UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

THÈSE

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

« Synthèse d'analogues de substrats ou d'inhibiteurs d'enzymes de la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) pour la synthèse des isoprénoïdes »

Présentée par

Sarah PONAIRE

Soutenue le 1^{er} Octobre 2010 devant la commission d'examen

M. Philippe BISSERET	Rapporteur Externe
M. Joe CONNOLLY	Rapporteur Externe
Mme Catherine GROSDEMANGE-BILLIARD	Directrice de Thèse
M André MANN	Rapporteur Interne
M. Michel ROHMER	Membre invité

Contrairement à ce que je pensais, cette partie n'était pas la plus simple à rédiger, puisqu'il ne faut oublier personne. Je vais donc tenter de remercier toutes celles et ceux, et ils sont nombreux, sans qui cette thèse n'aurait pu être menée à son terme.

Au terme de ce travail, je tenais à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à l'ensemble des personnes qui m'ont soutenu :

Monsieurs les Docteurs Philippe Bisseret et André Mann ainsi que le Professeur Joe Connolly pour avoir eu la patience et la gentillesse d'attendre tout ce temps avant que je ne passe finalement ma thèse

Monsieur le Professeur Rohmer pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour sa formation scientifique et bien évidemment toutes ses histoires de fleurs et de cactus qui ont égaillé ces années de travail.

Madame le Docteur Catherine Grodemange - Billiard pour son aide, ses précieux conseils, sa gentillesse et ses petits coups de pied aux fesses.

Monsieur le Docteur Denis Tritsch pour son humour décalé et ses nombreux éclaircissements sur la partie biologique de ce travail.

A tous mes camarades et collègues du laboratoire, et plus spécialement à Catherine Zingle et Fonzy qui m'ont supportée au quotidien avant que mon chéri et Guizmo ne prennent le relais.

Un merci particulier au Docteur Mazen Hanbali qui a eu un rôle plus qu'important dans cette thèse mais également à mes amies de longues dates Dorothée et Marshall pour les franches parties de rigolades partagées qui m'ont permis de relâcher la pression.

Merci à ma famille et plus particulièrement à mes parents et à mon frère pour leur soutien sans lequel rien n'aurait été possible.

I. Les Microorganismes

I.1 Généralités

Les microorganismes sont des organismes vivants apparus il y a 3,8 milliards d'années. Ils font partie des premiers êtres vivants sur Terre et seraient donc nos ancêtres communs à tous. Invisibles à l'œil nu, leur observation détaillée n'a été possible que bien plus tard, au milieu du XXe siècle avec l'arrivée du microscope électronique.

On distingue différentes sortes de microorganismes. D'une part les procaryotes, ne possédant pas de noyau (ex : les bactéries et les Archaea) et d'autre part les eucaryotes, possédant un noyau (ex : les champignons comme les levures, et les deux types de protistes, algues unicellulaires et protozoaires.)



Candida albicans



Protozoaire

Plasmodium falciparum



Escherichia coli

Figure 1. Exemples de microorganismes.

Ces microorganismes sont présents dans tous types d'environnements naturels et colonisent tous les écosystèmes. Ils se retrouvent dans le sol, les eaux douces et les eaux marines, dans l'air, mais aussi dans des environnements plus hostiles tel que les pôles, les déserts, les geysers, le fond des océans. Dans ces derniers cas, ils sont qualifiés d'extrémophiles.

Ils ont une grande importance dans tous les écosystèmes de par leur capacité à dégrader ou synthétiser de la matière organique (comme dans le cycle du carbone lors de la décomposition de la fraction organique du sol.).

De plus, de nombreux microorganismes sont associés aux plantes ou aux animaux avec lesquels ils peuvent entretenir des relations de symbiose, de commensalisme ou de parasitisme.

Ils sont également très présents dans l'industrie et plus particulièrement dans le domaine agroalimentaire. Notons par exemple que la fabrication du pain nécessite l'utilisation d'un champignon microscopique *Saccharomyces cerevisiae*, communément appelé levure de bière, qui est responsable de la fermentation. Ce processus intervient également dans la fabrication du vin ou encore du champagne.

Mais tous les microorganismes ne sont pas « utiles » et certains peuvent même être pathogènes, c'est à dire entraîner une maladie chez les plantes ou les animaux.

I.2 Les microorganismes pathogènes

De nombreuses maladies sont d'origine microbienne et ont pour agent pathogène, une bactérie, un protozoaire ou encore un champignon.

Maladies causées par des bactéries :

La tuberculose est une des maladies les plus ravageuses puisqu'elle provoque la mort de plus de deux millions de personnes chaque année dans le monde¹. Elle est causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*. D'autres bactéries comme *Neisseria meningitidis, Mycobacterium leprae, Yersinia pestis* ou encore *Vibrio cholerae* sont respectivement responsables de la méningite, de la lèpre, de la peste et du choléra. Rappelons que la lèpre et la méningite font encore chacune plus de 500 000 morts par an.¹

Maladies causées par des protozoaires :

Les protozoaires sont également la cause de diverses maladies. Par exemple, le genre *Trypanosome* est à l'origine de la maladie du sommeil et dont l'agent vecteur est la mouche Tsé-Tsé. Un autre protozoaire très connu, le «*plasmodium* » est, lui, responsable du paludisme. Cette maladie est encore très présente de part le monde puisqu'elle tue toujours un enfant sur trois en Afrique et entre un et trois millions de personnes par an selon les estimations de l'OMS.

Maladies causées par des champignons :

Les champignons peuvent également être à l'origine de maladies chez l'homme ou les plantes. Ainsi, on regroupe sous le terme de "mycoses" les différentes manifestations de champignons microscopiques nuisibles à la santé de l'homme. Il en existe plusieurs types : depuis les mycoses dites superficielles, qui touchent la peau et/ou les ongles (levures du genre *Candida*), jusqu'aux mycoses dites systémiques qui peuvent toucher tous les autres tissus ou organes et qui sont souvent très graves (moisissure telle que *Aspergillus*), notamment chez les sujets immunodéprimés. Les plantes également peuvent être touchées. *Monilia fructicola* s'attaque à certains arbres fruitiers, tandis que *Cryphonectria parasitica* est impliqué dans le chancre du châtaignier.

Les microorganismes sont donc la cause de diverses maladies. Il est ainsi nécessaire de développer des moyens efficaces de lutte contre ces agents pathogènes.

I.3 Les moyens de lutte contre les microorganismes

La plupart des antibiotiques opèrent indirectement en bloquant la synthèse de divers composés cellulaires. Certains agissent sur la paroi bactérienne, alors que d'autres agissent en inhibant la synthèse des molécules intracellulaires de la bactérie, comme l'ADN, l'ARN, les ribosomes et les protéines En fonction de leur mode d'action, on distingue deux grandes catégories d'antibiotiques: ceux qui inhibent la croissance bactérienne (bactériostatiques) et ceux qui tuent les bactéries (bactéricides).

Sous l'appellation antibiotiques bactéricides, sont regroupées plusieurs familles de composés comme par exemple celle des bêtalactamines, des aminosides, ou encore celle des quinolones...

Les bêtalactamines inhibent la synthèse des peptidoglycanes - qui sont les principaux constituants de la paroi bactérienne - mais n'interfèrent pas avec la formation des composants intracellulaires. Cela a pour conséquence la rupture de la paroi bactérienne sous la pression osmotique de ses composants qui continuent à être fabriqués.

La famille des pénicillines fait aussi partie des antibiotiques bactéricides. L'Ampicilline (Figure 2) va par exemple inhiber l'activité des trans-peptidases responsables de la formation de la paroi bactérienne^{2,3}. D'autres molécules agissent sur la synthèse des précurseurs du peptidoglycane. Par exemple la fosfomycine (Figure 2) va bloquer la formation d'acide *N*-acétylmuramique, un des constituants du peptidoglycane, ce qui aura pour conséquence la mort de la bactérie.^{4,5}



Figure 2. Molécules bactéricides agissant sur la paroi bactérienne.

L'acide nalidixique, un antibiotique de la famille des quinolones (Figure 3), inhibe la synthèse de l'ADN gyrase, une enzyme intervenant dans la réplication et la réparation de l'ADN ou encore dans la transcription.



Quinolone acide nalidixique

Figure 3. Antibiotique bactéricide agissant sur la synthèse de l'ADN.

Les antibiotiques bactériostatiques, dont font partie les sulfamides, les tétracyclines, ou encore les macrolides..., ont des modes d'actions également très divers. En effet, les sulfamides, comme par exemple le sulfanilamide (Figure 4), empêchent la formation de l'ADN en inhibant la synthèse de l'acide folique, un des co-facteurs nécessaires à la biosynthèse de la thymine.⁶ Les macrolides, comme par exemple l'érythromycine, se lient aux ribosomes des bactéries et empêchent ainsi l'élongation de la chaîne peptidique (Figure 4).



Figure 4. Exemples d'antibiotiques bactériostatiques

Pour finir, une classe d'antibiotique jusqu'ici inconnue à été découverte par une équipe du laboratoire Merck en 2006. La recherche systématique de molécules antibactériennes parmi 250 000 extraits naturels de terres originaires du monde entier a été effectuée et à permis de découvrir la platensimycine dans un extrait de terre africaine.⁷ Les antibiotiques de cette nouvelle classe agissent en bloquant les enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras dont les bactéries ont besoin pour construire leurs membranes cellulaires. La platensimycine s'est révélée efficace contre des bactéries gram + et contre les *Staphylococcus aureus* multirésistants), responsables de redoutables infections nosocomiales.

De nos jours, beaucoup d'antibiotiques sont commercialisés, et leur utilisation excessive parfois inadaptée entraîne un phénomène de résistance.^{8,9} Pour pallier à ce problème, nous nous sommes intéressés à une cible jusqu'à présent peu exploitée pour la mise au point de nouveaux antibiotiques : les isoprénoïdes.

II. La biosynthèse des isoprénoïdes, une cible potentielle pour de nouveaux antibactériens

II.1 Les isoprénoïdes

Les isoprénoïdes constituent une classe importante de produits naturels.¹⁰ Leur squelette carboné est formellement constitué d'un assemblage de sous unités à 5 carbones et dérivés de l'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène) **1** (Figure 5). Présents chez tous les êtres vivants, ces isoprénoïdes possèdent des structures, des propriétés physiques et chimiques ainsi que des activités biologiques très diverses.



Figure 5. Exemples d'isoprénoïdes Isoprène 1, Thymol 2, Menthol 3, Myrcène 4, Sclaréol 5, Cholestérol 6, Ubiquinone 7, β-Carotène 8, Ménaquinones 9, Vitamine E 10

L'existence de ces motifs isopréniques a été envisagée pour la première fois en 1887 par Wallach. Ce dernier proposa le concept de condensations successives d'unités isopréniques de manière « tête à queue » qui conduisent à des composés chimiques à n fois cinq atomes de carbones.¹¹ Cet aspect a ensuite été développé en 1959 par Ruzicka qui proposa un concept appelé « règle isoprénique biogénétique » ou « règle de Ruzicka ».^{12,13} Ainsi tous les squelettes isopréniques peuvent être déduits en utilisant quelques règles en accord avec les réactions classiques de la chimie organique, comme par exemple la formation d'isoprénoïdes acycliques par condensation d'unité isoprénique en C₅, la formation de carbocations induisant la cyclisation de 1,5-polyènes et des réarrangements de type Wagner-Meerwein.

Le diphosphate d'isopentényle (IPP) **11** et le diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) **12** sont les équivalents biologiques de l'isoprène. Ils sont les précurseurs de tous les isoprénoïdes, et peuvent s'isomériser sous l'action d'une enzyme, l'IPP isomérase.¹⁴⁻¹⁷ La condensation du diphosphate d'isopentényle **11** (entité nucléophile) sur le diphosphate de diméthylallyle **12** (entité électrophile) mène au diphosphate de géranyle **13** (GPP, C₁₀), précurseur des monoterpènes (Figure 6). Une élongation supplémentaire du diphosphate de farnésyle avec une entité d'IPP, conduit au diphosphate de géranylgéranyle **15**, précurseur des diterpènes et des caroténoïdes. Une condensation "tête-à-tête" de deux molécules de diphosphate de farnésyle **14** aboutit au squalène **16** (C₃₀), précurseur des triterpènes, des stérols et des hopanoïdes (Figure 6).

L'élongation des chaînes prényles par l'addition d'une molécule d'IPP **11** est catalysée par des enzymes appelées prényles transférases.¹⁸ Ces précurseurs acycliques isopréniques peuvent subir différentes réactions chimiques (oxydation, cyclisation suivie de transposition), ce qui permet de dénombrer à ce jour plus de 22 000 isoprénoïdes.¹⁰

De nombreuses études sur la formation du diphosphate d'isopentényle **11** et du diphosphate de diméthylallyle **12**, principalement réalisées sur les tissus de foie, ont permis la découverte, dans les années 50, de la **voie du mévalonate** (voie du MVA).¹⁹⁻²² Elle a longtemps été considérée comme la seule et unique voie de biosynthèse des isoprénoïdes chez tous les organismes vivants. Cependant, durant ces deux dernières décennies, une voie alternative, indépendante de celle du mévalonate a été découverte chez plusieurs eubactéries, chez les algues et dans les chloroplastes des plantes supérieures, il s'agit de la voie du 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate plus communément appelée **voie du MEP**.



Figure 6. Biosynthèse des isoprénoïdes à partir du diphosphate d'isopentényle (IPP) 11

II.2 La voie du mévalonate

Depuis les années 50, la voie du mévalonate est décrite dans tous les ouvrages de biochimie.¹⁹⁻²² Elle a longtemps été acceptée par tous comme étant la seule voie de biosynthèse de tous les isoprénoïdes chez tous les êtres vivants.

Dans cette voie, trois molécules d'acétyl-CoA sont condensées successivement pour former le 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) **20** (Figure 7). Celui-ci est ensuite réduit en mévalonate **21** par l'HMG-CoA réductase. Cette étape est l'étape clé de cette voie de biosynthèse des isoprénoïdes puisque l'enzyme y joue, chez les animaux, un rôle de régulation. Le mévalonate ainsi formé est ensuite phosphorylé à deux reprises : une première fois par la mévalonate kinase pour former le composé **22** puis par la phosphomévalonate kinase pour conduire au diphosphate de mévalonate **23**. La décarboxylation par la diphosphomévalonate décarboxylase, conduit à l'IPP qui est convertit en son isomère le DMAPP grâce à l'IPP isomérase.



Figure 7. Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle **11** selon la voie du mévalonate: i. Acétoacétyl-CoA thiolase; ii. HMGCoA synthase; iii. HMGCoA réductase; iv. Mévalonate kinase; v. Mévalonate 5-phosphate kinase; vi. Mévalonate 5-diphosphate décarboxylase; vii. IPP isomérase

Bien que cette voie de biosynthèse des isoprénoïdes ait été universellement acceptée pour tous les organismes vivants pendant plusieurs années, des résultats non attendus ont été obtenus en faisant des expériences d'incorporation d'acétate ou de mévalonate marqué au ¹⁴C chez certaines bactéries.^{23,24} En effet, la localisation de la radioactivité était en contradiction avec celle qui aurait du être observée. L'existence d'une voie alternative à la voie du mévalonate a été suggérée dans les années quatre vingt. C'est l'équipe du Professeur Michel Rohmer qui découvrit la première étape réactionnelle de la voie alternative à celle du mévalonate pour la formation de l'IPP et du DMAPP.²⁵

II.3 Voie alternative au mévalonate : voie du MEP

La première étape de cette nouvelle voie de biosynthèse est la formation du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate **26** (DXP) par condensation du pyruvate **24** et du D-glycéraldéhyde 3phosphate **25**, catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) (Figure 8). Un réarrangement intramoléculaire suivi d'une réduction conduit au 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate **27** (MEP). Ce dernier est ensuite converti en 4-diphosphocytidyl-2-*C*-méthylérythritol **28**, puis phosphorylé pour former le 4-diphosphocytidyl-2-*C*-méthylérythritol 2-phosphate **29**. Cette molécule est ensuite cyclisée en 2-*C*-méthylérythritol 2,4-cyclodiphosphate **30** avec élimination de cytidine monophosphate (CMP). Récemment le (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl 1-diphosphate **31** (HMBPP) a été caractérisé comme le dernier intermédiaire de la voie de biosynthèse de l'IPP. Ce dernier précurseur conduit soit au diphosphate d'isopentényle **11**, soit au diphosphate de diméthylallyle **12**. Toutes ces réactions constituent la voie de biosynthèse des isoprénoïdes selon le MEP.²⁶⁻³³



Figure 8. Biosynthèse du diphosphate d'isopentényle **11** et du diphosphate de diméthylallyle **12** selon la voie du 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate²⁷.

II.4 Distribution des voies du MVA et du MEP

Malgré la découverte plutôt récente de la voie du MEP, la distribution des deux voies de biosynthèse des unités isopréniques est clairement délimitée. La voie du mévalonate intervient dans la biosynthèse des isoprénoïdes chez les animaux, les champignons, les végétaux (cytoplasme), quelques eubactéries et les archébactéries.²⁴

La voie du MEP est présente chez la plupart des bactéries, aussi bien chez les bactéries Gram-positives que chez les bactéries Gram-négatives. Quelques procaryotes appartenant au genre *Streptomyces* possèdent cependant les deux voies.^{34,35} Dans ce cas, la voie du MEP est exprimée durant la phase de croissance exponentielle et intervient pour la biosynthèse de métabolites essentiels comme la chaîne prénylée des dérivés de la ménaquinone, tandis que la voie du MVA est utilisée pendant la phase stationnaire pour la biosynthèse de la partie isoprénique de certains antibiotiques

Chez les végétaux et un certain nombre d'algues, elle est uniquement localisée dans les chloroplastes.³⁶ Elle est aussi présente chez un certain nombre d'organismes non phototrophes, mais phylogénétiquement très proches des algues unicellulaires, comme le parasite responsable de la malaria, *Plasmodium falciparum.*³⁷

Comme nous venons de le voir, de nombreux organismes pathogènes ou opportunistes comme les bactéries responsables de la tuberculose, de la lèpre et également les protozoaires responsables du paludisme, possèdent la voie de biosynthèse des isoprénoïdes selon la voie du MEP. Dans une période où la résistance aux antibiotiques et aux agents antiparasitaires devient un problème de plus en plus sérieux, il est important de pouvoir définir de nouvelles cibles pour lutter contre ces agents pathogènes. Comme l'homme ne possède pas la voie du MEP, toutes les enzymes de cette voie sont des cibles pour des inhibiteurs.

II.5 Inhibiteurs de la voie du MEP

Bien que la découverte de la voie du MEP soit relativement récente, plusieurs publications sur des inhibiteurs de cette voie sont déjà recensées.

II.5.1. Inhibiteurs de la DXS

II.5.1.1 Généralités :

La formation du DXP est catalysée par une enzyme appelée 1-désoxy-D-xylulose 5phosphate synthase ou DXS, découverte pour la première fois chez *E. coli*. Le gène *dxs* codant pour cette enzyme a été cloné, surexprimé, et la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase a été purifiée et caractérisé.^{38,39} Chez *E. coli*, cette protéine se présente sous la forme d'un homodimère formé de deux sous-unités. Lors de cette étape, la DXS catalyse la condensation de l'hydroxyéthylidènethiamine, obtenue par la décarboxylation du pyruvate pour conduire au 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP).

II.5.1.2 Inhibiteurs :

Plusieurs inhibiteurs de la DXS sont déjà connus :

cs Le fluoropyruvate **32** (Figure 9) inhibe les DXS d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* avec respectivement des IC₅₀ de 80 μ M et de 400 μ M, en se liant de manière covalente au site actif de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase.⁴⁰

cs La 5-kétoclomazone **33** (Figure 9) qui est un produit du métabolisme de la clomazone (herbicide), inhibe la DXS de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, avec une IC_{50} d'environ 0,1 mM, alors que la clomazone n'a pas d'effet.⁴¹



Figure 9. Inhibiteurs de la DXS de la voie du MEP

La DXS n'est cependant pas une enzyme de choix pour la synthèse d'inhibiteur de la voie du MEP puisque ses substrats sont impliqués dans plusieurs voies de biosynthèse. Par contre elle est intéressante s'il s'agit de synthétiser des herbicides.

II.5.2. Inhibiteurs de la DXR

II.5.2.1. Généralités :

La 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase (DXR) est une réductoisomérase. Il s'agit d'une enzyme qui nécessite la présence d'un cation Mn^{2+} ou Mg^{2+} ainsi que du NADPH lors de la catalyse de la deuxième étape de la voie du MEP. Bien que la découverte de cette voie soit encore assez récente, des inhibiteurs de la DXR ont déjà été décris dans la littérature. Le mécanisme d'isomérisation a fait l'objet de plusieurs publications car deux hypothèses étaient envisagées. La première de ces hypothèses impliquait un réarrangement concerté de type α -cétol alors qu'une deuxième hypothèse soutenait qu'il s'agissait plutôt d'un réarrangement de type rétro-aldol/aldol. Des publications récentes ont définitivement mis fin à cette polémique en prouvant que ce dernier mécanisme est mis en jeu lors de la catalyse enzymatique.^{42,43}

II.5.2.2. Inhibiteurs :

Il existe différents types d'inhibiteurs de la DXP, que l'on peut classer de la façon suivante :

- ✓ Tout d'abord, les inhibiteurs analogues du DXP, substrat naturel de la DXR.
- \checkmark Puis les analogues de la fosmidomycine, inhibiteur le plus connu de la DXR.

Les analogues du DXP :

Cos Deux analogues du DXP 34, 35 (Figure 10), ne possédant pas de fonction hydroxyle soit en C₃ soit en C₄, ont été synthétisés au laboratoire et ont montré une activité inhibitrice mixte et réversible avec des Ki de respectivement (Ki = 800 μ M) et (Ki = 120 μ M).⁴⁴



Figure 10. Inhibiteurs analogues du DXP

Cos Deux analogues monofluorés en position C3 et C4 du DXP ont été synthétisés et testés sur la DXR d'*E. coli.*⁴⁵ Les résultats observés montrent que ces composés se comportent comme des inhibiteurs non compétitifs de la DXR avec des constantes d'inhibitions de 444 μ M pour le composé **36** et 733 μ M pour le composé **37** (Figure 11).



Figure 11. Inhibiteurs fluorés de la DXR.

CSI En 2004, l'équipe de P.J. Proteau publie la synthèse d'analogues du DXP portant soit un carbone supplémentaire soit une fonction amide, ou encore un diastéréoisomère du DXP.⁴⁶ Tous ces composés ont été testés sur une DXR de *Synechocystis* PCC6903, et se comportent comme des inhibiteurs compétitifs faibles avec des valeurs de Ki de 30 μ M pour **38**, 150 μ M pour **39** et 180 μ M pour **40** (Figure 12).



Figure 12. Inhibiteurs de la DXR synthétisés par le groupe de P. J. Proteau.

CSI En 2005, le groupe de D. Poulter décrit la synthèse de plusieurs analogues du DXP.⁴⁷ Chez ces analogues, le groupement cétone est remplacé par un acide, un amide, un ester, un alcool, une amine ou encore un hydroxamate (Figure 13). Ces analogues se sont

avérés être de mauvais inhibiteurs de la DXR dont les IC₅₀ sont compris entre 253 μ M pour le composé **39** et plus de 5 mM pour les composés **43** et **42** (Figure 13).



Figure 13. Inhibiteurs de la DXR synthétisés par D. Poulter.

Les analogues de la fosmidomycine :

Cos La fosmidomycine **46** (Figure 14) est un antibiotique découvert par les laboratoires de recherche Fujisawa⁴⁸ qui possède une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-négatives et quelques bactéries Gram-positive. Sa faible toxicité envers les animaux ainsi que son efficacité sur des souris infectées lui ont permis de passer au stade de tests cliniques.⁴⁹ Les bactéries utilisant la voie du mévalonate se sont montrées résistantes alors qu'une baisse des quantités d'ubiquinone et de ménaquinone a été observée chez *E. coli* et qu'une diminution des caroténoïdes est observé chez *Micrococcus luteus*.⁵⁰ Ces données ont permis de démontrer que la fosmidomycine est un inhibiteur de la synthèse des isoprénoïdes. Lorsque les enzymes ont été disponibles, il a été montré que la fosmidomycine est inhibiteur de type slow tight-binding de la DXR chez *E. coli*^{51,52} et un inhibiteur compétitif de l'enzyme provenant de *Zymomonas mobilis* (Ki = 0,6 μ M).⁵³





CS Le FR-900098 **47** (Figure 15) est un analogue de type méthylcétone de la fosmidomycine. Tous deux inhibent de manière dose dépendante la DXR du *Plasmodium falciparum*, le parasite responsable du paludisme.³⁷ Ils sont donc de puissants anti-paludéens potentiels. Un autre analogue, le FR-33289,⁵⁰possédant un groupement hydroxyle **48** (Figure 15) est également connu.

ß



Figure 15. Analogues méthylé et hydroxylé de la fosmidomycine

CS En 2005, M.C. Viaud-Massuard et *al.* synthétisent différents analogues de la fosmidomycine dont la partie hydroxamate est incluse dans un cycle.⁵⁴ Ces molécules inhibent l'accumulation de l'ajmalicine, un alcaloïde monoterpénoïde indolique produit par *Catharanthus roseus*, la pervenche de Madagascar. Deux d'entre eux les composés **49**, **50** (Figure 16) se sont montrés de meilleurs inhibiteurs que la fosmidomycine en inhibant totalement l'accumulation d'alcaloïdes à une concentration de 100 μ M.

CS



Figure 16. Analogues cycliques de la fosmidomycine.

C3 La même année, le laboratoire de R. J. Cox, synthétise plusieurs fragments de la fosmidomycine ainsi que des dérivés cycliques de celle-ci (Figure 17).⁵⁵ Les résultats

d'inhibition sur la DXR obtenus avec ces analogues, sont peu probants. Toutefois, cette étude a permis de montrer que l'ancrage de la fosmidomycine (la molécule entière) dans le site actif de l'enzyme induit une réorganisation du site actif rendant difficile des études de docking.



Figure 17. Analogues de la fosmidomycine.

CS Toujours en 2005, notre laboratoire publie la synthèse d'analogues de la fosmidomycine, **55 et 56** où la pince hydroxamate est inversée (Figure 18) Ces composés sont quasiment aussi efficaces que la fosmidomycine sur la DXR d'*E. coli*. De plus le composé N-méthylé **55** est actif sur des souches d'*E. coli* résistantes à la fosmidomycine.⁵⁶



Figure 18. Analogues de la fosmidomycine avec une fonction hydroxamate inversée

CS En 2006, V. Devreux *et al.* synthétisent différents analogues de la fosmidomycine, à mobilité conformationnelle réduite.⁵⁷ Le composé **57** (IC₅₀ = 0,050 μ M) (Figure 19.) possède un pouvoir inhibiteur comparable à celui de la fosmidomycine (IC₅₀ = 0,048 μ M) sur la DXR d'*E. coli* ainsi que sur la croissance de *P. falciparum*.



Figure 19. Analogue cyclopropanique de la fosmidomycine

CS Toujours en 2006, l'équipe de S. Van Calenbergh synthétise une série d'analogues de la fosmidomycine substitués en α du phosphonate par un groupement aryle substitué.⁵⁸ Le meilleur d'entre eux, le composé **58** (Figure 20), présente une IC₅₀ de 0,059 μ M, très voisine de celle de la fosmidomycine (IC₅₀ = 0,030 μ M) sur la DXR d'*E. coli*.



Figure 20. Analogue de la fosmidomycine substitués en α du phosphonate par un groupement aryle

Cette même année, le laboratoire de J. Proteau met au point la synthèse de la fosfoxacine **59**, l'analogue phosphate de la fosmidomycine, ainsi que de son dérivé acétylé **60** (Figure 21).⁵⁹ Ces deux molécules s'avèrent être *in vitro* de meilleurs inhibiteurs de la DXR de *Synechocystis* que la fosmidomycine (Ki = 0,057 μ M) avec des Ki de respectivement 0,057 μ M et 0,002 μ M.



Figure 21. Analogues phosphate de la fosmidomycine.

CS En 2007 l'équipe de S. Van Calenbergh synthétise plusieurs analogues de la fosmidomycine **61**, **62**, **63** substitués en position α par différents aryles fonctionnalisés par différents groupements (Figure 22). Un de ces analogues, possédant en α un groupement 4-cyanophényle est aussi bon inhibiteur (IC₅₀ = 0,054 µM) que la fosmidomycine sur la DXR d'*E*.*coli*.⁶⁰



Ar: (4-CF₃)Ph; (4-CN)Ph; (4-CONH₂)Ph; thien-2-yl; thien-3-yl; (3-NH₂)Ph; (4-NH₂)Ph

Figure 22. Analogues de la fosmidomycine possédant un groupement aryle différemment substitué.

CS Toujours en 2007, le même laboratoire, décrit la synthèse d'analogues du FR900098, substitués par un aryle en position α du phosphore et insaturés (*E* et *Z*) en positions α et β (Figure 23).⁶¹ Mais les évaluations biologiques réalisées sur la DXR d'*E. coli* indiquent que tous les composés synthétisés ont un IC₅₀ bien inférieur à celui de la fosmidomycine.



R= (3-NO₂)Ph, (4-NO₂)Ph, 2-thienyl, 3-thienyl, (4-CN)Ph, (3,4-Cl₂)Ph

Figure 23. Analogues de la fosmidomycine substitués en α du phosphonate et possédant une insaturation

En 2008, le laboratoire du professeur Schlitzer met au point la synthèse de plusieurs analogues de la fosmidomycine (Figure 24).⁶² Cette publication montre entre autre l'importance de la présence de charges négatives lors de la liaison entre l'inhibiteur et la DXR. Ainsi, l'échange du groupement phosphonate par un sulfonamide non chargé résulte en une perte quasi-totale de l'activité inhibitrice.



Figure 24. Analogue sulfonamide de la fosmidomycine

cs Enfin en 2010, notre laboratoire publie la synthèse de dérivés de la fosmidomycine (Figure 25) qui présentent des modifications au niveau du point d'ancrage

(remplacement du phosphonate par un sulfonate), et de la longueur de l'espaceur. Tous ces composés ont été testés *in vitro* sur la DXR d'*Escherichia coli*.⁶³

Lorsque la longueur de la chaîne carbonée est soit plus courte (en C_3) ou soit plus longue, (en C_5), le pouvoir inhibiteur de ces composés est mauvais comparé à celui correspondant aux dérivés de la fosmidomycine en C_4 , **55** et **56**. De même le remplacement d'un groupement *N*méthylé (composé **55**) par un groupement *N*-éthylé **71** n'améliore pas les propriétés inhibitrices de ces dérivées. Lorsque le point d'ancrage (phosphonate) est remplacé par un sulfonate (**74**, **75**) ou un carboxylate (**72**, **73**) les résultats se sont avérés décevants, ces molécules possèdent des IC₅₀ de l'ordre du millimolaire. Ces résultats ont pu mettre en évidence l'importance de la longueur de la chaîne carbonée mais également de la nature du point d'ancrage.



Figure 25. Analogue de la fosmidomycine

Tous les inhibiteurs de la DXR décrits précédemment, même les plus efficaces, ont un point commun, ils portent un phosphonate libre, ce qui réduit leur biodisponibilité. En effet un phosphonate libre est polaire et rend donc le passage de la paroi membranaire très difficile. Un moyen souvent utilisé pour résoudre ce type de problème est l'utilisation de prodrogues.

III. Les Prodrogues

III.1. Généralités.

Beaucoup de molécules actives d'un point de vu thérapeutique ont une utilisation clinique très limitée. En effet, bien que leurs effets thérapeutiques aient été prouvés *in vitro* et *in vivo* sur différentes cellules, plusieurs obstacles les empêchent d'être utilisés cliniquement. Ces barrières peuvent prendre différentes formes.⁶⁴

• La Barrière pharmaceutique:

On appelle barrière pharmaceutique, l'ensemble des inconvénients liés à la solubilité, la stabilité chimique mais également au goût ou à l'odeur de ces molécules.

• Barrière pharmacodynamique :

On appelle barrière pharmacodynamique l'ensemble des problèmes posés par la molécule active dans l'organisme, comme par exemple : des effets secondaires indésirables ou encore la toxicité.

• Barrière pharmacocinétique,

Le terme "barrière pharmacocinétique" regroupe tous les problèmes posés par le devenir de la molécule dans l'organisme avant son arrivée vers sa "cible" :

Pour une absorption orale, le premier problème rencontré est le métabolisme présystémique : En effet, l'absorption orale d'un médicament implique son passage par la salive (neutre à légèrement acide), puis par la gorge (relativement neutre) avant son arrivée dans l'estomac (très acide, pH = 2 à 5). Par la suite, il arrive dans l'intestin et finalement c'est au niveau de l'intestin grêle qu'il sera prit en charge par le système sanguin après absorption intestinale. La molécule active est ensuite transportée par la veine porte jusqu'au foie avant d'atteindre la circulation systémique. Le principe actif doit donc faire face à des conditions très rudes, il est donc possible qu'il subisse une métabolisation présystémique avant de pouvoir atteindre la circulation générale.

Un autre problème rencontré peut être la trop courte durée d'action de la molécule ou encore une distribution défavorable de la molécule dans l'organisme lui empêchant d'atteindre sa cible dans l'organisme.

. • Considération commerciale : exemple des "Me-too drugs " :

Il s'agit de molécules actives structurellement très similaires à une autre molécule parente reconnue comme active et déjà sur le marché. Il s'agit pour ces "Me-too" d'exploiter les opportunités de marché créées par la première. Si la molécule mère représente souvent une innovation par rapport aux thérapeutiques existantes, les déclinaisons chimiques qui suivent n'apportent pour la plupart qu'une amélioration limitée qui ne peut être qualifiée d'innovation. On peut cependant noter que leur mise sur le marché génère une compétition au niveau du produit ce qui implique une baisse des prix.

Voici quelques exemples de "Me-too drugs " ainsi que de leurs molécules parentes :

* Par exemple, le Nexium [®] (AstraZeneca), un médicament récemment approuvé pour l'ulcère, est une modification du Prilosec [®], qui doit perdre prochainement son brevet (Figure 26).⁶⁵



Le Nexium[®] (me-too drug)

La molécule parente : le Prilosec[®].

Figure 26. Le Nexium et sa molécule parente : le Prilosec.

* Clarinex[®], un anti-allergique, est une reformulation de la Claritin[®] (Figure 27).



Clarinex[®] (me-too drug) La molécule parente : la Claritin[®]

Figure 27. Le Clarinex et sa molécule parente : La Claritin.

* Le Sarafem[®], un antidépresseur est le même médicament que le Prozac[®] mais il a été renommé et présenté sous forme de comprimés rose et lavande (Figure 28).



Sarafem[®] (me-too drug)

La molécule parente : Le Prozac[®]

Figure 28. Le Sarafem[®] et sa molécule parente : Le Prozac[®].

La recherche consacre donc une grande place à la mise au point de méthodes visant à améliorer les bénéfices thérapeutiques de ces molécules, tout en réduisant voir en éliminant leurs effets indésirables. Parfois, une formulation adéquate permet de surmonter ces inconvénients, mais souvent, une modification chimique de la molécule active est nécessaire pour corriger ces effets.

L'utilisation de prodrogues, est une approche utilisant des dérivés réversibles des molécules actives afin d'optimiser leur application thérapeutique d'un point de vu clinique. Cette approche est née au début des années soixante dix et depuis, de nombreuses prodrogues ont été conçues et développées afin de pallier aux différents problèmes freinant leur utilisation clinique.

Le terme "prodrogue " a été introduit pour la première fois par Albert en 1950. Il désigne alors « un dérivé chimique pharmacologiquement inactif qui pourrait être utilisé pour altérer momentanément les propriétés physico-chimiques du médicament de manière à en accroître l'utilité et à en réduire la toxicité ».⁶⁶ Durant les années qui suivirent, ces composés ont également été appelés «médicament en latence= latentiated drugs » ou encore « dérivés bioréversibles » ou même « congénères » ; aujourd'hui, le terme « prodrogues » reste cependant le terme le plus communément accepté .⁶⁷

De nos jours, le terme "prodrogues" (IUPAC) est défini comme « Tout composé qui subit une biotransformation avant d'exposer ses effets pharmacologiques ». Les prodrogues peuvent donc être considérées comme des médicaments contenant des groupements protecteurs non toxiques spéciaux et utilisés de manière transitoire dans le but de modifier ou d'éliminer les propriétés indésirables de la molécule mère.⁶⁸

Le professeur Wermuth, a classifié les prodrogues en deux grandes catégories : les "carrier-linked prodrugs " et les bioprécurseurs.⁶⁹

III.2. Les "Carrier-linked prodrugs"

Les "carrier-linked prodrugs" s'obtiennent en liant une molécule active à un groupement temporaire (appelé "transporteur"). Cette réaction modifie les propriétés physicochimiques de la molécule et lui permet de surmonter les barrières l'empêchant d'être utilisé cliniquement. La prodrogue formée est moins active que sa molécule parente, voir même inactive. C'est la séparation entre les deux parties qui va libérer la molécule active (Figure 29).



