH₂ Ar1), 5.55 (d, 1H, J_{1'-2'} = 3.7 Hz, 1'), 7.28-7.37 (m, 10H, Ar).

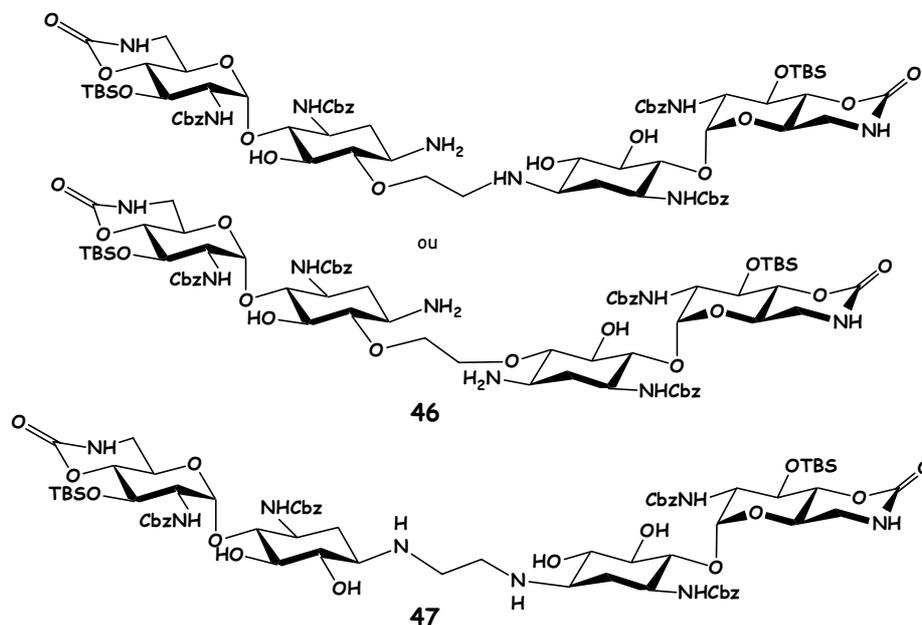
RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) : attribution par analogie

-4.5 (CH₃ TBS), -3.8 (CH₃ TBS), 19.1 (tBu IV), 26.4 (tBu TBS), 34.5 (2), 44.2 (6'), 47.4 (1 ou 3), 51.6 (1 ou 3), 57.3 (2'), 62.5 (5'), 67.8 (CH₂-Ar), 71.8 (3'), 80.9, 81.0, 81.8, 82.2, 82.6 (4, 4', 5, 6 et CH bras), 100.0 (1'), 129.0 (Ar C^{III}), 129.1 (Ar C^{III}), 129.2 (Ar C^{III}), 129.5 (Ar C^{III}), 138.0 (Ar C^{IV}), 138.1 (Ar C^{IV}), 155.4 (C=O carbamate cycle à 6), 158.5 (C=O Cbz), 158.6 (C=O Cbz).

Spectre de masse :

MS ES⁺ : [M + H⁺] 1483.6621 ppm ; simulation pour C₇₂H₉₉N₈O₂₂Si 1483.6407

Composés 46 et 47



C₇₂H₁₀₂N₈O₂₂Si₂ : 1487,79 g.mol⁻¹
Solides blancs

Le produit 45 (112 mg ; 0,076 mmol) est solubilisé dans du THF distillé fraîchement (6 mL). Du borohydrure de lithium 2M dans le THF (76 µL ; 0,15 mmol ; 2éq) est ajouté. Le mélange est agité à TA pendant 7h30. Deux autres équivalents de borohydrure de lithium (76 µL ; 0,15 mmol ; 2éq) sont ajoutés et le mélange est encore agité 16h. Du méthanol est ajouté et la solution est agitée 2h. Après évaporation des solvants, le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 95/5, puis 9/1, puis 8/2) pour conduire aux produits **46** (46 mg ; rdt : 41 %) et **47** (28 mg ; rdt : 25 %).

