



HAL
open science

Etude méthodologique du couplage d'acides aminés trifluorométhylés et application à la synthèse d'analogues du GPE, un tripeptide à visée thérapeutique

Julien Simon

► To cite this version:

Julien Simon. Etude méthodologique du couplage d'acides aminés trifluorométhylés et application à la synthèse d'analogues du GPE, un tripeptide à visée thérapeutique. Autre. Université de Cergy Pontoise, 2012. Français. NNT : 2012CERG0596 . tel-00816535

HAL Id: tel-00816535

<https://theses.hal.science/tel-00816535>

Submitted on 27 Nov 2014

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

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



UNIVERSITÉ
de Cergy-Pontoise

ECOLE DOCTORALE SCIENCES ET INGENIERIE

De l'Université de Cergy-Pontoise

THESE

Présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Cergy-Pontoise
Spécialité : Chimie Organique

**Etude méthodologique du couplage d'acides aminés
trifluorométhylés et application à la synthèse d'analogues du
GPE, un tripeptide à visée thérapeutique**

Par
Julien SIMON

Laboratoire Synthèse Organique Sélective et Chimie bioOrganique (SOSCO)

Le 28 novembre 2012

Devant le jury composé de

Mme Florine CAVELIER
Mme Sandrine ONGERI
Mme Anna Maria PAPINI
M. Vincent AUCAGNE
M. Thierry BRIGAUD
Mme Nathalie LENSEN
M. Grégory CHAUME

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directeur de thèse
CoDirectrice de thèse
Invité

*A ma famille et mes amis,
A tous ceux qui ont partagés ces moments magiques.*

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie Mme Florine CAVELIER, Professeur à l'université de Montpellier et Mme Sandrine ONGERI, Professeur à l'université Paris Sud, d'avoir accepté d'être rapporteur.

Je remercie également Anna Maria PAPINI, Professeur à l'université de Cergy-Pontoise d'examiner mon travail de thèse. Je tiens également à la remercier pour m'avoir permis de découvrir brièvement à la fois la synthèse peptidique supportée et la ville de Florence.

Je remercie aussi M. Vincent AUCAGNE, du centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans de participer au jury en tant qu'examineur.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe « fluor » qui m'a accueilli en Master puis en thèse et qui m'a permis de vivre mon rêve d'enfant, faire de la chimie ! Tout d'abord un grand merci à M. Thierry BRIGAUD, mon directeur de thèse, qui m'a fait entrer dans l'univers magique de la chimie du fluor. Je lui suis très reconnaissant d'avoir partagé avec moi son savoir. Je le remercie également pour sa grande disponibilité durant toutes ces années.

Je remercie Mme Nathalie LENSEN, ma codirectrice de thèse pour ses très nombreux conseils avisés, sa gentillesse, son écoute et son soutien sans faille.

Je remercie également M. Grégory CHAUME, qui m'a également encadré pendant cette thèse et qui est à l'origine de ce projet. Je le remercie de m'avoir fait confiance pour effectuer ce travail, pour son humour sans borne et pour son aide tout au long de ma thèse.

Je n'oublie pas les autres membres de l'équipe, Mme Evelyne CHELAIN que je remercie pour sa gentillesse inversement proportionnelle à sa taille, sa bonne humeur permanente et ses conseils. Et M. Julien PYTKOWICZ pour sa gentillesse, son humour, ses conseils et son excellente interprétation de Baloo.

Je remercie M. Emeric MICLET, de l'université Paris VI pour son aide précieuse sur tout ce qui est étude conformationnelle par RMN.

Je remercie également tout les membres du laboratoire, Mme Nadège LUBIN-GERMAIN, Mme Elisa PERONI, Mme Maud LARREGOLA, M. Florian GALLIER, M. Jacques AUGÉ, Mme Nancy LINDER et M. Jacques UZIEL ainsi que notre secrétaire Mme Jocelyne GOUGEROT.

J'adresse mes remerciements à Mme Gwenaëlle SIZUN-THOME qui s'occupe avec amour de tout nos appareils, en particulier de la RMN qui a une vie mouvementée. Je la remercie également pour sa gentillesse et son écoute.

Un très grand merci à tous mes amis thésards, ex-thésards, Post-Doc, ATER, stagiaires. Je remercie M. Olivier MONASSON pour son humour sans égal et sa gentillesse. Je remercie également Mme Emmanuelle DEVILLERS avec qui ce fût un plaisir de partager un bureau avant mon déménagement « au fond du couloir » et qui est également le meilleur public que je connaisse pour les blagues plus ou moins réussies. Je remercie également Mme Véronique DOAN avec qui j'ai partagé mon bureau pendant ces derniers moments de thèse.

Je remercie particulièrement les « ex » membres du laboratoire, en particulier M. Hodney LUBIN qui a été mon voisin de paillasse et collègue de bureau, pour sa bonne humeur communicative. Mes remerciements vont également à Mme Stéphanie RAT qui a animé le laboratoire de son humour et de sa bonne humeur.

Je remercie de même nos tunisiens, M. Charfedinne AYED, Mme Ibtissem JLALIA et M. Khoubaid BEN HAJ SALAH qui se sont tous révélés d'une gentillesse formidable.

Mes remerciements vont également à Fanny CATTENOY, Carlotta SANTORO, Yi-hong CAO, Fabio RIZZOLO, Mouhamad JIDA, François PALLOT, Cédric RENTIER, Bimalendu ROY, Justine CARLOS, Lotfi TAK-TAK, Benjamin METOYER et aussi toute l'équipe florentine du PeptLab.

Je remercie Blizzard Entertainment[®], Lagavulin[®] et mes amis qui m'ont permis de m'évader aux moments où j'en avais besoin.

Pour finir, mes plus grands remerciements vont à ma famille et mes amis, qui m'ont soutenu durant toute la durée de ma thèse et à qui j'ai expliqué avec plus ou moins de succès mes péripéties chimiques.