Figure 29. Formation de "carrier linker prodrugs" et libération in vivo de son principe

actif.

Cette séparation doit se faire très rapidement et le groupement temporaire ne doit pas être toxique. Les "carrier-linked prodrugs" peuvent se classer en trois sous classes ⁷⁰:

III.2.1. Les "bipartates prodrugs":

Les biparties sont des prodrogues à deux partenaires comprenant une molécule active et un transporteur (Figure 30).



Figure 30. Prodrogue "bipartate"

C'est le cas par exemple de la prédnisolone **77**, un anti-inflammatoire de la famille des corticostéroïdes. Cette molécule est employée pour traiter les oedèmes d'origine allergiques, les maladies du tissu conjonctif, l'asthme ou encore les maladies inflammatoires de l'œil. Du fait de sa faible solubilité dans l'eau, c'est en fait sa prodrogue (le prédnisolone succinate de sodium **76**) qui est utilisé dans les préparations injectables ou en utilisation ophtalmologique (Figure 31).



Figure 31. Exemple d'une "bipartate prodrugs", le prédnisolone succinate de sodium

III.2.2 Les "tripartates prodrugs" :

Ce sont des prodrogues à trois partenaires. Dans ce cas le transporteur est lié à un espaceur lui-même lié à la molécule active. Cette technique permet une plus grande flexibilité au niveau du choix des groupements fonctionnels et des sites d'accroches pouvant être utilisés. Cela permet également de déplacer le site de clivage loin du transporteur. L'espaceur et la molécule active doivent se séparer spontanément après le clivage du transporteur (Figure 32).



Figure 32. Prodrogue "tripartate"

C'est le cas de la bacampicilline **78**, prodrogue de l'ampicilline dont l'espaceur est indiqué en bleu et le transporteur en rose dans la Figure ci-dessous (Figure 33). L'ampicilline **79** est un antibiotique à large spectre de la famille des pénicillines. Elle a largement été utilisée pour traiter les infections bactériennes depuis 1961. L'ampicilline inhibe la synthèse des parois cellulaires chez de nombreuses bactéries à Gram-négatif et Gram-positif.



Figure 33. Libération de l'Ampicilline à partir de sa prodrogue.

Pour libérer l'ampicilline à partir de sa prodrogue, l'estérase coupe le carbonate ce qui permet la formation d'un ester d'hémicétal et d'éthanol Grâce à une réaction intramoléculaire spontanée avec formation d'éthanal, l'ampicilline est libérée.

III.2.3. Les "Mutuals prodrugs":

Il s'agit de prodrogues "biparties" ou des "triparties". La différence avec ces deux catégories de prodrogues se fait au niveau du transporteur utilisé. Dans le cas des "mutuals prodrugs" le transporteur n'est pas une molécule inerte mais une autre molécule active qui agit en synergie avec la première (Figure 34).⁷¹



Figure 34. "Mutual prodrugs"

C'est le cas de la sultamicilline (Unacim[®]) **80**, un antibiotique combinant ampicilline **82** sulbactame **81** (Figure 35).⁷² Cette association permet de réduire considérablement le problème de faible absorption orale de ces deux molécules prises séparément. La sultamicilline est facilement absorbée (biodisponibilité de 80%) dans le tube digestif puis rapidement hydrolysée pour libérer en concentration équimolaire l'ampicilline et le sulbactame. Ce dernier est un inhibiteur semi-synthétique de bêta-lactamase, sa combinaison avec l'ampicilline étend l'activité antibactérienne de ces deux molécules à des bêta-lactamases jusqu'alors résistantes.





III.3. Les bioprécurseurs:

Les bioprécurseurs constituent la seconde grande classe de prodrogues. Ce sont des prodrogues qui ne nécessitent pas de transporteur mais une modification moléculaire du principe actif lui-même. Cette modification génère un nouveau complexe, capable de se transformer métaboliquement ou chimiquement pour régénérer le principe actif.

Les bioprécurseurs doivent satisfaire à plusieurs conditions :

* Ils subissent une modification chimique du principe actif sans ajout de transporteur.

* Le composé modifié, inactif, est substrat des enzymes du métabolisme.

* Le métabolite principal obtenu est le principe actif lui-même.

* Les réactions métaboliques peuvent exclusivement être des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse.

Un exemple connu de bioprécurseur est le sulindac (Arthrocine[®]) **83**.⁷³ Il s'agit d'un anti-inflammatoire non stéroïdien dérivé de l'acide aryl-carboxylique utilisé pour traiter des douleurs légères comme des maux de tête, des douleurs dentaires, etc... Le sulindac lui-même n'a aucun effet, c'est son métabolite, le thiométhyle sulindac **84** qui lui va permettre de réduire la production de prostaglandines impliquées dans le processus de la douleur et de la fièvre par inhibition des enzymes cyclo-oxygénases. Un second métabolite, le sulindac sulfone **85** est également formé mais reste totalement inactif (Figure 36)



Figure 36. Métabolites du Sulindac

III.4 Quelques prodrogues connues déjà sur le marché

Ce paragraphe présente quelques exemples de prodrogues de différentes familles. Toutes les molécules présentées ci-dessous sont déjà sur le marché.

III.4.1. Antalgiques, anti-inflammatoires :

1./ Le Prodafalgan[®] 86 (= proparacétamol) :

Le Prodafalgan[®] **86** est un bioprécurseur dont la fonction phénol du paracétamol **87** est estérifiée par un acide acétique portant une amine tertiaire ce qui rend la molécule plus hydrophile et permet d'en faire une préparation injectable (Figure 37). Par la suite, la fonction ester sera facilement hydrolysée par des estérases plasmiques, et le paracétamol sera libéré dès la fin de l'administration. Le paracétamol est le médicament le plus vendu en France ; il a une action antalgique et antipyrétique. Son mode d'action n'est pas encore bien connu, mais des études montrent qu'il agit en réduisant la production de prostaglandines.



Figure 37. Formation du paracétamol à partir de sa prodrogue.

2./ Le Dynastat[®] **88** (= parécoxib):

Le Dynastat[®] **88** ou parécoxib est une prodrogue bipartie qui après hydrolyse libère le valdécoxib **89** ou valdécoxib, un anti-inflammatoire non stéroïdien appartenant à la classe des inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase de type 2 (COX-2) (Figure 38). Le Dynastat[®] a pour indication le traitement, à court terme et en milieu hospitalier, des douleurs post-opératoires. Le Bextra[®] (= valdécoxib) n'est pas commercialisé en France, mais il est disponible dans certains états européens.



Figure 38. Formation du Bextra ® à partir de sa prodrogue, le Dynastat ®

III. 4.2. Antiépileptiques

1./ La Prodilantine [®] 90 (= fosphénytoïne):

La Prodilantine[®] **90** est la prodrogue, soluble dans l'eau, d'un anticonvulsant, la phénytoïne **91** (Figure **39**). Cette prodrogue est exclusivement utilisée pour le traitement et la prévention des crises d'épilepsie. La phénytoïne, une fois libérée par hydrolyse, va inhiber le flux de sodium à travers la membrane des cellules neuronales afin de ralentir l'amplitude et la rapidité de la dépolarisation, réduisant l'excitabilité et la conduction. Cette hydrolyse libère du phosphate ainsi que du formaldéhyde en plus de la phénytoïne (Figure **39**).



Figure 39. Libération de la phénytoïne par hydrolyse du prodilantine [®]

2./ Le Trileptal[®] **92** (= oxcarbazépine) :

Le Trileptal[®] **92** est un anticonvulsant utilisé dans les crises partielles d'épilepsie chez les enfants de 4 à 16 ans. Il s'agit d'un bioprécurseur qui subit un processus de réduction au niveau des enzymes du foie et libère le 10-hydroxy-carbazepine **93**, métabolite actif (Figure 40). Le mécanisme d'action n'est pas encore bien connu.



Figure 40. Le trileptal[®] et son métabolite actif.

III.4.3. Antiviraux :

1./ Le Tamiflu[®] 94 (= oseltamivir) :

Le Tamiflu[®] **94**, un antiviral commercialisé par la multinationale suisse, Roche. Ce médicament devenu célèbre, ces dernières années,⁷⁴ pourrait constituer une parade médicamenteuse efficace, à titre curatif ou préventif contre "la grippe de poulet" en inhibant sélectivement les neuraminidases du virus de la grippe. Le phosphate d'oseltamivir est la prodrogue du métabolite actif, le carboxylate d'oseltamivir **95** qui est généralement administrée avec l'ajout d'un phosphate. Après une hydrolyse au niveau du foie, il libère le carboxylate d'oseltamivir, le produit actif (Figure 41).



Figure 41. Formation du métabolite actif du Tamiflu[®]

2./ L' Oravir[®] 96 (=famciclovir):

L'Oravir[®] **96** est une prodrogue du penciclovir **97**, un analogue nucléosidique doté d'une puissante activité contre certains herpès virus, (herpès labial, génital, zona) inhibant leur ADN polymérase.⁷⁵ Le penciclovir n'est pas encore la forme active de la molécule, elle doit encore subir une triple phosphorylation grâce à une enzyme virale, la thymidine-kinase. Le penciclovir est mal absorbé par le tube digestif, sa prodrogue, le famciclovir a donc été mis au point. Après son administration orale, le famciclovir est métabolisé en penciclovir au niveau de l'intestin puis du foie (Figure 42).



Figure 42. Libération du penciclovir

III.4.4. Agent chimiothérapique : Le Xeloda[®] (= capécitabine) et le Tegafur[®].

Le Xeloda[®] **98** (= capécitabine) et le Tegafur[®] **99** sont des agents cytotoxiques, c'est-àdire des médicaments qui bloquent la croissance des cellules tumorales pour finir par les détruire. Après leur administration par voie orale, ces deux prodrogues sont métabolisées dans l'organisme en 5-fluorouracile (5-FU) **100**, le produit actif, qui est ensuite lui-même métabolisé en plusieurs métabolites actifs ou inactifs (Figure 42). L'activation de la capécitabine en 5-FU comporte trois étapes enzymatiques et celle du Tegafur[®] une seule (Figure 43). Le 5-FU libéré, agit en s'incorporant à la place de l'uracile dans la biosynthèse de l'ARN et de l'ADN qu'il perturbe. Par ailleurs un de ses métabolites (le 5-dFUMP), en présence d'acide folique, inhibe la thymidylate synthase et la formation de thymidine nécessaire à la constitution de l'ADN "normal".



Figure 43. Libération de 5-FU à partir de deux prodrogues différentes.

III.4.5. Pneumologie

1./ L'Alvesco[®] **101** (=ciclésomide)

L'Alvesco[®] **101** est une prodrogue de type bipartate de la famille des corticostéroïdes utilisée dans le traitement de l'asthme. Une fois inhalé, le ciclésomide est converti par des estérases pulmonaires en son produit actif **102** (Figure 44). Après son activation, il se lie aux récepteurs des glucocorticoïdes des poumons pour exercer une activité anti-inflammatoire locale cent fois plus importante que sa molécule parente. Comme sa transformation ne peut se faire qu'au niveau des poumons, les effets indésirables systémiques et oro-pharyngés sont réduits.



Figure 44. Libération du principe actif du ciclésomide par une estérase.

IV. Objectif de la thèse

Au laboratoire, plusieurs inhibiteurs de la DXR ont déjà été synthétisés et ont montré des activités inhibitrices *in vitro* très voisine de celle de la fosmidomycine (analogues hydroxamate **55 et 56** de la fosmidomycine **46**). De plus *in vivo*, l'un d'entre eux (R= Me) (Figure 45) est actif sur une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine.



Figure 45. Fosmidomycine et analogues hydroxamate synthétisés au laboratoire.

Cependant, comme pour cette dernière, leur biodisponibilité reste assez modérée en raison de leur faible lipophilie. Afin d'améliorer leur lipophilie et donc leur biodisponibilité, nous avons décidé de synthétiser ces molécules sous forme de prodrogues (Figure 46). L'ajout de groupements acyloxyalkylesters sur le phosphonate devrait permettre de rendre la molécule plus lipophile et faciliter ainsi son passage au travers de la membrane. Nous avons décidé de reprendre le chemin réactionnel, partant du bromoester commercial **104**, déjà utilisé pour la synthèse des inhibiteurs **55**, **56** afin de réaliser la synthèse de nos prodrogues **103**.



Figure 46. Schéma rétrosynthétique pour la formation des différentes prodrogues.

La seconde partie de ce chapitre sera consacrée à la caractérisation des propriétés biologiques des prodrogues synthétisées. Nous avons d'une part testé ces prodrogues sur *Mycobacterium smegmatis* mais nous avons également effectué des tests *in vivo* sur des cellules de tabac, les BY2.
Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un analogue du MEP, le 2-2-*C*-méthyl-D-érythritol-4-*O*-yl-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphinin-2-oxides (plus communément appelé c*yclo*sal-méthylérythritol phosphate **105**) où le phosphate présent sur le MEP est remplacé par un phosphotriester. La présence d'un tel groupement sur le phosphate devrait le rendre lipophile et lui permettre de traverser la barrière membranaire (Figure 47).



Figure 47. Rétrosynthèse du cyclosal-méthylérythritol phosphate

Parallèlement nous avons également choisi de synthétiser le MEP sous forme de « prodrogue » où le *cyclos*al serait remplacé par un ester de pivaloyloxy-*t*-butyle (Figure 48), que nous avons déjà utilisé pour la synthèse de nos prodrogues.



Figure 48. Synthèse du bis (pivaloyloxy-*t*-butyl ester)-méthylérythritol phosphate.

La troisième partie de ces travaux a été consacrée à la synthèse de petites molécules hautement fonctionnalisées et plus particulièrement à la synthèse de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP), substrat naturel des aldolases. Ces biocatalyseurs permettent la formation de liaisons C-C stéréospécifiques entre la DHAP et n'importe quel aldéhyde. Toutefois, le coût élevé et l'instabilité de cette molécule limitent son utilisation en synthèse organique. Nous avons donc cherché à synthétiser un précurseur stable de la DHAP où les fonctions alcools et phosphate porterait le même groupement protecteur. Une seule étape de déprotection serait donc nécessaire et régénérerait la DHAP juste avant son utilisation (Figure 49).



Figure 49. Synthèse de la DHAP

L'étape clé de cette synthèse est l'ouverture de l'époxy-alcool par le dibenzyle phosphate (Figure **49**). Une étude méthodologique basée sur l'utilisation de différents acides de Lewis a été réalisée pour permettre d'accéder au produit d'ouverture avec un rendement optimisé. Le précurseur stable de la DHAP est ensuite facilement obtenu après oxydation de l'alcool secondaire. Une simple déprotection des groupements benzyles sans purification additionnelle permet alors l'accès a la DHAP.

Dans cette dernière partie, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'une autre molécule hautement fonctionnalisée, le L-glycéraldéhyde phosphate (L-GAP) (Figure 50). Cet aldéhyde est l'énantiomère du substrat naturel de la DXS, enzyme catalysant la formation du désoxyxylulose phosphate à partir du D-GAP et du pyruvate. La synthèse du L-GAP permettra de discuter de la stéréosélectivité de l'enzyme vis-à-vis ces deux énantiomères.



Figure 50. Synthèse du L-GAP.

Deux stratégies ont été envisagées : la première est l'ouverture du glycidol dont la fonction alcool est protégée par un groupement PMB, par le dibenzylphosphate. Dans la seconde voie, le groupement phosphate est inséré sur la fonction hydroxyle du glycidol avant son ouverture en milieu aqueux (Figure 50).

- (1) <u>http://www.pasteur.fr</u>.
- (2) Blumberg, P. M.; Strominger, J. L. Bacteriol. Rev. 1974, 38, 291.
- (3) Page, M. I. Acc. Chem. Res. 1984, 17, 144-151.

(4) Hendlin, D.; Stapley, E. O.; Jackson, M.; Wallick, H.; Miller, A. K.; Wolf, F. J.; Miller, T. W.; Chaiet, L.; Kahan, F. M.; Foltz, E. L.; Woodruff, H. B.; Mata, J. M.; Hernandez, S.; Mochales, S. *Science* **1969**, *166*, 122.

- (5) Osborne, M. J. Annu. Rev. Biochem. **1969**, *38*, 501.
- (6) Chu, E. J.-H. J. Am. Chem. Soc. **1945**, 67, 2243.
- (7) Wang, J. *Nature* **2006**, *44*, 358.

(8) Trouiller, P.; Olliaro, P.; Torreele, E.; Orbinski, J.; Laing, R.; Ford, N. *Lancet* **2002**, *359*, 2188.

(9) Neu, H. C. *Science* **1992**, *257*, 1064.

(10) Connolly, J. D.; Hill, R. A. *Dictionary of terpenoids*. **1992**, New-York: Chapmann and Hall.

- (11) Wallach, O. Liebigs Ann. Chem. 1887, 239, 1.
- (12) Ruzika, L.; Eschenmoser, A.; Heusser, H. Experientia 1953, 9, 357.
- (13) Ruzika, L. Proc. Chem. Soc. 1959, 341-360.

(14) Agranoff, B. W.; Eggerer, H.; Henning, U.; Lynen, F. J. Am. Chem. Soc. **1959**, *81*, 1254.

(15) Agranoff, B. W.; Eggerer, H.; Henning, U.; Lynen, F. J. Biol. Chem. **1960**, 235, 326.

(16) Clifford, K.; Cornforth, J. W.; Mallaby, R.; Philipps, G. T. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1971, 1599.

(17) RamosValdivia, A. C.; vanderHeijden, R.; Verpoorte, R. *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 591.

(18) Ogura, K.; Koyama, T. Chem. Rev. **1998**, *4*, 1263.

(19) Spurgeon, S. L.; Porter, J. W. *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds (Porter, J. W. and Spurgeon, S. L., Eds), New York: Wiley* **1981**, *1*, 1.

(20) Qureshi, N.; Porter, J. W. *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds (Porter, J. W. and Spurgeon, S. L., Eds), New York: Wiley* **1981**, *1*, 47.

(21) Bloch, K. Steroids **1992**, 57, 378.

(22) Bochar, D. A.; Friesen, J. A.; Stauffacher, C. V.; Rodwell, V. W. *Comprehensive Natural Product Chemistry, Isoprenoid Carotenoids and Steroid (Cane, D. E., Ed.) Oxford: Pergamon* **1999**, *2*, 15.

(23) Bach, T. J. *Lipids* **1995**, *30*, 191-202.

(24) Rohmer, M. Comprehensive Natural Product Chemistry, Isoprenoid Carotenoids and Steroid (Cane, D. E., Ed.) Oxford: Pergamon **1999**, 2, 45.

(25) Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahm, H. *Biochem. J.* **1993**, 295, 517.

(26) Rohmer, M.; Seemann, M.; Horbach, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. J. Am. Chem. Soc. **1996**, *118*, 2564.

(27) Sprenger, G. A.; Schorken, U.; Wiegert, T.; Grolle, S.; de Graaf, A. A.; Taylor, S. V.; Begley, T. P.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 12857.

(28) Lois, L. M.; Campos, N.; Putra, S. R.; Danielsen, K.; Rohmer, M.; Boronat, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2105.

(29) Kuzuyama, T.; Takahashi, S.; Watanabe, H.; Seto, H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4509.

(30) Rohmer, M. Nat. Prod. Rep. 1999, 16, 565.

(31) Rohdich, F.; Kis, K.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 535.

(32) Eisenreich, W.; Rohdich, F.; Bacher, A. *Trends Plant. Sci.* 2001, 6, 78.

(33) Rohmer, M.; Seemann, M.; Grosdemange-Billiard, C. *Biopolymers* 2001, 2, 49.

(34) Seto, H.; Watanabe, H.; Furihata, K. Tetrahedron Lett. 1996, 37, 7979.

(35) Seto, H.; Orihara, N.; Furihata, K. Tetrahedron Lett. 1998, 39, 9497.

(36) Lichtenthaler, H. K.; Schwender, J.; Disch, A.; Rohmer, M. FEBS. Lett. 1997, 400, 271.

(37) Jomaa, H.; Wiesner, J.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Weidemeyer, C.; Hintz, M.; Turbachova, I.; Eberl, M.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H. K.; Soldati, D.; Beck, E. *Science* **1999**, *285*, 1573.

(38) Sprenger, G. A.; Schorken, U.; Wiegert, T.; Grolle, S.; de Graaf, A. A.; Taylor, S. V.; Begley, T. P.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 12857.

(39) Lois, L. M.; Campos, N.; Putra, S. R.; Danielsen, K.; Rohmer, M.; Boronat, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 2105.

(40) Altincicek, B.; Hintz, M.; Sanderbrand, S.; Wiesner, J.; Beck, E.; Jomaa, H. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *190*, 329.

(41) Mueller, C.; Schwender, J.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H. K. *Biochem Soc Trans* **2000**, *28*, 792.

(42) Wong, U.; Cox, R. J. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2007, 46, 4926.

(43) Munos, J. W.; Pu, X.; Mansoorabadi, S. O.; Kim, H. J.; Liu, H. W. J. Am. Chem. Soc. **2009**, *131*, 2048.

(44) Hoeffler, J. F.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4446.

(45) Wong, A.; Munos, J. W.; Devasthali, V.; Johnson, K. A.; Liu, H. W. Org. Lett. **2004**, *6*, 3625.

(46) Phaosiri, C.; Proteau, P. J. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 14, 5309.

(47) Walker, J. R.; Poulter, C. D. J. Org. Chem. 2005, 70, 9955.

(48) Okuhara, M.; Kuroda, Y.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1980**, *33*, 24.

(49) Mine, Y.; Kamimura, T.; Nonoyama, S.; Nishida, M.; Goto, S.; Kuwahara, S. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1980**, *33*, 36.

(50) Shigi, Y. J. Antimicrob. Chemother **1989**, 24, 131-145.

(51) Koppisch, A. T.; Fox, D. T.; Blagg, B. S.; Poulter, C. D. *Biochemistry* **2002**, *41*, 236.

(52) Zingle, C.; Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. J. Org. Chem. 2010, 75, 3203.

(53) Grolle, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. FEMS Microbiol. Lett. 2000, 191, 131.

(54) Mincheva, Z.; Courtois, M.; Andreu, F.; Rideau, M.; Viaud-Massuard, M. C. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1797.

(55) Merckle, L.; de Andres-Gomez, A.; Dick, B.; Cox, R. J.; Godfrey, C. R. *Chembiochem.* **2005**, *6*, 1866.

(56) Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Hemmerlin, A.; Willem, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 127.

(57) Devreux, V.; Wiesner, J.; Goeman, J. L.; Van der Eycken, J.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2656

(58) Van Calenbergh, S. Verh K Acad Geneeskd Belg 2006, 68, 223.

(59) Woo, Y. H.; Fernandes, R. P.; Proteau, P. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2375.

(60) Devreux, V.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Rozenski, J.; Van der Eycken, J.; Van Calenbergh, S. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3783.

(61) Devreux, V.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Van der Eycken, J.; Van Calenbergh, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4920.

(62) Perruchon, J.; Ortmann, R.; Altenkamper, M.; Silber, K.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Klebe, G.; Schlitzer, M. *Chem.Med.Chem.* **2008**, *3*, 1232.

(63) Zingle, C.; Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. J. Org. Chem., 75, 3203.

- (64) Han, H. K.; Amidon, G. L. A.A.P.S. PharmSci. 2000, 2, 6.
- (65) <u>http://stanmed.stanford.edu/2005summer/drugs-metoo.html</u>.
- (66) Albert, A. *Nature* **1958**, *182*, 421.
- (67) Stanczak, A.; Ferra, A. Pharmacol. Rep. 2006, 58, 599.
- (68) IUPAC Pure & Appl. Chem. 1998, 70, 1129.
- (69) Wermuth Academic Press, London **1984**, 47.
- (70) Carl J. Med. Chem. 1981, 24, 479.
- (71) Wise, R. Journal of antimicrobial chemotherapy **1981**, 503.
- (72) Lode, H.; Hampel, B.; Bruckner, G.; Koeppe, P. APMIS Suppl 1989, 5, 17.
- (73) Duggan, D. E. Drug. Metab. Rev. 1981, 12, 325.

(74) Ward, P.; Small, I.; Smith, J.; Suter, P.; Dutkowski, R. J. Antimicrob. Chemother. **2005**, 55 Suppl 1, i5.

(75) Reusser, P. Schweiz. Med. Wochenschr. 2000, 130, 101.

Synthèse de prodrogues, dérivées de la fosmidomycine

I. Introduction.

La désoxyxylulose phosphate réducto-isomérase (DXR) est la seconde enzyme intervenant dans la biosynthèse des isoprénoïdes selon la voie du MEP. Elle permet une catalyse du réarrangement du DXP ainsi qu'une réduction concomitante de l'aldéhyde intermédiaire formé pour donner le MEP.^{1,2} Cette enzyme requiert impérativement la présence d'un cation divalent tel que Mn²⁺, Mg²⁺ ou encore Co²⁺. En effet, au cours de cette étape, le substrat, le DXP, se fixe sur le métal avant que le réarrangement intra-moléculaire ait lieu, puis la réduction de l'aldéhyde intermédiaire est réalisée par le NADPH cofacteur de la réaction.

Différents inhibiteurs de la DXR dérivés de la fosmidomycine **46** et de son analogue *N*-méthylé, le FR-900098 **47** ont déjà été synthétisés au laboratoire. Ces analogues diffèrent au niveau de la pince chélatante. En effet sur la fosmidomycine et le FR-900098, cette pince est représentée par la fonction (*N*-formyl-*N*-hydroxyl)amine (aussi appelée rétrohydroxamate) alors que, dans les dérivés synthétisés dans notre laboratoire, cette pince est matérialisée par la fonction hydroxamate (Figure 51).



Figure 51. Inhibiteurs de référence et analogues hydroxamates synthétisés au laboratoire.

Des essais enzymatiques ont montré que les molécules **55** et **56** sont de bons inhibiteurs de la DXR d'*E. coli.* Leurs IC₅₀ sont comparables à celui de la fosmidomycine (32 nM) avec respectivement des valeurs de 48 nM et 170 nM. De plus *in vivo*, l'un d'entre eux (**55**) s'est montré actif sur une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine.³

Les acides phosphoniques sont des acides forts, ce qui fait que, à pH physiologique, les phosphonates ne se présentent que sous forme déprotonée. C'est donc cette faible lipophilie qui rend le passage de la membrane cellulaire plus difficile et diminue leur biodisponibilité en l'absence d'un transporteur (comme par exemple chez les mycobactéries). Afin de contrer ce problème, nous avons décidé de synthétiser des prodrogues.

Par définition, les prodrogues sont des molécules inactives obtenues par dérivations chimiques du principe actif qu'elles doivent libérer par action chimique ou/et enzymatique à l'endroit où elles vont agir. Une prodrogue est destinée à l'usage thérapeutique. Pour que s'exerce une activité pharmacologique, elle doit subir une bio-transformation, après son administration à un organisme. Une prodrogue peut s'obtenir en liant une molécule active (dans notre cas, l'inhibiteur synthétisé) à un groupement temporaire, ce qui donne une nouvelle molécule, non chargée, moins active que la 'drogue' d'origine, ou même inactive. La séparation doit se faire très vite et le groupement temporaire ne doit avoir, par lui-même, ni action pharmacologique, ni toxicité (Figure 52).



Figure 52. Diffusion d'une prodrogue au travers de la membrane plasmique.⁴ (Carsten, S. ; *Bioorg. Med. Chem*, 2003, 11, 885)

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nombreuses situations nécessitent le recours aux prodrogues: passer de la forme soluté à la forme comprimé ou inversement, masquer une odeur ou une saveur, résister au milieu stomacal, aux enzymes hépatiques, passer la barrière intestinale, cutanée ou hématoencéphalique, obtenir un effet retard.

Le cas qui nous intéresse est celui des prodrogues de phosphonates. Plusieurs groupements ont déjà été utilisés avec succès sur des phosphonates et forme des molécules plus active que leurs molécules parents.⁵⁻⁸

Parmi les différentes possibilités de protection du phosphonate libre, nous avons choisi les groupements acyloxyalkylester. En effet, la libération des groupements acyloxyalkylester pour donner l'acide phosphonique se fait en deux étapes.⁵ La première se fait grâce à des carboxyestérases non spécifiques qui coupent de manière enzymatique un des deux esters. Le

phosphonate monoprotégé formé devient ainsi plus réactif ce qui induit une libération spontanée de formaldéhyde suivant le schéma ci-dessous. Ces deux étapes sont ensuite reproduites afin d'obtenir le phosphonate libre (Figure 53).



Figure 53. Mécanisme de libération du phosphonate à partir d'acyloxyalkylester.⁹ (Krise, J. P., Stella, V. *J. Advanced Drug Delivery Reviews* **1996**, *19*, 287).)

Déjà en 1965 Jansen et Russell utilisaient ces groupements acyloxyalkylester pour masquer la fonction acide carboxylique de la pénicilline.¹⁰ Ainsi la pivampicilline, médicament bien assis sur le marché, possède le groupement pivaloyloxyméthyle.

En 2003, Schlitzer *et coll*. ont décrit la synthèse du bis(acyloxyalkyl)-ester correspondant au FR-900098,¹¹ prodrogue possédant de très bonnes qualités de libération de l'antibiotique et donc de biodisponibilité.

Dans la littérature, deux approches sont décrites pour introduire des groupements acyloxyalkylester sur les hydroxyles du phosphonate. La première consiste en un alkylation du phosphonate libre par un dérivé halogéné. Différents exemples de prodrogues ont été réalisés grâce à cette méthode (Figure 54).¹²⁻¹⁶



Figure 54. Formation de prodrogues à partir du phosphonate libre.

La seconde méthode de formation de telles prodrogues est l'utilisation d'un dichlorophosphonate sur lequel on réalise une substitution nucléophile par addition d'un alcool (Figure 55).^{13,15,17-24}



Figure 55. Formation de prodrogue de phosphonate à partir de dichlorophosphonate.

Différents groupements acyloxyalkylester ont été choisis pour la synthèse des prodrogues des deux inhibiteurs hydroxamates **55** et **56**. Le groupement acyloxytertbutylester (Figure 56, groupement A), a été sélectionné parce qu'il a donné les meilleurs résultats lors des tests de biodisponibilité sur les prodrogues de la fosmidomycine et du FR-900098. Le second, l'acyloxypropylester (Figure 56, groupement B), sera introduit pour évaluer l'influence d'une chaîne aliphatique, moins rigide, en α de l'ester. Enfin le groupement,

l'acyloxyphénylester (groupement C, Figure 56) nous permettra d'étudier les effets de la présence d'un groupement aromatique.



Figure 56. Groupements acyloxyalkyl/aryl méthylester choisis pour masquer un groupement phosphonate.

II. Synthèse.

Les deux étapes importantes de la synthèse sont la formation de la fonction hydroxamate, mais surtout celle de l'introduction des deux groupements acyloxyalkyl/aryl ester.

Lors de la synthèse des inhibiteurs **55** et **56** (Figure 51) L. Kuntz avait obtenu l'hydroxamate désiré en deux étapes à partir de l'ester éthylique. En effet, après introduction du phosphonate, hydrolyse de l'ester et la condensation du chlorhydrate d'hydroxylamine mène au composé **108** (Figure 57, voie **A**). Or d'après la littérature,²⁵ il est possible de synthétiser cet hydroxamate en une seule étape, en partant du même ester éthylique permettant ainsi de diminuer le nombre d'étapes. (Figure 57, voie **B**).



i : (EtO)₂P(O)H, NaH, THF, 84 % ; ii : BnONH₂.HCl, LiHMDS, THF, -78°C, 69 %.

Figure **57**. Formation de l'hydroxamate

Nous avons choisi comme produit de départ un bromoester, le 4-bromobutyrate d'éthyle, qui possède, d'une part, une fonction ester qui pourra être transformée en

hydroxamate et d'autre part, le brome pouvant être substitué par un anion phosphite et ainsi former le phosphonate (Figure 57).

La première étape de cette synthèse est l'introduction du groupement phosphonate. La réaction de l'hydrure de sodium sur le diéthylphosphite conduit à l'anion correspondant, qui réagit avec le 4-bromobutyrate d'éthyle pour donner le phosphonate désiré avec 84 % de rendement (Figure 58). L'addition/élimination de l'anion de l'hydroxylamine protégée sur le composé **106** est réalisée en présence de cinq équivalents de LiHMDS. Le premier équivalent de base sert à libérer l'amine de son chlorhydrate, le second à former l'amidure, et trois autres équivalents servant à déprotoner les protons acides de l'hydroxamate formé afin de déplacer l'équilibre. L'hydroxamate **108** désiré est obtenu dans ces conditions avec un rendement de 65 %. La réaction de méthylation de l'amine secondaire s'est révélée assez délicate puisque l'utilisation d'hydrure de sodium comme base a entraîné une dégradation du produit de départ. Cet hydrure est probablement capable de réagir avec les protons en α des fonctions esters, provoquant ainsi des réactions parasites qui dégradent le composé. Nous avons donc utilisé une base moins réactive, le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU). L'utilisation de cette base et de l'iodure de méthyle conduit au produit *N*-méthylé **109** avec un rendement de 58 %.

L'introduction des groupements acyloxyalkyl/aryl ester est obtenue en une réaction « one pot ». La déprotection des groupements éthyles du phosphonate avec du TMSBr (110, 111), suivie d'une substitution nucléophile sur un chloroacyloxyalkylester permet d'obtenir la prodrogue protégée. Cette réaction « one pot » donne des rendements différents suivant que les composés sont soit *N*-méthylé ou non. En effet, la formation des trois prodrogues méthylées 119, 121 et 123, est réalisée avec des rendements de 39 à 45 % selon le substituant R . La formation des trois autres prodrogues non méthylé 118, 120 et 122, a posé plus de problèmes puisque les rendements obtenus sont beaucoup plus faibles et compris entre 21 % et 35 % selon le substituant R.



 $\label{eq:holosoft} \begin{array}{l} i:BnONH_2.HCl, LiHMDS, THF, -78^\circ\text{C}, 69~\%.\\ ii:DBU, MeI, THF, 58~\%; iii:1) TMSBr, CH_2Cl_2, 0^\circ\text{C} puis TA; 2) H_2O, THF; iv: chloroacyloxyalkyl/aryl ester, TEA, DMF, 70^\circ\text{C}, 33~\%; v:H_2, Pd/C, EtOH, 99~\%\\ \end{array}$

Figure 58. Synthèse des prodrogues 118 à 123

Finalement, la déprotection du groupement benzyles se fait par hydrogénolyse catalytique avec du palladium sur charbon et conduit quantitativement et sans aucune purification, aux prodrogues, **118**, **119**, **120**, **121**, **122**, **123**.

Nous avons donc synthétisé six prodrogues. Trois d'entre elles correspondent au dérivé acide phosphonohydroxamique (**118, 120** et **122**). Les trois autres correspondent au dérivé *N*-méthylé (**119, 121** et **123**) (Figure 59).



Figure 59. Récapitulatif des six prodrogues synthétisées.

Afin déterminer l'incidence de l'utilisation de ces prodrogues sur le passage au travers de la paroi membranaire, ces molécules seront testées d'une part sur des cellules de tabac et d'autre part sur des cellules de *Mycobacterium smegmatis*.

III. Tests biologiques

III.1. Tests sur des cellules de tabac, BY-2

III.1.1. Principe du test.

Les plantes supérieures utilisent les deux voies de biosynthèse des isoprénoïdes, mais ces voies sont localisées dans différents compartiments cellulaires. Ainsi la voie du mévalonate est cytoplasmique alors que celle du MEP est plastidiale. Cette compartimentation des deux voies n'est cependant pas stricte, et des échanges (« cross talk ») ont été mis en évidence grâce à l'utilisation combinée de précurseurs marqués au ¹³C et d'inhibiteurs spécifiques de chacune des deux voies (Figure 60).²⁶⁻²⁹



HMGR, 3-Hydoxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase; DXS, 1-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase; DXR, 1-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase; IDS, Isopentényl diphosphate / diméthylallyl diphosphate synthase; IDI, isopentényl diphosphate isomérase; GPS, Géranylgéranyl diphosphate synthase; Acétyl-CoA, Acétyl-Coenzyme A; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A; MVA, Mévalonate; IPP, Isopentényl diphosphate; DMAPP, Diméthylallyl diphosphate; GPP, Géranyl diphosphate; FPP, Farnésyl diphosphate; GGPP, Géranylgéranyl diphosphate; MEP, 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate.

Figure **60** : Compartimentation des deux voies de biosynthèse des isoprénoïdes dans les plantes supérieures avec le « cross talk » entre les différents compartiments.

Dans une culture de cellules de tabac Bright-Yellow-2, lorsque la voie du mévalonate est inhibée par la mévinoline (inhibiteur connu de cette voie) les isoprénoïdes sont essentiellement synthétisés selon la voie du MEP.³⁰

Ces cellules de tabac BY-2 ont été choisies comme matériel végétal, car leur cycle cellulaire est particulièrement court.^{31,32} Elles sont donc métaboliquement très actives. L'équipe du Pr. Thomas Bach a très récemment mis au point une technique qui peut nous permettre de tester nos prodrogues sur une culture de cellule BY-2.³³ Elle repose entre autres sur le fait que seule la voie du MEP est utilisée pour la biosynthèse des unités isopréniques destinés à la prénylation des protéines (Figure 60).