Composé 46 :

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH 8/2 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
Rf = 0,72

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) :

0.12 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.21 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.88 (s, 9H, tBu TBS), 1.38 (ddd, 1H, 2ax), 2.04 (ddd, 1H, 2éq), 2.53 (m, 1H), 2.68 (m, 1H, CH₂ bras), 2.85 (m, 1H, CH₂ bras), 2.86-3.20 (m, 2H), 3.37-3.70 (m, 5H), 3.79 (m, 1H), 3.90 (m, 2H), 4.04 (m, 1H), 4.84 (d, 1H, J = 12.4 Hz, CH₂ Ar1), 5.02 (d, 1H, J = 12.2 Hz, CH₂ Ar2), 5.09 (d, 1H, J = 12.2 Hz, CH₂ Ar2), 5.32 (d, 1H, J = 12.4 Hz, CH₂ Ar1), 5.50 (d, 1H, 1'), 7.28-7.36 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) : attribution par analogie aux autres spectres

-6.6 (CH₃ TBS), -5.8 (CH₃ TBS), 17.0 (tBu IV), 24.5 (tBu TBS), 28.7 (2), 42.2 (6'), 44.9 (CH₂ bras : Intensité divisée par 2), 49.5 (3), 55.3 (1), 56.7 (2'), 60.6 (5'), 65.7 (CH₂-Ar), 65.8 (CH₂-Ar), 69.9 (3'), 75.0 (5), 76.5 (6), 79.1 (4'), 80.0 (4), 98.2 (1'), 127.1 (Ar C^{III}), 127.5 (Ar C^{III}), 127.6 (Ar C^{III}), 136.0 (Ar C^{IV}), 153.5 (C=O carbamate cycle à 6), 156.5 (C=O Cbz).

Spectre de masse :

MS ES+ : [M + H⁺] 1487.6740 ppm ; simulation pour C₇₂H₁₀₃N₈O₂₂Si₂ 1487.6720

Composé 47 :

CCM : CH₂Cl₂ / MeOH 8/2 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}
Rf = 0,07

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) :

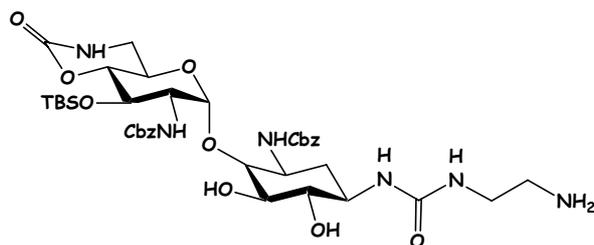
0.13 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.20 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.86 (s, 9H, tBu TBS), 1.38 (ddd, 1H, 2ax), 2.06 (ddd, 1H, 2éq), 2.48 (m, 1H), 2.62 (m, 1H, CH₂ bras), 2.81 (m, 1H, CH₂ bras), 3.12 (m, 2H), 3.37-3.70 (m, 5H), 3.79 (m, 1H), 3.88 (m, 2H), 4.05 (m, 1H), 4.82 (d, 1H, J = 12.4 Hz, CH₂ Ar1), 5.00 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂ Ar2), 5.10 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂ Ar2), 5.32 (d, 1H, J = 12.4 Hz, CH₂ Ar1), 5.48 (d, 1H, J_{1',2'}} = 3.7 Hz, 1'), 7.27-7.38 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) : attribution par analogie aux autres spectres

-6.0 (CH₃ TBS), -5.2 (CH₃ TBS), 17.6 (tBu IV), 25.0 (tBu TBS), 32.7 (2), 42.8 (6'), 45.6 (CH₂ bras), 50.1 (3), 55.9 (1), 57.0 (2'), 61.1 (5'), 66.3 (CH₂-Ar), 66.5 (CH₂-Ar), 70.5 (3'), 75.8 (5), 77.1 (6), 79.7 (4'), 80.6 (4), 98.8 (1'), 127.6 (Ar C^{III}), 127.8 (Ar C^{III}), 128.0 (Ar C^{III}), 128.1 (Ar C^{III}), 136.6 (Ar C^{IV}), 136.7 (Ar C^{IV}), 154.1 (C=O carbamate cycle à 6), 157.2 (C=O Cbz).

Spectre de masse :

MS ES+ : [M + H⁺] 1487.6737 ppm ; simulation pour C₇₂H₁₀₃N₈O₂₂Si₂ 1487.6720

Composé 48

$$C_{38}H_{56}N_6O_{12}Si : 816,97 \text{ g.mol}^{-1}$$

Solide blanc

Le composé 14 (100 mg ; 0,132 mmol) bien sec est dissout sous argon dans 4 mL de THF fraîchement distillé. L'éthylène diamine fraîchement distillée (53 μ L ; 0,792 mmol ; 6 eq.) est ajoutée, puis ce mélange est agité à température ambiante pendant 23h. De l'éther diéthylique est ajouté afin de faire précipiter le produit. Le solide blanc ainsi obtenu est filtré et rincé à l'éther puis chromatographié sur une colonne de gel de silice (dioxane / H₂O / NH₃ : 8 / 2 / 0,1) pour conduire à un solide blanc (67 mg ; rdt : 62 %).