Résumé

Le tripeptide GPE possède une activité neuroprotectrice intéressante *in-vitro* et *in-vivo* pour différents types de dommage neuronal. L'objectif de cette thèse est de mettre au point des méthodes de couplage peptidique pour les acides aminés trifluorométhylés et de réaliser des analogues trifluorométhylés du GPE.

Au cours de cette thèse, la synthèse d'acides aminés trifluorométhylés cycliques énantiopurs (proline, pseudoproline) a été réalisée à l'échelle du gramme.

Ensuite, une étude méthodologique de l'incorporation de ces acides aminés trifluorométhylés dans des peptides a été effectuée.

Des expériences RMN ont été menées pour étudier la conformation *cis/trans* de la liaison amide de ces peptides trifluorométhylés.

Enfin, des analogues du tripeptide GPE ont été synthétisés en remplaçant le motif proline par une proline ou pseudoproline trifluorométhylé. Des tests biologiques sont actuellement en cours pour évaluer leur activité sur divers troubles neuronaux.

Mots Clés : peptide fluoré, acide aminé trifluorométhylé, couplage peptidique, proline, pseudoproline, neuroprotecteurs

Abstract

GPE is a tripeptide with neuroprotecting activity both *in-vitro* and *in-vivo* for various neuronal damage. The goal of this thesis was to work out peptide coupling methods for trifluoromethylated amino acids and the synthesis of trifluoromethylated analogs of GPE.

During this thesis, the synthesis of enantiopure cyclic trifluoromethylated amino acids (proline and pseudoproline) was performed successfully on grams scale.

Then, methodological study of their incorporation in peptide was performed.

NMR experiments were made to investigate the *cis/trans* conformation of the amide bond of trifluoromethylated peptide.

At last, analogs of the tripeptide GPE were made with trifluoromethylated proline and pseudoproline instead of the proline. Biological tests are currently under progress to evaluate their activity on various neuronal disorders.

Key Words : fluorinated peptide, trifluoromethylated amino acid, peptide coupling, proline, pseudoproline, neuroprotective

Table des matières

Introduction	17
Chapitre 1 : Rappels bibliographiques	22
1. Les AVC : Généralités	23
1.1. Mécanisme précoce : l'excitotoxicité	24
1.2. Mécanismes différés : inflammation et apoptose	25
1.2.1. Inflammation post-ischémique	25
1.2.2. Apoptose post-ischémique	26
1.3. Arsenal thérapeutique	27
2. Le tripeptide GPE : Outil thérapeutique	28
2.1. Le GPE : Endogène	28
2.2. Le GPE et ses analogues : Etude structure-activité	29
3. Utilisation des peptides en thérapeutique : Intérêts et limitations	37
3.1. Avantages des peptides	39
3.2. Limitations des peptides	39
4. Des acides aminés trifluorométhylés aux peptides	40
4.1. Le Fluor : Généralités	40
4.2. Les acides aminés α-trifluorométhylés	43
4.3. Les peptides trifluorométhylés	47
5. Conclusion	49
Chapitre 2 : Synthèse d'acides aminés α-trifluorométhylés cycliques et étude méthodologique de la réaction de couplage	50
1. Synthèse des acides aminés α-trifluorométhylés	51
1.1. Rappels bibliographiques	51
1.1.1. Les 2-Tfm-Prolines (2-CF ₃ -Pro)	51
1.1.2. La 5-Tfm-Proline (5-CF ₃ -Pro)	52

1.1.3. Les Tfm-pseudoproline issue de la sérine : Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$)	53
1.2. Résultats et discussion	54
1.2.1. Les 2-Tfm-Prolines (2- CF_3 -Pro)	54
1.2.2. La Tfm-pseudoproline issue de la sérine : Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$).....	58
1.2.3. La Tfm-pseudoproline issue de la cystéine : Cys($\Psi^{CF_3,H}Pro$)	59
1.2.4. Les Tfm-pseudoprolines.....	60
2. De l'acide aminé trifluorométhylé au peptide.....	61
2.1. Rappels bibliographiques.....	61
2.1.1. Généralités sur le couplage peptidique en solution	61
2.1.1.1. Les carbodiimides	63
2.1.1.2. Les anhydrides symétriques et les anhydrides mixtes.....	65
2.1.1.3. Les sels de phosphonium/uronium.....	67
2.1.1.4. Les halogénures d'acyle	68
2.1.1.5. Les esters activés	71
2.1.2. Le couplage d'acides aminés α -trifluorométhylés : un challenge.....	71
2.1.2.1. Couplage C-terminal	72
2.1.2.2. Couplage N-terminal	77
2.2. Etude méthodologique du couplage d'acides aminés fluorés : Résultats et discussion	80
2.2.1. Couplage avec la 2-Tfm-Proline	80
2.2.1.1. Le couplage C-Terminal.....	80
2.2.1.2. Le couplage N-terminal : Les anhydrides	82
2.2.1.3. Le couplage N-terminal : Les fluorures d'acyle.....	82
2.2.1.4. Les chlorures d'acyle	83
2.2.2. Couplage avec la Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$)	86
2.2.2.1. Couplage C-terminal	87
2.2.2.2. Couplage N-terminal	87

2.2.2.3. Couplage C-terminal sur le dipeptide Fmoc-Gly-Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$).....	93
2.2.3. Couplage avec la Cys($\Psi^{CF_3,H}Pro$).....	94
2.2.3.1. Couplage N-terminal	94
2.2.3.2. Couplage C-terminal	96
2.2.4. Couplage avec les oxazolidines.....	97
2.2.4.1. Couplage N-terminal	98
2.2.4.1. Couplage C-terminal	99
2.2.5. La synthèse sur support solide (SPPS).....	100
2.2.5.1. Couplage de la CF ₃ -Alanine avec le décapeptide FLAPYGWML ..	100
2.2.5.2. Couplage du peptide contenant la CF ₃ -Alanine avec de la Fmoc-Glycine	102
2.2.5.3. Couplage de la CF ₃ -Alanine avec l'acide glutamique greffé.....	103
2.2.5.4. Couplage du dipeptide CF ₃ -Alanine-acide Glutamique avec la Fmoc- Glycine	103
2.2.5.5. Couplage du dipeptide CF ₃ -Proline-acide Glutamique avec la Fmoc- Glycine	105
2.2.6. Etude structurale des dipeptides Fmoc-AA-Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$)-OMe par RMN	105
2.2.6.1. Détermination de la conformation de cycle de la Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$).....	105
2.2.6.2. Détermination de la configuration absolue de la Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$).....	108
2.2.6.3. Détermination de l'isomérisie <i>cis/trans</i> de la liaison amide des dipeptides Fmoc-AA-Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$)-OMe.....	111
3. Conclusion	115
Chapitre 3 : Synthèse d'analogues trifluorométhylés du GPE en série proline.....	116
1. Rappels bibliographiques.....	117
2. Synthèse du GPE en série proline : Résultats et discussion.....	121
2.1. Le GPE en série (S)-2-CF₃-proline	121