Pour mettre au point cette technique, il a fallu construire un outil expérimental permettant de visualiser, dans les cellules végétales, l'isoprénylation d'une protéine chimère. L'outil biologique de travail choisi a été la « Green Fluorescent Protein » (GFP) qui est une protéine fluorescente de couleur verte, provenant d'une petite méduse du Pacific Nord,

*Aequorea victoria.*³⁴ La protéine chimère désirée a été obtenue par fusion de la GFP avec la séquence responsable de la prénylation d'une protéine végétale naturelle. Cette prénylation se traduit par un changement de localisation intracellulaire (Figures 61).³⁵



Figure **61**. Fusion de la protéine et de la GFP pour la construction d'un outil biologique

En effet, les travaux réalisés au laboratoire du Pr Bach ont démontré que les protéines chimères prénylées ainsi obtenues (farnésylée ou géranylgéranylée) se retrouvent dans la membrane plasmique, alors que lors de l'inhibition de cette prénylation, par des inhibiteurs de la voie du MEP, l'accumulation se fait dans le noyau et plus particulièrement dans le nucléole (Figure 62).³²



Figure 62. Localisation de la protéine chimère dans la cellule avec/sans présence d'un inhibiteur de la voie du mévalonate et nos inhibiteurs de la voie MEP sous forme de prodrogues.

Ainsi, si les prodrogues synthétisées sont efficaces, la prénylation de la protéine ne doit pas avoir lieu. La visualisation au microscope confocal des protéines chimères fluorescentes dans le noyau de la cellule permettra de confirmer cette inhibition.

Voici ce que nous observons grâce au microscope confocal lors de la prénylation de la molécule chimère (Figure 63, gauche) et lorsque qu'il n'y a pas prénylation (Figure 63, droite) (photographies réalisées par Michael Hartmann, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS).





Figure **63** : A gauche : Accumulation dans la membrane plasmique de la protéine chimère isoprénylée. A droite, inhibition de la prénylation et accumulation dans le noyau.

III.1.2 Résultats obtenus avec les prodrogues synthétisées

La fosmidomycine **46** ainsi que ses analogues hydroxamates **55** et **56** ont précédemment fait l'objet de tests à différentes concentrations, sur les cellules BY2 (Figure 64). Les images obtenues grâce au microscope confocal montrent qu'à 100 μ M la fosmidomycine et l'analogue *N*-méthylé **55** sont de bons inhibiteurs, puisque la grande majorité des protéines fluorescentes se retrouve dans le noyau. L'analogue **56** est moins performant, puisque la protéine chimère se retrouve aussi bien dans la membrane que dans le noyau.(Figure64).



Figure 64 : Cellules de tabac BY-2 exprimant une protéine prénylable fluorescente. Images obtenues avec un microscope confocal en présence de fosmidomycine, ainsi que les deux analogues 55 et 56 à 50 μ M : Blocage de la prénylation et absence de transport vers la membrane plasmique.

Nos six prodrogues (**118** à **123**) ont également été testées sur les cellules de tabac par Michael Hartmann à différentes concentrations. Les premiers essais ont été effectués à 50 μ M. Qualitativement, les résultats montrent une inhibition de la prénylation avec une accumulation dans le noyau (Figure 65).



Figure 65 : Cellules de tabac BY-2 exprimant une protéine prénylable fluorescente traitées par chacune de nos prodrogues 118 à 123 à 50 μM.
Photographies prises au microscope confocal (Michael Hartmann).

Comme on peut le voir sur les clichés de la figure 65, les six prodrogues sont efficaces à cette concentration. Afin de pouvoir également donner un résultat quantitatif et de comparer les capacités inhibitrices de nos prodrogues avec celle de la fosmidomycine, un décompte manuel a été réalisé sur un groupe d'une centaine de cellules (Michael Hartmann, communication personnelle).

La localisation des protéines chimères peut se classer selon trois groupes :

- Les protéines se retrouvant essentiellement dans le noyau et plus particulièrement le nucléole,
- 2/ Les protéines se dispersant à égale quantité entre le noyau et la membrane plasmique,
- 3/ Les protéines se retrouvant uniquement dans la membrane plasmique.

Les chiffres obtenus étant le résultat d'un décompte manuel, ils ne peuvent pas être considérés comme extrêmement précis. Une tolérance de quelques unités doit donc être prise en compte. Des tests automatisés plus fiables, sont en cours de réalisation.

Les différentes prodrogues ont tout d'abord été testées à une concentration de 50 μ M, et les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour la fosmidomycine (Figure **66**).

Concentration en inhibiteur 50 μΜ	Membrane plasmique et noyau	membrane plasmique uniquement	Noyau uniquement	total
Fos	26		74	100
118	21	23	56	100
119	14		86	100
120	20	49	31	100
121	16		84	100
122	5	95		100
123 (faible fluorescence)	9	24	67	100

Figure 66 : Cellules de tabac BY-2 exprimant une protéine prénylable fluorescente traitées par chacune de nos prodrogues 118 à 123 à 50 μM. Résultats chiffrés obtenus par comptage manuel d'un groupe d'une centaine de cellules.

La figure ci-dessous (Figure 67), permet une meilleure visualisation des résultats. Les prodrogues **119** et **121** se démarquent nettement en surpassant les résultats de la fosmidomycine, avec respectivement 86 et 84 % des protéines dans le noyau. Les autres résultats sont moins spectaculaires.



Figure 67 : Cellules de tabac BY-2 exprimant une protéine prénylable fluorescente traitées par chacune de nos prodrogues 118 à 123 à 50 μM. Graphique des résultats chiffrés obtenus par comptage manuel d'un groupe d'une centaine de cellules. En violet : pourcentage de molécules chimères s'accumulant dans le noyau.

Afin de vérifier si leurs capacités inhibitrices existent toujours à plus faible concentration, nos six prodrogues ont toutes été diluées pour atteindre une concentration de 5 μ M. Les résultats de ces tests sont regroupés dans le tableau de la Figure 68, et illustrés dans le graphique de la Figure 69.

Concentration en inhibiteur 5 µM	Membrane plasmique et noyau	membrane plasmique uniquement	Noyau uniquement	total
Fos	40	30	30	100
118	5	95		100
119	5	2	93	100
120	5	95		100
121	28		72	100
122	2	98		100
123	aucune donné			-

Figure 68 : Cellules de tabac BY-2 exprimant une protéine prénylable fluorescente traitées par chacune de nos prodrogues 118 à 123 à 5 μM. Résultats chiffrés obtenus par comptage manuel d'un groupe d'une centaine de cellules.



Figure 69 : Cellules de tabac BY-2 exprimant une protéine prénylable fluorescente traitées par chacune de nos prodrogues 118 à 123 à 5 μM. Graphique des résultats chiffrés obtenus par comptage manuel d'un groupe d'une centaine de cellules. En violet : pourcentage de molécules chimères s'accumulant dans le noyau.

A la concentration de 5 μ M, on remarque une nette baisse de l'efficacité de la fosmidomycine (toujours utilisée comme référence). En effet, le pourcentage de protéines dans le noyau passe de 74 % (à 50 μ M) à 30 % (à 5 μ M). On constate également que les deux prodrogues **121** et **119** gardent à peu près les mêmes capacités d'inhibition qu'à 50 μ M avec respectivement 72 et 93 % de protéines fluorescentes dans le noyau. Ces deux prodrogues semblent donc être de meilleurs inhibiteurs que la fosmidomycine.

Afin de vérifier ce résultat, nous avons dilué une troisièmes fois la fosmidomycine ainsi que les prodrogues **121** et **119** jusqu'à 0,5 μ M. A cette concentration, la fosmidomycine n'a plus aucun effet alors que les prodrogues **121** et surtout le composé **119** conservent quelques capacités d'inhibition.

III.1.3 Conclusion

En conclusion, nous pouvons affirmer que nos prodrogues ont une efficacité sur les cultures de cellules BY-2 comparable à celle de la fosmidomycine, mais qu'en plus, deux d'entre elles (**119** et **121**) sont plus efficaces puisqu'elles montrent encore des propriétés d'inhibitions à des concentrations auxquelles la fosmidomycine n'a déjà plus d'effet.

III.2. Test sur des cellules de Mycobacterium smegmatis

III.2.1 Principe du test

Les mycobactéries sont des microorganismes que l'on peut retrouver dans la terre, l'eau, les aliments, ainsi qu'à la surface de nombreuses plantes. Certaines espèces de *Mycobacterium* sont très pathogènes. On peut par exemple citer :

- Mycobacterium leprae responsable de la lèpre,
- Mycobacterium tuberculosis, responjsable de la tuberculose
- *Mycobacterium bovis*, à qui l'on doit la tuberculose bovine (et quelques rares cas d'infection humaine)
- Mycobacterium avium, agent responsable de la tuberculose aviaire.

Toutes les mycobactéries ont en commun une paroi particulièrement complexe qui forme autour de la cellule bactérienne une véritable «couche protectrice » extrêmement hydrophobe. Cette paroi, très riche en lipides et en acide gras, empêche la pénétration de nombreuses molécules comme les antibiotiques qui ne peuvent atteindre leur site d'action (Figure **70**).



Figure 70 : Paroi des mycobactéries.

Les mycobactéries utilisent la voie du MEP pour la synthèse de l'IPP et du DMAPP. Malheureusement, du fait de la présence de cette paroi protectrice et en l'absence d'un transporteur, la fosmidomycine n'a aucun effet sur leur croissance. L'hydrophobicité de nos prodrogues, pourrait rendre le passage au travers de cette « couche protectrice » possible. Après déprotection *in situ* par une estérase, les inhibiteurs ainsi libérés pourraient atteindre leur cible et bloquer la croissance des cellules car la DXR de *M. tuberculosis* est inhibée par la fosmidomycine.

Pour tester nos prodrogues, c'est *Mycobacterium smegmatis* qui a été choisi, car cette espèce est non pathogène et caractérisée par une croissance rapide. Le test est fondé sur la méthode de diffusion de l'inhibiteur déposé sur un disque en papier (ou antibiogramme). Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence de nos prodrogues et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. L'inhibition de la croissance de la bactérie se traduit par l'apparition d'une zone circulaire dépourvue de bactéries. La taille de cette zone dépend du gradient de concentration de l'inhibiteur qui a diffusé dans le milieu à partir du disque de papier. C'est le diamètre atteint par cette zone qui traduit l'efficacité de l'inhibition des produits.

Comme témoin positif, nous avons choisi de prendre l'isoniazide **124** (Figure **71**). Ce composé empêche la formation des acides mycoliques,³⁶ composants de la paroi membranaire des mycobactéries, et donc inhibe leur croissance. C'est un agent antituberculeux classique.



Figure **71** : Structure de l'isoniazide.

III.2.2 Résultats obtenus sur nos prodrogues

Après 24 h d'incubation à 37° C, les prodrogues possédant un atome d'hydrogène sur l'azote du groupement hydroxamate inversé (**118**, **120**, **122**), n'ont aucun impact sur la croissance de *M. smegmatis*. Par contre, les prodrogues *N*-méthylées (**119**, **121**, **123**) inhibent significativement la croissance de la bactérie (Figure **72**).



Figure 72. Résultats obtenus pour les prodrogues méthylée 119, 112 et 123 ainsi que pour l'isoniazide.

Le meilleur résultat est obtenu pour le composé **119** dont le diamètre d'inhibition atteint 18 mm, alors que, pour les prodrogues **121** et **123**, ce diamètre est respectivement de 10 et 12 mm.

Pour conforter nos résultats obtenus avec l'antibiogramme, nous avons effectué des tests colorimétriques en milieu liquide en présence de résazurine, un indicateur de la viabilité des cellules.³⁷

Une gamme à des concentrations allant de 250 à 1500 μ M pour la prodrogue **119** ayant donné les meilleurs résultats d'inhibition sur l'antibiogramme a été réalisée. Alors que la gamme de concentration variait 10 à 50 μ M pour l'isoniazide.

Dans ces conditions, avec l'isoniazide nous avons observé une inhibition quasi-totale à 10 μ M, alors que dans les mêmes conditions il faut une concentration de 500 μ M pour que notre prodrogue **119** inhibe de la même manière la croissance bactérienne. L'isoniazide reste cependant le meilleur inhibiteur pour *Mycobacterium smegmatis* puisque son inhibition est de l'ordre de 50 fois celle de notre meilleure prodrogue.

III.2.3 Conclusion

Des six prodrogues que nous avons synthétisées (**118** à **123**), seules trois d'entre elles (**119, 121** et **123**) ont montré une inhibition de la croissance bactérienne chez *Mycobacterium smegmatis*. Nous pouvons conclure que ces prodrogues méthylées ont réussi à traverser la paroi bactérienne. *Mycobacterium smegmatis* possède donc les enzymes nécessaires à la déprotection de celles-ci. Il est également intéressant de noter que ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus pour les tests effectués sur les cellules de tabac (BY-2), puisque qu'une fois encore la prodrogue la plus efficace s'avère être la prodrogue **119**.

- (1) Wong, C.; Cox, R. J. Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 4926.
- (2) Munos, J. W.; Mansoorabadi, S. O.; Kim, H. J.; Liu, H.-W. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 2048.
- (3) Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Hemmerlin, A.; Willem, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 127.
- (4) Carsten, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 885.
- (5) Meier, C. *Synlett.* **1998**, 233.
- (6) Krise, J. P.; Stella, V. J. Adv. Drug. Deliver. Rev. 1996, 19, 287.
- (7) Friis, G. J.; Bundgaard, H. Eur. J. Pharm. Sci. 1996, 4, 49.
- (8) Jones, R. J.; Bischofberger, N. Antiviral Res. 1995, 27, 1.
- (9) Krise, J. P.; Stella, V. J. Advanced Drug Delivery Reviews 1996, 19, 287.
- (10) Jansen, A. B.; Russell, T. J. J. Chem. Soc. 1965, 65, 2127.

(11) Ortmanna, R.; Wiesnerb, J.; Reichenbergb, A.; Henschkerb, D.; Beckb, E.; Jomaab, H.; Schlitzer, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2163.

- (12) Jansen, A. B. A.; Russell, T. J. J. Chem. Soc. Part. II 1965, 2127.
- (13) Schultz, C. Bioorg. Med. Chem. 2003, 11, 885.
- (14) Farquhar, D.; Chen, R.; Khan, S. J. Med. Chem. 1995, 38, 488.

(15) Starrett, J. E. J.; Tortolani, D. R.; Russell, J.; Hitchcock, M. J. M.; Whiterock, V.; Martin, J. C.; Mansuri, M. M. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1857.

(16) Saari, W. S.; Freedman, M. B.; Hartman, R. D.; King, S. W.; Raab, A. W.; Randall, W. C.; Engelhardt, E. L.; Hirschmann, R. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 746.

(17) Serafinowska, H. T.; Ashton, R. J.; Bailey, S.; Harnden, M. R.; Jackson, S. M.; Sutton, D. J. Med. Chem. **1995**, *38*, 1372.

(18) De Lombaert, S.; Blanchard, L.; Berry, C.; Ghai, R. D.; Trapani, A. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 151.

(19) Meier, C. Synlett, **1988**, 233.

(20) Egron, D.; Imbach, J.-L.; Gosselin, G.; Aubertin, A.-M.; Périgaud, C. J. Med. Chem. **2003**, *46*, 4564.

(21) Lefebvre, I.; Périgaud, C.; Pompon, A.; Aubertin, A.-M.; Girardet, J.-L.; Kirn, A.; Gosselin, G. J. Med. Chem. **1995**, *38*, 3941.

(22) Mitchell, A. G.; Thomson, W.; Nicholls, D.; Irwin, W. J.; Freeman, S. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 1992, 2345.

(23) Hunston, R. N.; Jones, A. S.; McGuigan, C.; Walker, R. T.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 440.

- (24) Meier, C.; Lomp, A.; Meerbach, A.; Wutzler, P. J. Med. Chem. 2002, 45, 5157.
- (25) Gissot, A.; Volonterio, A.; Zanda, M. J. Org. Chem. 2005, 70, 6925.
- (26) Piel, J.; Donath, J.; Bandemer, K.; Boland, W. Angew. Chem. Int. 1998, 37, 2478.

(27) Kasahara, H.; Hanada, A.; Kuzuyama, T.; Takagi, M.; Kamiya, Y.; Yamaguchi, S. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 45188.

(28) Laule, O.; Furholz, A.; Chang, H. S.; Zhu, T.; Wang, X.; Heifetz, P. B.; Gruissem, W.; Lange, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 6866.

(29) Hemmerlin, A.; Hoeffler, J. F.; Meyer, O.; Tritsch, D.; Kagan, I. A.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M.; Bach, T. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 26666.

(30) Alberts, A. W.; Chen, J.; Kuron, G.; Hunt, V.; Huff, J.; Hoffman, C.; Rothrock, J.; Lopez, M.; Joshua, H.; Harris, E.; Patchett, A.; Monaghan, R.; Currie, S.; Stapley, E.; Albers-Schonberg, G.; Hensens, O.; Hirshfield, J.; Hoogsteen, K.; Liesch, J.; Springer, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 3957.

(31) Nagata, T.; Nemoto, Y.; Hasezawa, S. Int. Rev. Cytol. 1992, 132, 1.

(32) Gerber, E.; Hemmerlin, A.; Hartmann, M.; Heintz, D.; Hartmann, M. A.; Mutterer, J.; Rodriguez-Concepcion, M.; Boronat, A.; Van Dorsselaer, A.; Rohmer, M.; Crowell, D. N.; Bach, T. J. *Plant. Cell.* **2009**, *21*, 285.

- (33) Gerber, E. *Thèse Université Louis Pasteur, Strasbourg.* 2005.
- (34) Morise, H.; Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Winant, J. *Biochemistry* 1974, 13, 2656.

- (36) Mayer, B. Goren Bacteriological Reviews 1972, 33.
- (37) MacFaddin, J. F. Williams & Wilkins, Baltimore. 1985, vol. I.

⁽³⁵⁾ Dong, A.; Xin, H.; Yu, Y.; Sun, C.; Cao, K.; Shen, W. H. *Plant. Mol. Biol.* **2002**, *48*, 203.

Synthèse du MEP sous forme de prodrogue

I. Introduction

Le 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) est un intermédiaire clé de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes indépendante du mévalonate, appelée également voie du MEP. Cet intermédiaire est formé par le réarrangement du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) et d'une réduction concomitante. Cette réaction est catalysée par la deuxième enzyme de la voie du MEP, la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase (DXR). Ce réarrangement a été mis en évidence pour la première fois en 1998 par Seto *et al.*¹ Le groupement phosphate porté par le DXP est indispensable puisque son équivalent non phosphorylé n'est pas substrat de la DXR. Le réarrangement du DXP en MEP, implique la formation d'un aldéhyde intermédiaire, (Figure 73). Ce dernier n'étant pas libéré du site actif, il n'a pu être directement identifié.²



Figure 73. Formation du MEP catalysé par la DXR.

En 1997, des études ont montré que le 2-*C*-méthyl-D-érythritol (ME) marqué par des atomes de deutérium, le dérivé non phosphorylé du MEP, est faiblement incorporé dans les chaînes prénylées de l'ubiquinone et la ménaquinone pour des cellules d'*E. coli*. Par contre, il n'y a aucune incorporation par les cellules de *Methylobacterium organophilum* et *Corynebacterium ammoniagenes*.³ Ce résultat pourrait s'expliquer par l'absence d'une kinase efficace nécessaire pour la phosphorylation du ME en MEP. Chez les plantes, le ME libre n'est pas non plus incorporé.

Une alternative serait l'incorporation directe du MEP. Le transport d'une molécule polaire chargée négativement comme un phosphate pose également problème. Ainsi le transport de la fosmidomycine, un phosphonate analogue du DXP et inhibiteur de la DXR, utilise chez *E. coli* le système de transport du glycérol phosphate. De plus un ester phosphorique est sensible aux phosphatases. Nous avons donc voulu contourner ce problème en synthétisant une prodrogue neutre du MEP qui permettrait le passage à travers la membrane de cellule.

II. Synthèse

II.1. Choix du groupement masquant le phosphate

Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser le groupement *cyclo*Sal(igényl) pour masquer le phosphate. Le groupement *cyclo*Sal(igényl) est formé d'un cycle à six chaînons formant d'une part un ester benzylique de phosphate et d'autre part un ester phénolique de phosphate. Le phosphate est libéré grâce à une réaction tandem.⁴ Comme l'ester de phényle est le plus labile, il est hydrolysé en premier via une attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur le phosphore. Il en résulte le groupement *o*-hydroxybenzyle qui est ensuite spontanément libéré par clivage de la liaison C-O (Figure 74).⁵



Figure 74. Libération du phosphate protégé par un groupement cycloSal(igényl).

Cette approche a déjà été utilisée avec succès pour la mise au point de divers nucléosides anti-VIH,⁶⁻⁸ D'autres agents anti-viraux ont également été préparés grâce ce groupement.^{9,10}

Les composés phosphorylés protégés par un groupement *cyclo*Sal(igényl) sont synthétisés à partir d'un alcool et d'un chlorophosphite cyclique **125** suivit d'une oxydation du phosphore au degré d'oxydation III en phosphore V. Ce dernier étant lui-même formé en faisant réagir du trichlorure de phosphore et du 2-(hydroxyméthyl)phénol en présence de pyridine (Figure 75).^{11,12}



Figure 75. Formation du phosphate protégé par un groupement cycloSal(igényl).

II.2 Stratégie de synthèse

Pour synthétiser le *cyclo*Sal MEP **105**, nous avons choisi d'introduire en fin de synthèse le groupement *cyclo*Sal (igényl) et donc de préparer l'intermédiaire **126** où les hydroxyles en C-1, C-2 et C-3 seraient protégés par des groupements adéquats (Figure 76).



Figure 76. Précurseur 126 du cycloSal MEP 105.

Pour préparer ce composé nous nous sommes inspirés de la synthèse du MEP réalisée au laboratoire par Jean François Hoeffler.¹³ Il s'agit d'une approche chiron utilisant un dérivé de glucide commercial, le 1,2-*O*-isopropylidène- α -D-xylofuranose comme produit de départ. Ce composé possède en C-2 la configuration attendue pour le carbone en position C-3 du *Cyclo*Sal-méthylérythritol phosphate **127**. De plus, l'addition nucléophile sur le carbonyle en C-3 se fait de manière diastéréosélective du fait de la présence du groupement isopropylidène qui est encombrant et permet d'obtenir le centre stéréogène désiré au niveau du carbone C-2 pour le dérivé de MEP **127** (Figure 77).



Figure 77. Etapes clés de la voie de synthèse du CycloSal-méthylérythritol phosphate.

Finalement après un jeu de protection /déprotection, la coupure oxydante entre les positions C-1 et C-2 du dérivé de pentose, permettrait de greffer le groupement *Cyclo*Sal(igényl) sur l'alcool primaire pour conduire vers le *Cyclo*Sal-méthylérythritol phosphate (Figure 77).

II.3 Première voie de synthèse

La première étape de cette synthèse est la protection sélective de l'alcool primaire par un groupement *t*-butyldiméthylsilyle. Cette réaction réalisée à l'aide de chlorure de *t*butyldiméthylsilyle permet l'obtention de l'alcool protégé **129** avec un rendement de 82% (Figure 78). L'oxydation de l'alcool secondaire en utilisant la procédure de Swern modifiée par Ireland permet d'accéder à l'alcool tertiaire **130** avec un rendement de 83 %.



i : TBDPSCl, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂, 82 % ; ii : 1) (COCl)₂, DMSO, TEA 2) MeMgBr, THF, 83 % ; iii: MOMCl, DIPEA, CH₂Cl₂, 85 %



L'étape suivante est la protection de l'alcool tertiaire formé. Le choix du groupement protecteur est important. En effet ce groupe protecteur devra résister aux conditions de déprotection de l'acétonide d'une part, du groupement TBDPS d'autre part. De plus sa déprotection ne pourra être réalisée par hydrogénolyse en présence de Pd/C puisque dans ces conditions, le groupement *Cyclo*Sal(igényl) pourrait être dégradé.

Nous avons choisi d'utiliser le groupement méthoxyméthyl éther (MOM). En effet, plusieurs exemples de la littérature montrent que sous certaines conditions, la déprotection sélective de l'acétonide est possible sans que le groupement MOM ne soit touché.¹⁴⁻¹⁸ Par ailleurs, la déprotection du TBDPS pourra se faire sélectivement par utilisation de fluorure de tétrabutylammonium (TBAF). L'alcool tertiaire protégé par un groupement MOM **131** a été obtenu avec un rendement de 85 % en utilisant du chlorure de méthoxyméthyl éther.¹⁹ L'étape suivante est la déprotection de l'acétonide. Plusieurs essais ont été effectués (Figure 79).

Entrée	Réactifs	Température	Durée	Résultats
1	AcOH 60 %	T.A	3 jours	Produit de départ
2	AcOH 80 %	T.A	1 jour	Produit de départ
3	AcOH 80 %	55°C	4 h	Déprotection acétonide et MOM.
4	TFA 1 %	T.A	5 h	Déprotection acétonide et MOM.

Figure 79. Différents essais de déprotection sélective de l'acétonide.

De l'acide acétique (AcOH) à 60 % en solution aqueuse et à température ambiante a tout d'abord été utilisé. Les résultats n'ont pas été concluants puisque, après 3 jours à température ambiante, seul le produit de départ **130** a été récupéré (Figure 79, entrée **1**). Une augmentation de la concentration en acide acétique (80 %) ne permet pas d'accéder au produit désiré (Figure 79, entrée **2**). Toutefois, lorsque ce mélange est porté à 55°C pendant 4h, le produit de départ disparaît mais on observe une déprotection simultanée des groupements protecteurs acétonide et MOM (Figure 79, entrée **3**). Ces résultats ont également été obtenus en utilisant de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 1 % à température ambiante (Figure 79, entrée **4**).²⁰ Au vu des problèmes rencontrés lors de déprotection sélective de l'acétonide par rapport au groupement MOM, nous avons réfléchi à une voie de synthèse où l'alcool tertiaire serait protégé par un groupement protecteur plus résistant aux conditions acides.
II.4 Deuxième voie de synthèse

Dans cette nouvelle voie, l'alcool primaire du 1,2-*O*-isopropylidène-α-D-xylofuranose **132** pourrait être protégé par un benzyle. L'alcool tertiaire formé ultérieurement serait protégé par un groupement TBDPS **134** (Figure 80). En effet d'après la littérature, ce groupement est assez stable pour résister aux conditions utilisées pour couper des acétals.^{21,22}



Figure **80**. Synthèse du 3-*t*-butyldiphénylsilyl-3-C-méthyl 5-*O*-benzylidène-D-ribofuranose **135** avec les nouveaux groupements protecteurs testés.

La première étape est la benzylation de l'alcool primaire qui est réalisée à l'aide d'oxyde de dibutylétain, de bromure de tétrabutylammonium et de bromure de benzyle. Cette méthode nous permet d'obtenir sélectivement l'alcool primaire protégé **132** avec un rendement de 81 %. La seconde étape est une réaction de Swern modifié par Ireland et conduit à l'alcool tertiaire **133** avec 87 % de rendement. Nous avons choisi de protéger la fonction hydroxyle sous forme d'éther de *t*-butyldiphénylsilyle (TBDPS) pour différentes raisons.

- Il s'agit d'un groupement plus stable vis-à-vis des réactions d'hydrolyse acide que ne l'était le groupement MOM.
- Il pourra être déprotégé sans dégrader le groupement cycloSal(igényl) grâce à des ions fluorures.

La silulation de l'alcool tertiaire par un groupement tel que le TBDPS est assez difficile du fait de l'encombrement stérique (Figure 77). Cependant, l'utilisation d'hydrure de sodium et de chlorure de *t*-butyldiphénylsilule à reflux dans le THF a permis d'accéder au produit silulé **134** de manière quantitative.

La synthèse se poursuit par la déprotection du groupement acétonide. Là encore, nous avons rencontré des difficultés. Différents essais ont été réalisés (Figure 81). L'utilisation de TFA à 10 % et à température ambiante n'a donné aucun résultat, et seul le produit de départ est récupéré (Figure 81, entrée 1). Lorsque l'on augmente la concentration en TFA (50 %),²¹

Entrée	Réactif	Solvant	Température	Durée	Résultats
1	TFA 10 %	THF	ТА	12h	Produit de départ
2	TFA 50 %	THF	ТА	12h	BnO H HO OH
3	BCl ₃ .MeS	CH ₂ Cl ₂	0°C	2h	HO H TBDPSO O
4	AcOH 80 %	/	75°C	48h	BNO H TEDPSO OH 61 %

nous observons la déprotection de l'acétonide mais également celle du groupement celle du groupement silylé (Figure 81, entrée 2).

Figure 81. Essais de déprotection du groupement acétonide.

Au vu de ces résultats, nous avons tenté d'utiliser un autre réactif, le complexe de trichlorure de bore/diméthylsulfure (BCl₃.Me₂S).²³ Là encore, nous n'obtenons pas le produit désirée mais uniquement le composé où seul le groupement benzyle est déprotégé (Figure 81, entrée **3**). Finalement, l'utilisation de AcOH à 80 % et à 75°C, permet d'obtenir le composé désiré **135** avec un rendement de 66 % (Figure 81, entrée **4**).²⁴

L'étape suivante de notre synthèse est une coupure oxydante. L'utilisation de periodate de sodium²⁵ permet l'accès à l'aldéhyde hydraté **136** (Figure 82). Ce dernier est engagé sans purification dans une réaction de réduction²⁶ pour former le diol **137** avec 55 % de rendement sur les deux étapes.



i : Bu₂SnO, Bu₄NBr,BnBr, toluène, 140°C, 81 %; ii: (COCl)₂, DMSO, TEA, MeMgBr, THF, 87 %; iii: NaH, TBDPSCl, THF, reflux, quantitatif ; iv : 80 % aq. AcOH, 75°C, 66% ; v + vi: 1) NaIO₄, MeOH/THF/ H₂O (1/1/2), 98 %, 2) NaBH₄, MeOH, 55 %; vii : TMSOTf, lutidine, CH₂Cl₂, 71 % ; viii : TBAF, THF, 32 % ; ix : DIPEA, MOMCl, CH₂Cl₂, 88 % ; x :DIPEA, méthoxyméthyl chloride, CH₂Cl₂, 88% ; xi : chlorophosphane cyclique, DMAP, TEA, CH₃CN, *t*-BuOOH.

Figure **82**. Deuxième synthèse envisagée du *Cyclo*Sal-méthylérythritol phosphate

Dans la suite de la synthèse, les groupements hydroxyle du diol **137** sont protégés sous forme d'éthers silylés. Nous avons choisit d'introduire des groupes triméthylsilyle (TMS) afin d'éventuels problèmes d'encombrement stérique. De plus, ces

groupements pourront par la suite être déprotégés en même temps que le groupement TBDPS. Cette fois encore, plusieurs essais ont été nécessaires avant l'obtention du composé **138** (Figure 83)

Entrée	Réactif Température		Durée	Résultats	
1	TMSCl, TEA, DMAP $-10^{\circ}C \rightarrow reflux$		12 h	Produit de départ Produit monosilylé	
2	NaH, TMSCl reflux		12h	Produit monosilylé	
3	TMSOTf, lutidine	TA	12h	Produit disilylé 71 %	

Figure 83. Tests de protection du diol 137 par des groupes silylés.

Les conditions classiques de silylation des alcools par du chlorure de *t*butyldiméthylsilyle en présence de triéthylamine et d'une quantité catalytique de *N*,*N*diméthylaminopyridine ²⁷ ne permet pas d'obtenir le produit disilylé. En effet non seulement cette réaction n'est pas totale mais de plus elle conduit au produit uniquement monosilylé sur l'alcool primaire (Figure 83, entrée 1). Dans des conditions basiques, c'est-à-dire en présence de NaH à reflux dans le THF la réaction est totale mais encore une fois, seul le produit monosilylé est obtenu (Figure 83, entrée 2). Finalement l'utilisation de triflate de *t*butyldiméthylsilyle en présence de lutidine permet d'obtenir le composé disilylé **138** avec 71 % de rendement (Figure 83, entrée **3**).²⁸

L'étape suivante est la débenzylation de l'alcool primaire afin d'introduire le groupement *cyclo*Sal(igényl). Là encore, nous avons rencontré des difficultés (Figure 84).

Entrée	Réactif	solvant	Durée	Résultats
1	Pd/C, H ₂ , 20 %	MeOH	48h	Produit de départ
2	Pd/C, H ₂ , 40 %	MeOH/ EtOAc	48h	Taux de conversion très faible
3	Pd/C, H ₂ , 20 %, 50 bar	MeOH/ EtOAc	12h	Taux de conversion faible
4	Li, DTBBP	THF -78°C à -40°C	12h	Produit de départ

Figure 84. Essais de déprotection du groupement benzyle.

L'hydrogénolyse du groupement benzyle dans les conditions classiques et quelles que soient les quantités en Pd/C utilisées, ne permet pas d'obtenir le produit débenzylé (Entrés 1 et 2). De plus, l'utilisation de ce même réactif sous pression d'hydrogène (50 bars) n'a pas donné de meilleurs résultats (Entrée 3). Du lithium en présence de di-*t*-butyldiphényle (DTBBP) n'a pas non plus permis la déprotection du groupement benzyle (Entrée 4).²⁹

Bien que le composé **138** soit assez encombré, l'utilisation de palladium sur charbon ne devrait pas poser de problème d'un point de vu stérique. Pour savoir si les groupements silylés sont une des causes de ce problème de déprotection, nous avons décidé de déprotéger les trois alcools silylés et de les remplacer par des groupements MOM.

Une solution de TBAF dans le THF est utilisée pour la déprotection des alcools silylés. Le composé **139** est obtenu avec un rendement de 86 %.

L'introduction des groupements MOM est réalisée grâce au chlorure de méthoxyméthyle en présence de la diisopropyléthylamine et conduit au composé **140** avec 88 % de rendement. Avec ce composé **140**, aucun problème n'est rencontré lors de l'étape de débenzylation. Le composé **141** est obtenu quantitativement par simple hydrogénation catalytique réalisée à pression atmosphérique. L'étape suivante est l'introduction du phosphate cyclique *cyclo*Sal(igényl) sur l'alcool primaire. Ce groupement protecteur a préalablement été synthétisé en utilisant les conditions précédemment décrites (Figure 75).¹¹

La formation de l'analogue prodrogue du MEP **142**, dont tous les hydroxyles sont protégés par des groupements MOM est alors réalisée avec un rendement de 77 % (Figure 82). La dernière étape de notre synthèse est une étape de déprotection des groupements MOM. Différents essais ont été réalisés et sont reportés dans la Figure 85.

Entrée	Réactifs	Solvant	Température	Durée	Résultats
1	HCl 6M	H ₂ O/ 1goutte de THF	50°C	3h	Dégradation du groupement cycloSal(igényl)
2	AcOH 80%	H ₂ O	65°C	4h	Déprotection d'un seul MOM
3	TFA 90 %	acétone	-10°C	1h	Dégradation du produit de départ
4	TFA 20%	H ₂ O / acétone	-10°C puis T.A	4h	Déprotection d'un seul MOM
5	HCl 1M	H ₂ O/THF	40°C	2h	Formation d'un produit plus polaire non identifié

Figure **85**. Essais de déprotection des groupements MOM pour l'obtention du produit final.

Un premier essai utilisant une solution d'acide chlorhydrique 6M a été effectué. Dans ces conditions le groupement *cyclo*Sal(igényl) s'est dégradé (Entrée 1). Un second essai mettant en jeu de l'acide acétique (AcOH) à 65°C n'a permis la déprotection que d'un seul des trois groupements MOM (Entrée 2). L'utilisation de TFA à 90 % à une température de - 10°C conduit à la dégradation du produit de départ (Entrée 3). En diminuant la concentration de TFA jusqu'à 20 %, nous observons la déprotection d'un seul des groupements MOM (Entrée 4). Lors de l'utilisation de HCl à une concentration de 1M et à 40°C, nous observons la formation d'un produit extrêmement polaire impossible à purifier. Nous avons donc décidé d'acétyler le produit obtenu pour vérifier qu'il s'agissait bien de notre prodrogue déprotégée. Mais aucun produit acétylé n'est obtenu.

II.5 Troisième voie de synthèse

Au vu de ces problèmes rencontrés lors de cette dernière étape de déprotection, nous avons décidé de changer de groupement masquant le phosphate. Le groupement acyloxy-*t*-butylester, déjà utilisé dans notre chapitre **1** lors de la synthèse de nos prodrogues d'acides phosphoniques, nous a semblé tout à fait indiqué puisqu'il avait déjà donné de bons résultats. Pour cette nouvelle voie de synthèse, nous nous sommes inspirés du schéma réactionnel utilisé mis au point par J.-F. Hoeffler pour la synthèse de MEP.¹³ Contrairement aux voies de synthèses précédentes, l'introduction du groupement phosphate se fait dès la première et la formation du groupe acyloxy-*t*-butylester se fera en fin de synthèse.