CCM : dioxane / H₂O / NH₃ 8 / 2 / 0,5 ; révélateur : ninhydrine

Rf = 0,52

Point de fusion : Exp. : T dec.

Pouvoir rotatoire :Exp. : $[\alpha]_{589}^{20} + 8,8^\circ$ (c = 1 ; MeOH)**RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) : (totale)**

0.12 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.20 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.87 (s, 9H, tBu TBS), 1.40 (ddd, 1H, $J_{2ax-2\acute{e}q} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 12.7 \text{ Hz}$, 2ax), 2.02 (ddd, 1H, $J_{2ax-2\acute{e}q} = 12.7 \text{ Hz}$, 2 $\acute{e}q$), 2.74 (m, 2H, CH₂ b), 3.13 (dd, 1H, $J_{6'ax-6'\acute{e}q} = J_{6'ax-5} = 10.5 \text{ Hz}$, 6'ax), 3.18 (m, 1H, 6), 3.22 (m, 2H, CH₂ a), 3.45 (m, 2H, 4 et 6' $\acute{e}q$), 3.53 (m, 2H, 5 et 1), 3.62 (ddd, 1H, $J_{3-2ax} = J_{3-4} = 12.9 \text{ Hz}$, $J_{3-2\acute{e}q} = 3.7 \text{ Hz}$, 3), 3.79 (dd, 1H, $J_{2'-1'} = 3.4 \text{ Hz}$, $J_{2'-3'} = 9.4 \text{ Hz}$, 2'), 3.86 (dd, 1H, $J_{3'-2'} = J_{3'-4'} = 9.4 \text{ Hz}$, 3'), 3.89 (dd, 1H, $J_{4'-3'} = J_{4'-5'} = 9.0 \text{ Hz}$, 4'), 4.06 (m, 1H, 5'), 5.01 (d, 1H, J = 12.2 Hz, CH₂-Ar en 2'), 5.08 (d, 1H, J = 12.4 Hz, CH₂-Ar en 2'), 5.30 (d, 1H, J = 12.2 Hz, CH₂-Ar en 3), 5.49 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 3.2 \text{ Hz}$, 1'), 7.30 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) :

-4.6 (CH₃ TBS), -3.8 (CH₃ TBS), 19.0 (tBu IV), 26.4 (CH₃ tBu), 35.9 (2), 42.5 (a + b), 44.2 (6'), 51.4 (3), 52.0 (1), 57.3 (2'), 62.6 (5'), 67.7 (CH₂-Ar), 67.8 (CH₂-Ar), 71.8 (3'), 77.1 (6), 78.6 (5), 81.1 (4'), 81.8 (4), 100.2 (1'), 129.0 (Ar C^{III}), 129.2 (Ar C^{III}), 129.4 (Ar C^{III}), 129.5 (Ar C^{III}), 138.0 (Ar C^{IV}), 138.1 (Ar C^{IV}), 155.5 (C=O carbamate cycle à 6), 158.4 (C=O Cbz), 158.7 (C=O Cbz), 161.2 (C=O bras espaceur).

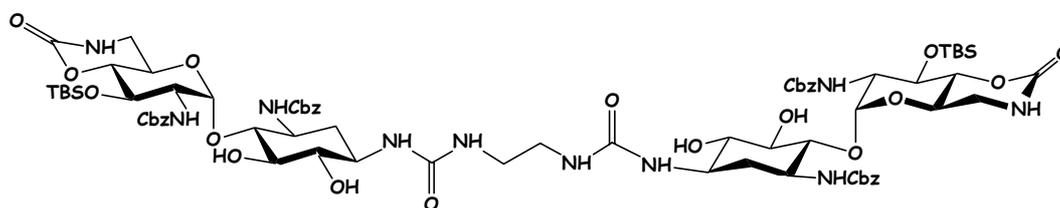
IR (film KBr) cm⁻¹ :3100-3600 cm⁻¹ O-H ; N-H ν

2930 cm^{-1} C-H ν
 1702 cm^{-1} C=O ν (cycle à 6) et C=O ν (Cbz) (amide I)
 1660 cm^{-1} C=O ν (urée) (amide I)
 1552 cm^{-1} N-H δ et N-C=O ν (amide II)
 1456 cm^{-1}
 1408 cm^{-1}
 1260 cm^{-1}
 1080 cm^{-1}

Spectre de masse :

HRMS ES⁺ : [M + H⁺] 817.3805 ppm ; simulation pour C₃₈H₅₇N₆O₁₂Si 817.3798

Composé 49



C₇₄H₁₀₄N₁₀O₂₄Si₂ : 1573,84 g.mol⁻¹
 Solide blanc

Le composé 14 (795mg ; 1,05 mmol ; 2,2 éq.) est solubilisé dans du THF anhydre (16 mL). L'éthylène diamine fraîchement distillée (32 μL ; 0,477 mmol) est ajoutée, puis le mélange est agité à 50°C pendant 92 h. Le THF est évaporé sous pression réduite. Le solide obtenu est purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / acétone : 6 / 4 puis dioxane / MeOH / NH₃ : 8 / 2 / 0,1) pour conduire à un solide blanc (697 mg ; rdt : 93 %).