2.2. Le GPE en série (<i>R</i>)-2-CF ₃ -proline.....	124
2.3. La série oxazolidine dérivée de la sérine : Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro).....	124
2.4. La série oxazolidine dérivée de l'éthanolamine.....	125
3. Conclusion	126
Conclusion générale	127
Experimental part	131
Références bibliographiques	193
Table des schémas	199
Table des tableaux.....	203
Table des figures.....	204
ANNEXES.....	207

LISTE D'ACRONYMES ET D'ABREVIATIONS

Å	Ångström
Ac	Acétate
I	Acide Désoxy riboNucléique
Aib	Acide aminoisobutyrique
AIF	Facteur Induisant l'Apoptose (Apoptosis Inducing Factor)
ANR	Agence Nationale de la Recherche
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
Bcl-2	Lymphome à cellules B
Boc	<i>Tert</i> -butoxycarbone
BOP	Hexafluorophosphate benzotriazole-1-yloxytris(diméthylamino)- phosphonium
BOP-Cl	Chlorure de Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphorodiamidique
BSA	<i>N,O</i> -Bis(triméthylsilyl)acétamide
Bzl	Benzyle
CAN	Nitrate de cérium et d'ammonium
COX-2	Cyclooxygénase-2
D-AP5	Acide (2 <i>R</i>)-amino-5-phosphonopentanoïque
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC	DiCyclohexylCarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DCU	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylurée
DIC	Diisopropylcarbodiimide
DIEA ou DIPEA	<i>N,N'</i> -Diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
dmP	5,5-Diméthylproline
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dts	Dithiasuccinoyle
EDCI	Chlorhydrate de <i>N</i> -éthyl- <i>N'</i> -(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EPO	Erythropoïétine

FAS	Fragment inducteur d'apoptose (Apoptosis Simulating Fragment)
Fmoc	9-Fluorénylméthoxycarbone
¹⁸ F-FDG	Fluorodesoxyglucose marqué au fluor 18
GluR	Récepteur glutamate
GPE	Glycine-Proline-Glutamate
HATU	2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyl uronium hexafluorophosphate méthanaminium
HMPT	Hexaméthylphosphorotriamide
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	Chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography)
HRMS	Spectroscopie de masse haute résolution (High Resolution Mass Spectrometry)
IGF-1	Facteur de croissance semblable à l'insuline (Insuline-like Grow Factor)
INR	Ratio International Normalisé (International Normalized Ratio)
I.R.	Infrarouge
I.R.M.	Imagerie par Résonance Magnétique
K	Degré Kelvin
LC/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectroscopie de masse (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)
m.p.	Point de fusion (melting point)
MECP2	Protéine liant les méthyls CpG 2 (Methyl CpG binding protein 2)
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium
MW	Masse moléculaire (Molecular Weight)
Nbs	2-Nitrobenzenesulfonyle
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
NCA	<i>N</i> -Carboxyanhydrides
NDA	Nouveau médicament approuvé (New Drug Approvals)
NIH	Institut National de la santé (National Institutes of Health)

NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimide
Nle	Norleucine
NMDA	<i>N</i> -Méthyl-D-aspartate
NMM	<i>N</i> -Méthylmorpholine
NNZ-2566	GPE substitué par une 2-méthylproline
nOe	Effet nucléaire overhauser (Nuclear Overhauser Effect)
NOS	Oxyde nitrique synthétase (Nitric Oxyde Synthetase)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Oxyma Pure	Ethyle 2-cyano-2-(hydroxyimino)acétate
PFCE	Ether 15-couronne-perfluoré (perfluoro-15-crown-5-ether)
Pfp	Pentafluorophénole
Phg	Phénylglycine
Pht	Phtaloyle
PPTS	<i>Para</i> -toluène sulfonate de pyridinium
PyBOP	Hexafluorophosphate benzotriazole-1- yloxytri(pyrrolidino)phosphonium
Rd	Rapport diastéréoisomérique
Rdt	Rendement
RMN	Résonance magnétique nucléaire
<i>r</i> -tPA	Activateur recombinant du plasminogène tissulaire
SEM	Erreur standard (Standard Error of the Mean)
SFNV	Société Française Neuro-Vasculaire
SNC	Système Nerveux Central
SPPS	Synthèse peptidique sur support solide (Solid Phase Peptide Synthesis)
t.a	Température Ambiante
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium tétrafluoroborate
TEP	Tomographie par Emission de Positron
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMSCN	Cyanure de triméthylsilyle
Xaa ou AA	Acide aminé

Z	Benzyloxycarbonyle
$[\alpha]_D$	Pouvoir rotatoire spécifique
α -Tfm-AA	Acide aminé α -trifluorométhylé

Introduction

« La science est une chose merveilleuse...tant qu'il ne faut pas en vivre ! »