La phosphorylation de l'alcool primaire est réalisée en présence de diéthylchlorophosphate et de pyridine.³⁰ Le dérivé phosphorylé **143** est obtenu avec un rendement de 78 % (Figure 86).



i : (EtO)₂P(O)Cl, pyridine, CCl₄, 78 %; ii : PDC, AcOH, 3 Å tamis moléculaire, CH₂Cl₂, 77 %; iii : MeMgBr, THF, 87 %; iv : Benzyl 2,2,2-trichloroacétimidate, CF₃SO₃H (cat), cyclohexane/CH₂Cl₂ 2/1, 47 %; v : TFA, CCl₄, 70 %; vi : NaIO₄, MeOH-H₂O, 89 %; vii : NaBH₄, MeOH, 49 %; viii : Benzaldéhyde diméthylacétal, *p*-TSA, CH₂Cl₂, 38 %; ix : 1/ TMSBr, CH₂Cl₂, 2/ H₂O-THF, 3/chorométhylpivalate, Et₃N, DMF, 37 %.

Figure **86**. Troisième voie de synthèse pour la formation d'une prodrogue du MEP dont le groupement phosphate serait protégé par un groupement acyloxy-*t*-butylester

L'oxydation de l'alcool secondaire **143** est réalisée à l'aide de dichromate de pyridinium (PDC).³¹ La cétone correspondante **144** est obtenue avec un rendement de 77 %. La synthèse se poursuit par l'addition nucléophile du bromure de méthylmagnésium³² sur le groupement carbonyle et conduit à la formation de l'alcool tertiaire **145** avec un rendement de 87 %. Le choix de l'utilisation de groupements benzyles pour la protection de toutes les fonctions alcools permettra de n'avoir qu'une simple débenzylation comme ultime étape de synthèse et d'accéder à notre produit final sans aucune purification supplémentaire.

La protection de l'alcool tertiaire par un groupement benzyle est délicate puisqu'il s'agit d'insérer un groupement assez encombrant sur un alcool déjà encombré. Pour cette

réaction nous avons utilisé le trichloroacétimidate de benzyle en combinaison avec de l'acide trifluorométhanesulfonique.^{33,34} Grâce à cette méthode assez drastique nous avons réussi à obtenir l'alcool protégé **146** avec un rendement de 47 %. Pour déprotéger l'acétonide un mélange d'acide trifluoroacétique à 90 % et de CCl₄ a été utilisé.²⁶ Les deux anomères attendus sont obtenus avec un rendement de 70 % malgré une réaction qui n'est pas totale.

La coupure oxydante entre les deux alcools libres adjacents se fait grâce au periodate de sodium dans un mélange méthanol-eau (1:1). Nous obtenons l'aldéhyde sous forme d'hydrate **148** avec un rendement de 89%. La réduction de cet aldéhyde est réalisée par l'addition de borohydrure de sodium dans le méthanol. L'alcool **149** correspondant est obtenu avec un rendement assez moyen de 49 %. Pour la protection des deux hydroxyles libres présents sur la molécule à ce moment de la synthèse, nous avons deux possibilités : soit benzyler les deux alcools, soit utiliser un benzylidène. C'est la deuxième solution qui a été retenue pour des raisons évidentes d'encombrement stérique. La formation du benzylidène est réalisée par addition de benzaldéhyde diméthylacétal et d'acide *p*-toluènesulfonique sur le diol **149**. Nous obtenons le composé **150** avec 38 % de rendement.

La suite de la synthèse consiste en la déprotection des éthyles du phosphate par le bromure de triméthylsilyle suivie one pot de l'addition du chlorométhylpivalate pour former le composé **151**. Sur ces deux étapes, un rendement de 37 % est obtenu. Il s'agit d'un rendement plutôt moyen mais en accord avec ceux de la littérature pour ce type de réaction. A ce niveau de la synthèse il ne reste que quelques milligrammes de produit encore disponibles, un seul essai de déprotection est donc réalisable au vu de la perte de la masse molaire pour cette étape de déprotection. Le composé **151** est solubilisé dans du méthanol et le palladium sur charbon est additionné. Le mélange est tout d'abord agité à pression atmosphérique pendant 3 h mais aucune modification n'est observée par CCM. La pression est alors portée à 50 bars et le mélange réactionnel agité pendant une nuit. La CCM indique une disparition du produit de départ ainsi que la formation de plusieurs composés plus polaires. L'analyse de la RMN du proton indique encore la présence de groupements aromatiques. Celle du phosphore présente plusieurs signaux. Nous n'avons donc pas réussi à obtenir notre produit final et nous observons la formation d'un mélange de produits non identifiés.

III. Conclusion

L'obtention d'une prodrogue du MEP n'a donc pas été possible. Que le phosphate soit protégé par un phosphotriester ou par deux groupements acyloxy-*t*-butylester, la dernière étape de déprotection n'a jamais été réalisable. Pourtant, dans les deux cas, plusieurs groupements protecteurs des alcools présents ont été testés. Il serait cependant intéressant de réessayer cette dernière synthèse afin de tester d'autres méthodes de déprotection des différents groupements benzyles et benzylidène. (1) Takahashi, S.; Kuzuyama, T.; Watanabe, H.; Seto, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 9879.

(2) Hoeffler, J. F.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4446.

(3) Duvold, T.; Cali, P.; Bravo, J.-M.; Rohmer, M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6181.

(4) Meier, C. Angew. Chem. **1996**, 108, 77.

(5) Meier, C. *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 219.

(6) Meier, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 793.

(7) Lorey, M.; Meier, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1307.

(8) Meier, C.; Knispel, T.; De Clercq, E.; Balzarini, J. J. Med. Chem. **1999**, 42, 1604.

(9) Meerbach, A.; Wutzler, P.; Lomp, A.; Meier, C. Antiviral Res. 2000, 46, A82.

(10) Meier, C.; Lomp, A.; Meerbach, A.; Wutzler, P. *ChemBioChem.* **2001**, *2*, 283-285.

(11) Meier, C.; Lorey, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417.

(12) Wissner, A.; Carroll, M. L.; Green, K. E.; Kerwar, S. S.; Pickett, W. C.; Schaub, R. E.; Torley, L. W.; Wrenn, S.; Kohler, C. A. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1650.

(13) Hoeffler, J. F.; Pale-Grosdemange, C.; Rohmer, M. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1485.

(14) Miyaoka, H.; Yamanishi, M.; Mitome, H.; Yamada, Y. *Tetrahedron* 2003, *59*, 61.

(15) Zhang, S.; Wang, J.; Hirose, K.; Ando, M. J. Nat. Prod. 2002, 65, 1786.

(16) Zeng, Q.; Paquette, L. Synlett. 1999, 10, 1547.

(17) Johnston, J. N.; Tsui, H. C.; Paquette, L. A. J. Org. Chem. 1998, 63, 129.

(18) Okada, K.; Hashizume, K.; Tanino, H.; Kakoi, H.; Inoue, S. *Chem. Pharm. Bull.* (*Tokyo*) **1989**, *37*, 791.

(19) Rosselli, S.; Bruno, M.; Pibiri, I.; Piozzi, F. J. Org. Chem. 2002, 1594.

(20) Okada, K.; Hashizume, K.; Tanino, H.; Kakoi, H.; Inoue, S. *Pharma. Soc. Jap.* **1988**, *37*, 791.

- (21) Hanessian, S.; Lavallee, P. Can. J. Chem. 1975, 53, 2975.
- (22) Hanessian, S.; Lavallee, P. Can. J. Chem. 1977, 55, 562.
- (23) Nicolaou, K. C.; Mitchell, H. J.; Fylaktakidou, K. C.; Rodriguez, R. M.; Suzuki, H. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3116.
- (24) Roberts, S. M.; Shoberu, K. A. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 1992, 2625.
- (25) Wang, F.-P.; Chen, Q.-H.; Li, Z.-B.; Li, B.-G. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 689.
- (26) Hoeffler, J.-F.; Pale-Grosdemange, C.; Rohmer, M. Tetrahedron 2000, 56, 46.
- (27) Gilbert, J. C.; Selliah, R. D. Tett. Letters 1992, 33, 6259.
- (28) Felpin, F.-X.; Lebreton, J. Curr. Org. Synth. 2004, 1, 83.
- (29) Shimshock, S.; Waltermire, R.; DeShong, P. J. Am. Chem. Soc. **1991**, 113, 8791.
- (30) Hall, R. H.; Khorana, H. G. J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 5056.
- (31) Czernecki, S.; Ezzitouni, A.; Krausz, P. Synthesis 1990, 651, 653.
- (32) Brimacombe, J. S.; Rollins, A. J.; Thompson, S. W. *Carbohydr. Res.* **1973**, *31*, 108.
- (33) Iversen, T.; Bundel, D. R. J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1981, 1240.
- (34) Widmer, U. Synthesis 1987, 568.

Etude méthodologique d'ouverture d'époxyde benzylé par un phosphate : Synthèse de la DHAP.

I. Introduction.

Dans cette troisième partie, nous nous sommes intéressés à la synthèse de petites molécules hautement fonctionnalisées et plus particulièrement à la dihydroxyacétone phosphate **154** (DHAP). La DHAP se retrouve dans un certain nombre de voies métaboliques. Plus particulièrement, elle joue un rôle crucial dans la glycolyse. Lors de la quatrième étape de cette voie, une aldolase, la fructose bisphosphate (FruA), scinde le fructose bisphosphate **152** en deux unités à trois carbones, la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et le D-glycéraldéhyde phosphate **153** (D-GAP), dans une réaction équilibrée (Figure 87). La DHAP **154** est également impliquée dans le cycle de Calvin et dans la biosynthèse de glycérolipides.



Figure 87. Formation de la DHAP lors de la glycolyse.

La DHAP est le substrat naturel des aldolases. En effet, ces biocatalyseurs réalisent une condensation aldolique entre la DHAP et un aldéhyde quelconque pour former une liaison C-C de façon stéréospécifique.¹

Il existe en effet plus d'une vingtaine d'aldolases différentes dans les organismes vivants. Chacune d'entre elles catalyse l'addition asymétrique de la DHAP avec différents aldéhydes. Chaque enzyme offre une stéréochimie spécifique des carbones en position C3 et C4 du produit (Figure 88).



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

Figure 88. Exemple d' aldolases

Les aldolases sont classées selon leur mécanisme d'action. Les aldolases de classe I, trouvées principalement chez les animaux^{2,3} et les plantes,⁴ activent le donneur en formant un intermédiaire covalent du type base de Schiff. Les aldolases de classe II, présentent principalement chez les microorganismes⁵⁻⁷ comme *E. coli*, contiennent dans leur site actif un ion Zn^{++} , jouant le rôle d'acide de Lewis, qui va faciliter la formation d'un énolate sur le donneur (Figure 89). Ces deux types d'aldolases acceptent une grande variété de substrats naturels, et la stéréosélectivité de la réaction est prévisible.



Figure 89. Mécanisme d'action des aldolases de type I et II

L'enzyme la plus fréquemment utilisée en synthèse organique est la RAMA (rabbit muscle aldolase) qui est une FruA. L'utilisation de ces biocatalyseurs est cependant souvent restreinte à la synthèse *in vitro* de sucres, selon un processus biomimétique. Pourtant ces enzymes représentent un grand intérêt en synthèse asymétrique puisque suivant l'aldolase utilisée, la configuration absolue de deux centres stéréogènes adjacents pourrait être

contrôlée.^{8,9} De plus une réduction asymétrique de la fonction carbonylée permettrait le contrôle d'un troisième centre stéréogène.

C'est en fait le coût commercial (4640 \notin/g) et la très grande réactivité de cette molécule qui limite son utilisation en synthèse organique. Voilà pourquoi nous avons voulu mettre au point un chemin réactionnel qui permettrait d'accéder facilement à un précurseur stable de la DHAP.

I.1 Synthèse de la DHAP

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

I.1.1 Synthèses enzymatiques de la DHAP

Généralement, les synthèses enzymatiques de la DHAP suivent une des trois routes suivantes partant d'un précurseur non phosphorylé bon marché :

- A partir de la dihydroxyacétone (DHA). Cette route est la plus directe, et a été mise au point dès 1983.¹⁰
- 2. A partir du glycérol ou du glycidol via le glycérol phosphate.
- 3. Via une route enzymatique en plusieurs étapes qui mime la glycolyse.

La DHA, produit peu onéreux a en effet utilisée comme produit de départ dans plusieurs synthèses enzymatiques de la DHAP. Quatre enzymes ont été testées avec succès pour phosphoryler la DHA (Figure 90, voie 1), Les rendements obtenus pour la DHAP ne sont cependant pas très bons.

On peut regrouper dans une seconde voie enzymatique les synthèses utilisant comme intermédiaire le glycérol phosphate. Deux produits de départs, le glycérol et le glycidol racémique, peuvent être utilisés pour conduire à cet intermédiaire (Figure 90, voie 2). Cette voie à l'avantage de passer par un intermédiaire stable (le glycérol phosphate) qui peut être conservé.

Enfin la dernière voie regroupe les réactions multi-étapes enzymatiques. Comme par exemple, la synthèse enzymatique « one pot » de la DHAP à partir du saccharose. Cette transformation met en jeu une série de huit enzymes différentes (Figure 90, voie **3**).



Voie 3

rac-GlyP: glycérol phosphate racémique; Pi: phosphate inorganique; PPi: pyrophosphate; PC: phosphatidylcholine; ALDase: aldolase; AP: acide phosphatase; CAT: catalase; CIP: calf intestinal alkaline phosphatase; DHAK: dihydroxyacétone kinase; FPK: fructose 6-phosphate kinase; GI: glucose 6-phosphate isomérase; GK: glycérol kinase; GPO: L-glycérophosphate oxydase; HK: hexokinase; INV: invertase; PHY: phytase; PLC: phospholipase C; PLD: phospholipase D; TPI: triosephosphate isomérase; XI: xylose isomérase.

Figure 90 : Résumé des voies enzymatiques décrites pour accéder à la DHAP.

Toutes ces voies enzymatiques vont nécessiter, à un moment donné, l'utilisation d'un donneur de phosphate. Dans la majorité des synthèses, c'est l'ATP qui va jouer ce rôle d'agent phosphorylant. L'ATP est un réactif onéreux. Sa régénération est donc un point crucial lors de la synthèse de la DHAP. Deux méthodes essentiellement permettent de régénérer l'ATP.¹¹ La première s'effectue à partir de l'acétyle phosphate en présence d'acétyle kinase (Figure 91, voie **A**). La seconde se fait à partir du phosphoénol pyruvate par la pyruvate kinase (Figure 91, voie **B**).



AcP: acétyle phosphate, Ac: Acétate, AcK: acétyle kinase, PEP: phosphoènol pyruvate, PK; pyruvate kinase, AK: adénosine kinase, Pyr: pyruvate.

Figure 91 : Système de régénération de l'ATP.

Les synthèses enzymatiques pour préparer la DHAP sont trop onéreuses pour pouvoir les utiliser à grande échelle. C'est pourquoi, les méthodes chimiques sont préférées.

I.1.2 Synthèses chimiques de la DHAP

Une des propriétés importantes de la DHAP est sa faible stabilité chimique. Sa dégradation est initiée par la déprotonation de l'alcool primaire (Figure 92). Le groupement phosphate de l'intermédiaire formé est ensuite éliminé. Cette élimination a déjà lieu en milieu neutre, mais se fait surtout en milieu basique et conduit à la formation du méthylglyoxal.¹²





Sous des conditions neutres à légèrement basiques, le temps de demi-vie de la DHAP est de 3 h à 37° C et 30 h à 25° C.^{13,14}

L'instabilité chimique de la DHAP a eu une grande incidence sur les stratégies de synthèses mises au point jusque là. En effet, ce n'est pas la synthèse de la DHAP qui est privilégiée mais plutôt celle d'un précurseur stable.

Beaucoup de précurseurs ont déjà été synthétisés. Le plus ancien est le cétal monomère phosphorylé **155** (Figure 93). Ce composé est accessible après plusieurs étapes réactionnelles, à partir de différents produits de départ. La première synthèse de ce cétal a été réalisée par Ballou et Fischer en 1956 à partir du 3-chloro-1,2-propanediol.¹⁵ D'autres synthèses de l'acétal **155** ont été réalisées à partir de l'acétone,¹⁶ la dibromoacétone,¹⁷ ou encore le dimère de dihydroxyacétone^{18,19} avec des rendements de 13 à 48%. L'hydrolyse dans des conditions acides ou basiques de ce cétal monomère phosphorylé différemment substitué conduit à la DHAP.



dihydroxyacétone dimère

Figure 93. Formation de la DHAP à partir du cétal monomère phosphorylé 155.

Le dimère phosphorylé **156** (Figure 94) est le précurseur le plus répandu pour accéder à la DHAP. Il a été synthétisé pour la première fois lors de la synthèse décrite par Colbran *et coll.*²⁰ et permet d'obtenir la DHAP après déprotection des acétals en milieu acide.

La synthèse proposée par Effenberger et Straub. (Figure 94), la DHAP est fournie sous forme de sels de baryum en trois étapes avec un rendement de 34%.²¹ Cette synthèse a ensuite été optimisée par Wong et *coll*, en particulier en ce qui concerne l'étape de phosphorylation. La DHAP est alors obtenue en quatre étapes avec 55% ²²ou 61% ²³de rendement selon la méthode de phosphorylation utilisée.



Voie A : a.: (EtO)₃CH, 50 % ; b. : POCl₃/py, H₂O/HCO₃⁻/OH⁻, MgCl₂/NH₄Cl, BaCl₂/EtOH, 8 5% ; c. : Dowex 50 X8 H⁺, 80 %

 $\begin{array}{l} \textbf{Voie B}: i.: (EtO)_{3}CH, H_{2}SO_{4}, 97 \ \%; ii. (Et_{2}N) \ P(OBn)_{2}, triazole, H_{2}O_{2}, 98 \ \% \ ou \ ClPO(OBn)_{2}, py, \\ 96 \ \%; iii.: H_{2}, Pd/C, 84 \ \%; iv.: H^{+}, H_{2}O, 65^{\circ}C, 66 \ \%. \end{array}$

Figure 94. Synthèse du précurseur 156 de la DHAP

En 2000, Raap et *coll* proposent une méthode de synthèse de la DHAP marquée à partir d'acide acétique via le précurseur **157** (Figure 95) dans lequel toutes les fonctions hydroxyles sont protégées par des benzyles.²⁴ Le rendement global de la synthèse est de 66 %, mais deux ans plus tard, les mêmes auteurs ont publié une synthèse modifiée pour la préparation de l'intermédiaire **157** avec cette fois ci un rendement de 52 % (Figure 95).²⁵ Cette nouvelle méthode a été réalisée dans le but de minimiser les réactions secondaires observées dans leurs expériences précédentes.





Figure **95**. Synthèse de la DHAP par Raap et *coll*.

Plus récemment une nouvelle approche utilisant le (\pm) -glycidol commercial comme produit de départ a été mise au point dans notre laboratoire (Figure 96).²⁶ Cette synthèse passant également par l'intermédiaire **157** s'effectue en quatre étapes et permet d'obtenir la DHAP avec un rendement 61 % (Figure 96). Ce rendement est du même ordre que celui des synthèses les plus performantes réalisées jusque là (66 % ou 52 % pour celles de Raap et *coll*) mais offre l'avantage d'une séquence de réactions courte et facile à mettre en œuvre à partir du glycidol racémique peu coûteux et à l'aide de réactifs non toxiques. De plus le précurseur benzylé, est un composé stable pouvant être stocké plusieurs mois à -18°C. La DHAP est ensuite obtenue après une simple hydrogénolyse à pression atmosphérique et directement utilisable sans aucune purification.



i.: a) (BnO)₂P-NEt₂, tétrazole ; b) *m*CPBA, CH₂Cl₂, 85 % ; ii. : BnOH, BF₃/Et₂O, tamis moléculaires 4 Å, CH₂Cl₂, 88 % ; iii. : TPAP, NMO, tamis moléculaire 4 Å, CH₂Cl₂, 82 % ; iv. : H₂, Pd/C, MeOH/H₂O-9/1, quantitatif.

Figure 96. Synthèse de la DHAP

Enfin en 2010, Slepokura et Lis ont cristallisé la DHAP sous formes de différents sels,²⁷ notamment le sel CaCl(DHAP)²,9 H₂O qui peut être conservé plusieurs mois à température ambiante sans se décomposer.

La plupart des synthèses chimiques décrites dans la littérature conduisent à la formation de la DHAP avec des rendements assez moyens et font intervenir des purifications longues et fastidieuses. De plus, certaines d'entre elles impliquent la formation d'intermédiaires instables et/ou l'utilisation de produits onéreux et toxiques. Nous avons donc cherché à développer un chemin réactionnel qui permettrait la synthèse à plus grande échelle du précurseur stable (**157**) de la DHAP.

II Nouvelle synthèse de la DHAP à partir du glycidol benzylé.

Afin d'optimiser la synthèse de l'intermédiaire **157**, nous avons décidé de partir du glycidol benzylé, commercial et peu onéreux. En effet, après ouverture de cet époxyde par du dibenzylphosphate, le composé obtenu pourrait être oxydé et former en seulement deux étapes l'intermédiaire **157** désiré (Figure 97). Une simple hydrogénolyse, des groupements protecteurs permettrait de récupérer la DHAP juste avant son utilisation. Cette synthèse a été mise au point au laboratoire en collaboration avec le Dr Odile Meyer qui a effectué les tests préliminaires.²⁸



Figure 97. Rétrosynthèse du précurseur 157

Dans la littérature, il n'existe que très peu d'exemples d'ouverture d'époxydes par un phosphate. A notre connaissance, seul six exemples de ce type de réaction sont recensés jusqu'à maintenant et seules trois synthèses utilisent un phosphate protégé par des groupements benzyles (Figure 98).



Figure 98. Formation de phosphate par ouverture d'époxyde

Dans les exemples $a^{29,30}$, $b^{31,32}$ et c^{33} , les époxydes subissent une attaque nucléophile du phosphate dont les groupements hydroxyles sont protégés soit par des éthyles soit par des benzyles ou des butyles. Les solvants utilisés pour ce type de réaction sont le benzène, le THF ou encore le CH₂Cl₂. L'ouverture d'époxyde peut également être réalisée avec un phosphate de potassium ou de sodium (Figure 98, **d**.,³⁴ **e**.,^{35,36} **f**.) en milieu aqueux.

Comme nous souhaitons former un phosphate protégé par des groupements benzyles, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au trois premiers exemples (Figure 98, **a.**, **b.**, **c.**). Dans chaque cas, le phosphotriester formé résulte de l'ouverture régio- et stéréospécifique d'un époxyde par réaction d'un phosphate nucléophile agissant suivant un mécanisme de type SN₂.

Afin de déterminer quel serait le solvant le plus adéquat pour l'ouverture du glycidol benzylé par le dibenzylphosphate, nous avons mis en solution ces deux réactifs avec différents solvants. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus (Figure 99)

\bigtriangledown	`OB	n	PO(OBn) ₂ ►	OH BnOOPO(OBn		
159				158		
		Solvant	Temps (h)	Rendements (%)		
	1	benzène	96	13		
	2	toluène	48	20		
	3	THF	120	9		
	4	CH_2Cl_2	36	33		

Figure 99. Ouverture du benzylglycidol par le dibenzylphosphate dans différents solvants

Le solvant le plus approprié pour cette étape est le dichlorométhane, puisque le composé est obtenu avec un rendement de 33% (Figure 99, entrée 4). Les rendements modestes de ces différents essais d'ouverture d'époxyde par un phosphate ne sont pas en accord avec ceux trouvés dans la littérature. Notons cependant que toutes les réactions d'ouverture décrites font intervenir des époxydes liés à un cycle. Dans ce cas, la tension de cycle est supérieure à celle de l'époxyde sur une chaîne linéaire et l'ouverture est donc favorisée d'un point de vue énergétique.

Afin d'optimiser cette synthèse, nous avons cherché à rendre le phosphate plus nucléophile en passant par sa base conjuguée. Plusieurs essais ont été réalisés en utilisant différentes bases (NaH, Et₃N, collidine, Na₂CO₃ ou encore Cs₂CO₃) mais ils n'ont pas permis d'obtenir le produit attendu, et seul le produit de départ est récupéré. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que la base conjuguée formée est moins nucléophile que le phosphate. De plus, le phosphate de dibenzyle étant un acide, il pourrait protoner l'époxyde favorisant ainsi son ouverture, ce qui n'est pas possible en milieu basique.

Pour contourner ces problèmes, nous avons choisi d'utiliser des acides de Lewis qui ont déjà été employés dans l'ouverture stéréo- et régiospécifique d'époxyde par d'autres

nucléophiles. La chélation des deux oxygènes de l'époxy alcool par l'acide de Lewis devrait faciliter son l'ouverture par le phosphate. Dans la littérature l'acide de Lewis le plus fréquemment employé est le titane IV oxophile qui offre généralement de bons rendements sur les réactions d'ouverture d'époxy alcools par des nucléophiles.³⁷ Les conditions les plus couramment décrites dans la littérature mettent en jeu 1,5 équivalent de titane IV. Nous avons donc dans un premier temps appliqué ces mêmes conditions réactionnelles à notre synthèse en utilisant comme solvant le CH₂Cl₂. Là encore, seul le produit de départ est récupéré (Figure 100). Par la suite, nous avons chauffé le milieu réactionnel mais le même résultat a été obtenu. Dans un second temps, nous avons voulu connaître l'influence de la quantité de titane IV sur l'évolution de la réaction.



	Ti(OiPr) ₄ (éq.)	Température	Temps (h)	Rendements (%)
1	1,5	t.a.	24	0
2	1,5	Reflux	8	0
3	1	t.a.	17	0
4	0,5	t.a.	17	16
5	0,25	t.a.	24	34
6	0,1	t.a.	17	41
7	0,05	t.a.	17	52

Figure **100**. Essais de formation du composé **158** t.a. : température ambiante

Lorsque la quantité de titane IV est stœchiométrique ou supérieure par rapport à l'époxy alcool, aucun produit d'ouverture n'est observé (Figure 100, entrées **1**, **2** et **3**). Par contre, lorsque l'on diminue la quantité de titane, nous observons l'apparition du produit souhaité (Figure 100, entrées **4**, **5** et **6**) Le meilleur rendement est obtenu avec une quantité catalytique de titane IV (Figure 100, entrée **7**). Dans ces conditions, le phosphate **158** est formé avec 52 % de rendement. Ces résultats inattendus pourraient s'expliquer par la chélation du titane IV non seulement avec l'époxyde mais également avec le phosphate. Lorsque des quantités stoechiométriques de titane IV sont mises dans le milieu réactionnel, le phosphate est totalement complexé ce qui le rend inactif et l'empêche de réagir.

Dans la littérature, d'autres acides de Lewis, comme BF_3/Et_2O ³⁸ou encore CuI,³⁹ ont aussi été utilisés. Nous avons donc décidé de tester un large panel de ces acides afin d'essayer d'améliorer le rendement de la réaction. Tous les tests décrits dans la Figure **101** ont été réalisés dans les mêmes conditions et toutes les réactions ont été stoppées après que la totalité de l'époxyde **159** ait été consommé. Le solvant utilisé est le dichlorométhane ; 2,2 équivalents de dibenzyle phosphate sont ajoutés et l'acide de Lewis est présent en quantité stoechiométrique.

	Acides de Lewis	Т	t (h)	Rendements (%)	Т	t (h)	Rendements (%)
1	ZnOTf ₂	t.a.	15	12	reflux	15	13
2	CsF	t.a.	25	29	reflux	20	62
3	BF ₃ /Et ₂ O	t.a.	18	31	reflux	3	17
4	Ag ₂ SO ₄	t.a.	5	32	reflux	3	81
5	AgBH ₄	t.a.	4	37	reflux	2	48
6	AgPF ₆	t.a.	4	66	reflux	3	52
7	SnSO ₄	t.a.	30	65	reflux	16	48
8	CuOTf ₂	t.a.	18	18	reflux	17	28
9	CuSO ₄	t.a.	24	69	reflux	17	36
10	CuI	t.a.	25	90	reflux	2,5	22

Figure 101. Ouverture de l'époxyde 159 par le dibenzylphosphate (2,2 équivalents) en
présence d'un acide de Lewis (1 équivalent), dans CH ₂ Cl ₂ .
t.a. : température ambiante = 25° C

En effet, des premiers tests ont montré que contrairement a ce qu'on a pu observer avec le titane IV, les meilleurs rendements sont obtenus en utilisant un équivalent d'acide de Lewis.

L'analyse des spectres par RMN des premiers tests effectués avec LiBr et ZnCl₂ montre que les produits formés correspondent aux produits d'ouverture d'époxyde par les ions bromures et chlorures qui ont joué le rôle de nucléophile. Par la suite nous avons donc décidé de n'utiliser que des acides de Lewis dont les contres ion ne possèdent pas de propriétés nucléophiles.

A température ambiante, le triflate de zinc, le fluorure de césium ainsi que le BF_3 éthérate ont permis l'ouverture de l'époxyde avec un rendement plutôt modéré (respectivement 12, 29 et 31%) (Figure 101, entrées **1**, **2**, **3**) et accompagné de plusieurs sous produits dont les structures n'ont pu être déterminées. L'utilisation de sel d'argent (Ag (I)) comme Ag₂SO₄, AgBF₄ ou encore AgPF₆ ont permis d'obtenir le produit souhaité avec des rendements compris entre 31 et 66 % (Figure 101, entrées **3**, **4**, **5** et **6**).

Lorsque le cuivre II est employé, le phosphate désiré est respectivement formé avec 18 % de rendement avec le sulfate de cuivre et de 69 % avec le triflate de cuivre.

L'emploi de CuI en tant qu'activateur nous a donné le meilleur résultat puisque nous obtenons le produit désiré avec un rendement de 90 %.

Nous avons également voulu voir quelle influence la température du milieu réactionnel pouvait avoir sur l'avancement de la réaction. Nous avons donc utilisé les mêmes acides de Lewis dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment mais à reflux. Dans la majorité des cas, la cinétique de réaction est légèrement accélérée, et dans quelques cas le rendement diffère de manière assez significative. C'est le cas pour CsF et Ag_2SO_4 pour lesquels le rendement à reflux est nettement supérieur (Figure 101, entrées 2 et 4). Au contraire, pour CuSO₄ ainsi que pour CuI, le rendement est cette fois ci beaucoup moins bon qu'à température ambiante (Figure 101, entrées 3, 9 et 10).

Il est important de noter que, mis à par BF₃/Et₂O et AgPF₆, aucun des acides de Lewis testés n'est soluble dans le dichlorométhane. La réaction se passe donc à l'interface solideliquide, dans des conditions hétérogènes. On pourrait donc penser que l'utilisation d'une quantité catalytique d'acide de Lewis donnerait les mêmes résultats qu'un équivalent. Pourtant des tests préalables, réalisés au laboratoire par Odile Meyer, ont montré le contraire. Un équivalent est donc bien nécessaire pour obtenir les meilleurs rendements.

Quels que soient l'acide de Lewis, ou encore les conditions de températures utilisées, l'attaque nucléophile du dibenzylphosphate s'est toujours faite de manière régiospécifique sur le carbone C-3 du glycidol benzylé. Ce résultat est probablement du à la chélation de manière bidentate des acides de Lewis sur les deux oxygènes de l'époxyde de départ. On peut

également noter qu'à température ambiante, les contre-ions des sels d'argent et de cuivre, Ag(I) et Cu(II), jouent probablement un rôle lors de la réaction d'ouverture de l'époxyde (Figure 101, entrées 3, 4, 5 et 8, 9) puisque l'on note de significatives différences de rendements.

En résumé, ce travail méthodologique nous a montré que le solvant le plus adapté à cette réaction est le dichlorométhane et qu'en condition basique, il n'y avait pas ouverture de l'époxyde. Par contre, l'utilisation d'acide de Lewis comme CuI permet d'obtenir le phosphate désiré avec 90 % de rendement à température ambiante (Figure 102).



Figure **102**. Ouverture de l'époxyde **159** par le dibenzyle phosphate : conditions réactionnelles optimales

Nous avons ensuite appliqué cette méthodologie à la synthèse de la DHAP (Figure 103). Après cette première étape nous permettant d'accéder à l'alcool secondaire, ce dernier est oxydé à l'aide de TPAP /NMO en cétone. Cette étape est réalisée avec un rendement de 82% et permet d'accéder directement au précurseur stable **157**, précurseur qu'il est possible de garder plusieurs mois à -18°C.



i: HOP(O)(OBn)₂, CuI, CH₂Cl₂, tamis moléculaire 4 Å 90 % ; ii. : TPAP, NMO, tamis moléculaire 4 Å, CH₂Cl₂, 82 %; iii. : H₂, Pd/C, MeOH/ H₂O (9/1), quant.

Figure 103. Synthèse de la DHAP

La dernière étape de cette synthèse efficace est la déprotection de tous les groupements benzyles présents sur notre cétone **157**. Pour cela, une simple hydrogénolyse catalytique à pression atmosphérique est nécessaire. Cette hydrogénolyse est réalisée en 1 h dans un mélange eau- méthanol (1/9) en présence de Pd/C (11%). Cette étape de déprotection ne nécessite aucune purification si ce n'est une simple filtration du catalyseur sur célite. Le filtrat

est ensuite évaporé à sec et le résidu obtenu est finalement dissous dans l'eau et neutralisé par ajout d'une solution de soude à 1M.

III Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons réalisé une étude méthodologique d'ouverture du glycidol benzylé par le dibenzylphosphate. Cela nous a permis d'accéder au phosphate désiré avec un rendement de 90 % grâce à l'utilisation d'acides de Lewis.

Cette étude a ensuite été appliquée à la synthèse de la DHAP par un nouveau chemin réactionnel, en seulement trois étapes et avec un rendement global de 74 %. Ce rendement fait que notre synthèse est la plus courte et la plus efficace de la littérature. De plus, elle fait intervenir un précurseur stable **157** qui peut être stocké pendant plusieurs mois à -18°C et qui peut facilement et quantitativement conduire à la DHAP sans étape de purification.

(1) Gijsen, H.; M., J.; Qiao, L.; Fitz, W.; Wong, C.-H. Chem. Rev. 1996, 96, 443.

(2) Tolan, D. R.; Amsden, A. B.; Putney, S. D.; Urdea, M. S.; Penhoet, E. E. J. Biol. Chem. **1984**, 259, 1127.

- (3) Lebhertz, H. G. J. Biol. Chem 1973, 248, 1650.
- (4) Valentin, M.-L.; Bolte, J. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8103.
- (5) Baldwin, S. A.; Perham, R. N.; Stribling, D. *Biochem. J.* **1978**, *169*, 633.

(6) Hill, H. A. O.; Lobb, R. R.; Sharp, S. L.; Stokes, A. M.; Harris, J. I.; Jack, R. S. *Biochem. J.* **1976**, *153*, 551.

(7) Von der Osten, C. H.; Barbas, C. F. I.; Wong, C.-H.; Sinskey, A. J. *J. Mol. Microbiol.* **1989**, *3*, 1625.

(8) Henderson, I.; Sharpless, K. B.; Wong, C.-H. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 558.

(9) Toone, E. J.; Simon, E. S.; Bednarski, M. D.; Whitesides, G. M. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 5365.

- (10) Wong, C. H.; Whitesides, G. M. J. Org. Chem. 1983, 48.
- (11) Wong, C. H.; Whitesides, G. M. *Tetrahedron Organic chemistry Series volume 12* **1994**.
- (12) Richard, J. P. Biochem. 1991, 30, 4581.
- (13) Hettwer, J.; Oldenburg, H.; Flashel, E. J. Mol. Catal. B. Enzym. 2002, 19, 215.
- (14) Suau, T.; Alvaro, G.; Benaiges, M. D.; Lopez-Santin, J. *Biotechnol. Bioeng.* 2006, *93*, 48.
- (15) Ballou, C. E.; Fischer, H. O. J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 1659.
- (16) Valentin, M.-L.; Bolte, J. Bull. Soc. Chim. Fr. 1995, 132, 1167.
- (17) Gefflaut, T.; Lemaire, M.; Valentin, M.-L.; Bolte, J. J. Org. Chem. 1997, 62, 5920.

(18) Ferroni, E. L.; DiTella, V.; Ghanayem, N.; Jeske, R.; Jodlowski, C.; O'Connell, M.; Styrsky, J.; Svoboda, R.; Venkataraman, A.; Winkler, B. M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4943.

(19) Charmantray, F.; El Blidi, L.; Gefflaut, T.; Hecquet, L.; Bolte, J.; Lemaire, M. J. Org. Chem. 2004, 69, 9310.

(20) Colbran, R. L.; N., J. J. K.; Matheson, N. K.; Rozema, I. *Carbohydr. Res.* **1967**, *4*, 355.