CCM : dioxane / H₂O / NH₃ 8 / 2 / 0,1 ; révélateur : ninhydrine
 R_f = 0,75

Point de fusion : Exp. : 199°C < Tf < 205°C

Pouvoir rotatoire :

Exp. : $[\alpha]_{589}^{20} + 9,6^\circ$ (c = 0,78 ; MeOH)

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) :

0.12 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.20 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.87 (s, 9H, tBu TBS), 1.41 (ddd, 1H, J_{2ax-2éq} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 10.9 Hz, 2ax), 2.03 (ddd, 1H, J_{2ax-2éq} = 12.8 Hz, 2éq), 3.13 (m, 2H, 6'ax et 6), 3.16 (m, 2H, CH₂ bras), 3.44 (m, 2H, 4 et 6'éq), 3.51 (m, 2H, 5 et 1), 3.59 (m, 1H, 3), 3.79 (m, 1H, 2'), 3.88 (m, 2H, 3'et 4'), 4.05 (m, 1H, 5'), 4.83 (d, 1H, CH₂-Ar en 2') en partie sous le pic d'eau, 5.00 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂-Ar en 2'), 5.09 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂-Ar en 2'), 5.29 (d, 1H, J = 12.3 Hz, CH₂-Ar en 3), 5.46 (d, 1H, J_{1'-2'} = 3.4 Hz, 1'), 7.30 (m, 10H, Ar).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) :

-4.5 (CH₃ TBS), -3.8 (CH₃ TBS), 19.0 (tBu IV), 26.4 (CH₃ tBu), 35.9 (2), 41.4 (CH₂ bras), 44.2 (6'), 51.4 (3), 51.9 (1), 57.4 (2'), 62.6 (5'), 67.8 (CH₂-Ar), 68.1 (CH₂-Ar), 71.9 (3'), 76.9

(6), 78.6 (5), 81.1 (4'), 82.0 (4), 100.3 (1'), 129.0 (Ar C^{III}), 129.1 (Ar C^{III}), 129.2 (Ar C^{III}), 129.5 (Ar C^{III}), 129.9 (Ar C^{III}), 138.0 (Ar C^{IV}), 138.1 (Ar C^{IV}), 155.5 (C=O carbamate cycle à 6), 158.4 (C=O Cbz), 158.7 (C=O Cbz), 161.2 (C=O bras espaceur).

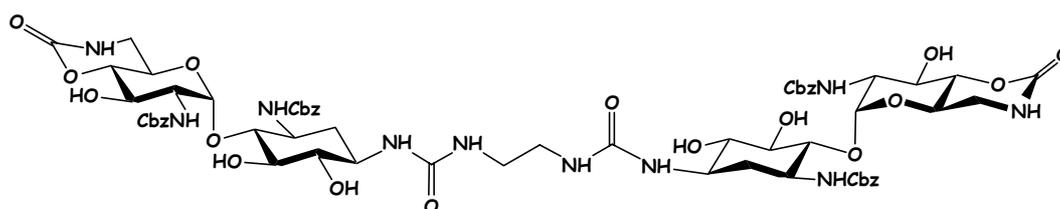
IR (film KBr) cm⁻¹ :

3100-3600 cm⁻¹ O-H ; N-H v
 2930 cm⁻¹ C-H v
 1704 cm⁻¹ C=O v (cycle à 6) et C=O v (Cbz) (amide I)
 1650 cm⁻¹ C=O v (urée) (amide I)
 1545 cm⁻¹ N-H δ et N-C=O v (amide II)
 1456 cm⁻¹
 1408 cm⁻¹
 1259 cm⁻¹
 1047 cm⁻¹

Spectre de masse :