Albert Einstein

L'ischémie cérébrale aigüe est une insuffisance artérielle sévère qui est consécutive à l'occlusion d'une artère cérébrale ou de ses collatérales. D'un point de vue épidémiologique, l'ischémie cérébrale aigüe représente une des causes majeures de mortalité, derrière les cardiopathies et le cancer, et c'est surtout la première cause d'infirmité physique lourde à long terme chez l'adulte dans les pays développés. Elle représente donc une part très importante des dépenses de santé avec une prise en charge du malade de plus en plus élevée. Malheureusement, il n'existe toujours pas de traitement efficace pour soigner ce type de pathologie lors de la phase aigüe. Actuellement, les ischémies aigües peuvent être traitées par des thrombolytiques (ex. Altéplase[®]) à condition que le patient soit hospitalisé dans les plus brefs délais (prise en charge dans les 3 heures après les premiers symptômes). Ils permettent une récupération complète plus fréquente et une diminution de la mortalité. Cependant, étant donné leurs effets indésirables potentiels (notamment des hémorragies intracrâniennes), leur marge thérapeutique est très étroite et ce type de traitement ne peut être proposé que dans des centres spécialisés et pour des malades sélectionnés selon des critères très précis (**Annexe 1**, p 207). C'est pourquoi de nouveaux traitements basés sur le concept de neuroprotection sont actuellement en développement. En effet, puisque l'évolution du processus de mort neuronale est progressive, une fenêtre thérapeutique est ouverte pour permettre une éventuelle intervention. Ainsi, l'administration de composés neuroprotecteurs exogènes puissants, permettant de préserver ou bien même de régénérer les neurones, est une stratégie très prometteuse pour le traitement de nombreuses attaques du système nerveux central (SNC). Par ailleurs, cette stratégie pourrait être étendue aux maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou d'Huntington. De tels mécanismes de neuroprotection se produisent naturellement dans le cerveau des mammifères, particulièrement les cerveaux immatures et sont induits par des facteurs de croissance neurotrophiques.

Parmi les facteurs de croissance endogènes, IGF-1 (facteur de croissance semblable à l'insuline), un peptide constitué de 70 acides aminés, a été particulièrement décrit pour ses effets neuroprotecteurs puissants, *in vitro* et *in vivo* pour divers types d'ischémie^{1,2,3,4} ou pour sa neuromodulation dans le cas du syndrome de Rett.⁵ Malgré ces excellentes propriétés, l'utilisation clinique d'IGF-1 pourrait être problématique à cause de sa faible aptitude à passer

¹ Yin, Q. W. ; Johnson, J. ; Prevette, D. ; Oppenheim, R. W. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 7629-7640.

² Parrizas, M.; Saltiel, A. R.; LeRoith, D. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 154-161.

³ Mason, J. L.; Ye, P.; Suzuki, K.; D'ercole, A. J.; Matsushima, G. K. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 5703-5708.

⁴ Johnston, B. M.; Mallard, E. C.; Williams, C. E.; Gluckman, P. D. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 300-308.

⁵ Tropea, D.; Giacometti, E.; Wilson, N. R.; Beard, C.; McCurry, C.; Fu, D. D.; Flannery, R.; Jaenisch, R.; Sur, M. *PNAS* **2009**, *6*, 2029-2034.

la barrière hémato-encéphalique et de ses effets mitogéniques potentiels. Par ailleurs, il semble qu'IGF-1 subit l'action d'une protéase dans les tissus cérébraux endommagés pour libérer le tripeptide glycine-proline-glutamate (GPE) (**Figure 1**).⁶

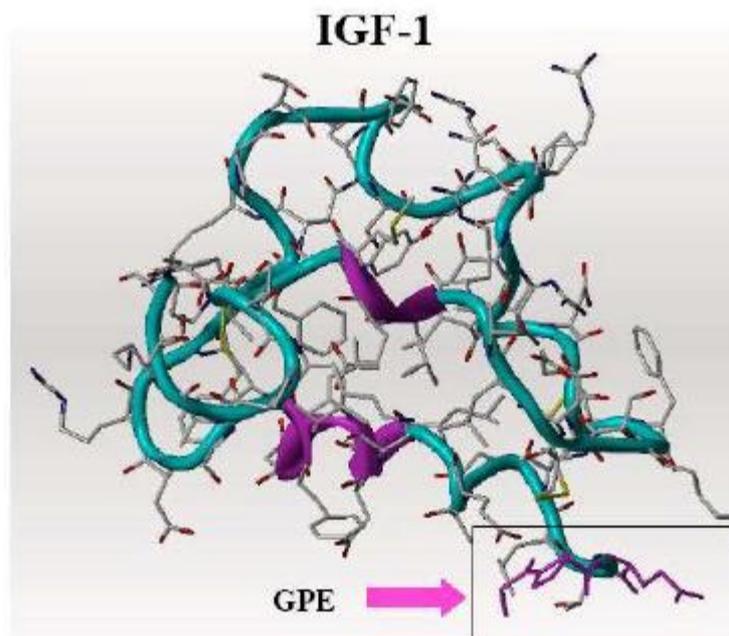


Figure 1 : IGF-1⁷

Bien qu'il ne possède aucun effet neurotrophique, le GPE montre des activités remarquables au niveau du SNC, ainsi il présente des propriétés de neuromodulation permettant la libération d'acétylcholine ou de dopamine. Le GPE montre également une très forte affinité pour les récepteurs au glutamate et exerce une puissante activité neuroprotectrice *in vitro* vis-à-vis de nombreux types de neurones sur de nombreux dommages neuronaux d'origine excitotoxique ou ischémique. Par ailleurs, le GPE présente des effets neuroprotecteurs dans différents modèles animaux sur des mécanismes neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou d'Huntington. Du fait de sa simplicité structurale et de ses importantes propriétés, le tripeptide GPE a été très rapidement considéré comme un «lead» très prometteur pour l'émergence d'analogues structuraux à fort potentiel pour le traitement de maladies du système nerveux central et des désordres neurodégénératifs. Deux molécules dérivées du GPE ont été développées par la compagnie Neuren-Pharmaceuticals et ont conduit à des essais cliniques (**Figure 2**).

⁶ Sara, V. R.; Carlsson-Sdwirut, C.; Bergman, T.; Jornvall, H.; Roberts, P. J.; Crawford, M.; Hakansson, L. N.; Civalero, I.; Nordberg, A. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1989**, *165*, 766-771.

⁷ Brimble, M. A.; Harris, P. W. R. *Chem. N. Z.* **2001**, 133-136.