- (21) Effenberger, F.; Straub, A. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1641.
- (22) Pederson, R. L.; Esker, J.; Wong, C.-H. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2643.
- (23) Jung, S.-H.; Jeong, J.-H.; Miller, P.; Wong, C.-H. J. Org. Chem. 1994, 59, 7182.
- (24) Ouwerkerk, N.; Van Boom, J. H.; Lugtenburg, J.; Raap, J. J. Org. Chem. 2000, 1480.
- (25) Ouwerkerk, N.; Steenweg, M.; de Ruijter, M.; Van Boom, J. H.; Lugtenburg, J.; Raap, J. J. Org. Chem. **2002**, 67, 1480.
- (26) Meyer, O.; Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C. *Curr. Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7921.
- (27) Slepokura, K.; Lis, T. Carbohydr. Res., 345, 512.
- (28) Meyer, O.; Ponaire, S.; Rohmer, M.; Grosdemange-Billiard, C. Org. Lett. 2006, 8, 4347.
- (29) Adelt, S.; Plettenburg, O.; Stricker, R.; Reiser, G.; Altenbach, H. J.; Vogel, G. J. Med. Chem. **1999**, 42, 1262.
- (30) Plettenburg, O.; Adelt, S.; Vogel, G.; Altenbach, H. J. *Tetrahedron:Asymmetry* **2000**, *11*, 1057.
- (31) Plante, O. J.; Palmacci, E. R.; Andrade, R. B.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9545.
- (32) Hunt, D. K.; Seeberger, H. Org. Lett. 2002, 4, 2751.
- (33) Di Raddo, P.; Chan, T.-H. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1983, 16.
- (34) Roussev, C. D.; Simeonov, M. F.; Petkov, D. D. J. Org. Chem. 1997, 62, 5238.
- (35) Pederson, R. L.; Liu, K.-C.; Rutan, J. F.; Chen, L.; Wong, C.-H. J. Org. Chem. **1990**, 55, 4897.
- (36) Ghérard, C.; Alphand, V.; Archelas, A.; Demuynck, C.; Hecquet, L.; Furtoss, R.; Bolte, J. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3399.
- (37) Caron, M.; Sharpless, K. B. J. Org. Chem. 1985, 50, 1557.
- (38) Guivisdalsky, P. N.; Bittman, R. J. Org. Chem. 1989, 54, 4637.
- (39) Bonini, C.; Chiummiento, L.; Lopardo, M. T.; Pullez, M.; Colobert, F.; Solladié, G. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2695.

Tentative de synthèse du L-Glycéraldéhyde 3-Phosphate

I. Introduction

I.1 Généralités :

Dans cette dernière partie, nous nous sommes intéressés à la première enzyme de la voie du MEP : la désoxyxylulose phosphate réducto-isomérase (DXS). Cette enzyme catalyse la réaction de formation du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) à partir du pyruvate, décarboxylé et activé sous la forme d'hydroxyéthylidènethiamine, et du D-glycéraldéhyde 3-phosphate (D-GAP) (Figure 104).



Figure 104. Première étape de la voie du MEP catalysée par la DXS

Lors de précédents travaux effectués au laboratoire¹ une synthèse mixte chimique/enzymatique de l'analogue phosphonate du MEP, le MEP_N a été réalisée dans le but de tester le MEP_N sur YgbP, la troisième enzyme de la voie du MEP qui converti le MEP en MEP-CDP. Pour ce faire, le D,L-glycéraldéhyde 3-phosphonate a été tout d'abord synthétisé à partir du 1,2-*O*-isopropylidène glycérol commercial. Ce dernier a ensuite été mis en présence de pyruvate et de la DXS pour donner l'analogue phosphonate du DXP, le DXP_N. Après filtration de l'excès de DXS, le brut de réaction enzymatique a été incubé avec la DXR et a permis d'obtenir le MEP_N (Figure 105).



Figure 105. Synthèse mixte du DXP_N

Dans ces conditions, le DL-GAP est intégralement consommé lors de son incubation avec le pyruvate et la DXS. Pourtant des analyses RMN ³¹P ont révélé la présence de trois signaux. Deux d'entres eux ont été respectivement attribués à l'analogue phosphonate de la DHAP, le DHAP_N (23,0 ppm) et à l'analogue phosphonate du DXP, DXP_N (24,7 ppm) formés. Le troisième signal à 25 ppm n'a pu être attribué avec certitude. Une hypothèse a tout de même été formulée. Il est mentionné dans la littérature que le L-glycéraldéhyde est substrat de la DXS.² Il est donc vraisemblable de penser que son analogue phosphonate, le L-GAP_N ait été transformé enzymatiquement et soit à l'origine du signal non attribué. Deux hypothèses sont alors envisageables.

Une première hypothèse impliquerait l'attaque de l'hydroxyéthylidènethiamine sur la face Re du L-GAP_N comme pour la catalyse naturelle. Dans ce cas nous obtiendrions un diastéréoisomère du L-DXP_N, un L-érythropentulose phosphonate (Figure 106) dont le signal en RMN du ³¹P serait différent de celui du DXP_N.

Une seconde hypothèse, pourrait être l'attaque de l'hydroxyéthylidènethiamine, dérivée du pyruvate sur la face Si du L-GAP_N. Dans ce cas, nous obtiendrions l'énantiomère L du GAP_N, un L-thréopentulose phosphonate (Figure 106) impossible à différencier du D-DXP_N en RMN.



Figure **106**. DXP_N et analogues phosphonate de désoxypentulose phosphate pouvant provenir de couplage entre du L-GAP_N et du pyruvate par la DXS.

Une telle utilisation de deux substrats énantiomères par une même enzyme est assez inhabituelle ; il nous a donc paru intéressant d'étudier la stéréoselectivité de la DXS afin de vérifier notre hypothèse.

Pour ce faire, une synthèse du L-GAP devra être mise au point. Après son incubation avec le pyruvate et la DXS, nous pourrions comparer en RMN, les signaux provenant du produit d'incubation du L-GAP avec ceux provenant du diastéréoisomère du DXP. La synthèse du diastéréoisomère du DXP a été réalisée au laboratoire par Grégory Hébinger.

I. 2 Historique

Dans la littérature, les synthèses chimiques du substrat naturel de la DXS, le D-GAP, sont très peu nombreuses, malgré le grand intérêt qu'a le D-GAP pour les biochimistes. En effet cette molécule occupe une place importante dans le métabolisme de la plupart des organismes vivants. Il est l'un des intermédiaires essentiels de la glycolyse. Quasiment seul l'énantiomère D est présent dans les cellules vivantes.

Quelques synthèses du glycéraldéhyde phosphate racémique ont été décrites dans la littérature.

Une première synthèse chimique du D,L-GAP a été réalisée en 1932 par Fischer et Baer.³ Grâce à cette synthèse plusieurs expérimentations ont pu être réalisées et ont indiquées l'importance biologique de ce composé. Cependant, l'utilisation de la voie chimique de synthèse du D,L-GAP est souvent abandonnée au profit de la voie de synthèse enzymatique conduisant au D-GAP.

Dans la voie enzymatique, le D-GAP est formé par le la coupure du fructose 1,6-bisphosphate, catalysée par la fructose bisphosphate aldolase (Figure 107). L'autre produit de cette réaction, la DHAP, est également converti en D-GAP par la triose phosphate isomérase. Le D-GAP est ensuite converti en 1,3-diphosphoglycérate par la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (Figure 107)



Figure 107. Schéma de la glycolyse.

La première synthèse chimique du D-GAP énantiomériquement pur est réalisée pour la première fois en 1955 par Ballou et Fischer.⁴ Cette synthèse en neuf étapes utilise le D-mannitol comme produit de départ. Après un jeu de protections et déprotections des fonctions hydroxyles, cette synthèse permet l'accès à un précurseur stable du D-GAP, le D-glycéraldéhyde diméthylacétal 3-phosphorate. Ce dernier, placé dans des conditions acides, permet d'obtenir le D-GAP (Figure 108).



Figure 108. Première synthèse du D-GAP par Ballou et Fischer en 1955.

En 1990, une synthèse mixte chimique/enzymatique a été mise au point par Wong et coll.⁵ Cette synthèse en cinq étapes utilise le glycidaldéhyde diéthylacétal comme produit de départ. L'étape clé de cette synthèse chimioenzymatique est l'utilisation de la LP-80-Lipase qui permet l'hydrolyse énantiosélective du 2-acétoxy-3-chloropropionaldéhyde diéthylacétal en (*S*)-3-chloro-2-hydroxypropionaldéhyde diéthylacétal et son énantiomère acétylé (Figure 109). La formation en milieux basique du (*S*)-glycidaldéhyde diéthylacétal va ensuite permettre l'ouverture de l'époxyde par un phosphate en milieu aqueux. Cette dernière molécule, placée en milieu acide permet d'accéder au D-GAP.



Figure 109. Synthèse mixte du D-GAP par Wong en 1990

Il est à noter qu'aucune synthèse chimique du L-GAP n'est encore connue. La réussite de sa synthèse serait donc une première dans la littérature. Cependant Tropp *et coll*, en 1987, ont réalisé la synthèse chimique/enzymatique du L-GAP.⁶
II. Synthèse du L-glycéraldéhyde 3-phosphate

II.1 Première voie de synthèse à partir du glycidol protégé

Notre première approche pour cette synthèse est fondée sur l'utilisation de la méthodologie d'ouverture d'époxyde par le dibenzylphosphate, une étude méthodologique que nous avons réalisée pour la synthèse de la DHAP. Nous avons donc voulu synthétiser un précurseur stable du L-GAP dont les fonctions hydroxyles pourraient toutes être déprotégées en une seule étape. Après ouverture du glycidol, protégé par un groupement R_1 , par le dibenzylphosphate, l'alcool secondaire formé serait protégé par un groupement hydrogénolysable R_2 , analogue à ceux portés par le phosphate. Une déprotection sélective de R_1 suivie d'une oxydation de l'alcool primaire pourrait nous permettre d'obtenir un précurseur stable du L-GAP. Une simple réaction d'hydrogénation permettrait ensuite sa libération juste avant son utilisation (Figure 110).



Figure 110. Stratégie de synthèse du L-GAP

En s'appuyant sur cette réflexion, nous avons essayé de mettre au point une nouvelle synthèse. Notre stratégie ne permet pas d'utiliser la méthodologie d'ouverture d'époxyde réalisée pour la synthèse de la DHAP car le groupement R_1 ne peut être un benzyle. Nous avons préparé différents glycidol protégés

Nous avons dans un premier temps protégé le groupement hydroxyle du glycidol sous forme d'éther méthylique en utilisant un mélange d'iodure de méthyle et d'hydroxyde de sodium.⁷ Le glycidol méthylé est obtenu avec un très faible rendement (moins de 10 %) du fait de sa trop grande volatilité. L'utilisation de groupes protecteurs tels que le THP ou MOM conduit également à la formation de composés extrêmement volatils. Lorsque la fonction alcool est protégée sous forme d'éther silylé, la réaction avec le dibenzylphosphate permet d'obtenir l'ouverture de l'époxyde silylé mais avec un rendement moyen de 36 %. La présence des orbitales d de l'atome de silicium pourrait être à l'origine du caractère moins basique du doublet de l'oxygène de la fonction hydroxyle. Dans ces conditions la chélation

par l'acide de Lewis devient plus difficile. La protection de l'alcool par un groupement *p*méthoxyphényle (PMP) permet non seulement l'ouverture de l'époxyde avec un bon rendement (75 %), mais aussi une déprotection sélective par rapport aux groupements benzyliques porté par le phosphate (Figure 111).



Figure 111. Choix du groupement protecteur sur le glycidol.

Pour éviter un jeu de protection, déprotection, l'alcool secondaire formé après ouverture de l'époxyde doit être protégé par un groupement qui pourra être déprotégé dans les mêmes conditions que les groupes protecteurs portés par le phosphate.

Nous avons choisi un groupement benzyle. Différentes conditions de benzylation⁸ ont été testées en milieu basique (Figure 112, entrées 1 et 2) et en milieu acide^{9,10} (Figure 112, entrée 3) mais aucune n'a permis la formation du produit attendu.

B	nO_p/ 3nO 0 16	OPMP ->>	BnO O BnO OPMP OBn 161				
	Entrées	Réactifs	Résultats				
	1	BnBr, NaH, THF	Mélange non purifiable				
	2	BnBr, NaH, Bu₄NI, DMF	Mélange non purifiable				
	3	2,2,2 trichloroacétimidate de benzyle, CF ₃ SO ₃ H (cat), cyclohexane/CH ₂ Cl ₂	Mélange non purifiable				

Figure 112. Conditions des essais de benzylation de l'alcool secondaire du composé 160.

L'encombrement stérique est probablement à l'origine de ces résultats. Pour résoudre ce problème, nous avons décidé d'utiliser le groupe *p*-méthoxybenzyle (PMB), qui devrait régler de façon astucieuse le problème d'encombrement. En effet, l'ouverture de l'époxyde protégé par un PMB conduit à l'alcool secondaire avec un rendement de 58 %. Le composé **163** en présence de 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) en milieu anhydre conduit à l'acétal de méthoxybenzylidène¹¹ **164** sous forme d'un mélange de diastéréoisomères (1:1) avec un rendement de 75 %. Il s'agit donc d'une protection intramoléculaire qui limite grandement le problème d'encombrement stérique (Figure 113). L'étape suivante est une réduction du méthoxybenzylidène pour obtenir sélectivement l'alcool primaire **165**. Plusieurs réducteurs sont décrits dans la littérature



Figure **113** : Utilisation d'un groupement PMB pour résoudre les problèmes d'encombrement stérique.

Le DIBAL-H est en général un réactif de choix pour effectuer ce type de réduction.¹² Pourtant, l'utilisation de six équivalents de DIBAL-H dans du CH_2Cl_2 à $-78^{\circ}C^{13}$ ont uniquement permis l'obtention de l'alcool secondaire (Figure 114, entrée 1). Lorsque le CH_2Cl_2 est remplacé par du THF, aucun produit de réduction n'est observé et seul le produit de départ est récupéré (Figure 114, entrée 2)

	Réactifs	Acide de Lewis	Nombres d'équivalents Réactif/ A.L.	Température	Solvant	Temps	Résultats
1	DIBAL-H		6/0	-78°C	CH ₂ Cl ₂	1h	Alcool secondaire
2	DIBAL-H		6/0	-78°C	THF	4h	Produit de départ
3	DIBAL-H	LiCl	6/1,5	-78°C	THF	1 nuit	Apparition d'un produit non identifié
4	LEBH	TiCl ₄	1/1	-78°C	CH ₂ Cl ₂	10 min	Dégradation
5	Bu ₂ BOTf	BH ₃ .THF	1 / 10	-78°C		20 min	Alcool primaire/alcool secondaire : 15/85
6	Bu ₂ BOTf	BH ₃ .THF	1 / 10	-10°C		10 min	Alcool primaire/alcool secondaire : 15/85
7	Me ₂ NH.BH ₃	BF ₃ .Et ₂ O	5/5	-40°C	CH ₂ Cl ₂	1h	Obtention du diol
8	Me ₂ NH.BH ₃	BF ₃ .Et ₂ O	2,5 / 2,5	-40°C	CH ₂ Cl ₂	1h	Obtention du diol
9	Me ₂ NH.BH ₃	BF ₃ .Et ₂ O	1 / 1	-40°C	CH ₂ Cl ₂	10 min	Alcool primaire/alcool secondaire : 30/70
10	Me ₂ NH.BH ₃	BF ₃ .Et ₂ O	1 / 1	-78°C	CH ₂ Cl ₂	20 min	Alcool primaire/alcool secondaire : 30/70
11	Me ₂ NH.BH ₃	BF ₃ .Et ₂ O	1 / 1	RT	CH ₂ Cl ₂	10 min	Alcool primaire/alcool secondaire : 30/70
12	Me ₂ NH.BH ₃	BF ₃ .Et ₂ O	1/1	-78°C	THF	5 h	Alcool primaire/alcool secondaire : 10/90

Figure **114**. Conditions et réactifs testés pour la réaction de réduction du méthoxybenzylidène afin d'obtenir sélectivement l'alcool primaire **165**.

L'addition d'un acide de Lewis avant l'ajout du DIBAL, pourrait chélater l'atome d'oxygène du phosphate et du groupement acétal, permettant ainsi la formation de l'alcool primaire. Des essais ont été effectués en présence de LiCl (Figure 114, entrée **3**). Malheureusement, nous n'avons pas observé la formation du produit attendu et seul un produit non identifié est observé.

L'utilisation de triéthylborohydrure de lithium (LEBH) en présence de TiCl₄ conduit à la dégradation du produit de départ après seulement 10 min à -78°C (Figure 114, entrée **4**). Par contre l'emploi de Bu₂BOTf utilisé à -78°C en présence d'un équivalent d'un acide de Lewis, BH₃.THF,¹⁴ permet d'obtenir l'alcool primaire mais en faibles proportions (15 %) par rapport à l'alcool secondaire (85 %) (Figure 114, entrée **5**). La température n'a aucune influence sur la proportion d'alcool primaire obtenu, seule la vitesse de réaction augmente avec la température. (Figure 114, entrée **6**). Lorsque l'on utilise les conditions de la littérature, soit 5 équivalents du complexe Me₂NH.BH₃ en présence de 5 équivalents de BH₃.Et₂O à -40°C,¹⁵ nous observons la déprotection totale du PMB (Figure 114, entrée **7**). Il faut être en proportions stœchiométriques pour observer l'apparition des alcools monoprotégés avec un rapport de 30/70 en faveur de l'alcool secondaire (Figure 114, entrée **9**).

Nous avons tenté d'améliorer la régiosélectivité de l'ouverture en faveur de l'alcool primaire en modifiant la température et la nature du solvant (Figure 114, entrées **10**, **11** et **12**). Quelle que soit la température, nous observons la même proportion d'alcool secondaire monoprotégé par rapport à l'alcool primaire monoprotégé.

Lorsque le CH_2Cl_2 est remplacé par du THF, le pourcentage de l'alcool primaire souhaité diminue considérablement (Figure 114, entrée **12**).

On se rend bien compte que, dans la majorité des conditions de réactifs et de températures que nous avons testées, l'alcool secondaire est fortement majoritaire. Ce phénomène pourrait être dû au phosphate présent sur notre molécule. En effet aucun substrat phosphaté n'a jamais été utilisé pour une réduction de ce type. Si l'acide de Lewis vient chélater l'oxygène de l'alcool secondaire protégé au lieu de chélater l'oxygène le moins encombré, l'alcool primaire se formerait majoritairement (Figure 115). Cette hypothèse pourrait donc expliquer nos mauvais résultats.



Figure 115. Chemins réactionnels pour la réduction du composé 164.

Après protection de notre époxyde de départ par un benzyle, ouverture de l'époxyde puis un jeu de protections et déprotections des fonctions hydroxyles (Figure 116) ; nous avons tenté d'oxyder l'alcool primaire en aldéhyde.



i : PMBCl, NaH, DMF, 95 % ; ii : dibenzylphosphate, CuI ; tamis moléculaires, CH₂Cl₂, 58 % ; iii : DDQ, tamis moléculaires, CH₂Cl₂, 75 % ; iv : Me₂NH.BH₃, BF₃.Et₂O, CH₂Cl₂, 30 % ; v : TPAP, NMO, tamis moléculaire, CH₂Cl₂.

Figure 116. Synthèse du L-GAP à partir du (R)-(+) glycidol

Dans cette étape, l'alcool primaire obtenu en présence du complexe $Me_2NH.BH_3$ et de $BH_3.Et_2O$ dans le CH_2Cl_2 (Entrée 11) est ensuite oxydé en aldéhyde en utilisant du perruthénate de tétrapropylammonium (TPAP) et d'un co-oxydant, le 4-méthyl-*N*-morpholine oxyde (NMO).¹⁶ La RMN du produit brut montre l'apparition d'un signal à 9,3 ppm qui pourrait correspondre au signal du proton de l'aldéhyde **166**.

L'étape suivante de déprotection des deux groupements benzyles et du PMB en une seule étape a été testée sur le brut réactionnel afin d'éviter une dégradation possible. Une réaction d'hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon (Pd/C) conduit à un mélange réactionnel dont l'analyse RMN n'a pas permit de conclure à la présence du L-glycéraldéhyde 3-phosphate puisque le spectre révèle l'existence de plusieurs produits non identifiés.

Nous avons donc envisagé une seconde voie de synthèse qui permettrait d'accéder au L-GAP protégé cette fois ci uniquement par des groupements benzyles.

II.2 Deuxième voie de synthèse, à partir du glycidol non protégé:

Quelques petits changements dans le chemin réactionnel théorique ont été envisagés afin d'accéder au précurseur du L-GAP dont toutes les fonctions hydroxyles sont protégées par des groupements benzyles (Figure 117).



i': dibenzylphosphate, CuI, tamis moléculaires, CH₂Cl₂, 16 %; i: phosphoramidite (*N*,*N*-diisopropyl-O,O-dibenzyl), tétrazole, *m*-CPBA, CH₂Cl₂, quantitatif; ii: 1% H₂SO₄, THF, 60 %; iii: benzaldéhyde diméthylacétal, *p*-TSA, 75 %; iv: Me₂NH.BH₃, CH₂Cl₂, -40°C, 17 %; v: TPAP, NMO, tamis moléculaires, CH₂Cl₂, Pd/C, H₂.

Figure 117. Synthèse du L-GAP à partir du (S)-(+) glycidol ou du (R)-(-) glycidol.

La réaction d'ouverture d'époxyde par un phosphate, précédemment mise au point, pourrait être directement utilisée sur le (R)-(-) glycidol non protégé pour nous conduire au diol **168**. Sur ce dernier, un jeu de protection/déprotection des alcools primaire et secondaire suivi d'une oxydation de l'alcool primaire nous donnerait accès au L-GAP totalement protégé par des benzyles. Une simple hydrogénolyse catalytique permettrait finalement d'obtenir le L-GAP sans aucune purification supplémentaire.

Le premier essai d'ouverture du glycidol non protégé, utilisant les conditions identiques à celles mises au point pour la synthèse de la DHAP, a été effectué sur le (R)-(-) glycidol en présence de CuI en tant acide de Lewis. Le diol **168** est obtenu mais avec un rendement très faible de 16%. L'utilisation de CuSO₄ dans les mêmes conditions que précédemment, conduit au diol désiré **168** mais avec un rendement de 13 %.

Au vu des mauvais rendements obtenus, nous avons choisi tout d'abord de phosphoryler le glycidol puis de réaliser l'ouverture de l'époxyde en milieu acide dilué.

Dans ces conditions, pour obtenir la bonne configuration du centre stéréogène du L-GAP, il faut partir du (S)-(+) glycidol

L'étape de phosphorylation est réalisée avec du N,N-diisopropyl-O,O-dibenzyl phosphoramidite en présence de tétrazole. Le phosphite ainsi formé est oxydé « one pot » en phosphate **167** par ajout d'acide *m*-chloroperoxybenzoïque (*m*-CPBA) avec un rendement quantitatif.¹⁷

La deuxième étape consiste à ouvrir l'époxyde par une solution diluée d'acide afin d'obtenir le composé **168**. L'utilisation d'une solution d'acide sulfurique à 1 % permet, après une journée et demie d'agitation à température ambiante, d'obtenir le diol **168** avec un rendement correct de 60 % (Figure 118).

Malgré une étape supplémentaire, le passage par l'intermédiaire **167** est plus intéressant du point de vue du rendement. En effet, l'obtention du diol **168** se fait avec un rendement de 60 % sur deux étapes alors qu'il n'est que de 16 % si on utilise la méthode « one pot ».



Schéma 118. Choix du chemin réactionnel pour l'accès au composé 168

Le diol **168** ainsi obtenu devra être sélectivement protégé par un benzyle sur l'alcool secondaire. Pour ce faire, nous avons choisi un groupement protecteur, le groupe benzylidène permettant de protéger simultanément les deux hydroxyles de la molécule. La réduction sélective du benzylidène devrait permettre d'obtenir l'alcool secondaire benzylé. Une

oxydation de l'alcool primaire ainsi formé suivit d'une hydrogénolyse devrait nous mener jusqu'au L-GAP.

La protection du diol **168**, a été réalisée en ajoutant une solution de benzaldéhyde diméthylacétal et d'acide *p*-toluènesulfonique¹⁸ sous pression réduite (50 mbar) pendant 3 jours. Le composé **169** est obtenu avec un rendement de 75 %.

Plusieurs conditions réactionnelles ont été testées pour réduire sélectivement le benzylidène en alcool primaire **170** (Figure 119). Là encore il faut noter que la réduction se fait en faveur de la formation de l'alcool secondaire quelles que soient les conditions utilisées (Figure 119).

Entrées	Réactifs	Température	Nombre d'équivalents	Solvant	Temps	Résultats
1	BH ₃ .THF Bu ₂ BOTf	-10°C	2	/	30 min	-Formation majoritaire de l'alcool secondaire. - 3 % d'alcool primaire .
2	DIBAL-H	-78°C	5,5	CH ₂ Cl ₂	2h	 -Réaction incomplète. -Formation majoritaire de l'alcool secondaire. - 5 % d'alcool primaire
3	Me ₂ NH.BH ₃	-40°C	1	CH ₂ Cl ₂	3h	 -Réaction incomplète. -Formation majoritaire de l'alcool secondaire. -17 % d'alcool primaire

Figure **119**. Conditions et réactifs testés pour la réduction sélective du diol **168** protégé par un benzylidène, en alcool primaire.

C'est le réactif Me₂NH.BH₃, utilisé à -40°C dans le dichlorométhane (Figure 119, entrée **3**) qui a donné les meilleurs résultats. Le composé **170** est cependant obtenu avec un faible rendement de 17 %.

Malgré ces résultats, nous avons continué afin de tenter de mener cette synthèse à terme. L'étape suivante est l'oxydation de l'alcool primaire **170** en aldéhyde **171**. Là encore différentes méthodes ont été testées. En présence de TPAP et NMO, la RMN du brut réactionnel montre l'apparition d'un pic à 9,5 ppm correspondant au proton de l'aldéhyde attendu. Après purification sur colonne de silice, le produit est totalement dégradé. Afin d'éviter toute dégradation, nous avons cherché à utiliser une méthode d'oxydation propre ne nécessitant aucune purification. C'est pourquoi nous avons voulu tester ce même oxydant

mais sur support solide. Mais l'utilisation du PSP (polymer-supported perruthénate) n'a pas permis la formation de notre aldéhyde, seul le produit de départ est récupéré.

Une seconde technique d'oxydation, utilisant comme réactif le DMPI (Dess-Martin periodinane)¹⁹, a été testée. Cette fois encore, l'analyse RMN du brut réactionnel signal l'apparition d'un pic à 9,5 ppm correspondant au signal du proton aldéhydique. Cette analyse nous montre également que le DMPI permet l'obtention d'un brut réactionnel beaucoup plus « propre » qu'avec l'utilisation de DMAP/NMO. Nous avons donc logiquement testé ce même réactif sur support solide mais sans résultat puisque le produit oxydé **171** n'a jamais été formé malgré l'utilisation d'un fort excès d'oxydant.

II.3 Troisième voie de synthèse réalisée par un doctorant du laboratoire :

En parallèle à ces travaux, Grégory Hébinger, un autre doctorant du laboratoire, a réalisé la synthèse du L-GAP en utilisant une voie complètement différente de celles présentées dans ce chapitre (Figure 120). Le produit de départ est le (-)-2,3-*O*-benzylidène-L-tartrate de diméthyle. Après avoir testé plusieurs chemins réactionnels qui se sont avérés infructueux, la synthèse suivante a pu être mise au point.



i :LiAlH₄, THF, 0°C, 96 % ; ii : NaH, TBDMSCl, THF 0°C, 88 % ; iii: BH₃.Me₂NH, BF₃.Et₂O, CH₂Cl₂, 98 %; iv: acétone diméthylacétal, PPTS, DMF, 78 %; v: TBAF, THF, 98 % ; vi : (BnO)₂P-NiPr₂, tétrazole, *m*-CPBA, CH₂Cl₂, 95 % ; AcOH 60 % dans l'eau, 94 % ; viii : Amberlyst A-26 ion-exchange, NaIO₄, THF/ D₂O, quantitatif ; ix : H₂/PdOH, CD₃OD/D₂O, quantitatif.

Figure 120 : Synthèse du L-GAP à partir du (-)-2,3- O-benzylidène-L-tartrate

Le produit de départ de cette synthèse est donc le (-)-2,3-*O*-benzylidène-L-tartrate de diméthyle commercial. Après sa réduction par LiAlH₄ avec un rendement de 96%, les fonctions hydroxyles du diol obtenu **172** sont protégées par deux groupements *t*-butyldiméthyles (88 %). Une réduction du benzylidène par deux équivalents de BF₃.Et₂O et un équivalent d'hydrure de bore permet ensuite l'obtention du diol 1,2 **174** avec un rendement quasi quantitatif. Celui-ci est alors protégé par un acétonide (78 %), ce qui permet après désilylation de l'alcool primaire (98 %), d'introduire le phosphate III sur l'hydroxyle libre. Celui-ci est oxydé "one pot" grâce à l'utilisation de *m*-CPBA et nous permet d'obtenir le composé **177** avec 95 % de rendement. La déprotection de l'acétonide est réalisé par addition d'une solution aqueuse d'acide acétique (60 %) qui nous conduit au diol **178** avec 94 % de rendement. Une coupure oxydante, réalisé grâce à l'utilisation de NaIO₄ sur résine, nous permet d'accéder quantitativement au composé **179** sans aucune purification. Finalement une réaction d'hydrogénolyse nous permet à nouveau d'obtenir le L-GAP sans purification supplémentaire. Afin d'éviter d'éventuels problèmes d'épimérisation de la molécule, les deux dernières étapes de cette synthèse doivent être effectuées juste avant l'incubation de la DXS.

III. Conclusion

La synthèse du L-GAP a donc finalement été mise au point, non pas, comme nous le pensions au début de ces travaux, en utilisant la méthode de l'ouverture d'époxyde mise au point pour la DHAP, mais en partant du (-)-2,3- *O*-benzylidène-L-tartrate de diméthyle. Grâce à cette méthode, le L-GAP est obtenu avec un rendement global de 57% sur les 9 étapes. Cependant, il paraît tout de même intéressant de persévérer et trouver une technique

permettant l'utilisation de la notre voie de synthèse. Il s'agit en effet d'une voie plus directe puisque seul cinq à six étapes (selon que l'on part du glycidol protégé ou non protégé) seraient nécessaires pour former le L-GAP.

- (1) Hirsch, G. thèse, Université Louis Pasteur, Dtrasbourg, France 2004.
- (2) Bailey, A. M.; Mahapatra, S.; Brennan, P. J.; Crick, D. C. *Glycobiology* **2002**, *12*, 813.
- (3) Bear, E.; Fischer, H. O. L. Ber. Deutsch. Chem. Ges 1932, 65B, 337.
- (4) Ballou, C. E.; Fischer, H. O. L. J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 3329.
- (5) Pederson, R. L.; Liu, K. K. C.; Rutan, J. F.; Chen, L.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4897.
- (6) Kalyananda, M. K. G. S.; Engel, R.; Tropp, B. E. J. Bacteriol. 1987, 169, 2488.
- (7) Jung, M. E.; Kass, S. M. *Tetrahedron. Lett.* **1989**, *30*, 641.
- (8) Freedma, H. H.; Dubois, R. A. *Tetrahedron. Lett.* **1975**, 3251.
- (9) Iversen, T.; Bundle, D. R. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1981, 1240.
- (10) Widmer, U. Synthesis 1987, 568.
- (11) Oikawa, Y.; Yoshioka, T.; Yonemitsu, O. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 889.
- (12) Tanaka, N.; Ogawa, I.; Yoshigase, S.; Nokami, J. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 2675.
- (13) Mikami, T.; Asano, H.; Mitsunobu, O. Chem. Lett. 1987, 2033.
- (14) Jiang, L.; Chan, T.-H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 355.
- (15) Oikawa, M.; Liu, W.-C.; Nakai, Y.; Koshida, S.; Fukase, K.; Kusumoto, S. *Synlett* **1996**, 1179.
- (16) Griffith, W. P.; Ley, S. V. Aldrichimica Acta. **1990**, 23, 13.
- (17) Viguerie, N. L.; Wilson, M.; Périé, J. New J. Chem. 1994, 18, 1183.
- (18) Ritter, T.; Zarotti, P.; Carreira, E. M. Org. Lett. 2004, 4371.
- (19) Dess, D. B.; Martin, J. C. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 7277.

CONCLUSION

La biosynthèse des isoprénoïdes par la voie du méthylérythritolphosphate (MEP) constitue une cible intéressante chez les bactéries et dans les chloroplastes pour la mise au point de biocides. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'inhibiteurs de la voie du MEP sous forme de prodrogues et également à la synthèse de petites molécules ultra- fonctionnalisées, comme la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et le L-glycéraldéhyde 3-phosphate (L-GAP).

Dans une première partie, nous avons mis au point la synthèse de prodrogues d'analogues de type hydroxamate de la fosmidomycine et du FR-900098, qui sont actuellement les deux inhibiteurs les plus efficaces de la voie du MEP. Cette synthèse a permis d'accéder à six prodrogues différentes qui ont ensuite été testées, d'une part sur des cultures de cellules de tabac, les BY-2 et d'autre part sur une bactérie, *Mycobacterium smegmatis*. Les résultats obtenus sur BY-2 sont très encourageants puisque deux de nos prodrogues se sont révélées être de meilleurs inhibiteurs que la fosmidomycine. De plus, ces molécules sont toujours actives à des concentrations auxquelles la fosmidomycine n'a plus aucun effet. En ce qui concerne *Mycobacterium smegmatis*, deux de nos prodrogues ont effectivement réussit à passer la paroi cellulaire puisqu'une activité inhibitrice sur la multiplication cellulaire a été détectée, contrairement aux molécules libres. Cependant ces résultats restent nettement inférieurs à ceux obtenus avec l'isoniazide, un antibactérien de référence pour les mycobactéries.

Dans une seconde partie, nous avons tenté de synthétiser le MEP sous forme de prodrogue en utilisant le groupement *cyclo*Sal(igényl) pour masquer la fonction phosphate. Malheureusement, nous avons uniquement réussi à obtenir le *cyclo*Sal-méthylérythritol phosphate dont toutes les fonctions hydroxyles étaient protégées. Les réactions de déprotections n'ont jamais été concluantes malgré les différents groupements protecteurs utilisés. Au vu de ces résultats, nous avons décidé de changer le groupement *cyclo*Sal(igényl) par des groupes acyloxy-butylester déjà utilisés pour masquer un phosphate dans le chapitre sur les prodrogues mentionnées précédemment. Là encore, la déprotection finale des groupements hydroxyles a échoué. Il faut cependant noter que par manque de temps et de produit une seule tentative de déprotection a pu être tentée. Il serait intéressant de reprendre la synthèse afin d'effectuer de nouveaux tests de déprotection.

Par la suite nous avons cherché à optimiser la synthèse de la DHAP. Cette petite molécule joue un rôle essentiel dans les réactions d'aldolisation enzymatique et pourrait permettre l'accès à des analogues du DXP. La synthèse de la DHAP utilisant comme réaction clé l'ouverture d'un époxyde par un phosphate avait été initiée par le Dr. Odile Meyer. Une étude méthodologique de cette réaction, utilisant différents acides de Lewis a été entreprise. Le meilleur résultat est obtenu avec du CuI et l'alcool phosphorylé est obtenu avec un rendement de 90%. Nous avons donc réussi à mettre au point une synthèse efficace de la DHAP à partir du glycidol en seulement trois étapes et avec un rendement global de 74%.

La dernière partie de notre travail est consacrée à la synthèse d'une petite molécule fonctionnalisée, le L-glycéraldéhyde 3-phosphate (L-GAP). Cette molécule est l'énantiomère du substrat naturel de la désoxyxylulose phosphate synthase (DXS), la première enzyme de la voie du MEP. Dans la voie du MEP, cette enzyme catalyse la réaction de formation du DXP à partir du pyruvate et du D-GAP. Afin d'étudier la stéréosélectivité de ce biocatalyseur, nous avons synthétisé le L-GAP. Pour ce faire nous avons choisi d'appliquer la méthodologie que nous avons développée pour la synthèse de la DHAP, c'est-à-dire une méthode d'ouverture d'époxyde par un phosphate. Deux chemins réactionnels utilisant cette étape ont été envisagés, mais nous n'avons pas réussi à mener cette synthèse à son terme par cette méthode. Une autre voie mise au point au laboratoire par Grégory Hebinger a permis d'accéder au L-GAP avec un rendement de 57% sur 9 étapes. Cependant il serait intéressant de persévérer dans notre voie puisque qu'elle permettrait d'atteindre le L-GAP en seulement cinq ou six étapes.

EXPERIMENTAL SECTION

MATERIALS

THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC)

TLC were made on silica gel 60 F_{254} Merck aluminium sheets. Products containing phenyl groups were visualized under UV light (254 nm). Sugar derivatives were revealed with an ethanol solution containing *p*-anisaldehyde (2.5%), sulphuric acid (3.5%) and acetic acid (2.5%) or phosphomolybdic acid solution in ethanol (20%, Aldrich) after heating the TLC plate above 100°C.