HRMS ES+ : [M + H⁺] 1573.6795 ppm ; simulation pour C₇₄H₁₀₅N₁₀O₂₄Si₂ 1573.6836

Composé 50



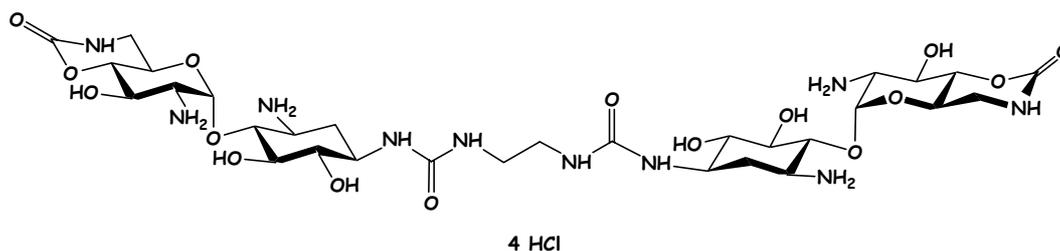
C₆₂H₇₆N₁₀O₂₄ : 1345,32 g.mol⁻¹
 Solide blanc

Le composé 49 (853 mg ; 0,54 mmol) est solubilisé dans un minimum de méthanol, puis une solution d'acide chlorhydrique 1M est ajoutée (4 mL). La solution est agitée une nuit sous argon, puis est placée 24h sous le vide de la pompe pour conduire au produit souhaité (748 mg ; rdt quantitatif). Ce produit a été mis en réaction sans purification.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) :

1.21 (ddd, 1H, 2ax), 1.88 (ddd, 1H, 2éq), 2.98 (s, 2H, CH₂ bras), 3.00 (m, 1H), 3.22-3.96 (m, 10H) 4.76 (d, 1H, J = 12.5 Hz, CH₂-Ar), 4.98 (d, 1H, J = 12.5 Hz, CH₂-Ar), 5.13 (d, 1H, J = 12.5 Hz, CH₂-Ar), 5.16 (d, 1H, 1'), 6.98 (d, 1H, NH), 7.25-7.38 (m, 14H, Ar et NH).

Composé 51



$C_{30}H_{56}Cl_4N_{10}O_{16}$: 954,63 g.mol⁻¹

Solide couleur saumon pâle

Le composé 50 (300 mg ; 0,223 mmol) est placé dans un bicol à -78°C surmonté d'un réfrigérant à -78°C . L'ammoniac gazeux est condensé (~60 mL), puis le sodium (120 mg ; 5,24 mmol ; 23,5 équ.) est ajouté par portions jusqu'à obtenir la solution bleu nuit. La couleur n'ayant persisté que pendant 15 min, le reste de sodium est ajouté (120 mg ; 5,24 mmol ; 23,5 équ.). La solution est agitée à -78°C pendant 3h15, puis elle est neutralisée très lentement à l'aide d'acide acétique glacial (0,644 mL ; 11,15 mmol ; 50 équ.) sous bonne agitation jusqu'à disparition de la coloration bleue. L'ammoniac est ensuite évaporé en laissant remonter la température lentement. Le solide obtenu est adsorbé sur silice afin d'être purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (dioxane / MeOH / NH_3 : 5 / 5 / 0,5 puis dioxane / H_2O / NH_3 5 / 5 / 0,5) pour donner un solide blanc. Ce dernier est alors dissout dans un peu d'acide chlorhydrique 1 M, la solution résultante est filtrée puis évaporée sous pression réduite pour conduire au produit tétrachlorhydraté (177 mg ; rdt : 83 %).

CCM : dioxane / H_2O / NH_3 5 / 5 / 0,5 ; révélateur : ninhydrine

R_f = 0,47

Point de fusion : Exp. : T dec.138°C

Pouvoir rotatoire :

Exp. : $[\alpha]_{589}^{20} + 27,5^{\circ}$ (c = 1 ; H_2O)

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : calibrage effectué avec le *tert*-butanol

1.66 (ddd, 1H, $J_{2\text{ax}-2\text{éq}} = J_{2\text{ax}-1} = J_{2\text{ax}-3} = 12.8$ Hz, 2ax), 2.30 (ddd, 1H, $J_{2\text{éq}-2\text{ax}} = 13.0$ Hz, $J_{2\text{éq}-1} = J_{2\text{éq}-3} = 4.3$ Hz, 2éq), 3.20 (s, 2H, CH₂ bras), 3.32 (dd, 1H, $J_{6'\text{ax}-6'\text{éq}} = J_{6'\text{ax}-5} = 10.7$ Hz, 6'ax), 3.44 (dd, 1H, $J_{6-5} = J_{6-1} = 10.0$ Hz, 6), 3.49 (m, 1H, 3), 3.59 (m, 2H, 6'éq et 2'), 3.66 (m, 2H, 5 et 1), 3.89 (dd, 1H, $J_{4-3} = J_{4-5} = 10.0$ Hz, 4), 4.18 (dd, 1H, $J_{4'-3'} = J_{4'-5'} = 9.4$ Hz, 4'), 4.26 (m, 2H, 3' et 5'), 5.87 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 3.8$ Hz, 1').