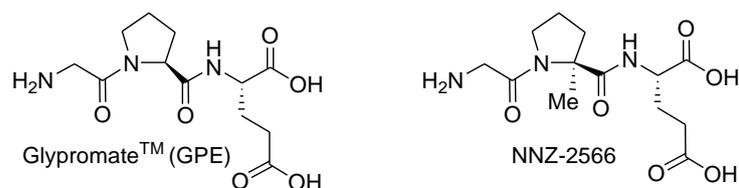


Figure 2 : Structure chimique du GPE et de NNZ-2566

Le Glypromate™ (nom commercial du GPE) a été testé en phase III pour son activité neuroprotectrice lors de transplantations cardiaques et/ou pulmonaires. Cette étude a montré que seule une faible partie des patients (20%) ont montré des signes de déclin cognitif et que ce déclin est en moyenne faible. Les trop faibles différences entre le groupe placebo et le groupe traité par le Glypromate™ a conduit à l'arrêt des essais cliniques.

Le NNZ-2566 (GPE substitué par une 2-méthylproline) est actuellement en phase II pour évaluer son activité neuroprotectrice lors de traumatismes crâniens sévères par utilisation en administration *i.p.* (*intra péritonéal*) et pour des traumatismes légers *p.o.* (*per os*, par voie orale), il est également en phase I pour son activité thérapeutique sur le syndrome de Rett.

Cette thèse fait l'objet d'un contrat ANR (**ANR-09-JCJC-0060-01**) obtenu par le Dr. Grégory Chaume et consiste en la synthèse et l'étude des relations structure-activité d'analogues trifluorométhylés du tripeptide GPE (**Figure 3**).

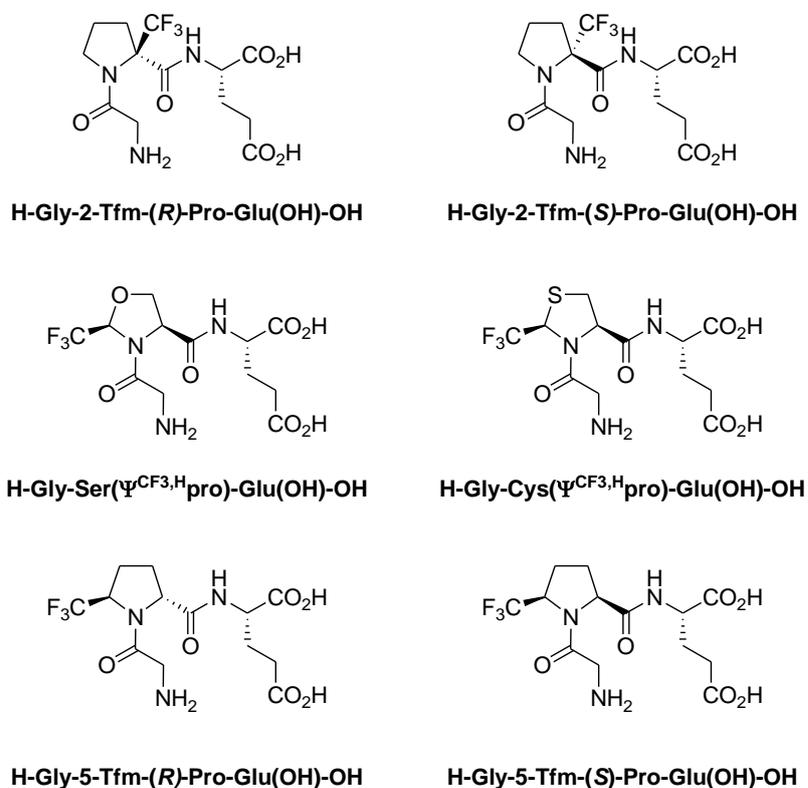


Figure 3 : Analogues trifluorométhylés du GPE

Du fait de ses propriétés conformationnelles particulières, la proline joue un rôle clef dans l'activité biologique du GPE. L'incorporation d'une proline ou d'un mime de proline comportant un groupement CF_3 en lieu et place du résidu proline, devrait augmenter sa stabilité métabolique et sa lipophilie, permettant une meilleure biodisponibilité. De plus, les changements conformationnels induits par ces motifs pourront conduire à une meilleure activité neuroprotectrice. Le groupement CF_3 sera introduit en position 2 ou 5 par rapport à la fonction amine. Ainsi, les analogues trifluorométhylés synthétisés comporteront de fortes similitudes structurales avec les dérivés non-fluorés les plus efficaces et pourraient conduire à l'obtention d'un candidat pour le traitement des dommages affectant le système nerveux central et autres désordres neurodégénératifs.

Dans un premier temps, des voies de synthèse d'acides aminés trifluorométhylés cycliques hautement sélectives et à l'échelle du gramme seront mises au point.

Dans un second temps, de nouvelles méthodes de couplage peptidique seront étudiées pour permettre l'incorporation des aminoacides trifluorométhylés (CF_3 -AAs).

Enfin, la synthèse des analogues trifluorométhylés du GPE sera réalisée puis les différents composés testés pour leur activité biologique.

Chapitre 1 : Rappels bibliographiques

« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre »

Aristote

1. Les AVC : Généralités

Selon l’OMS, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la 3^e cause de mortalité dans les pays industrialisés. L’ischémie cérébrale peut être provoquée par un accident vasculaire cérébral (thrombose, compression ou rupture artérielle) et affecter un territoire limité (ischémie focale) ou bien toucher tout le cerveau dans le cas d’un arrêt cardiaque temporaire (ischémie globale). De nombreuses études ont été réalisées pour comprendre les mécanismes cellulaires successifs qui se déclenchent suite à l’ischémie.⁸ Les lésions cérébrales sont provoquées par une cascade complexe de réactions. Le cœur de l’ischémie est le siège d’une nécrose rapide résultant de la libération massive de calcium qui conduit à une mort cellulaire d’origine cytoplasmique, ce qui entraîne des dommages irréversibles. La zone de pénombre entoure la zone de cœur et consiste en un tissu ayant subi des dommages réversibles. La zone d’oligémie (hypovascularisation) est définie par un débit sanguin cérébral diminué mais évolue spontanément vers la récupération. Au cours du temps, la zone de pénombre diminue, soit par extension de la zone de mort neuronale, soit par récupération d’un débit sanguin cérébral normal pour conduire à un tissu sain (**Figure 4**).