PREPARATIVE LAYER CHROMATOGRAPHY (PLC)

Preparative TLC were made on silica gel 60 F₂₅₄ Merck glass plate (20 x 20 cm):

- 0.25 mm thickness (amount of product lower than 10 mg),
- 0.5 mm thickness (amount of product between 5 mg and 25 mg),
- 2 mm thickness (amount of product between 25 mg and 100 mg).

The products were usually visualised with UV light (254 mm). To avoid product losses, preparative TLC plates were not revealed with reagents.

FLASH COLUMN CHROMATOGRAPHY

Flash chromatography was made on silica gel 60 (40-63 μ m) Merck under nitrogen pressure. The height of the silica gel column was generally 15 cm and the diameter depended of the amounts of products to be separated. All eluent systems were chosen to yield R_f between 0.25 to 0.40 on analytical TLC plates for the considered products.

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

The ¹H, ¹³C, ³¹P NMR spectra were recorded on a BRUKER AM 300 spectrometer (¹H NMR: 300 MHz, ¹³C NMR: 75 MHz, ³¹P NMR: 121 MHz) in CDCl₃, D₂O or CD₃OD solution. The chemical shifts (δ) are expressed in ppm. The references were generally the solvent used for recording the sepctra.

- CHCl₃: $\delta_{ref} = 7.26$ ppm for ¹H NMR and CDCl₃: $\delta_{ref} = 77.16$ ppm for ¹³C NMR.
- DHO: $\delta_{ref} = 4.79$ ppm for ¹H NMR.
- CD₂HOD: $\delta_{ref} = 3.31$ ppm for ¹H NMR and CD₃OD: $\delta_{ref} = 49.00$ ppm for ¹³C NMR.

For the ³¹P NMR reference, the spectrometer had an external reference, corresponding to 80% phosphoric acid in D₂O ($\delta = 0.0$ ppm).

s, d, t, q, br s are abbreviations for signal multiplicity correspond to singlet, doublet, triplet and quadruplet and broad singlet. J-couplings are exposed in Hz. Conformers are distinguished in a spectrum with * added to the corresponding proton or carbon assignments for each diastereoisomers.

Ethyl 4-(diethoxyphosphoryl)butanoate 106



Sodium hydride (573 mg; 23.9 mmol) was added to a solution of diethyl phosphite (3 g; 21.7 mmol) in THF (100 mL) at 0°C. The solution was then stirred for 20 min at room temperature. Ethyl bromobutyrate (4.70 mL; 32.6 mmol) was added and the solution was stirred for 48 h. The reaction was quenched by adding a saturated solution of NH₄Cl. Diethyl ether was added and the aqueous layer was further extracted with three portions of diethyl ether. The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by flash chromatography (EtOAc/Petroleum ether, 7:3) yielding ethyl 4-(diethoxyphosphoryl)butanoate **106** (4.60 g) as a colourless oil.

Yield: 84 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.12$ (EtOAc/petroleum ether 7:3)

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** $\delta = 1.19$ (3H, t, J = 7.1 Hz, -O-CH₂-CH₃); 1,26 (6H, t, J = 7.1 Hz, P-O-CH₂-CH₃); 1.69-1.89 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.33 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH₂-CO); 4.04 (6H, m, O-CH₂, P-O-CH₂).

¹³**C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 14.2, 16.3 (d, *J* = 6.0 Hz); 18.1 (d, *J* = 4.3 Hz); 24.9 (d, *J* = 141.6 Hz); 34.4 (d, *J* = 15.5 Hz); 60.4, 61.4 (d, *J* = 6.4 Hz); 172.5.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): δ = 32.3.

HRMS (EI⁺): m/z calculated for C₁₀H₂₁O₅PNa [M+Na]⁺ 275.1019, found 275.1025.

Diethyl 4-(benzyloxyamino)-4-oxobutylphosphonate 108



A 1 M solution of LiHMDS in THF (71 mL; 70.8 mmol) was added to a solution of *O*-benzylhydroxylamine hydrochloride (2.21g; 13.9 mmol) in THF (70 mL) at -78°C for 30 min. Subsequently, a solution of ethyl 4-(diethoxyphosphoryl)butanoate **106** (3.5 g; 13.9 mmol) in THF (5 mL) was added dropwise to the cold reaction mixture. After overnight stirring, the reaction mixture was quenched with a saturated aqueous NH₄Cl solution and extracted several times with EtOAc. The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (EtOAcaffording diethyl 4-(benzyloxyamino)-4-oxobutylphosphonate **108** (2.97 g) as a pale yellow oil.

Yield: 65 %

 \mathbf{R}_{f} =0.30 (EtOAc)

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** $\delta = 1.28$ (6H, t, J = 7.0 Hz, CH₃); 1.66-1.98 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.20 (2H, t, J = 6.6 Hz, CH₂-CO); 3.94-4.13 (4H, m, CH₂-CH₃); 4.84 (2H, s, CH₂-Ph); 7.35 (5H, m, Ph), 9.12 (1H, br signal, NH).

¹³**C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 16.4 (d, *J* = 6.0 Hz); 18.4, 23.9 (d, *J* = 140.5 Hz); 32.6 (d, *J* = 12.1 Hz); 61.7 (d, *J* = 6.4 Hz); 78.1, 128.5, 128.6, 129.1, 135.3, 170.1.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 32.5$.

HRMS (EI⁺): *m/z* calculated for C₁₅H₂₄NO₅PNa [M+Na]⁺ 352.1284, found 352.1263.

Diethyl 4-(benzyloxy(methyl)amino)-4-oxobutylphosphonate 109



To a solution of diethyl 4-(benzyloxyamino)-4-oxobutylphosphonate **108** (1.2 g; 3.64 mmol) in THF (48 mL) was added 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (1.63 mL; 10.9 mmol). The reaction mixture was stirred for 30 min at the same temperature. Methyl iodide (680 μ L; 10.9 mmol) was added dropwise, and the reaction mixture was allowed to warm at room temperature overnight. The reaction was quenched with a saturated aqueous NH₄Cl solution and extracted several times with EtOAc. The combined organic layers were dried, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/MeOH, 95:5) yielding diethyl 4-(benzyloxy(methyl)amino)-4-oxobutylphosphonate **109** (725 mg, 2.12 mmol) as a pale brownish oil.

Yield: 58 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.17 \text{ (EtOAc)}$

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 1.21 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₃); 1,60-1.90 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.40 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, CH₂-CO); 3.10 (3H, s, CH₃-N); 3.90-4.07 (4H, m, CH₂-CH₃); 4.74 (2H, s, CH₂-Ph); 7.30 (5H, m, Ph).

¹³**C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** $\delta = 16.4$ (d, J = 6.0 Hz); 17.6 (d, J = 4.7 Hz); 25.0 (d, J = 140.8 Hz); 32.3 (d, J = 15.9 Hz); 61.5 (d, J = 6.4 Hz); 76.2, 128.7, 129.0, 129.3 and 134.5, 173.4.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): δ = 32.5.

HRMS (EI⁺): m/z calculated for C₁₆H₂₆NO₅PNa [M+Na]⁺ 366.144, found 366.139.

[4-(N-benzyloxyamino)oxobutyl]phosphonobis(n-butyryloxymethyl)ester 112



To a solution of diethyl 4-(benzyloxyamino)-4-oxobutylphosphonate 108 (0.50 g; 1.52 mmol; 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added TMSBr (1.0 mL; 7.59 mmol; 5 eq.) at 0°C. The reaction mixture was first stirred at 0°C for 1 h and then overnight at room temperature. The solvent was evaporated, and the residue was dissolved in THF (5 mL). Water (60 µL) was added, and the mixture was stirred for 10 min. The solvents were evaporated, and the residue was dried under vacuum overnight. The crude dried product was dissolved in DMF (8 mL) and TEA (0.53 mL; 3.8 mmol; 2.5 eq.). The reaction mixture was stirred at 70°C for 25 min. Chloromethyl butyrate (0.58 mL; 4.56 mmol; 3 eq.) was added, and the mixture was stirred at 70°C for 20 h at room temperature for additional 24 h. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent was evaporated. The crude residue was the purified by flash chromatography (ethyl acetate / petroleum ether, 8:2) to give [4-(*N*benzyloxyamino)oxobutyl]phosphonobis(n-butyryloxymethyl)ester 112 (187 mg) as a colourless oil.

Yield: 26 %

 $\mathbf{R_{f}} = 0.55 (Et_2O)$

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 0.92 (6H, t, *J* = 7.4 Hz, CH₃-CH₂); 1.62 (4H, ddq, *J* = 7.4 Hz, CH₂-CH₃); 1.76-2.03 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.16 (4/10 of 2H, t, *J* = 6.0 Hz, CH₂-CON)*; 2.32 (4H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₂-CO); 2.45 (6/10 of 2H, t, *J* = 5.4 Hz, CH₂-CON); 4.88 (4/10 of 2H, s, CH₂-Ph)*; 4.90 (6/10 of 2H, s, CH₂-Ph), 5.58 (2H, dd, *J* = 5.4 Hz, 7.5 Hz, O-CH₂-O); 5.63 (2H, dd, *J* = 5.7 Hz, 7.8 Hz, O-CH₂-O); 7.33 (5H, m, Ph); 8.97 (1H, broad signal, NH).

¹³**C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** $\delta = 13.7$; 16.9; 18.1; 24.9 (d, J = 140.9 Hz); 25.6 (d, J = 140.9 Hz)*; 32.4 (d, J = 21.1 Hz); 32.3 (d, J = 21.6 Hz)*; 35.9; 78.3; 81.2 (d, J = 6.3 Hz), 128.9, 129.3, 129.6, 134.6, 169.7*, 169.8, 172.2, 172.3.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 33.5^*$, 33.7.

HRMS (EI⁺): m/z calculated for C₂₁H₃₂NO₉PNa [M+Na]⁺ 496.171, found 496.168.

[4-(N-benzyloxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(n-butyryloxymethyl)ester 113



To a solution of diethyl 4-(benzyloxy(methyl)amino)-4-oxobutylphosphonate 109 (0.52 g; 1.52 mmol; 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added TMSBr (1.0 mL; 7.59 mmol; 5 eq.) at 0°C. The reaction mixture was first stirred at 0°C for 1 h and then overnight at room temperature. The solvent was evaporated, and the residue was dissolved in THF (5 mL). Water (60 μ L) was added, and the mixture was stirred for 10 min. Solvents were evaporated, and the residue was dried under vacuum overnight. The crude dried product was dissolved in DMF (8 mL) and TEA (0.53 mL; 3.8 mmol; 2.5 eq.). The reaction mixture was stirred at 70°C for 25 min. Chloromethyl butyrate (0.58 mL; 4.56 mmol; 3 eq.) was added, and the mixture was stirred at 70°C for 20 h and at room temperature for additional 24 h. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent was evaporated. The crude residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether. 8:2) to give [4-(Nbenzyloxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(n-butyryloxymethyl)ester 113 (333 mg) as a colourless oil.

Yield: 45 %

 $R_{f} = 0.55 (Et_2O)$

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 0.90 (6H, t, *J* = 7.3 Hz, CH₃-CH₂); 1.61 (4H, ddq, *J* = 7.5 Hz, CH₂-CH₃); 1.76-1.90 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.30 (4H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₂-C(O)-O); 2.42 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, CH₂-CON); 3.13 (3H, s, CH₃-N), 4.77 (2H, s, CH₂-Ph); 5.58 (2H, s, O-CH₂-O); 5.62 (2H, s, O-CH₂-O); 7.33 (5H, m, Ph).

¹³**C-NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 13.6; 17.1 (d, *J* = 4.3 Hz);, 18.1; 25.8 (d, *J* = 140.8 Hz); 32.1 (d, *J* = 15.5 Hz); 35.8; 76.3; 81.1 (d, *J* = 6.2 Hz), 128.8, 129.1, 129.4, 135.6; 172.1, 173.9.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 33.9$.

HRMS (EI⁺): m/z calculated for C₂₂H ₃₄NO₉PNa [M+Na]⁺ 510.186, found 510.185.

[4-(N-benzyloxyamino)oxobutyl]phosphonobis(pivaloyloxymethyl)ester 114



To a solution diethyl 4-(benzyloxyamino)-4-oxobutylphosphonate 108 (0.5 g; 1.52 mmol; 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added TMSBr (1.0 mL; 7.59 mmol; 5 eq.) at 0°C. The reaction mixture was first stirred at 0°C for 1 h and then overnight at room temperature. The solvent was evaporated, and the residue was dissolved in THF (5 mL). Water (60 µL) was added, and the mixture was stirred for 10 min. The solvents were evaporated, and the residue was dried under vacuum overnight. The crude dried product was dissolved in DMF (8 mL) and TEA (0.53 mL; 3.8 mmol; 2.5 eq.). The reaction mixture was stirred at 70°C for 25 min. Chloromethyl pivalate (0.66 mL; 4.56 mmol; 3 eq.) was added, and the mixture was stirred at 70°C for 20 h at room temperature for additional 24 h. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent was evaporated. The crude residue was the purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 8:2) to give [4-(Nbenzyloxyamino)oxobutyl]phosphonobis(pivaloyloxymethyl)ester 114 (0.16 g) as a colourless oil.

Yield: 21 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.53$ in Et₂O

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** $\delta = 1.19 (18H, s, CH_3)$; 1.78- 1.93 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.17 (3/10 of 2H, br, CH₂-C(O)-N*); 2.46 (7/10 of 2H, t, J = 6.0 Hz, CH₂- C(O)-N); 4.91 (2H, s, CH₂-Ph); 5.60 (2H, s, O-CH₂-O); 5.64 (2H, s, O-CH₂-O); 7.35 (5H, m, Ph); 8.89 (1H, br, NH).

¹³**C-NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 17.0, 18.3*, 25.7 (d, *J* = 147.2 Hz), 25.8 (d, *J* = 147.1 Hz)*, 27.0, 32.3 (d, *J* = 12.7 Hz), 38.9, 78.3, 81.5 (d, *J* = 6.3 Hz), 128.9, 129.2, 129.7, 134.6, 175.3, 175.4*, 177.1, 177.2*.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 33.4*, 33.6.

HRMS (EI⁺) *m/z* calculated for C₂₃H₃₆NO₉PNa [M+Na]⁺: 524.202, found 524.199.

[4-(N-benzyloxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(pivaloyloxymethyl)ester 115



To a solution of Diethyl 4-(benzyloxy(methyl)amino)-4-oxobutylphosphonate 109 (0.52 g; 1.52 mmol; 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added TMSBr (1.0 mL; 7.59 mmol; 5 eq.) at 0°C. The reaction mixture was first stirred at 0°C for 1 h and then overnight at room temperature. The solvent was evaporated, and the residue was dissolved in THF (5 mL). Water (60 µL) was added, and the mixture was stirred for 10 min. Solvents were evaporated, and the residue was dried under vacuum overnight. The crude dried product was dissolved in DMF (8 mL) and TEA (0.53 mL; 3.8 mmol; 2.5 eq.). The reaction mixture was stirred at 70°C for 25 min. Chloromethyl pivalate (0.66 mL; 4.56 mmol; 3 eq.) was added, and the mixture was stirred at 70°C for 20 h and at room temperature for additional 24 h. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent was evaporated. The crude residue was purified by chromatography (ethyl flash acetate/petroleum ether. 8:2) to give [4-(Nbenzyloxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(pivaloyloxymethyl)ester **115** (305 mg) as a colourless oil.

Yield: 39 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.56$ in $\mathrm{Et}_2\mathrm{O}$

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 1.16 (18H, s, CH₃); 1.75-1.87 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.41 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, CH₂-CON); 3.13 (3H, s, N-CH₃); 4.77 (2H, s, CH₂-Ph); 5.58 (2H, s, O-CH₂-O); 5.62 (2H, s, O-CH₂-O); 7.32 (5H, s, Ph).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 17.2$ (d, J = 4.9 Hz), 25.9 (d, J = 140.2 Hz), 26.9, 32.1 (d, J = 16.1 Hz), 38.8, 76.3, 81.4 (d, J = 6.2 Hz), 128.8, 129.1, 129.4, 134.5, 173.9, 176.9.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 33.9$.

HRMS (EI⁺) m/z calculated for C₂₄H₃₈NO₉PNa [M+Na]⁺: 538.224, found 538.226.

[4-(N-benzyloxyamino)oxobutyl]phosphonobis(benzoyloxymethyl)ester 116



To a solution diethyl 4-(benzyloxyamino)-4-oxobutylphosphonate 108 (0.5 g; 1.52 mmol; 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added TMSBr (1.0 mL; 7.59 mmol; 5 eq.) at 0°C. The reaction mixture was first stirred at 0°C for 1 h and then overnight at room temperature. The solvent was evaporated, and the residue was dissolved in THF (5 mL). Water (60 µL) was added, and the mixture was stirred for 10 min. The solvents were evaporated, and the residue was dried under vacuum overnight. The crude dried product was dissolved in DMF (8 mL) and TEA (0.53 mL; 3.8 mmol; 2.5 eq.). The reaction mixture was stirred at 70°C for 25 min. Chloromethyl benzoate (0.78 g; 4.56 mmol; 3 eq.) was added, and the mixture was stirred at 70°C for 20 h at room temperature for additional 24 h. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent was evaporated. The crude residue was the purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 8:2) to give [4-(*N*benzyloxyamino)oxobutyl]phosphonobis(benzoyloxymethyl)ester **116** (0.29 mg) as a colourless oil.

Yield: 35 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.52$ in Et₂O

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 1.82-1.96 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.42 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, CH₂-CON); 4.75 (2H, s, CH₂-Ph); 5.86 (2H, dd, *J* = 5.1 Hz, 9.6 Hz, O-CH₂-O); 5.92 (2H, dd, *J* = 5.1 Hz, 10.8 Hz, O-CH₂-O); 7.35 (5H, m, Ph); 7.38 (4H, t, *J* = 7.8 Hz, *m*-CH); 7.54 (2H, ddt, *J* = 1.4 Hz, 7.2 Hz, *p*-CH); 8.01 (4H, dd, *J* = 0.9 Hz, 8.1 Hz, *o*-CH); 8.90 (1H, bs , NH).

¹³**C-NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 17.4 (d, *J* = 4.3 Hz), 25.7 (d, *J* = 141.4 Hz), 34.0 (d, *J* = 16.1 Hz), 81.9 (d, *J* = 6.8 Hz), 86.9, 128.8, 129.2, 129.3, 129.7, 130.2, 134.0, 134.1, 165.1, 171.7.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 34.6$.

[4-(N-benzyloxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(benzoyloxymethyl)ester 117



To a solution of diethyl 4-(benzyloxy(methyl)amino)-4-oxobutylphosphonate 109 (0.52 g; 1.52 mmol; 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added TMSBr (1.0 mL; 7.59 mmol; 5 eq.) at 0°C. The reaction mixture was first stirred at 0°C for 1 h and then overnight at room temperature. The solvent was evaporated, and the residue was dissolved in THF (5 mL). Water (60 μ L) was added, and the mixture was stirred for 10 min. Solvents were evaporated, and the residue was dried under vacuum overnight. The crude dried product was dissolved in DMF (8 mL) and TEA (0.53 mL; 3.8 mmol; 2.5 eq.). The reaction mixture was stirred at 70°C for 25 min. Chloromethyl benzoate (0.78 g; 4.56 mmol; 3 eq.) was added, and the mixture was stirred at 70°C for 20 h and at room temperature for additional 24 h. After addition of water, the mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent was evaporated. The crude residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether. 8:2) [4-(Nto benzyloxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(benzoyloxymethyl)ester 117 (337 mg) as a colourless oil.

Yield: 40 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.50$ in Et₂O

¹**H-NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 1.82-1.96 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.41 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, CH₂-CON); 3.10 (3H, s, CH₃-N); 4.73 (2H, s, CH₂-Ph); 5.86 (2H, dd, *J* = 5.1 Hz, 9.6 Hz, O-CH₂-O); 5.91 (2H, dd, *J* = 5.1 Hz, 10.8 Hz, O-CH₂-O); 7.31 (5H, m, Ph); 7.38 (4H, t, *J* = 7.8 Hz, *m*-CH); 7.54 (2H, dd, *J* = 1.4 Hz, 7.2 Hz, *p*-CH); 8.00 (4H, dd, *J* = 0.9 Hz, 8.1 Hz, *o*-CH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 17.5 (d, *J* = 4.6 Hz), 26.2 (d, *J* = 140.3 Hz), 32.3 (d, *J* = 15.5 Hz), 33.8, 76.5, 82.1(d, *J* = 6.3 Hz), 129.0, 129.1, 129.4, 129.7, 130.4, 134.2, 134.9, 165.3, 174.1.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 34.3$.

HRMS (**EI**⁺) *m/z* calculated for C₂₈H₃₀NO₉PNa [M+Na]⁺: 578.1550, found 578.1516.

[4-(N-hydroxyamino)oxobutyl]phosphonobis(n-butyryloxymethyl)ester 118



[4-(N-benzyloxyamino)oxobutyl]phosphonobis(n-butyryloxymethyl)ester 112 (180 mg; 0.40 mmol; 1 eq.) was hydrogenolyzed in absolute methanol (4 mL/mmol) for 1h at room temperature over 10% palladium on charcoal. The catalyst was removed by filtration on cotton and the reaction evaporated dryness mixture was to to give [4-(Nhydroxyamino)oxobutyl]phosphonobis(n-butyryloxymethyl)ester 118 (135 mg) as a colourless oil.

Yield: 95 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.25$ in EtOAc

¹**H-NMR (300 MHz, MeOD):** δ = 0.97 (6H, t, *J* = 7.4 Hz, CH₃-CH₂); 1.67 (4H, q, *J* = 7.4 Hz, CH₂-CH₃); 1.79-2.01 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.31 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₂-CON); 2.40 (4H, t, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CO); 5.64 (2H, dd, *J* = 4.2 Hz, 9.0 Hz, O-CH₂-O); 5.69 (2H, dd, *J* = 4.3 Hz, 9.3 Hz, O-CH₂-O).

¹³C-NMR (75 MHz, MeOD): δ = 14.0, 19.2, 19.5 (d, *J* = 5.2 Hz), 26.5 (d, *J* = 140.9 Hz), 36.3 (d, *J* = 16.7 Hz), 36.6, 82.7 (d, *J* = 6.9 Hz), 173.6, 177.6.

³¹P-NMR (121.5 MHz, MeOD): δ = 33.9.

HRMS (EI⁺) m/z calculated for C₂₁H ₃₂NO₉PNa [M+Na]⁺: 496.171, found 496.168.

[4-(N-hydroxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(n-butyryloxymethyl)ester 119



[4-(*N*-benzyloxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(*n*-butyryloxymethyl)ester **113** (320 mg; 0.70 mmol; 1 eq.) was hydrogenolyzed in absolute methanol (4 mL/mmol) for 1h at room temperature over 10% palladium on charcoal. The catalyst was removed by filtration on cotton and the reaction mixture was evaporated to dryness to give of [4-(*N*-hydroxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(*n*-butyryloxymethyl)ester **119** (242 mg) as a colourless oil.

Yield: 94 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.23$ in EtOAc

¹**H-NMR (300 MHz, CD₃OD):** δ = 0.97 (6H, t, *J* = 7.4 Hz, CH₃-CH₂); 1.67 (4H, q, *J* = 7.4 Hz, CH₂-CH₃); 1.78-2.02 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.40 (4H, t, *J* = 7.4 Hz, CH₂-CO); 2.58 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₂-N); 3.19 (3H, s, N-CH₃); 5.64 (2H, dd, *J* = 5.4 Hz, 8.7 Hz, O-CH₂-O); 5.67 (2H, dd, *J* = 5.4 Hz, 8.7 Hz, O-CH₂-O).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 14.0, 18.6 (d, *J* = 4.4 Hz), 19.2, 26.5 (d, *J* = 140.8 Hz), 33.2 (d, *J* = 17.4 Hz), 36.4, 36.6, 82.7 (d, *J* = 6.2 Hz), 173.5, 174.7.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 34.1$.

HRMS (EI⁺) m/z calculated for C₁₅H₂₈NO₉PNa [M+Na]⁺: 420.1394, found 420.1360.

[4-(N-hydroxyamino)oxobutyl]phosphonobis(pivaloyloxymethyl)ester 120



4-(Benzyloxyamino)-4-oxobutyl- phosphinobutionyloxymethyl ester **114** (150 mg; 0.30 mmol; 1 eq.) was hydrogenolyzed in absolute methanol (4 mL/mmol) for 1h at room temperature over 10% palladium on charcoal. The catalyst was removed by filtration on cotton and the reaction mixture was evaporated to dryness to give [4-(N-hydroxyamino)oxobutyl]phosphonobis(pivaloyloxymethyl)ester **120** (116 mg) as a colourless oil.

Yield: 94 %

 $R_{f} = 0.21$ (EtOAc)

¹**H-NMR (300 MHz, CD₃OD):** δ (ppm) = 1.25 (18H, s, CH₃); 1.81- 2.30 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.33 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₂-CON); 5.67 (2H, dd, *J* = 5.4 Hz, 7.2 Hz, O-CH₂-O); 5.71 (2H, dd, *J* = 5.4 Hz, 7.2 Hz, O-CH₂-O).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) = 19.5 (d, J = 5.2 Hz)*, 19.6 (d, J = 5.1 Hz), 26.5 (d, J = 141.4 Hz), 27.4, 36.3 (d, J = 17.2 Hz), 37.0 (d, J = 17.2 Hz)*, 39.9, 83.0 (d, J = 6.9 Hz), 175.1*, 177.4, 178.3.

³¹**P-NMR (121.5 MHz, CD₃OD):** δ (ppm) = 33.7*, 33.8.

[4-(N-hydroxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(pivaloyloxymethyl)ester 121



[4-(*N*-Benzyloxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(pivaloyloxymethyl)ester **115** (290 mg; 0.56 mmol; 1 eq.) was hydrogenolyzed in absolute methanol (4 mL/mmol) for 1h at room temperature over 10% palladium on charcoal. The catalyst was removed by filtration on cotton dryness and the reaction mixture was evaporated to to give of [4-(*N*hydroxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(pivaloyloxymethyl)ester 121 (220 mg) as a colourless oil.

Yield: 92 % as a mixture of conformers (1:9)

 $\mathbf{R_f} = 0.26 \text{ (EtOAc)}$

¹**H-NMR (300 MHz, CD₃OD):** δ = 1.24 (18H, s, -CH₃), 1.79- 2.02 (4H, m, P-CH₂-CH₂), 2.28 (9/10 of 2H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₂-CON), 2.58 (1/10 of 2H, t, *J* = 6.9 Hz, CH₂-CON)*, 2.70 (9/10 of 3H, s, N-CH₃), 2.71 (1/10 of 3H, s, N-CH₃), 5.65 (2H, dd, *J* = 5.4 Hz, 7.5 Hz, O-CH₂-O), 5.69 (2H, dd, *J* = 5.4 Hz, 7.2 Hz, O-CH₂-O).

¹³**C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD):** $\delta = 19.8$ (d, J = 5.2 Hz), 26.4, 26.6 (d, J = 140.3 Hz), 27.4, 33.2 (d, J = 16.7 Hz)*, 36.8 (d, J = 17.2 Hz), 39.9, 83.0 (d, J = 6.3 Hz), 175.2, 175.3*, 178.2.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 33.8, 34.1^*$.

[4-(N-hydroxyamino)oxobutyl]phosphonobis(benzyloxymethyl)ester 122



[4-(N-benzyloxyamino)oxobutyl]phosphonobis(benzyloxymethyl)ester **116** (270 mg; 0.50 mmol; 1 eq.) was hydrogenolyzed in absolute methanol (4 mL/mmol) for 1h at room temperature over 10% palladium on charcoal. The catalyst was removed by filtration on cotton reaction and the mixture was evaporated to dryness to give [4-(*N*hydroxyamino)oxobutyl]phosphonobis(benzyloxymethyl)ester 122 (216 mg)as a colourless oil.

Yield: 96 % as a mixture of conformers (1:2)

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.23$ in (EtOAc)

¹**H-NMR (300 MHz, CD₃OD):** δ = 1.78-2.05 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.21 (2/3 of 2H, t, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CON); 2.59 (1/3 of 2H, t, *J* =6.9 Hz, CH₂-CON)*; 5.87-5.99 (4H, m, O-CH₂-O); 7.47 (4H, t, *J* = 8.0 Hz, *m*-CH); 7.61 (2H, dd, *J* = 1.1 Hz, 7.8 Hz, *p*-CH); 8.00 (4H, dd, *J* = 1.5 Hz, 8.1 Hz, *o*-CH).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 17.9 (d, *J* = 5.6 Hz), 27.3 (d, *J* = 142.5 Hz), 26.6 (d, *J* = 139.7 Hz)*, 32.8 (d, *J* = 16.8 Hz), 81.8 (d, *J* = 6.8 Hz), 127.5, 128.2, 128.4, 128.6, 129.4, 129.5, 133.7, 164.8. ³¹P-NMR (121.5 MHz,CD₃OD): δ = 33.9.

HRMS (EI⁺) m/z calculated for C₂₀H₂₂NO₉PNa [M+Na]⁺: 474.092, found 474.087.

[4-(N-hydroxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(benzyloxymethyl)ester 123



[4-(*N*-benzyloxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(benzyloxymethyl)ester **117** (320 mg; 0.58 mmol; 1 eq.) was hydrogenolyzed in absolute methanol (4 mL/mmol) for 1 h at room temperature over 10% palladium on charcoal. The catalyst was removed by filtration on cotton evaporated and the reaction mixture was to dryness to give of [4-(Nhydroxy(methyl)amino)oxobutyl]phosphonobis(benzyloxymethyl)ester 123 (250 mg) as a colourless oil.

Yield: 93 % as a mixture of conformers (1:2)

 $R_{f} = 0.26 (EtOAc)$

¹**H-NMR (300 MHz, CD₃OD):** δ = 1.81-2.08 (4H, m, P-CH₂-CH₂); 2.23 (2/3 of 2H, t, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CON); 2.53 (1/3 of 2H, t, *J* =6.9 Hz, CH₂-CON)*; 2.64 (2/3 of 3H, s, CH₃-N); 3.14 (1/3 of 3H, s, CH₃-N)*; 5.87-5.99 (4H, m, O-CH₂-O); 7.47 (4H, t, *J* = 8.0 Hz, *m*-CH); 7.63 (2H, ddt, *J* = 1.1 Hz, 7.8 Hz, *p*-CH); 8.02 (4H, dd, *J* = 1.5 Hz, 8.1 Hz, *o*-CH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 18.6$ (d, J = 4.0 Hz)*, 19.6 (d, J = 5.2 Hz), 26.5 (d, J = 140.3 Hz), 26.6 (d, J = 139.7 Hz)*, 33.1 (d, J = 17.1 Hz)*, 36.3, 36.7 (d, J = 16.7 Hz), 83.4 (d, J = 6.9 Hz), 129.9, 130.1, 131.1, 135.2, 166.3, 174.6*, 175.2.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 34.3, 34.6^*$.

HRMS (EI⁺) m/z calculated for C₂₁H₂₄NO₉PNa [M+Na]⁺: 488.108 found 488.102.

5-t-Butyldiphenylsilyl-1,2-O-isopropylidene-α-D-xylofuranose 129



1,2-*O*-Isopropylidene- α -D-xylofuranose (2g; 1.05 mmol; 1 eq.) and DMAP (13.00 mg; 0.1 mmol; 0.1 eq.) in distilled CH₂Cl₂ (2.0 mL) were stirred for 10 min at -10°C under argon. Triethylamine was then added to the mixture (0.25 mL; 1.8 mmol; 1.7 eq.) along with *t*-butyl-diphenylsilylchloride (0.38 mL; 1.47 mmol; 1.4 eq.). The reaction mixture was stirred for 2 h at -10°C, quenched with a saturated solution of NH₄Cl and extracted three times with CH₂Cl₂.The organic phase was washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 2:8) to give 5-*t*-butyldiphenylsilyl-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-xylofuranose **129** (328 mg) as a yellowish oil.

Yield: 85 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.25$ (ethyl acetate/cyclohexane, 2:8)

RMN ¹**H** (**300 MHz, CDCl**₃): $\delta = 1.04$ (9H, s, Si-<u>*t*-Bu</u>); 1.33 (3H, s, acetonide); 1.47 (3H, s, acetonide); 4.04 (1H, dd, ${}^{3}J_{OH,3} = 3,2$ Hz, OH); 4.12 (2H, m, 5-H); 4.15 (1H, dd, ${}^{3}J_{3,4} = 3.0$ Hz, ${}^{3}J_{4,5a} = 4.7$ Hz, 4-H); 4.39 (1H, dd, ${}^{3}J_{3,OH} = 3.2$ Hz, ${}^{3}J_{3,4} = 3$ Hz, 3-H); 4.55 (1H, d, ${}^{3}J_{2,1} = 3.7$ Hz, 2-H); 6.01 (1H, d, ${}^{3}J_{1,2} = 3.7$ Hz, 1-H); 7.40-7.45 (6H, m, aromatic H); 7.66-7.73 (4H, m, aromatic H).

RMN ¹³**C** (**75** MHz, CDCl₃): $\delta = 19.1$ (quaternary C); 26.3 (CH₃ from *t*-Bu); 26.8 (CH₃ acetonide); 62.9 (-<u>C</u>H₂-OTBDPS); 77.0 (-<u>C</u>H-OH); 78.5 (-<u>C</u>H-CH₂-OTBDPS); 84.5 (-<u>C</u>H-CHOH-); 105.1 (anomeric <u>C</u>H); 113.2 (acetonide quaternary C); 127.9, 132.3, 132.6, 135.7 and 135.8 (aromatic C).

5-t-Butyldiphenylsilyl-1,2-O-isopropylidene-α-D-ribofuranose 130



To a solution of oxalyl chloride (2.31 mL; 26.9 mmol; 3.2 eq.) in distilled THF (40 mL) at -78°C was added DMSO (2.30 mL; 31.0 mmol; 3.8 eq.). The mixture was stirred for 10 min at -35°C and then re-cooled at -78°C. At this point was added a solution of 5-*t*-butyldiphenylsilyl-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-xylofuranose **129** (3.60 g; 8.4 mmol; 1 eq.) in dry THF (25 mL). The reaction mixture was again stirred for 25 min at -35°C, and triethylamine was added (5.87 mL; 42.0 mmol; 5 eq.). The reaction mixture is stirred for additional 20 min at -10°C and 10 min at -15°C. After formation of the aldehyde (followed by TLC), the reaction mixture was recooled at -78°C overnight.

To the reaction mixture was then added ethanol (40 mL), and a saturated NH₄Cl solution (55 mL), water (15 mL) and diethyl ether (140 mL). The aqueous phase was extracted three times with diethyl ether, washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (cyclohexane /ethyl acetate, 85:15) to give 5-*t*-butyldiphenylsilyl-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-ribofuranose **130** (3.13 g).

Yield: 84 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.27$ (ethyl acetate/cyclohexane, 15:85)

RMN ¹**H** (**300 MHz, CDCl₃**): $\delta = 1.07$ (9H, s, Si-<u>*t*-Bu</u>); 1.12 (3H, s, CH₃); 1.36 (3H, s, acetonide); 1.57 (3H, s, acetonide); 2.55 (1H, s, OH); 3.83 (2H, m, -C<u>H₂</u>-Si-*t*-Bu); 3.91 (1H, dd, $J_{4,5a} = 6.4$ Hz, $J_{4,5b} = 3.9$ Hz, 4-H); 4.01 (1H, d, $J_{2,1} = 3.8$ Hz, 2-H); 5.77 (1H, d, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, 1-H); 7.35-7.43 (6H, m, aromatic H); 7.68-7.73 (4H, m, aromatic H).

RMN ¹³**C** (**75 MHz, CDCl₃**): $\delta = 18.6$ (CH₃); 19.2 (CH₃); 26.6 (CH₃); 26.6 (CH₃); 26.8 (3 x CH₃); 62.4 (CH₂); 76.9 (CH); 81.9 (-<u>C</u>H-CH₂-OTBDPS); 84.4 (CH); 103.6 (CH); 112.5 (quaternary C); 127.7, 129.7, 133.2, 133.4 and 135.7 (aromatic C).
3-Methyl-methyl-ether-5-*t*-butyldiphenylsilyl-1,2-*O*-isopropylidene-α-D-ribofuranose 131



To a solution of 5-*t*-butyldiphenylsilyl-1,2-*O*-isopropylidene-α-D-ribofuranose 130 (1.45 g; 3.28 mmol; 1 eq.) in distilled CH₂Cl₂ (9.4 mL) at 0°C, under argon, were added DIPEA (1.71 m; 9.83 mmol; 3 eq.) and methoxymethyl chloride (0.75 mL; 9.83 mmol; 3 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was then successively quenched with 0.1 M HCl (25 mL), a saturated solution of NaHCO₃ (25 mL) and water (25 mL). After extraction with CH₂Cl₂, the organic phase was washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/cyclohexane, 15:85) to give 3-methyl-methyl-ether-5-*t*-butyldiphenylsilyl-1,2-*O*-isopropylidene-α-D-ribofuranose **131** (1.32 g).