RMN ¹³C (125 MHz, D₂O) : calibrage effectué avec le *tert*-butanol

32.1 (2), 40.6 (CH₂ bras), 42.8 (6'), 49.6 (3), 50.5 (1), 54.2 (2'), 62.4 (5'), 66.8 (3'), 75.1 (6), 76.4 (5), 78.3 (4'), 80.1 (4), 97.6 (1'), 156.0 (C=O cyclique), 160.7 (C=O urée).

IR (film KBr) cm⁻¹ :

2900-3600 cm⁻¹ O-H ; N-H v

2750-2900 cm⁻¹ NH₂ v

1693 cm⁻¹ C=O v (cycle à 6) (amide I)

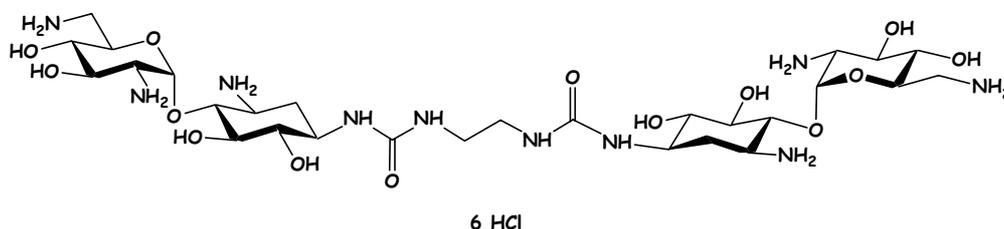
1620 cm⁻¹ C=O v (urée) (amide I)
 1488 cm⁻¹
 1400 cm⁻¹
 1214 cm⁻¹
 1053 cm⁻¹

Spectre de masse :

HRMS ES⁺ : [M + 2H⁺] 405.182 ppm ; simulation pour C₃₀H₅₄N₁₀O₁₆⁺⁺ 405.185 (le pic majoritaire)

HRMS ES⁺ : [M + H⁺] 809.365 ppm ; simulation pour C₃₀H₅₃N₁₀O₁₆⁺ 809.364 (pic minoritaire)

Composé 52



C₂₈H₆₂Cl₆N₁₀O₁₄ : 975,57 g.mol⁻¹
 Solide couleur crème

Le composé 51 (100 mg ; 0,105 mmol) est solubilisé dans l'eau (4 mL) avec la résine A26(HO⁻) (240 mg). Le mélange est agité doucement pendant 20 min à température ambiante. La solution est filtrée et récupérée dans un ballon. La résine est ensuite rincée avec de l'eau (5 mL) et du dioxane (5 mL). A la solution ainsi obtenue est ensuite ajouté Ba(OH)₂. 8H₂O (73 mg ; 0,23 mmol ; 2,2 éq.). Le mélange réactionnel est chauffé à 50 °C pendant 2h. Ba(OH)₂. 8H₂O (73 mg ; 0,230 mmol ; 2,2 éq.) et de l'eau (5 mL) sont ajoutés et le mélange réactionnel est chauffé à 50 °C pendant 2h. Un nouvel ajout de Ba(OH)₂. 8H₂O (73 mg ; 0,23 mmol ; 2,2 éq.) et d'eau (5 mL) est effectué et le mélange réactionnel est encore chauffé à 50 °C pendant 2h. Un dernier ajout identique aux précédents est effectué puis la réaction est poursuivie encore 2h30. Le mélange est refroidi à TA, du CO₂ est mis à buller, les sels de carbonate de baryum ainsi obtenus sont filtrés sur célite et rincés à l'aide d'un mélange dioxane / H₂O 1/1. Le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le brut réactionnel est alors purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (dioxane / H₂O / NH₃ : 6 / 4 / 1) pour donner un solide blanc. Ce dernier est alors solubilisé dans ce l'acide chlorhydrique 1M, trituré, la solution est filtrée sur papier puis évaporée sous pression réduite sans chauffer pour conduire au produit *hexa*-chlorohydraté jaune (76 mg ; 0,078 mmol ; rdt = 74 %).