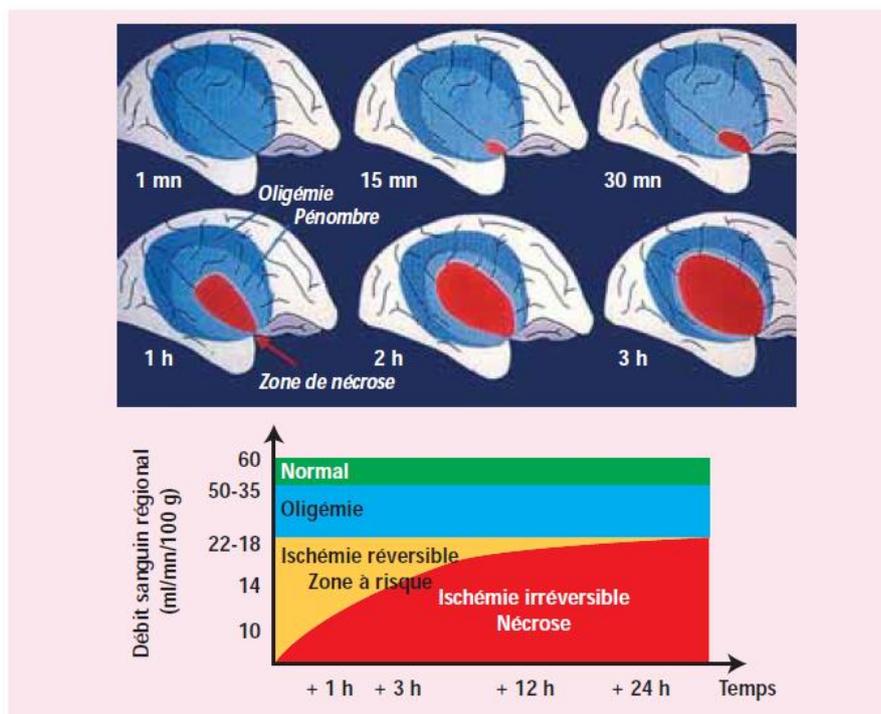


Figure 4 : Représentation schématique de la pénombre ischémique⁹

Cette évolution est contrôlée par une suite d’événements qui évoluent dans le temps et l’espace et qui sont dans le cas de mécanismes précoces l’excitotoxicité (processus

⁸ Brott, T.; Bogousslavsky, J. *N. Engl. J. Med.* **2000**, 710-722.

⁹ Baron, J.C. *Cerebrovasc. Dis.* **1999**, 193-201.

neurotoxique induit par des neurotransmetteurs excitateurs comme l'acide glutamique) et dans le cas de mécanismes différés l'inflammation et enfin l'apoptose (mort neuronale) (**Figure 5**).

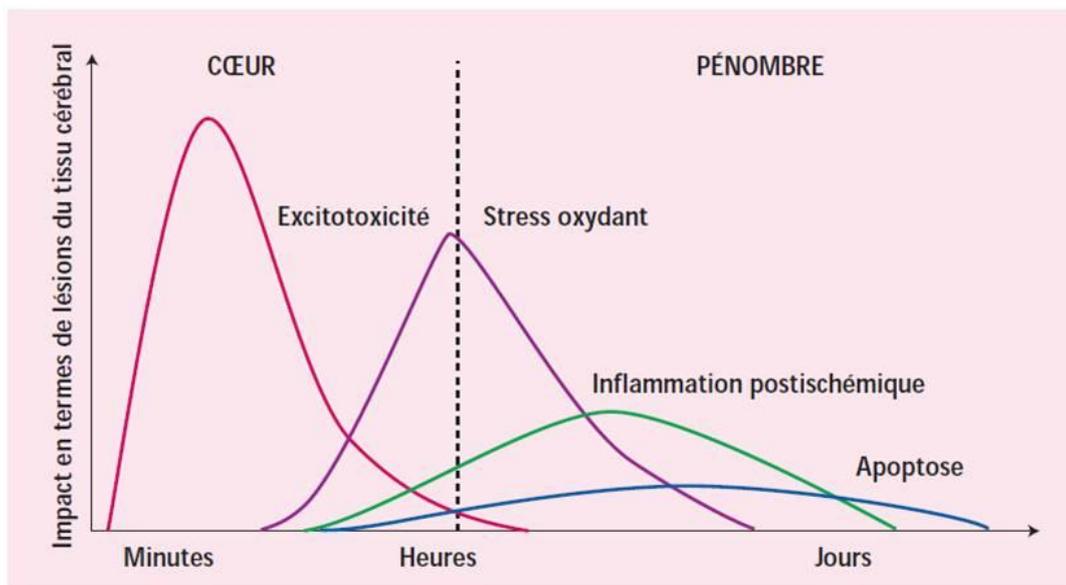


Figure 5 : Évolution spatio-temporelle des mécanismes impliqués dans l'ischémie cérébrale¹⁰

1.1. Mécanisme précoce : l'excitotoxicité

Le maintien de l'homéostasie (équilibre des paramètres physico-chimiques) du tissu cérébral nécessite une consommation relativement élevée en oxygène et en glucose et dépend exclusivement de la phosphorylation oxydative pour la production d'énergie nécessaire à la survie de la cellule. L'apport restreint en oxygène et glucose lors de l'épisode ischémique entraîne un déficit énergétique qui conduit à la dépolarisation des cellules nerveuses. La perte du potentiel membranaire provoque l'activation des canaux calciques voltage-dépendants qui conduisent à la libération d'acides aminés excitateurs tel le glutamate. L'activation des récepteurs glutamatergiques (surtout les récepteurs *N*-méthyl-D-aspartate ou NMDA) accroît et entretient l'augmentation intracellulaire de calcium qui provoque la lyse osmotique (rupture de la membrane plasmique provoquée par la pénétration d'eau dans la cellule) des neurones et des cellules gliales (cellules qui forment l'environnement des neurones) (**Figure 6**).