Yield: 85 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.34$ (ethyl acetate/cyclohexane, 15:85)

RMN ¹**H** (**300 MHz, CDCl₃**): $\delta = 1.06$ (9H, s, Si-<u>*t*-Bu</u>); 1.15 (3H, s, CH₃); 1.34 (3H, s, acetonide); 1.60 (3H, s, acetonide); 3.35 (3H, s, -O-CH₂-O-C<u>H₃</u>); 3.81 (2H, m, -C<u>H₂-Si-*t*-Bu</u>); 4.21 (1H, d, ³*J*_{1,2} = 3.6 Hz, 2-H); 4.22 (1H, dd, ³*J*_{4,5a} = 6.4 Hz, ³*J*_{4,5b} = 4.0 Hz, 4-H); 4.77 (2H, q, ³*J*_{6,7} = 6.64 Hz); 5.72 (1H, d, ³*J*_{1,2} = 3.6 Hz, 1-H); 7.35-7.42 (6H, m, aromatic H); 7.68-7.73 (4H, m, aromatic H).

RMN ¹³**C** (**75 MHz, CDCl**₃): $\delta = 16.7$ (CH₃); 19.2 (CH₃); 26.6 (CH₃); 26.8 (3 x CH₃); 27.4 (CH₃); 55.9 (CH₃); 62.6 (CH₂); 81.5 (CH); 84.2 (CH); 92.8 (CH₂); 103.6 (CH); 112.6 (quaternary C); 127.6, 129.6, 133.5, 133.6 and 135.7 (aromatic C).

1,2-O-Isopropylidene-5-O-benzylidene-α-D-xylofuranose 132



To a solution of 1,2-*O*-isopropylidene- α -D-xylofuranose (2.00 g; 10.51 mmol; 1 eq.) in dry toluene (42 mL) was added Bu₂SnO (3.93 g; 15.78 mmol; 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred at 110°C for 5 h. After a temperature drop to 100°C, *n*-Bu₄Br (1.69 g; 5.25 mmol; 0.5 eq.) and benzyl bromide (1.88 mL; 15.78 mmol; 1.5 eq.) were added. The reaction mixture was stirred overnight at 100°C. After completion of the reaction, the mixture was evaporated and immediately purified by flash chromatography (ethyl acetate/CH₂Cl₂/cyclohexane, 2:2:6) to give o1,2-*O*-isopropylidene-5-*O*-benzylidene- α -D-xylofuranose **132** (2.37 g).

Yield: 81 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.26$ (ethyl acetate/CH₂Cl₂/cyclohexane, 2:2:6)

RMN ¹**H** (**300 MHz**, **CDCl**₃): $\delta = 1.31$ (3 H, s, CH₃ acetonide); 1.48 (3 H, s, CH₃ acetonide); 1.62 (1H, d, ${}^{3}J_{3,OH} = 3.5$ Hz, OH); 3.93 (2H, m, -CH-CH₂-O-Bn); 4.24 (1H, m, -CH-CH₂-O-Bn); 4.28 (1H, dd, ${}^{3}J_{3,OH} = 5.9$ Hz, ${}^{3}J_{3,4} = 2.7$ Hz,(-CH-CH-CH₂-O-Bn); 4.51 (1H, d, ${}^{3}J_{1,2} = 3.8$ Hz, -C-O-C<u>H</u>-CH-OH); 4.56 (1H, d, ${}^{2}J_{H6a,H6b} = 11.9$ Hz, (-O-C<u>H</u>_aH_b-Ph)); 4.64 (1H, d, $J_{H6a,H6b} = 11.9$ Hz, -O-CH_aH_b-Ph); 5.98 (1H, d, ${}^{3}J_{1,2} = 3.7$ Hz, H in anomeric position); 7.33 (5H, m, aromatic H).

RMN ¹³**C** (**75 MHz, CDCl₃**): δ = 26.2 (CH₃); 26.7 (CH₃); 68.2 (CH₂); 74.1 (CH₂); 76.6 (CH); 78.0 (CH); 85.3 (CH); 104.8 (CH); 111.6 (quaternary C); 127.8, 128.0, 128.2, 128.5 and 137.10 (aromatic C).

1,2-O-Isopropylidene-5-O-benzylidene-3-C-methyl-α-D-ribofuranose 133



To a solution of oxalyl chloride (3.10 mL; 35.96 mmol; 3.2 eq.) in distilled THF (56 mL) at - 78°C was added DMSO (3.10 mL; 42.70 mmol; 3.8 eq.). The mixture was stirred for 10 min at -35°C and cooled to -78°C before adding a solution of 1,2-*O*-isopropylidene-5-*O*-benzylidene- α -D-xylofuranose **132** (3.15 g; 11.23 mmol; 1 eq.) in dry THF (30 mL). The reaction mixture was stirred for 25 min at -35°C, and triethylamine was added (7.85 mL; 56.15 mmol; 5 eq.). The reaction mixture was stirred for additional 20 min at -10°C and 10 min at -15°C. After formation of the aldehyde (followed by TLC), the reaction mixture was cooled at -78°C and methylmagnesium bromide (19.1 mL; 57.3 mmol; 5.1 eq.) was added. The reaction was stirred at -78°C overnight.

To the reaction mixture were successively added ethanol (53 mL), a saturated NH₄Cl solution (73 mL), water (20 mL) and diethyl ether (187 mL). The aqueous phase was extracted three times with diethyl ether, washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/ethyl acetate, 7:3) to give 1,2-*O*-isopropylidene-5-*O*-benzylidene- α -D-ribofuranose **133** (2.88 g).

Yield: 87 %

 $R_{f} = 0.23$

RMN ¹**H** (**300 MHz**, **CDCl**₃): $\delta = 1.12$ (3H, s, HO-C-C<u>H</u>₃); 1.34 (3 H, s, acetonide CH₃); 1.57 (3 H, s, acetonide CH₃); 2.66 (1H, s, -OH); 3.55 (1H, dd, ${}^{2}J_{5a,5b} = 10.4$ Hz, ${}^{3}J_{4,5a} = 7.5$ Hz, -CH-C<u>H</u>_aH_b-O-Bn); 3.68 (1H, dd, ${}^{2}J_{5a,5b} = 10.4$ Hz, ${}^{3}J_{4,5b} = 3.5$ Hz, -CH-CH_a<u>H</u>_b-O-Bn); 3.99 (2H, dd, ${}^{3}J_{4,5b} = 3.5$ Hz, ${}^{3}J_{4,5a} = 7.4$ Hz, ${}^{-}C\underline{H}$ -CH_a<u>H</u>_b-O-Bn); 4.09 (1H, d, ${}^{3}J_{2,1} = 3.8$ Hz, -C-O-C<u>H</u>-C-CH₃); 4.53 (1H, d, $J_{Ha,Hb} = 12.2$ Hz, -O-C<u>H</u>_aH_b-Ph); 4.64 (1H, d, ${}^{2}J_{Hb,Ha} = 12.2$ Hz, -O-C<u>H</u>_a<u>H</u>_b-Ph); 5.98 (1H, d, ${}^{3}J_{1,2} = 3.8$ Hz, (H in anomeric position); 7.31 (5H, m, aromatic H).

RMN ¹³C (**75 MHz, CDCl**₃): δ = 18.3 (CH₃); 26.6 (2 x CH₃); 68.3 (CH₂); 73.5 (CH₂); 76.9 (quaternary C); 78.0 (CH); 85.3 (CH ; 104.8 (CH in anomeric position); 111.6 (acetonide quaternary C); 127.9, 128.1, 128.2, 128.6 and 137.1 (aromatic C).

3-*t*-Butyldiphenylsilyl-5-*O*-benzylidene-3-*C*-methyl-1,2-*O*-isopropylidene-α-D-ribofuranose 134



To a solution of 1,2-*O*-isopropylidene-5-*O*-benzylidene-3-*C*-methyl- α -D-ribofuranose **133** (2.00 g; 6.80 mmol; 1 eq.) in dry THF (20 mL) under argon was added sodium hydride (0.33 g; 13.60 mmol; 2 eq.), and the reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. *t*-BDMSCl (2.60 mL; 10.20 mmol; 1.5 eq.) was added, and the reaction was refluxed overnight. After completion of the reaction, saturated brine (25 mL) and diethyl ether (25 mL) were cautiously added to the reaction mixture. The organic phase was washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether (5:95) to give *-t*-butyldiphenylsilyl-5-*O*-benzylidene-3-*C*-methyl-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-ribofuranose **134** (3.60 g).

Yield: quantitative

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.22$ (ethyl acetate/petroleum ether (5:95)

RMN ¹**H** (**300 MHz**, **CDCl**₃): $\delta = 0.96$ (3H, s, CH₃ acetonide); 1.02 (9 H, s, 3 x CH₃ *t*Bu); 1.08 (3 H, s, CH₃ acetonide); 1.47 (3H, s, TBDPS-O-C-C<u>H</u>₃); 3.27 (1H, d, ³*J* = 3.6 Hz, TBDPS-O-C-C<u>H</u>-); 3.58 (1H, dd, ²*J*_{Ha,Hb} = 10.4 Hz, ³*J* = 7.7 Hz, -CH-C<u>H</u>_aH_b-O-Bn); 3.83 (1H, dd, ²*J*_{Hb,Ha} = 10.8 Hz, ³*J* = 2.5 Hz, -CH-CH_a<u>H</u>_b-O-Bn); 4.35 (1H, dd, ³*J* = 7.7 Hz, ³*J* = 2.4 Hz, -C<u>H</u>-CH₂-OBn); 4.59 (1H, d, ²*J*_{Hb,Ha} = 12.3 Hz, -O-C<u>H</u>_aH_b-Ph); 4.71 (1H, d, ²*J*_{Hb,Ha} = 12.2 Hz, -O-CH_a<u>H</u>_b-Ph); 5.48 (1H, d, ³*J*=5.6 Hz, anomeric H); 7.30-7.42 (10H, m, aromatic H); 7.62-7.80 (5H, m, aromatic H).

RMN ¹³**C** (**75** MHz, CDCl₃): $\delta = 19.4$ (t-Bu quaternary C); 20.2 (CH₃); 26.0 (CH₃); 26.6 (CH₃); 26.9 (3 x CH₃ from *t*-Bu); 68.7 (CH₂); 73.5 (CH₂); 73.4 (CH₂); 79.7 (quaternary C); 81.1 (CH); 83.0 (CH); 103.9 (CH in anomeric position); 112.2 (acetonide quaternary C); 127.0, 127.3, 127.6, 127.7,127.8, 128.4, 129.6, 134.5, 134.8, 135, 135.2, 136.1, 136.5 and 138.2 (aromatic C);

3-t-Butyldiphenylsilyl-3-C-methyl 5-O-benzylidene-D-ribofuranose 135



3-*t*-Butyldiphenylsilyl-5-*O*-benzylidene-3-*C*-methyl-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-ribofuranose <u>134</u> (6.50 g; 12.20 mmol; 1 eq.) was dissolved using an ultrasound bath in 80% aqueous acetic acid (100 mL). The reaction mixture was stirred at 75°C for 31 h. After evaporation of the solvent, the residue was directly purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/ethyl acetate/cyclohexane (50:5:45) to give 3-*t*-butyldiphenylsilyl-3-*C*-methyl 5-*O*-benzylidene-Dribofuranose **135** (3.94 g).

Yield: 66 %.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.19 (CH_2Cl_2/ethyl acetate/cyclohexane (50:5:45))$

RMN ¹**H** (**300 MHz**, **CDCl**₃): $\delta = 1.06$ (9H, s, -Si-<u>*t*-Bu</u>); 1.10 (6/10 from 3H, s, HO-C-C<u>H</u>₃); 1.15 (4/10 from 3H, s, HO-C-C<u>H</u>₃); 3.10 (1H, m, -CH-C<u>H</u>₂-O-Bn); 3.28 (6/10 from 1H, dd, ${}^{3}J_{5a,5b} = 10.5$ Hz, ${}^{3}J_{4,5b} = 5.4$ Hz, -CH-CH_a<u>H</u>_b-O-Bn); 3.34 (4/10 from 1H, dd, ${}^{3}J_{5a,5b} = 10.7$ Hz, ${}^{3}J_{4,5b} = 5.6$ Hz, -CH-CH_a<u>H</u>_b-O-Bn); 3.67 (1H, m, -C<u>H</u>-CH₂-O-Bn); 4.30 (1H, m, -C-O-C<u>H</u>-C-CH₃); 4.39 (6/10 from 1H, s, -O-C<u>H</u>₂-Ph); 4.40 (4/10 from 1H, s, -O-C<u>H</u>₂-Ph); 5.25 (4/10 from1H, d, ${}^{3}J_{1,2} = 3.2$ Hz, H anomeric position); 5.29 (6/10 from 1H, d, ${}^{3}J_{1,2} = 4.5$ Hz, H anomeric position); 7.34 (10H, m, aromatic H from t-Bu); 7.72 (5H, m, aromatic H from -O-CH₂-Ph).

RMN¹³**C** (**75** MHz, CDCl₃): $\delta = 20.8$ (CH₃); 20.9* (CH₃); 27.2 (3 x CH₃); 69.1 (CH₂); 69.7* (CH₂); 73.3 (CH₂); 73.7* (CH₂); 76.9 (CH); 83.9 (CH); 96.5 (CH anomeric position); 104.1* (anomeric CH); 127.6, 127.8, 127.9, 128.1, 128.4, 128.6, 130.1, 130.3, 133.8, 133.9, 136.0, 136.1, 136.2 and 137.9 (aromatic C).

2-O-t-Butyldiphenylsilyl-2-C-methyl-4-O-benzyl-D-erythritol 137



To a solution of compound **135** (6.10 g; 12.40 mmol; 1 eq.) in a THF/ethanol mixture (1:1; 76 mL) was added a solution of NaIO₄ (3.20 g; 14.90 mmol; 1.2 eq.) in water (75 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. After completion of the reaction, the mixture was cautiously quenched with a solution of saturated NaHCO₃ and then extracted three times with CH_2Cl_2 . The combined organic phases were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to give a crude aldehyde **136** (6.20 g).

To a solution of the former compound **136** (6.20 g; 12.20 mmol; 1 eq.) dissolved in methanol (245 mL) at 0°C was added NaBH₄ (0.55 g; 14.60 mmol; 1.2 eq.). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. After addition of water (100 mL), the mixture was acidified with a 0.1 M HCl solution (130 mL) and extracted three times with CHCl₃. The combined organic phases were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 5:95) to give2-*O*-*t*-butyldiphenylsilyl -2-*C*-methyl-4-*O*-benzyl-D- erythritol **137** (3.74 g).

Yield: 66 %.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.22$ (ethyl acetate/petroleum ether, 5:95)

RMN ¹**H** (**300 MHz**, **CDCl**₃): $\delta = 1.08$ (9H, s, -Si-<u>t-Bu</u>); 1.17 (3H, s, HO-CH-C-C<u>H</u>₃); 2.78 (1H, d, ³*J*_{OH,CH2} = 5.1 Hz, O<u>H</u>-CH-); 2.95 (1H, s, HO-CH₂-); 3.52 (1H, d, ²*J* = 9.9 Hz, -C<u>H₂OH</u>-); 3.61 (1H, dd, ²*J* = 9.9 Hz, ³*J* = 6.7 Hz, HO-C<u>H</u>₂-); 3.73 (1H, d, ²*J*_{HaHb} = 9.6 Hz, -C<u>H</u>₂-O-Bn); 3.77 (1H, d, ²*J*_{HbHa} = 9.6 Hz, -C<u>H</u>₂-O-Bn); 3.96 (1H, m, -C<u>H</u>-CH₂-O-Bn); 4.49 (1H, d, ²*J*_{HaHb} = 11.8 Hz, -O-C<u>H</u>₂-Ph); 4.53 (1H d, ²*J*_{HbHa} = 11.8 Hz, -O-C<u>H</u>₂-Ph); 7.37 (10H, m, aromatics from TBDPS); 7.64 (5H, m, aromatics from -O-Bn).

RMN ¹³**C** (**75 MHz, CDCl**₃) δ = 19.3 (*t*-Bu quaternary C); 20.2 (CH₃); 27.0 (3 x CH₃); 29.7 (quaternary C); 69.1 (CH₂); 71.3 (CH₂); 73.5 (CH); 73.7 (CH₂); 127.6, 128.5, 129.9, 132.9, 135.7 and 137.8 (aromatic C).

1,3-*O-t*-Butyldimethylsilyl-2-*O-t*-butyldiphenylsilyl-2-*C*-methyl-4-*O*-benzyl-D-erythritol 138



To a solution of 2-*O*-*t*-butyldiphenylsilyl-2-*C*-methyl-4-*O*-benzyl-D- erythritol **137** (0.86 g; 1.48 mmol; 1 eq.) in dry CH_2Cl_2 (5 mL) under argon atmosphere was added lutidine (0.35 mL; 2.96 mmol; 2 eq.) and TBDMSO-Tf (0.41 mL; 1.77 mmol; 1.2 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. After quenching with a saturated NH₄Cl solution (25 mL) the reaction mixture was and extracted three times with CH_2Cl_2 . The combined organic phases were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (cyclohexane/dichloromethane, 30:70) to give 1,3-*O*-*t*-butyldimethylsilyl-2-*O*-*t*-butyldiphenylsilyl-2-*C*-methyl-4-*O*-benzyl-D- erythritol **138** (0.73 g).

Yield: 71 %.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.37$ (cyclohexane/dichloromethane, 30:70)

RMN ¹**H** (**300 MHz**, **CDCl**₃): $\delta = -0.01$ (6H, s, (2 x 3 -C<u>H</u>₃-Si-); 0.05 (6H, s, (2 x 3 -C<u>H</u>₃-Si-); 0.78 (9H, s, -Si-<u>*t*-Bu</u>); 0.82 (9H, s, -Si-<u>*t*-Bu</u>); 1.07 (9H, s, -Si(Ph)₂-<u>*t*-Bu</u>); 3.35 (1H, d, ²*J*_{Ha,Hb} = 9.8 Hz, -C<u>H</u>_a,H_b-O-Si-); 3.37 (1H, dd, ²*J*_{Hb,Ha} = 9.8, ³*J* = 6.7 Hz, -CH_a,<u>H</u>_b-O-Bn); 3.66 (1H, d, ²*J*_{Hb,Ha} = 9.9, -CH_a,<u>H</u>_b-O-Si-); 3.75 (1H, dd, ²*J*_{Ha,Hb} = 9.8, ³*J* = 2.3 Hz; -C<u>H</u>_a,H_b-O-Bn); 3.91 (1H, dd, ³*J* = 2.4 Hz, ³*J* = 6.6 Hz, BnO-CH₂-C<u>H</u>-); 4.43 (1H, d, ²*J*_{Hb,Ha} = 11.9 Hz, -CH_a<u>H</u>_b-Ph); 4.47 (1H, d, ²*J*_{Ha,Hb} = 11.9 Hz, -C<u>H</u>_aH_b-Ph); 7.29-7.40 (10H, m, aromatic C); 7.62-7.68 (5H, m, aromatic C).

RMN ¹³**C** (**75 MHz, CDCl**₃) δ = -4.8 (CH₃); -4.1 (CH₃); -2.1 (CH₃); -1.9 (CH₃); 16.3 (*t*-Bu quaternary C); 16.4 (*t*-Bu quaternary C); 19.3 (*t*-Bu quaternary C); 21.7 (CH₃); 25.9 (3 x CH₃); 26.1 (3 x CH₃); 26.9 (3 x CH₃); 69.8 (CH₂); 73.1 (CH₂); 73.2 (CH₂); 78.6 (quaternary C); 127.3, 127.6, 126.2, 129.6, 133.4, 133.5, 135.7 and 136.6 (aromatic C).

2-C-methyl 4-O-benzyl-D-erythritol 139



To a solution of 1,3-*O*-*t*-butyldimethylsilyl-2-*O*-*t*-butyldiphenylsilyl-2-*C*-methyl-4-*O*-Benzyl-D- erythritol **137** (350 mg; 0.50 mmol; 1 eq.) in distilled THF (2 mL) was added TBAF (1.00 g; 3.33 mmol; 6.6 eq.). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was then evaporated to dryness and directly purified by flash chromatography with pure ethyl acetate to give 2-*C*-methyl 4-*O*-benzyl-D-erythrose **139** (0.73 g).

Yield: 32 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.29$ (ethyl acetate)

RMN ¹**H** (**300 MHz**, **CDCl**₃): $\delta = 1.09$ (3H, s, -CH₂OH-C-C<u>H</u>₃)); 3.37 (2H, bs, 2 x -OH); 3.38 (1H, d, ²*J* = 11.4 Hz, -C<u>H</u>₂-OH); 3.41 (1H, bs, -OH); 3.56 (1H, dd, ²*J* = 9.7 Hz, ³*J* = 6.6 Hz, -C<u>H</u>₂-OBn); 3.65 (1H, d, ²*J* = 11.5 Hz, -C<u>H</u>₂-OH); 3.68 (1H, dd, ³*J* = 4.7 Hz, ²*J* = 9.9 Hz, -C<u>H</u>₂-OBn); 3.78 (1H, m, (-C<u>HOH</u>-)); 4.54 (2H, s, -CH₂-Ph); 7.29-7.35 (5H, m, aromatic H).

RMN¹³**C** (**75 MHz, CDCl**₃): δ = 20.11 (CH₃); 67.6 (CH₂); 70.9 (CH₂); 73.6 (CH); 73.7 (CH₂); 127.9, 127.8, 128.2, 128.6, 137.4 (aromatic C).

1,2,3-O-Methoxymethyl -2-C-methyl-4-O-benzyl-D-erythritol 140



To a solution of 2-*C*-methyl 4-*O*-benzyl-D-erythrose **139** (0.90 g; 4.00 mmol; 1 eq.) in distilled CH₂Cl₂ (12 mL) at 0°C, under argon, was added DiPEA (6.10 mL; 35.80 mmol; 9 eq.) and methoxymethyl chloride (2.80 mL; 35.80 mmol; 9 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was then successively quenched with 0.1 M HCl (25 mL), a saturated solution of NaHCO₃ (25 mL) and water (25 mL). After extraction with CH₂Cl₂, the organic phase was washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 1: 9) to give 1,2,3-*O*-methoxymethyl ether-2-*C*-methyl-4-*O*-benzyl-D-erythritol **140** (1.27 g).

Yield: 88 %.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.31$ (ethyl acetate/petroleum ether, 1: 9)

RMN ¹**H** (**300 MHz, CDCl**₃): $\delta = 1.27$ (3H, s, -CH₂OH-C-C<u>H</u>₃); 3.32 (3H, s, -O-C<u>H</u>₃); 3.35 (3H, s, -O-C<u>H</u>₃); 3.39 (3H, s, -O-C<u>H</u>₃); 3.57 (1H, d, ²*J* = 10.4 Hz, (-O-C<u>H</u>₂-O-); 3.60 (1H, d, ²*J* = 10.4 Hz, -O-C<u>H</u>₂-O-); 3.64 (1H, dd, ³*J* = 7 Hz, ³*J* = 10.3 Hz, MOM-O-C<u>H</u>-); 3.86 (1H, dd, ³*J* = 2.5 Hz, ²*J* = 10.3 Hz, -O-CH-C<u>H</u>₂-); 3.93 (1H, dd, ³*J* = 2.5 Hz, ²*J* = 7.0 Hz, -O-CH-C<u>H</u>₂-); 4.52 (1H, d, ²*J* = 12.0 Hz, -O-CH-C<u>H</u>₂-O); 4.56 (1H, d, ²*J* = 12.0 Hz, -O-C<u>H</u>₂-O); 4.61 (1H, d, ²*J* = 6.4 Hz, -O-C<u>H</u>₂-O); 4.64 (1H, d, ²*J* = 6.4 Hz, (-O-C<u>H</u>₂-O); 4.74 (1H, d, ²*J* = 6.7 Hz, -C<u>H</u>₂-O-MOM); 4.76 (1H, d, ²*J* = 6.4 Hz, -C<u>H</u>₂-O-MOM); 4.81 (1H, d, ²*J* = 7.3 Hz, -C<u>H</u>₂-Ph); 4.87 (1H, d, ²*J* = 6.3 Hz, -C<u>H</u>₂-Ph); 7.29-7.34 (5H, m, aromatic H).

RMN ¹³**C** (**75** MHz, CDCl₃): δ = 17.1 (CH₃); 55.5 (2 x CH₃); 56.1 (CH₃); 70.8 (CH₂); 71.2 (CH₂); 73.0 (CH₂); 78.5 (CH); 78.8 (quaternary C); 91.5 (CH₂); 96.9 (CH₂); 97.6 (CH₂); 127.5, 127.6, 126.3 and 138.5 (aromatic C)

1,2,3-O-Methoxymethyl ether-2-C-methyl-4-hydroxy-D- erythritol 141



A solution of compound **140** (1.22 g; 3.40 mmol; 1 eq.) in dry methanol (32 mL) and ethyl acetate (7 mL) was hydrogenolyzed by stirring overnight at room temperature and atmospheric pressure in the presence of Pd/C catalyst (30% mass; 0.36 g). under a hydrogen atmosphere. After completion of the reaction, the solvent was evaporated, and the residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 3:7) to give 1,2,3-*O*-methoxymethyl ether-2-*C*-methyl-4-hydroxy-D- erythritol **141** (822 mg).

Yield: 90 %.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.29$ (ethyl acetate/petroleum ether, 3:7)

RMN ¹**H** (**300 MHz, CDCl**₃): $\delta = 1.12$ (3H, s, -CH₂OH-C-C<u>H</u>₃); 3.28 (3H, s, -O-C<u>H</u>₃); 3.29 (3H, s, -O-C<u>H</u>₃); 3.35 (3H, s, -O-C<u>H</u>₃); 3.34-3.38 (1H, m, -C<u>H</u>-CH₂-OH); 3.50 (2H, bs, -C<u>H</u>₂-O-MOM); 3.55-3.65 (2H, m, C<u>H</u>₂-OH); 4.52 (1H, d, ²*J* = 6.7 Hz, -O-C<u>H</u>₂-O-); 4.55 (1H, d, ²*J* = 6.7 Hz, -O-C<u>H</u>₂-O-); 4.62 (1H, d, ²*J* = 6.6 Hz, -O-C<u>H</u>₂-O-); 4.66 (1H, d, ²*J* = 6.0 Hz, -O-C<u>H</u>₂-O-); 4.69 (1H, d, ²*J* = 7.6 Hz, -O-C<u>H</u>₂-O-); 4.72 (1H, d, ²*J* = 7.6 Hz, -O-C<u>H</u>₂-O-).

RMN ¹³**C** (**75 MHz, CDCl₃**): δ = 16.6 (CH₃); 55.3 (CH₃); 55.5 (CH₃); 55.8 (CH₃); 62.1 (CH₂); 70.3 (CH₂); 79.0 (quaternary C); 84.0 (CH); 91.4 (CH₂); 96.8 (CH₂); 98.1 (CH₂).

1,2,3-O-Methoxymethyl ether-2-C-methyl-D-erythritol 4-O-cyclo-Saligenyl phosphate 142



A solution of compound **141** (0,1 g; 0.37 mmol; 1 eq.) and DMAP (18.00 mg; 0.15 mmol; 0.4 eq.) in dry acetonitrile was stirred at -10° C for 10 min. Et₃N (0.1 mL; 0.75 mmol; 2 eq.) followed by cyclic chlorophosphane **125** (0.15 g; 0.75 mmol; 2 eq.) were added. The reaction mixture was stirred at -10° C for 1 h. *t*-BuOOH (0.22 mL; 1.3 mmol; 3.5 eq.) was added at -10° C, and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. After the completion of the reaction, the solvent was simply evaporated, and the crude residue purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 65:35) to give 1,2,3-*O*-methoxymethyl ether-2-*C*-methyl-D-erythritol 4-*O*-*cyclo*-Saligenyl phosphate **142** (183 mg).

Yield: quantitative

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.31$ (ethyl acetate/petroleum ether, 65:35)

RMN ¹**H** (**300 MHz**, **CDCl**₃): $\delta = 1.19$ (3H, s, -CH₂OH-C-C<u>H</u>₃); 3.26-3.33 (9H, s, 3 x -O-CH₂-O-C<u>H</u>₃); 3.48-3.57 (2H, m, -C<u>H</u>₂-O-MOM); 3.88-3.94 (1H, m, -CH-C<u>H</u>₂-O-P-); 4.26-4.37 (1H, m, -CH-C<u>H</u>₂-O-P-); 4.53-4.80 (7H, m, (3 x -O-C<u>H</u>₂-O-CH₃ and -O-C<u>H</u>-CH₂-O-P-; 4.27-5.44 (2H, m, -P-O-C<u>H</u>₂-Ph; 7.01-7.28 (4H, m, aromatic H).

RMN ¹³**C** (**75 MHz, CDCl**₃): δ = 16.8 (CH₃); 55.6 (CH₃); 55.7 (CH₃); 55.1 (CH₃); 68.5-68.7 (m, CH₂); 68.9-69.1 (m, CH₂); 70.1 (CH₂); 78.5-78.7 (m, CH); 91.4 (CH₂); 96.9 CH₂); 97.8 (d, $J_{C,P}$ = 4.3 Hz, CH₂); 118.8 (d, $J_{C,P}$ = 9.3 Hz) and 124.2, 125.3 and 129.7 (aromatic C).

RMN ³¹**P** (121.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = -8.4 and -8.3.

5-Diethylphosphate-1,2-*O*-isopropylidene-α-D-xylofuranose 143



To a solution of diethylchlorophosphate (4.75 mL; 33.12 mmol; 2.1 eq.) in CCl₄ (8.5 mL) was added a solution of 1,2-O-isopropylidene- α -D-xylofuranose (3.00 g; 15.77 mmol; 1 eq.) in dry pyridine (40 mL) at 0°C. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was then quenched with water and extracted three times with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate) as eluent to give 5-diethylphosphate-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-xylofuranose **146** (4 g).

Yield: 78 %.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.28$ (ethyl acetate/petroleum ether, 6:4)

RMN ¹**H** (**300 MHz, CDCl**₃): $\delta = 1.29$ (3H, s, CH₃ acetonide); 1.33 (6H, t, ³*J* =7.2 Hz, 2 xC<u>H₃</u>-CH₂-O-); 1.48 (3H, s, CH₃ acetonide); 4.06-4.16 (5H, m, 2 x CH₃-C<u>H₂-O and -CH</u>-CH₂-O-P-); 4.25-4.33 (3H, m, -C<u>H</u>-CH-C<u>H₂-O-P-); 4.54 (1H, d, ³*J* = 3.6 Hz, CH₃-C-O-C<u>H</u>-); 5.89 (1H, d, ³*J* = 3.5 Hz, anomeric CH).</u>

RMN ¹³**C** (**75 MHz, CDCl**₃): δ = 16.1 (d, ³*J*_{C-P} = 6.8 Hz, CH₃); 26.2 (CH₃); 26.9 (CH₃); 63.3 (d, ²*J*_{C-P} = 5 Hz, CH₂); 64.5 (d, ²*J*_{C-P} = 6.2 Hz, CH₂); 73.7 (CH); 79.0 (d, ³*J*_{C-P} = 5.6 Hz, CH); 85.1 (CH); 105.1 (CH); 111.8 (quaternary C).

RMN ³¹**P** (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.71$.

1,2-O-Isopropylidene-a-D-erythro-pentofuranose-3-ulose 5 diethylphosphate 144



To a stirred solution of 5-diethylphosphate-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-xylofuranose **143** (3.9 g; 12.0 mmol; 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (100 mL) were slowly added at 0°C activated 3 Å molecular sieves (4.0 g), PDC (6.44 g; 29.9 mmol; 2.5 eq.) and acetic acid (124 mL; 21.6 mmol; 1.8 eq.). The reaction was stirred at room temperature for 3 h. Chromium salts were eliminated by adding Celite (5 g) and diethyl ether (80 mL). The mixture was stirred for additional 30 min and filtered through a bed of silica gel. The solid cake was washed with diethyl ether (3 x 60 mL), and the filtrate was concentrated in vacuum to give 1,2-*O*-isopropylidene- α -D-erythropentofuranose-3-ulose 5-diethylphosphate **144** (3 g).

Yield: 77 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.34$ (ethyl acetate/petroleum ether, 7:3)

RMN ¹**H** (**300 MHz, CDCl**₃): $\delta = 1.30$ (6H, t, ³J = 7.0 Hz, 2 x C<u>H</u>₃-CH₂-O-); 1.39 (3H, s, acetonide CH₃); 1.45 (3H, s, acetonide CH₃); 4.03-4.18 (4H, m, 2 x CH₃-C<u>H</u>₂-O-); 4.21-4.25 (2H, m, -CH-C<u>H</u>₂-O-P-); 4.35 (1H, dd, ³J = 1 Hz, ³J = 4.3 Hz, -C<u>H</u>-CH₂-O-P-); 4.47 (1H, m, CH₃-C-O-C<u>H</u>-); 6.10 (1H, d, ³J = 4.3 Hz, anomeric CH).

RMN¹³**C** (**75 MHz, CDCl**₃): $\delta = 16.8$ (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.8$ Hz, CH₃); 27.1 (CH₃); 27.5 (CH₃); 64.1 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 6.2$ Hz, CH₂); 64.5 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₂); 76.3 (CH); 78.1 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 8$ Hz, CH); 103.4 (CH); 114.4 (quaternary C); 207.7 (C=O).

RMN ³¹**P** (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = -0.32$.

1,2-*O*-isopropylidene-α-D-ribofuranose- 5-diethylphosphate 145



To a solution of **144** (2.90 g; 8.94 mmol; 1 eq.) in dry THF (90 mL) was added a 3.0 M solution of methylmagnesium bromide in dry diethyl ether (3.90 mL; 11.63 mmol; 1.3 eq.) at - 10°C. After stirring overnight at room temperature, the reaction mixture was quenched with a saturated NH₄Cl solution (25 mL) and extracted three times with diethyl ether. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate) to give 5-diethylphosphate-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-ribofuranose **145** (2.65 g).

Yield: 87 %.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.38$ (ethyl acetate/petroleum ether, 7:3)

RMN ¹**H** (**300 MHz, CDCl₃**): $\delta = 1.11$ (3H, s, -COH-C<u>H₃</u>); 1.29 (6H, t, ³*J* = 6.0 Hz, 2 xC<u>H₃</u>-CH₂-O-); 1.31 (3H, s, acetonide CH₃); 1.53 (3H, s, acetonide CH₃); 2.75 (1H, br s, OH); 3.95-4.14 (7H, m, 2 x CH₃-C<u>H₂</u>-O-, -CH-C<u>H₂</u>-O-P-, and -C<u>H</u>-CH₂-O-P-); 4.17-4.23 (1H, m, CH₃-C-O-C<u>H</u>-); 5.73 (1H, d, ³*J* = 3.81 Hz, anomeric CH).

RMN ¹³**C** (**75 MHz**, **CDCl**₃): $\delta = 16.1$ (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.8$ Hz, 2 x CH₃); 18.2 (CH₃); 26.5 (2 x CH₃); 63.0 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 5.7$ Hz, CH₂); 64.0 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₂); 65.7 (d, ${}^{2}J_{C-P} = 5.6$ Hz, CH₂); 76.8 (quaternary C, -<u>COH</u>-CH₃); 80.4 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 7.2$ Hz, CH); 84.1 (CH); 103.5 (CH); 112.7 (acetonide quaternary C).

RMN ³¹**P** (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.15$

3-*O*-Benzyl-**5**-diethylphosphate-1,2-*O*-isopropylidene-α-D-ribofuranose 146



To a vigorously stirred solution of 5-diethylphosphate-1,2-*O*-isopropylidène- α -D-ribofuranose **145** (2.60 g; 7.64 mmol; 1 eq.) and benzyl-2,2,2-trichloroacetamidate (2.84 mL; 15.28 mmol; 2 eq.) in a mixture of cyclohexane–CH₂Cl₂ (2:1; 24 mL) under argon atmosphere was added trifluoromethanesulfonic acid (250 µL). The reaction mixture was stirred at room temperature and monitored by TLC until the starting material had completely reacted. The newly formed crystalline trichloroacetamidate was filtered off. The remaining solution was quenched with saturated NaHCO₃ (25 mL) and water (25 mL) and extracted three times with CH₂Cl₂ (3x 25 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 7:3) to give 3-*O*-benzyl-5-diethylphosphate-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-ribofuranose **146** (1.54 g).