CCM : dioxane / H₂O / NH₃ 6 / 4 / 1 ; révélateur : ninhydrine
 R_f = 0,15

Point de fusion : Exp. : T dec. 146°C

Pouvoir rotatoire :

Exp. : [α]₅₈₉²⁰ + 55,7° (c = 0,8 ; H₂O)

RMN ¹H (500 MHz, D₂O) :

1.69 (ddd, 1H, J_{2ax-2'éq} = J_{2ax-1} = J_{2ax-3} = 12.4 Hz, 2ax), 2.30 (ddd, 1H, J_{2'éq-2ax} = 12.8 Hz, J_{2'éq-1} = J_{2'éq-3} = 4.2 Hz, 2'éq), 3.20 (s, 2H, CH₂ bras), 3.30 (dd, 1H, J_{6'ax-6'éq} = 13.7 Hz, J_{6'ax-5'} = 6.8 Hz, 6'ax), 3.45 (dd, 1H, J₆₋₁ = J₆₋₅ = 9.9 Hz, 6), 3.46-3.52 (m, 4H, 2'. 4'. 3. 6'éq), 3.66 (m, 1H, 1), 3.68 (dd, 1H, J₅₋₄ = J₅₋₆ = 9.3 Hz, 5), 3.92 (dd, 1H, J₄₋₃ = J₄₋₅ = 9.5 Hz, 4), 4.00 (dd, 1H, J = 11.0 Hz, J = 9.1 Hz, 3'), 4.03 (m, 1H, 5'), 5.92 (d, 1H, J_{1'-2'} = 4.0 Hz, 1').

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) :

31.9 (2), 40.5 (CH₂ bras), 40.8 (6'), 49.5 (3), 50.3 (1), 54.2 (2'), 69.0 (3'), 69.7 (5'), 71.3 (4'), 75.0 (6), 76.5 (5), 79.2 (4), 96.7 (1'), 160.6 (C=O).

IR (film KBr) cm⁻¹ :

3140-3600 cm⁻¹ O-H ; N-H v

2800-3140 cm⁻¹ NH₂ v

1629 cm⁻¹ C=O v (urée) (amide I)

1564 cm⁻¹

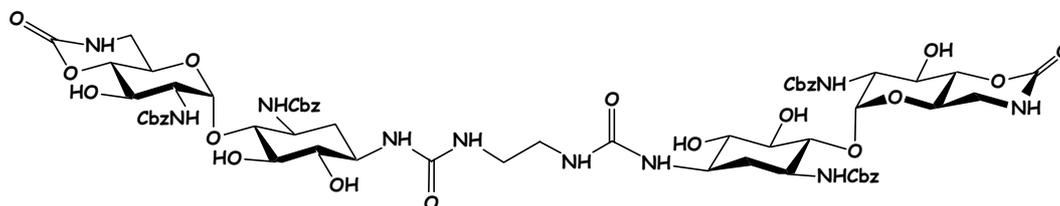
1494 cm⁻¹

1028 cm⁻¹

Spectre de masse :

HRMS ES+ : [M + H⁺] 757.4050 ppm ; simulation pour C₂₈H₅₇N₁₀O₁₄ 757.4050

Composé 50' obtenu par dimérisation du composé 14



C₆₂H₇₆N₁₀O₂₄ : 1345,32 g.mol⁻¹

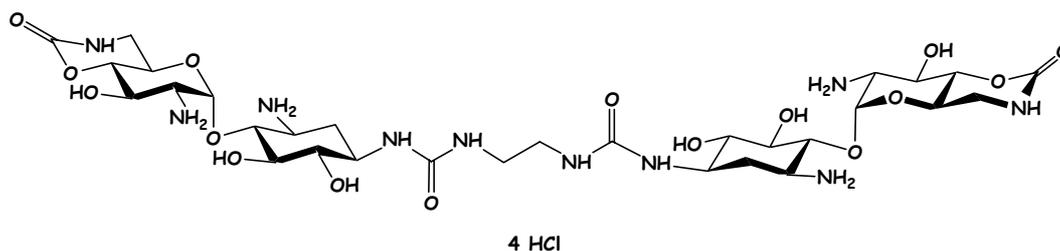
Solide blanc

Le composé 7 (200mg ; 0,31 mmol ; 2,2 éq.) est solubilisé dans du méthanol anhydre (15 mL). L'éthylène diamine fraîchement distillée (9 µL ; 0,14 mmol) est ajoutée, puis le mélange est agité à 50°C pendant 69 h. Un précipité blanc apparaît au bout de 17h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le solide obtenu n'est pas soluble dans le méthanol, l'acétone, des mélanges dioxane / H₂O ni dioxane / méthanol. Il est uniquement soluble dans le DMF et DMSO. Le produit brut est un solide blanc (157 mg ; rdt : 83 %).