¹⁰ Dirnagle, U.; Iadecola, C.; Moskowitz, M.A. *Trends Neurosci.* **1999**, 391-397.

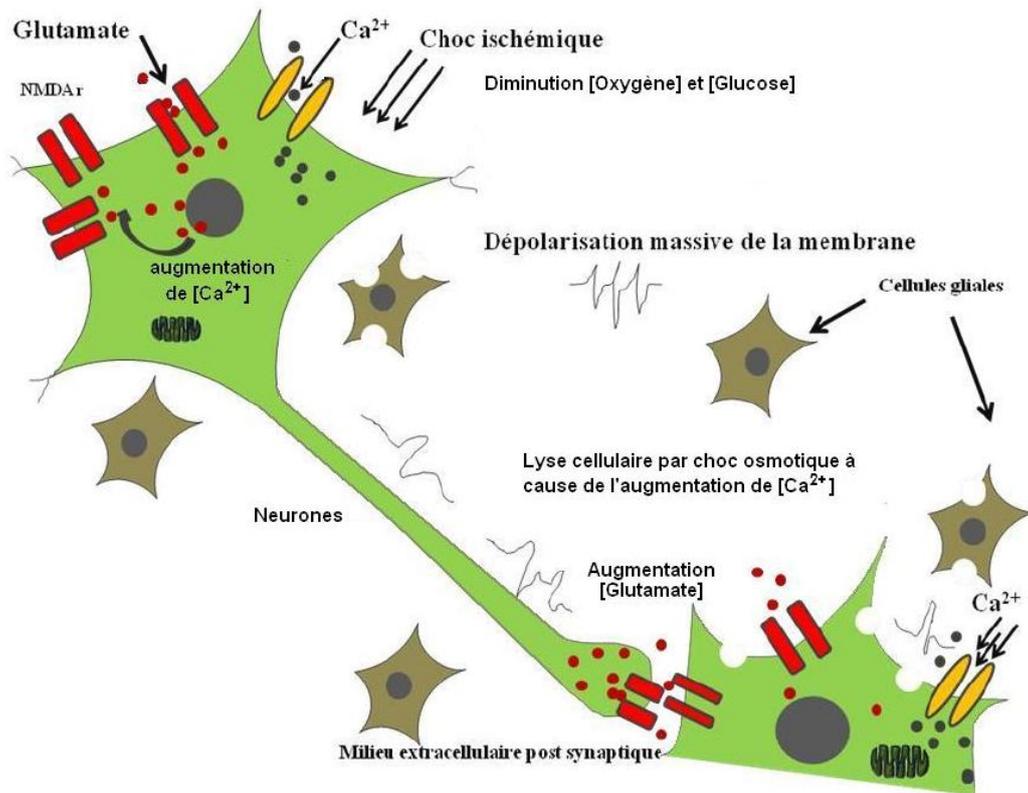


Figure 6 : Processus excitotoxique suite au choc ischémique¹¹

1.2. Mécanismes différés : inflammation et apoptose

1.2.1. Inflammation post-ischémique

Dès les premières heures suivant le choc ischémique, une augmentation des facteurs de transcription pro-inflammatoires (facteur nucléaire kappa B, facteur induit par l'hypoxie-1, facteur de régulation de l'interféron 1), est observée dans la zone de pénombre. Ces derniers stimulent l'expression des médiateurs de la réponse inflammatoire (facteur de nécrose tumorale-alpha, interleukines pro-inflammatoires). Ces derniers vont alors stimuler l'expression de molécules d'adhésion (protéine d'adhésion cellulaire), qui vont alors interagir avec des récepteurs situés à la surface des polynucléaires neutrophiles (globules blancs) afin d'en favoriser la migration au sein du parenchyme cérébral. Cette infiltration leucocytaire va ainsi augmenter l'expression d'enzymes comme la cyclooxygénase-2 (COX-2) ou l'oxyde nitrique synthétase (NOS) qui vont conduire à la production d'espèces toxiques (radicaux libres) contribuant à l'augmentation des lésions ischémiques (**Figure 7**).

¹¹ Asma LAMINE, Document présenté dans le cadre du cours BIO9000 du programme de Doctorat en Biologie de l'INRS Institut Armand Frappier.

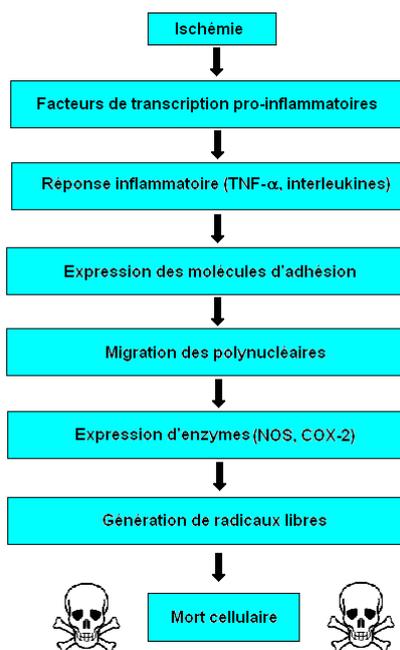


Figure 7 : Mécanismes lors de l'inflammation ischémique

Cependant, cette réaction inflammatoire apparaît nécessaire dans une certaine mesure afin d'assurer le nettoyage de la zone affectée, de même que son remodelage, sa reconstruction tissulaire ou encore sa néovascularisation.