Yield: 47 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.40$ (ethyl acetate/petroleum ether, 5:5)

¹**H** NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.21$ (3H, s, (BnO-CH₂-C-C<u>H₃</u>); 1.29 (6H, m, 2 x C<u>H₃</u>-CH₂-O-); 1.35 (3H, s, acetonide CH₃); 1.58 (3H, s, acetonide CH₃); 4.03-4.15 (7H, m, 2 x CH₃-C<u>H₂</u>-O-, -CH-C<u>H₂</u>-O-P- and -C<u>H</u>-CH₂-O-P-); 4.33 (1H, d, ³*J* = 3.8 Hz, CH₃-C-O-C<u>H</u>-) 4.54 (1H, d, ²*J* = 10.6 Hz, CH₂Ph); 4.61 (1H, d, ²*J* = 10.6 Hz, CH₂Ph); 5.78 (1H, d, ³*J* = 3.7 Hz, anomeric CH); 7.27–7.39 (5 H, m, Ph-).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): $\delta = 16.0$ (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.8$ Hz, 2 x CH₃); 16.2 (CH₃); 26.70 (CH₃); 26.8 (CH₃); 63.8 (d, ${}^{2}J_{C,P} = 6.8$ Hz, CH₂); 64.1 (d, ${}^{2}J_{C,P} = 7.4$ Hz, CH₂) 66.2 (d, ${}^{2}J_{C,P} = 4.9$ Hz, CH₂); 71.2 (CH₂); 79.8 (CH, d, ${}^{3}J_{C,P} = 7.5$ Hz); 82.0 (quaternary C, H-<u>COH</u>-CH₃); 82.7 (CH); 104.3 (CH); 112.4 (acetonide quaternary C); 127.6, 127.7, 128.3, 128.4 and 138.3 (aromatic C).

³¹**P** NMR (162 MHz, CDCl₃): $\delta = -0.04$.

3-O-Benzyl-3-C-methyl-5-O-diethylphosphate-D-ribofuranose 147



To a solution of 3-*O*-benzyl-5-diethylphosphate-1,2-*O*-isopropylidène- α -D-ribofuranose **146** (1.50 g; 3.48 mmol; 1 eq.) in CCl₄ was added TFA 90% in water (24.9 mL) at -10°C. The reaction was stirred at -10°C for 45 min. After completion of the reaction, the mixture is quenched with NaHCO₃ and extracted 3 times with EtOAc. The combined organic layers are washed with brine, dried over MgSO₄ and the solvent is evaporated off. The crude residue was purified by flash chromatography using pure EtOAc as eluent to give 3-*O*-benzyl-3-*C*-methyl-5-*O*-diethylphosphate-D-ribofuranose **147** (950 mg).

Yield: 70 %.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.47$ (ethyl acetate)

¹**H NMR (400 MHz, CDCl₃):** $\delta = 1.30$ (6H, t, ³*J* = 7.0 Hz, 2 xC<u>H₃</u>-CH₂-O-); 1.42 (2/3 of 3H, s, BnO-C-CH₃); 1.47 (1/3 of 3H, s, BnO-C-CH₃); 3.0 (2H, br s, 2 x OH); 4.04-4.16 (7H, m, 2 x CH₃-C<u>H₂</u>-O-, -CH-C<u>H₂</u>-O-P- and -C<u>H</u>-CH₂-O-P-); 4.33 (1H, m, -C<u>HOH</u>-C-OBn). 4.51 (2H, m, C<u>H₂</u>Ph); 5.21 (2/3 of 1H, d, ³*J* = 4.4 Hz, anomeric CH); 5.24 (1/3 of 1H, d, ³*J* = 3.5 Hz, anomeric CH); 7.27–7.36 (5H, m, Ph-).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): $\delta = 15.9$ (CH₃); 16.1 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.8$ Hz, 2 x CH₃); 64.1 (d, ${}^{2}J_{C,P} = 6.2$ Hz, CH₂); 64.5 (d, ${}^{2}J_{C,P} = 6.2$ Hz, CH₂); 66.1 (CH₂) 66.5 (d, ${}^{2}J_{C,P} = 5.58$ Hz, CH₂); 79.8 (d, ${}^{3}J_{C,P} = 6.2$ Hz, CH); 81.6 (CH); 82.4 (quaternary C); 96.7 (CH); 102.8 (CH); 127.4, 127.7, 128.1, 128.5 and 137.5 (aromatic C).

³¹**P** NMR (162 MHz, CDCl₃) δ = 0.06 and 0.33.

2-O-Benzyl-2-C-methyl-4-O-diethylphosphate-D-erythritol 149



To a solution of 3-*O*-benzyl-3-*C*-methyl-5-*O*-diethylphosphate-D-ribofuranose **147** (0.70 g; 1.79 mmol; 1 eq.) in methanol (10 mL) was added a solution of NaIO₄ (0.46 g; 2.15 mmol; 1.2 eq.) in water (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. After completion of the reaction, the mixture was cautiously quenched with a saturated NaHCO₃ solution and extracted three times with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to give a crude aldehyde **148** (0.65 g). To a solution of the former crude compound **148** (0.65 g; 1.70 mmol; 1 eq.) in distilled methanol (32 mL) at 0°C was added NaBH₄ (75.0 mg; 2.0 mmol; 1.2 eq.). The reaction mixture was acidified with a 0.1 M HCl solution (15 mL) and extracted three times with CHCl₃. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous performed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate) to give 2-*O*-benzyl-2-*C*-methyl-4-*O*-diethylphosphate-D-erythritol **149** (300 mg).

Yield: 49 %.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.45$ (ethyl acetate)

¹**H NMR** (**400 MHz, CDCl₃**): $\delta = 1.21$ (3H, s, C<u>H₃</u>-C-OBn); 1.32 (3H, td, ³*J* = 7.0 Hz, ³*J*_{H,P} = 0.9 Hz, C<u>H₃</u>-CH₂-O-P-); 1.33 (3H, td, ³*J* = 7.1 Hz, *J*_{H,P} = 0.9 Hz, C<u>H₃</u>-CH₂-O-P-); 3.73 (1H, d, ²*J* = 4.4 Hz, -CH₂-OH); 4.08-4.18 (6H, m, 2 x CH₃-C<u>H₂</u>-O-P- and -C<u>H₂</u>-O-P(O)(OEt)₂); 4.36-4.43 (1H, m, -C<u>H</u>-CH₂-O P-); 4.53 (1/2 2H, s, -O-C<u>H₂</u>-Ph); 4.54 (1/2 2H, s, -O-C<u>H₂</u>-Ph); 7.28–7.36 (5 H, m, Ph).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 15.5 (CH₃); 16.0 (d, ³*J*_{C-P} = 6.7 Hz, 2 x CH₃); 63.7 (d, ²*J*_{C,P} = 5.4 Hz, CH₂)); 63.8 (d, ²*J*_{C,P} = 3.8 Hz, CH₂); 64.4 (CH₂); 66.0 (d, ²*J*_{C,P} = 5.3 Hz, CH₂); 68.1 (d, ²*J*_{C,P} = 6.8 Hz, CH₂); 69.8 (quaternary C); 75.7 (CH₂); 82.1 (d, ³*J*_{C,P} = 7.2 Hz, CH); 101.8 (CH); 126.3, 127.3, 127.7, 128.2, 128.5, 129.1, 138.4 and 137.5(aromatic C).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) $\delta = 0.40; 0.41$

1,3-O-benzylidene-2-O-benzyl-2-C-methyl-4-O-diethylphosphate-D-erythritol 150



To a solution of 2-*O*-benzyl-2-*C*-methyl-4-*O*-diethylphosphate-D-erythritol **149** (37.0 mg; 0.1 mmol; 1 eq.) in CH₂Cl₂ (6.5 mL) was added at 0°C, benzaldehyde dimethyl acetal (25.0 μ L; 0.15 mmol; 1.5 eq.). *p*-TSA (5.0 mg; 0.03 mmol; 0.3 eq.) was slowly added to the reaction mixture, which was brought back to room temperature. After stirring for 1 h, solvent and reagent were evaporated. The residue was purified by preparative TLC (ethyl acetate/petroleum ether, 5:5) to give 1,3-*O*-benzylidene-2-*O*-benzyl-2-*C*-methyl-4-*O*-diethylphosphate-D-erythritol **150** (17 mg).

Yield: 38 %.

 $\mathbf{R_f}$ =0.31 (ethyl acetate/petroleum ether, 4:6)

¹**H NMR (400 MHz, CDCl₃):** $\delta = 1.21$ (3H, td, ³*J* = 7.0 Hz, *J*_{H,P} = 1.1 Hz, C<u>H</u>₃-CH₂-O-P-); 1.26 (3H, td, ³*J* = 7.05 Hz, ³*J*_{H,P} = 0.95, C<u>H</u>₃-CH₂-O-P-); 1.51 (3H, s, C<u>H</u>₃-C-OBn); 3.82 (1/2 1H, br s, -C<u>H</u>₂-O-CH-Ph); 3.86 (1/2 1H, br s, -C<u>H</u>₂-O-CH-Ph); 3.98-4.20 (7H, m, 1H -C<u>H</u>₂-O-CH-Ph, 2 CH₃-C<u>H</u>₂-O-P- and -C<u>H</u>₂-O-P(O)(OEt)₂); 4.42 (1/2 1H, dd, ³*J* = 10.7 Hz, *J*_{H,P} = 1.7 Hz, (-C<u>H</u>-CH₂-O P-); 4.45 (1/2 1H, dd, ³*J* = 6.1 Hz, *J*_{H,P} = 1.7 Hz, -C<u>H</u>-CH₂-O P-); 4.46 (1/2 2H, d, *J*_{H,P} = 11.4 Hz, -O-C<u>H</u>₂-Ph); 4.58 (1/2 2H, d, *J*_{H,P} = 11.2 Hz, -O-C<u>H</u>₂-Ph); 5.53 (1/3 1H, s, -C<u>H</u>-Ph); 5.54 (2/3 1H, s, -C<u>H</u>-Ph); 7.29–7.52 (10 H, m, aromatic H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): $\delta = 15.9$ (CH₃); 16.1 (d, ${}^{3}J_{C-P} = 6.8$ Hz, 2 x CH₃); 62.2 (d, ${}^{2}J_{C,P} = 6.8$ Hz, 2 x CH₂); 64.3 (CH₂); 64.7 (CH₂); 69.5 (d, ${}^{2}J_{C,P} = 6.2$ Hz, CH₂) 73.0 (d, ${}^{3}J_{C,P} = 5.6$ Hz, CH); 78.4 (quaternary C); 127.4, 127.6, 128.4 and 138.7 (aromatic C).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ = 1.60.

1,3-O-Benzylidene-2-O-benzyl-2-C-methyl-4-O-dipivaloylphosphate-D-erythritol 151



To a suspension of 1,3-*O*-benzylidene-2-*O*-benzyl-2-*C*-methyl-4-*O*-diethylphosphate-Derythritol **150** (30.0 mg; 0.067 mmol; 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (0.25 mL) cooled at 0°C was added TMSBr (45.0 μ L; 0.33 mmol; 5 eq.). The reaction mixture was stirred at 0°C for 1 h then at room temperature for 1 day. The solvent was evaporated and THF (25 μ L) and water (one drop) were added. The mixture was again stirred for 1 h at room temperature, the solvents were evaporated and the crude residue was dried under vacuum overnight. This crude compound (100.6 mg; 0.26 mmol; 1 eq.) was dissolved in dry DMF (1.7 mL). TEA (90.0 μ L; 0.64 mmol; 2.5 eq.) was added at room temperature, and the reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature. Chloromethylpivalate (0.37 mL; 2.55 mmol; 10 eq.) was added, and the mixture was heated at 60°C for 20 h. After completion of the reaction, Et₂O (5 mL) was added, and the organic layer was washed successively with water, a saturated solution of NaHCO₃ and water again. Separation on a preparative TLC plate (ethyl acetate/ methanol, 9:1) afforded 1,3-*O*-benzylidene-2-*O*-benzyl-2-*C*-methyl-4-*O*-dipivaloylphosphate-D-erythritol **151** (62 mg).

Yield: 37 %.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.57$ (ethyl acetate/petroleum ether, 7:3)

¹**H NMR** (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.16$ (9H, s, -O-C(O)-*t*-Bu); 1.17 (9H, s, -O-C(O)-*t*-Bu); 1.51 (3H, s, C<u>H₃-C-OBn</u>); 3.83 (1/2 1H, br s, -C<u>H₂-O-CH-Ph</u>); 3.87 (1/2 1H, br s, -C<u>H₂-O-CH-Ph</u>); 4.02-4.29 (7H, m, 1H of-C<u>H₂-O-CH-Ph</u>, 2 x CH₃-C<u>H₂-O-P- and -C<u>H₂-O-P(O)-O-CH₂-O-</u>); 4.44-4.46 (1H, m, -C<u>H</u>-CH₂-O P-); 4.45 (1/2 2H, d, $J_{H,P} = 11.3$ Hz, -O-C<u>H₂-Ph</u>); 4.59 (1/2 2H, d, $J_{H,P} = 11.4$ Hz, -O-C<u>H₂-Ph</u>); 5.53 (1/2 1H, s, -C<u>H</u>-Ph); 5.54 (1/2 1H, s, -C<u>H</u>-Ph); 5.55 (2H, d, $J_{H,P} = 13.8$ Hz, -P-O-CH₂-O-); 7.29–7.49 (10 H, m, aromatic H).</u>

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 15.9 (CH₃); 26.8 (6 x CH₃), 38.7 (2 x quaternary C); 64.4 (CH₂); 67.0 (d, ²*J*_{C,P} = 5.5 Hz, CH₂); 69.0 (quaternary C); 81.8 (d, ³*J*_{C,P} = 7.1 Hz, CH); 87.2 (d,

 ${}^{2}J_{C,P} = 6.2$ Hz, 2 x CH₂); 101.8 (CH); 126.3, 127.1, 127.3, 127.7, 128.3, 128.4, 129.1, 130.1, 133.5, 137.4 and 138.3, (aromatic C); 176.6 (2 quaternary C).

³¹**P** NMR (162 MHz, CDCl₃): δ = -2.40.

3-(Benzyloxy)-2-hydroxypropyl dibenzylphosphate 158



To a solution of 2-(benzyloxymethyl)-oxirane (0.108 g; 0.66 mmol) in dichloromethane (4 mL) were successively added CuI (0.126 g; 0.66 mmol) and dibenzyl phosphate (0.370 g; 1.32 mmol). After stirring at room temperature for 24 h, the reaction mixture was filtered through celite, which was further washed with CH_2Cl_2 . Water (5 mL) was added to the filtrate. After three extractions with CH_2Cl_2 , the organic layers were combined, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and the solvent evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/cyclohexane, 65:35) to afford a colourless oil of compound **158** (0.263 g).

Yield: 90 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.22$ (ethyl acetate/CH₂Cl₂, 1:9).

¹**H** NMR (**300** MHz, CDCl₃): δ = 3.16 (1H, s, -OH); 3.48 (2H, d, *J*₃₋₂ = 5.3 Hz, -C<u>H</u>₂-OBn); 3.96 (1H, m, -C<u>H</u>-CH₂-); 4.08 (2H, m, -C<u>H</u>₂-O-P); 4.51 (2H, s, -C<u>H</u>₂-Ph from OBn); 5.03 (2H, dd, *J*_{H-P} = 8.3 Hz, *J*_{H-H} = 11.4 Hz, -C<u>H</u>₂-Ph from OPO(OBn)₂), 5.07 (2H, dd, *J*_{H-P} = 8.3 Hz, *J*_{H-H} = 11.4 Hz, C<u>H</u>₂-Ph from -OPO(OBn)₂); 7.34 (15H, m, Ph).

¹³**C NMR (75 MHz, CDCl**₃): $\delta = 68.9$ (CH₂, d, $J_{C-P} = 6.2$ Hz); 69.2 (CH, d, $J_{C-P} = 6.8$ Hz); 69.4 (d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, 2 x -CH₂-Ph from -OPO(OBn)₂); 70.1 (CH₂, C-3), 73.3 (**CH₂**-Ph de -OBn); 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.3, 128.4, 128.5, 135.5, 135.6 and 137.7 (aromatic C).).

³¹P NMR (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.02$ (s).

HRMS (EI⁺) m/z calculated for C₂₄H ₂₈O₆PNa [M+Na]⁺: 443.162, found 443.163.

3-(Benzyloxy)-2-oxopropyl dibenzylphosphate 157

To a solution of the alcohol **158** (0.38 g; 0.85 mmol) in dichloromethane (10 mL) were added activated 4 Å molecular sieves (0.3 g), *N*-methylmorpholine-*N*-oxide (0.36 g; 2.66 mmol) and solid TPAP (37 mg; 0.10 mmol). The mixture was stirred at room temperature and monitored by TLC (ethyl acetate/hexane, 7:3) until the starting material completely disappeared. On completion, the reaction mixture was filtered through a silica layer on a sintered-glass funnel. The solid cake was washed with ethyl acetate, and the filtrate was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/hexane, 7:3) to afford a colourless oil of compound **157** (0.31 g).

Yield: 82 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.33$ (ethyl acetate/hexane, 7:3).

¹**H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 4.12 (2H, s, -C<u>H</u>₂-OBn); 4.53 (2H, s, -CH₂-O-C<u>H</u>₂-Ph from -OBn), 4.72 (2H, d, *J*_{HH-P} = 9.7 Hz, -C<u>H</u>₂-O-P); 5.08 (2H, dd, *J*_{H-P} = 8.3 Hz, *J*_{H-H} = 11.5 Hz, -C<u>H</u>₂-Ph) from OPO(OBn)₂); 5.13 (2H, dd, *J*_{H-P} = 8.3 Hz, *J*_{H-P} = 11.5 Hz, (-C<u>H</u>₂-Ph) from OPO(OBn)₂); 7.35 (15H, m, Ph).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 69.6$ (CH₂, d, $J_{C-P} = 4.9$ Hz); 69.7 (d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz, 2·x CH₂); 73.3 (CH₂); 73.6 (CH₂), 127.8, 128.0, 128.2, 128.6, 135.5, 135.6 and 137.7 (aromatic C), 201.9 (quaternary C, d, $J_{C-P} = 5.6$ Hz).

³¹P NMR (121.5 MHz, CDCl₃) δ = 0.20 (s).

HRMS (EI⁺) m/z calculated for C₂₄H₂₅O₆PNa [M+Na]⁺: 463.140 found 463.149.

Dihydroxyacetone phosphate (DHAP)

The protected DHAP (0.92 g; 2.1 mmol) was hydrogenolyzed over 10 % Pd/C (100 mg) in MeOH/H₂O (90:10; 40 mL) for 1 h at room temperature and atmospheric pressure after which TLC (*i*-propanol/water/ethyl acetate, 6:3:1) showed a single spot ($R_f = 0.33$). The mixture was filtered through celite, and the filtrate was evaporated to dryness under vacuum. The residue (0.35 g) was dissolved in water (1 mL) and the solution of sodium hydroxide 1M was added.

Yield: 99 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.34$ (*i*-propanol/water/ethyl acetate, 6:3:1).

¹**H** NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = (hydrate form) 3.90 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, -C<u>H₂</u>-O-P); 3.65 (2H, s, -C<u>H₂</u>-OH); (oxo form) 4.55 (2H, d, *J* = 6.5 Hz, -C<u>H₂</u>-O-P); 4.60 (2H, s, -C<u>H₂</u>-OH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 65.9, 66.4, 67.0, 68.4 (CH₂), 96.0 (quaternary C, hydrate form), 212.5 (quaternary C, oxo form).

³¹P NMR (121.5 MHz, CDCl₃) δ = 2.5 (s) and 2.9 (s).

(S)-2- (p-Methoxybenzyloxy)methyl)oxirane 162



To a solution of (*S*)-(-)-glycidol (0.40 g; 5.4 mmol; 1 eq.) in dry DMF at 0°C under argon atmosphere was added NaH (195.0 mg; 8.1 mmol; 1.5 eq.). The mixture was stirred at 0°C for 30 min, then *p*-methoxybenzyl chloride (0.88 mL; 6.5 mmol; 1.2 eq.) was added. The mixture was stirred for additional 3 min at 0°C then for 2 h at room temperature. A saturated solution of NH₄Cl was then added, and the mixture was extracted three times with CH₂Cl₂. The combined organic layers were first washed with water, then with brine and dried over anhydrous MgSO₄. The solvent was evaporated, and the crude residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 15:85) to give (*S*)-2-(*p*-methoxybenzyloxy)methyloxirane **162** (1.0 g).

Yield: 95 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.48$ (ethyl acetate/petroleum ether, 7:3)

¹**H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 2.61 (1H, dd, ²*J*_{Ha,Hb} = 5 Hz, ³*J* = 2.6 Hz, -C C<u>H</u>_aH_b-CH-OPMB); 2.79 (1H, dd, ²*J*_{Hb,Ha} = 5 Hz, ³*J* = 4.3 Hz, -C CH_a<u>H</u>_b -CH-CH₂-OPMB); 3.41 (1H, dd, ²*J*_{Ha,Hb} = 11.4 Hz, ³*J* = 5.8 Hz, -CH-C<u>H</u>_aH_b-OPMB); 3.72 (1H, dd, ²*J*_{Hb,Ha} = 11.4 Hz, ³*J* = 3.2 Hz, -CH-CH_a<u>H</u>_b-OPMB); 3.80 (3H, s, -O-CH₃); 4.52 (2H, 2d, ²*J*_{Ha,Hb} = 11.6 Hz, ²*J*_{Hb,Ha} = 11.5 Hz -O-CH₂-PMP); 6.88-7.27 (4H, m, aromatic H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 44.5$ (CH₂); 51.0 (CH); 55.4 (CH₃); 70.6 (CH₂); 73.1 (CH₂); 114.0, 130.0, 130.1, 159.4 (aromatic C)

(3S)-3-Hydroxy-4-(p-methoxybenzyloxy)butyl 1-dibenzylphosphate 163



To a solution of (S)-2-(*p*-methoxybenzyloxy)methyloxirane **162** (1.0 g; 5.12 mmol; 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (28 mL) was added dibenzyl-phosphate (3.14 g; 11.27 mmol; 2.2 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 36 h. After completion of the reaction, the mixture was quenched with water and extracted 3 times with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent is distilled off. The crude residue was purified by flash gel chromatography with a mixture of ethyl acetate and petroleum ether (6:4) to give (3*S*)-3-hydroxy-4-(*p*-methoxybenzyloxy)butyl 1-dibenzylphosphate **163** (0.9 g).

Yield: 38 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.38$ (ethyl acetate/petroleum ether, 55:45)

¹**H NMR (300 MHz, CDCl₃):** $\delta = 3.0$ (1H, br s, -OH); 3.44 (2H, d, ³*J* = 5.3 Hz, -C<u>H</u>₂-O-CH₂-PMP); 3.78 (3H, s, -O-CH₃); 4.02-4.09 (3H, m, -C<u>H</u>-CH₂-OPMB and -CH-C<u>H</u>₂-OPMB); 4.32 (2H, s, -CH₂-PMP); 5.02-5.05 (4H, m, 2 x Ph-C<u>H</u>₂-O-P-); 6.84-7.23 (5H, aromatic H from PMB); 7.31-7.35 (10H, m, 2 x -P-O-<u>Bn</u>).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 55.5 (CH₃); 69.1 (CH₂, d, ²*J*_{C,P} = 6.2 Hz); 69.3 (CH, d, ³*J*_{C,P} = 6.2 Hz); 69.5 (CH₂, d, ²*J*_{C,P} = 5.6 Hz); 69.9 (CH₂); 73.1 (CH₂); 113.8 (CH); 127.8, 128.6, 129.4, 135.6 and 135.7 (aromatic C).

³¹P NMR (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.95$

Dibenzyl ((4*R*)-2-(*p*-methoxyphenyl)-1,3-dioxolan-4-yl)methyl phosphate 164



To a suspension of 4Å molecular sieves (75 mg) in a solution of (3*S*)-3-hydroxy-4-(*p*-methoxybenzyloxy)butyl-1-dibenzylphosphate **163** (0.3 g; 0.635 mmol; 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (13 mL) was added very slowly DDQ (0.173 g; 0.762 mmol; 1.2 eq.) at -15°C. After stirring for 3 h at -15°C, the reaction mixture is heated up overnight to 0°C. A first filtration on silica gel with a mixture of ethyl acetate and petroleum ether (6:4) was followed by a flash chromatography with the same eluent to give dibenzyl ((4*R*)-2-(*p*-methoxyphenyl)-1,3-dioxolan-4-yl)methyl phosphate as a 2/3 mixture of two diastereoisomers **164** (0.165 g).

Yield: 55 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.43$ (ethyl acetate/petroleum ether, 55:45).

¹**H** NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 3.79 (3/5 \text{ of } 3\text{H}, \text{s}, -\text{O-CH}_3^*)$; 3.80 (2/5 3H, s, -O-CH₃*); 3.97-4.18 (3H, m, -P-O-CH₂-CH-C<u>H₂</u> and -P-O-CH₂-C<u>H</u>-CH₂, and 3/5 of 2H, -C<u>H₂</u>-O-P); 4.29-4.41 (2/5 of 2H, m, -C<u>H₂</u>-O-P*); 5.02-5.09 (4H, m, 2 x -P-O-C<u>H₂</u>-Ph); 5.73 (3/5 of 1H, s, -O-C<u>H</u>-Ph*); 5.80 (2/5 of 1H, s, -O-C<u>H</u>-Ph*); 6.84-6.90 (2H, m, H in meta position of PMP); 7.32-7.39 (13H, m, aromatic H of PMP and Bn).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 55.4$ (CH₃); 63.4 (d, ²*J*_{C,P}=6 Hz, CH₂); 69.7 (d, ²*J*_{C,P=} 6 Hz, CH₂); 70.1 (d, ⁴*J*_{C,P}= 5.2 Hz, CH₂); 72.9 (d, ³*J*_{C,P}= 8 Hz, CH); 104.2 (CH); 104.7 (CH *); 114.3, 127.6, 127.9, 128.4, 128.9, 130.1, 130.9, 135.7, 135.9, 158.2 (aromatic C)

³¹**P** NMR (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.82$ and 0.93

(R)-2-(p-Methoxybenzyloxy)-3-hydroxypropyl dibenzyl phosphate 165



To a solution of dibenzyl (4*R*)-2-(*p*-methoxyphenyl)-1,3-dioxolan-4-yl)methyl phosphate **164** (0.7; 1.5 mmol; 1 eq.) and Me₂NH[•]BH₃ (220 mg; 3.75 mmol; 2.5 eq.) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) was added BF₃[•]Et₂O (0.5 mL; 3.75 mmol; 2.5 eq.) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 4 h. After completion of the reaction, a few drops of a saturated solution of NaHCO₃ were added. The reaction mixture is then extracted three times with CHCl₃. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent was evaporated. The crude residue was purified by flash chromatography with pure ethyl acetate to give (*R*)-2-(*p*-methoxybenzyloxy)-3-hydroxypropyl dibenzyl phosphate **165** (213 mg).

Yield: 30 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.32$ (ethyl acetate/petroleum ether, 55:45).

¹**H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 2.4 (1H, br s, -OH); 3.65-3.57 (3H, m, HO-C<u>H₂</u>-CH- and OH-CH₂-C<u>H</u>-); 3.78 (3H, s, -O-CH₃); 4.07-4.11 (2H, m, -P-O-C<u>H₂</u>-CH-CH₂); 4.46 (1H, d, ²*J*_{HaHb} = 11.3, -O-C<u>H_a</u>H_b-PMP); 4.56 (1H, d, ²*J*_{HbHa} = 11.2, -O-CH_a<u>H_b</u>-PMP); 5.01-5.05 (4H, m, 2 x -P-O-CH₂-Ph); 6.83-6.86 (2H, m, H in meta position of PMP), 7.20-7.36 (13H, m, aromatic H of PMP and Bn).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 55.3$ (CH₃); 61.1(CH₂); 65.8 (d, ${}^{2}J_{C,P} = 6.3$ Hz, CH₂); 69.5 (d, ${}^{2}J_{C,P} = 5.2$ Hz, 2 x CH₂); 71.8 (CH₂); 77.2 (d, ${}^{3}J_{C,P} = 7.1$ Hz, CH); 114.1, 126.9, 127.5, 127.8, 127.9, 128.0, 130.1, 135.7, 135.9 and 159.0 (aromatic C)

³¹**P** NMR (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.91$

(R)-Dibenzyl oxiran-2-yl-methyl phosphate 167



To a solution of (*S*)-(+)-glycidol (0.35 mL; 5.12 mmol; 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ under argon atmosphere is added the phosphoramidate (4.3 mL; 13.2 mmol; 2.5 eq.) and tetrazole (30.0 mL; 15.36 mmol; 3 eq.). After stirring the reaction mixture for 1 h at room temperature, *m*CPBA (3.45 g; 15.36 mmol; 3 eq.) was added. After an additional 2 h stirring, the reaction was completed. Diethyl ether (150 mL) was added to the reaction mixture, which was successively washed with a 10% solution of Na₂S₂O₅ (100 mL), a saturated NaHCO₃ solution (100 mL), water (100 mL) and finally brine (100 mL). The solvent was then evaporated, and the crude residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 6:4) to give (*R*)dibenzyl oxiran-2-ylmethyl phosphate **167** (1.85 g).

Yield: quantitative

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.35$ (ethyl acetate/petroleum ether, 6:4)

RMN ¹**H** (**300 MHz**, **CDCl**₃): $\delta = 2.58$ (1H, dd, ${}^{3}J_{3a-2} = 2.6$ Hz, ${}^{2}J_{3a-3b}$, = 4.9 Hz, $-C\underline{H}_{a}H_{b}$ -CH-CH₂-O-P-); 2.77 (1H, dd, ${}^{3}J_{3b-2} = 4.5$ Hz, ${}^{2}J_{3b-3a} = 4.8$ Hz, (-CH_a<u>H</u>_b-CH-CH₂-O-P-); 3.15 (1H, m, -C<u>H</u>-CH₂-O-P-); 3.9 (1H, ddd ${}^{3}J_{1a-2} = 5.8$ Hz, ${}^{2}J_{1a-1b} = 8.6$ Hz, ${}^{3}J_{1a-P} = 11.7$ Hz, $-C(\underline{H}_{a}H_{b})$ -O-P-); 4.24 (1H, ddd, ${}^{3}J_{3a-2} = 3.3$ Hz, ${}^{2}J_{1a-1b} = 7.8$ Hz, ${}^{3}J_{1b-P} = 11.7$ Hz, $-C(\underline{H}_{a}\underline{H}_{b})$ -O-P-); 5.06 (4H, d, ${}^{3}J_{CH2-P} = 8.4$ Hz, -P-(O-C<u>H</u>₂-Ph₂); 7.35 (10H, m, aromatic H).

RMN ¹³**C** (**75** MHz, CDCl₃): $\delta = 44.4$ (-O-<u>C</u>H₂-CH-O-P); 49.8 (d, $J_{C-P} = 8.0$ Hz, -O-<u>C</u>H-CH₂-O-P-); 68.0 (d, $J_{C-P} = 5.5$ Hz, -P(O-<u>C</u>H₂-Ph)₂); 69.4 (d, $J_{C-P} = 5.5$ Hz, -<u>C</u>H₂-CH-CH₂-O-P-; 128.0, 128.4 (aromatic C); 135.6 (d, $J_{C-P} = 6.8$ Hz, aromatic C)

RMN ³¹**P** (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.31$

(R)-Dibenzyl 2,3-dihydroxypropyl phosphate 168



To a solution of (*R*)-dibenzyl oxiran-2-yl-methyl phosphate **167** (1.78; 5.38 mmol; 1 eq.) in THF (20 mL) was added an aqueous 1 % H_2SO_4 solution (50 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was then quenched with a saturated solution of NaHCO₃ extracted three times with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 9:1) to give (*R*)-dibenzyl- 2,3-dihydroxypropyl phosphate **168** (1.14 g).

Yield: 60 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.32$ (ethyl acetate/petroleum ether, 9:1)

RMN ¹**H** (**300 MHz**, **CDCl**₃): δ = 3.30 (2H, br s, -OH); 3.58 (2H, m, -C<u>H</u>₂-OH); 3.83 (1H, m, -C<u>H</u>-OH); 4.03 (2H, dd, ³*J*_{H-P} = 8.8 Hz, ³*J*_{H-H} = 5.3 Hz, -P-O-<u>C</u>H₂-CH-); 5.04 (4H, m, -P(O-<u>C</u>H₂-Ph)₂); 7.35 (10H, m, aromatic).

RMN¹³**C** (**75** MHz, CDCl₃): $\delta = 62.7$ (-<u>C</u>H₂-OH); 68.6 (d, $J_{C-P} = 5.8$ Hz, -P-O-<u>C</u>H₂-CH-); 69.7 (d, $J_{C-P} = 5.8$ Hz, -P(O-<u>C</u>H₂-Ph)₂); 70.6 (d, $J_{C-P} = 5.8$ Hz, -CH₂-<u>C</u>H-), 128.1, 128.7, 128.8 (aromatic C); 135.5 (d, $J_{C-P} = 6.6$ Hz, aromatic C).

RMN ³¹**P** (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.19$

(4R)-Dibenzyl -2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl phosphate 169



A mixture of (*R*)-dibenzyl 2,3-dihydroxypropyl phosphate **168** (1.6 g; 4.54 mmol; 1 eq.), benzaldehyde dimethylacetal (3.4 mL; 22.70 mmol; 5 eq.) and *p*-TSA (86.0 mg; 0.45 mmol; 0.1 eq.) was stirred under reduced pressure (50 mbar) for 3 days. After completion of the reaction, the catalyst was neutralized by addition of NaHCO₃ (200 mg). CH₂Cl₂ (10 mL) was added, and the mixture was stirred for an additional hour. The solution was then extracted three times with CH₂Cl₂' and the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated off. The crude residue was then purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 6:4 to give (4*R*) (dibenzyl)-2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl phosphate **169** (1.5 g).

Yield: 75 %

 $\mathbf{R_f} = 0.37$ (ethyl acetate/petroleum ether, 5:5).

¹**H NMR** (**300 MHz**, **CDCl**₃): δ = 3.97-4.18 (4H, m, -P-O-CH₂-CH-C<u>H</u>₂ and -P-O-CH₂-C<u>H</u>-CH₂); 3.75-3.80 (3/5 of 2H, -C<u>H</u>₂-CH-CH₂-O-P) 3.96-4.12 (3H and 2/5 of H, m, (2/5 of 2H, -C<u>H</u>₂-CH-CH₂-O-P, -C<u>H</u>₂-CH-CH₂); 5.02-5.11 (4H, m, 2 x -P(O-C<u>H</u>₂-Ph)₂); 5.73 (3/5 of 1H, s, -O-C<u>H</u>-Ph); 5.80 (2/5 of 1H, s, -O-C<u>H</u>-Ph); 6.33-7.47 (15 H, m, aromatic H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 66.9 (d, ²*J*_{C,P} = 6.0 Hz, CH₂); 67.3 (d, ²*J*_{C,P} = 6 Hz, 2 x CH₂); 69.5 (d, ⁴*J*_{C,P}= 5.2 Hz, CH₂); 74.2 (d, ³*J*_{C,P}= 8.2 Hz, CH); 104.0 (CH); 104.6 (CH*); 126.4, 126.7, 128.0, 128.4, 128.6, 129.3, 129.5, 135.6, 137.5, 136.8 and 137.5 (aromatic C)

³¹**P** NMR (121.5 MHz, CDCl₃) $\delta = 0.26$ and 0.42

(R)-Dibenzyl 2-(benzyloxy)-3-hydroxypropyl phosphate 170



To a solution of dibenzyl ((4*R*)-2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl phosphate **169** (1.5 g; 3.40 mmol; 1 eq.) and Me₂NH[·]BH₃ (200 mg; 3.40 mmol; 1 eq.) in dry CH₂Cl₂ (16 mL) was added BF₃·Et₂O (0.45 mL; 3.40 mmol; 1 eq.) at -40°C. The reaction mixture was stirred for 4 h. After completion of the reaction, a few drops of a saturated NaHCO₃ solution were added. The reaction mixture was extracted three times with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and the solvent was evaporated. The crude residue was purified by flash chromatography (ethyl acetate/petroleum ether, 7:3) to give (*R*)-dibenzyl 2-(benzyloxy)-3-hydroxypropyl phosphate **170** (256 mg).

Yield : 17 %

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.45$ in 5:5 ethyl acetate: petroleum ether

¹**H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 2.42 (1H, br s, -OH); 3.58-3.67 (3H, m, -OH-C<u>H</u>₂-CH- and -OH-CH₂-C<u>H</u>-); 4.08-4.13 (2H, m, -P-O-C<u>H</u>₂-CH-CH₂); 4.53 (1H, d, ²*J*_{HaHb} = 11.7, -O-r -PMP); 4.63 (1H, d, ²*J*_{HbHa} = 11.7, -O-CH_a<u>H</u>_b-Ph); 5.00-5.05 (4H, m, 2 x -P-O-C<u>H</u>₂-Ph); 7.28-7.37 (15H, m, aromatic H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 61.1(CH_2)$; 65.8 (d, ²*J*_{C,P} = 5.9 Hz, CH₂); 69.5 (d, ²*J*_{C,P} = 5.5 Hz, CH₂); 69.6 (d, ²*J*_{C,P} = 5.6 Hz, CH₂); 70.2 (CH₂); 77.5 (d, ³*J*_{C,P} = 6.7 Hz, CH); 127.8, 127.9, 128.0, 128.5, 128.6, 135.6 and 137.8 (aromatic C)

³¹P NMR (121.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.94$

Produits synthétisés