CCM : AE / méthanol 4/1 ; révélateur : acide phosphomolybdique + Ce^{IV}

R_f = 0,67

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) : spectre identique à celui du composé 50 mais moins bien résolu

Composé 51' obtenu par réduction du composé 50'

$C_{30}H_{56}Cl_4N_{10}O_{16}$: 954,63 g.mol⁻¹

Solide blanc

Le composé 50' (129 mg ; 0,0959 mmol) est placé dans un bicol à $-78^{\circ}C$ surmonté d'un réfrigérant à $-78^{\circ}C$. L'ammoniac gazeux est condensé (~20 mL), puis du sodium (52 mg ; 2,25 mmol ; 23 éq.) est ajouté par portions jusqu'à obtenir la solution bleu nuit. La couleur n'a persisté que pendant 10 min. Le reste de sodium est ajouté (52 mg ; 2,25 mmol ; 23 éq.). La solution se décolore à nouveau rapidement, mais elle est agitée à $-78^{\circ}C$ pendant 2h30. La réaction est arrêtée par un ajout très lent d'acide acétique glacial (0,277 mL ; 4,79 mmol ; 50 éq.) sous bonne agitation. L'ammoniac est ensuite évaporé en laissant remonter la température lentement. Le solide obtenu est adsorbé sur silice afin d'être purifié par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (dioxane / MeOH / NH₃ : 5 / 5 / 0,5 puis dioxane / H₂O / NH₃ 5 / 5 / 0,5) pour donner un solide blanc. Ce dernier est alors dissout dans un peu d'acide chlorhydrique 1 M, la solution résultante est filtrée puis évaporée sous pression réduite pour conduire au produit tétrachlorhydraté (81 mg ; rdt : 89 %).

CCM : dioxane / H₂O / NH₃ 5 / 5 / 0,5 ; révélateur : ninhydrine

R_f = 0,47

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : spectre identique à celui du composé 51 mais moins bien résolu

°C	Degré Celsius	Hz	Hertz
2-DOS	2-désoxystreptamine	IBMC	Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire
Å	Angström	IR	Infra rouge
Ac	Acétate	J	Joule
AcOH	Acide acétique	Litt.	De la littérature
ADN	Acide désoxyribonucléique	CD₃OD	Méthanol deutérié
AE	Acétate d'éthyle	MeOH	Méthanol
Ar	Aromatique	mg	Milligramme
ARN	Acide ribonucléique	MHz	Mégahertz
ARNi	Mécanisme d'interférence	mL	millilitre
ARNm	ARN messenger	mmol	millimole
ARNmi	Micro-ARN	mn	minute
ARNr	ARN ribosomique	MS	Spectre de masse
ARNt	ARN de transfert	N-BND	N-(<i>t</i> -butoxycarbonyloxy)-5-norbornène-endo-2,3-dicarboximide
Boc	<i>ter</i> -butoxycarbonyloxy	NEt₃	Triéthylamine
Cbz	Carbobenzyloxy	NHS	N-hydroxysuccinimide
CCM	Chromatographie sur couche mince	OMS	Organisation Mondiale pour la Santé
CDCl₃	Chloroforme deutérié	OTf	Triflate
CH₂Cl₂	Dichlorométhane	ppm	partie par million
COSY	Expérience RMN montrant les corrélations ¹ H- ¹ H	py	Pyridine
D₂O	Eau deutériée	rdt.	rendement
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide	Rev	Nom de la protéine qui se fixe sur le RRE
DCU	Dicyclohexylurée	Rf	Rapport frontal
DIPEA	Diisopropyléthylamine	RMN	Résonance magnétique nucléaire
DIS	Dimerization Initiation Site	ROESY	Expérience RMN montrant les corrélations ¹ H- ¹ H à travers l'espace
DMAP	Diméthylaminopyridine	RRE	Rev Responsive Element
DME	Diméthoxyéthane	RX	Rayons X
DMF	Diméthylformamide	TA	Température ambiante
DMS	Diméthylsulfate	TAR	Tat-responsive element
DMSO	Diméthylsulfoxyde	Tat	Transactivator of transcription
Éq.	Équivalent	TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
ES+	Electrospray positif	TBS	<i>Ter</i> -butyldiméthylsilyle
et al.	Et alii	TES	Triéthylsilyle
Et₂O	Éther éthylique	THF	Tétrahydrofurane
Exp.	Expérimental	TIPS	Triisopropylsilyle
g	Gramme	TMP	1,1,3,3-tetraméthoxypropane
h	Heure	Ts	Tosyle
HMBC	Expérience RMN montrant les corrélations ¹ H- ¹³ C en courte distance	VIH	Virus d'Immunodéficience Humaine
HMQC	Expérience RMN montrant les corrélations ¹ H- ¹³ C en longue distance	VIS	Virus d'Immunodéficience Simien
HRMS	Spectre de masse haute résolution		