1.2.2. Apoptose post-ischémique

La mort cellulaire programmée ou apoptose apparaît, tout comme l'inflammation, plus tardivement au cours d'un choc ischémique et se retrouve essentiellement dans la zone de pénombre. La mort neuronale apoptotique provient de l'activation simultanée de deux voies principales : extrinsèque et intrinsèque. La voie extrinsèque est activée par un ligand des récepteur de mort (ligand de FAS, une protéine transmembranaire appartenant à la famille du récepteur du facteur de nécrose tumorale). La voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) est dirigée par la famille de protéine homologue à Bcl-2 (B-Cell lymphoma ou lymphome à cellule B). Ces deux voies vont activer des caspases qui vont réagir en cascade. Ces dernières sont une famille de protéases jouant un rôle primordial dans l'apoptose, ainsi nommées en raison de la cystéine contenue dans leur site actif, et en raison de leur spécificité de clivage, qui survient après un résidu aspartate (cystéine, aspartate, protéase). Elles sont synthétisées sous forme de pro-enzyme, puis clivées protéolytiquement pour être activées. Ainsi, l'activation de nombreuses caspases peut engendrer des altérations de l'ADN cellulaire, une désorganisation du cytosquelette et un délabrement de la membrane cytoplasmique. La voie extrinsèque conduit également à l'apoptose indépendamment des caspases par libération du

facteur induisant l'apoptose (AIF) et de l'endonucléase G qui vont contribuer à dégrader l'ADN.

Les deux voies contribuent directement ou indirectement à la mort neuronale par apoptose qui est en partie responsable du développement de la zone de pénombre (**Figure 8**).

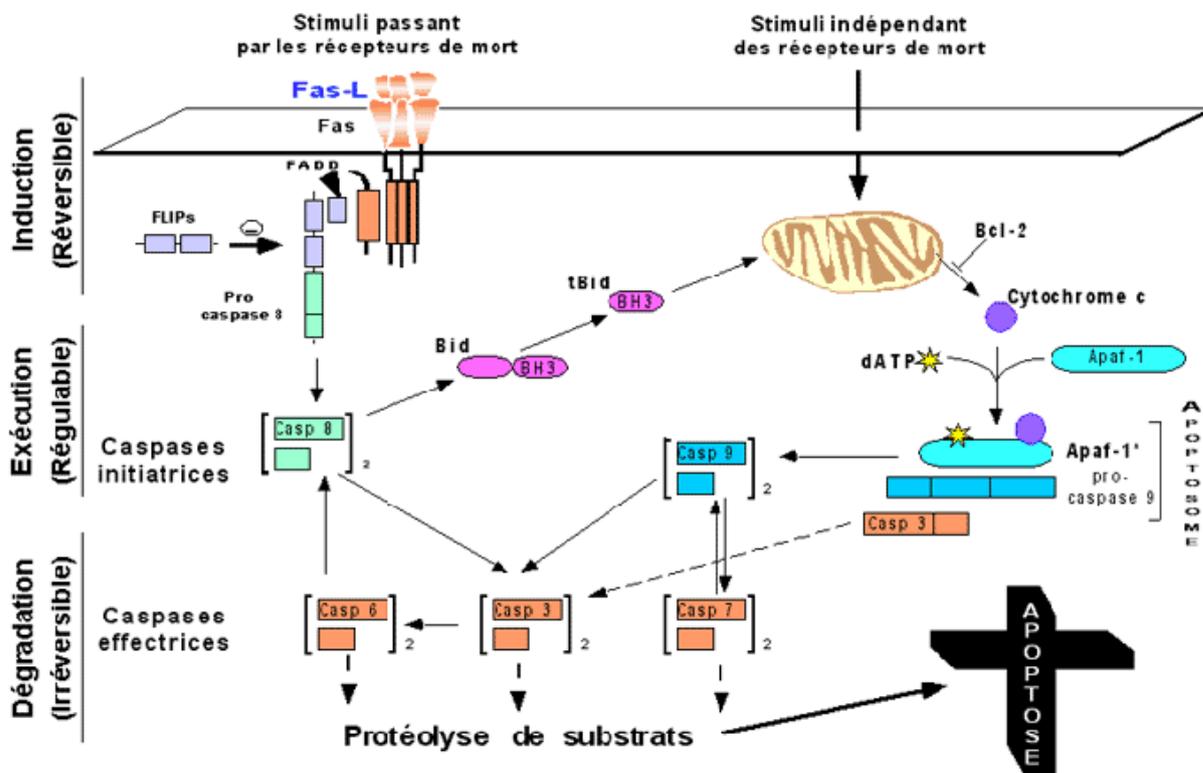


Figure 8 : Cascade de Caspase¹²

1.3. Arsenal thérapeutique

La zone de pénombre ischémique représente une zone de traitement potentiel pour éviter l'extension de la lésion ischémique et ses conséquences sur la santé du patient. Cependant, même si les mécanismes impliqués dans la cascade ischémique sont mieux compris, il n'existe aucun traitement satisfaisant pour bloquer la progression de la mort cellulaire au niveau de la zone de pénombre. Aujourd'hui, le seul traitement approuvé pour la prise en charge de l'ischémie cérébrale aux États-Unis et en Europe est l'administration d'activateur recombinants du plasminogène tissulaire (r-tPA) comme l'Altéplase® qui est utilisé comme agent thrombolytique capable de restaurer rapidement le débit sanguin cérébral dans la zone lésée. Les inconvénients de ce type de traitement sont qu'il doit être appliqué très rapidement après l'apparition des symptômes de l'AVC (quelques heures) et qu'il peut engendrer une hémorragie cérébrale. Les importantes limitations du traitement thrombolytique ont conduit

¹² Los, M.; Wesselborg, S.; Schulze-Osthoff, K. *Immunity* **1999**, *10*, 629-639.

les scientifiques à se pencher vers une approche neuroprotectrice qui consiste à inhiber ou ralentir les événements cellulaires qui conduisent à des lésions irréversibles.

2. Le tripeptide GPE : Outil thérapeutique

2.1. Le GPE : Endogène

Le facteur de croissance IGF-1 est naturellement produit dans le système nerveux central (SNC) après un épisode ischémique.¹³ Il possède des qualités neuroprotectrices en inhibant les différents mécanismes apoptotiques. La découverte du clivage protéolytique d'IGF-1 qui conduit à la formation de des(1-3)IGF-1 et du tripeptide *N*-terminal GPE, a conduit à l'étude des effets neuroprotecteurs potentiels de ce peptide (**Figure 9**).¹⁴

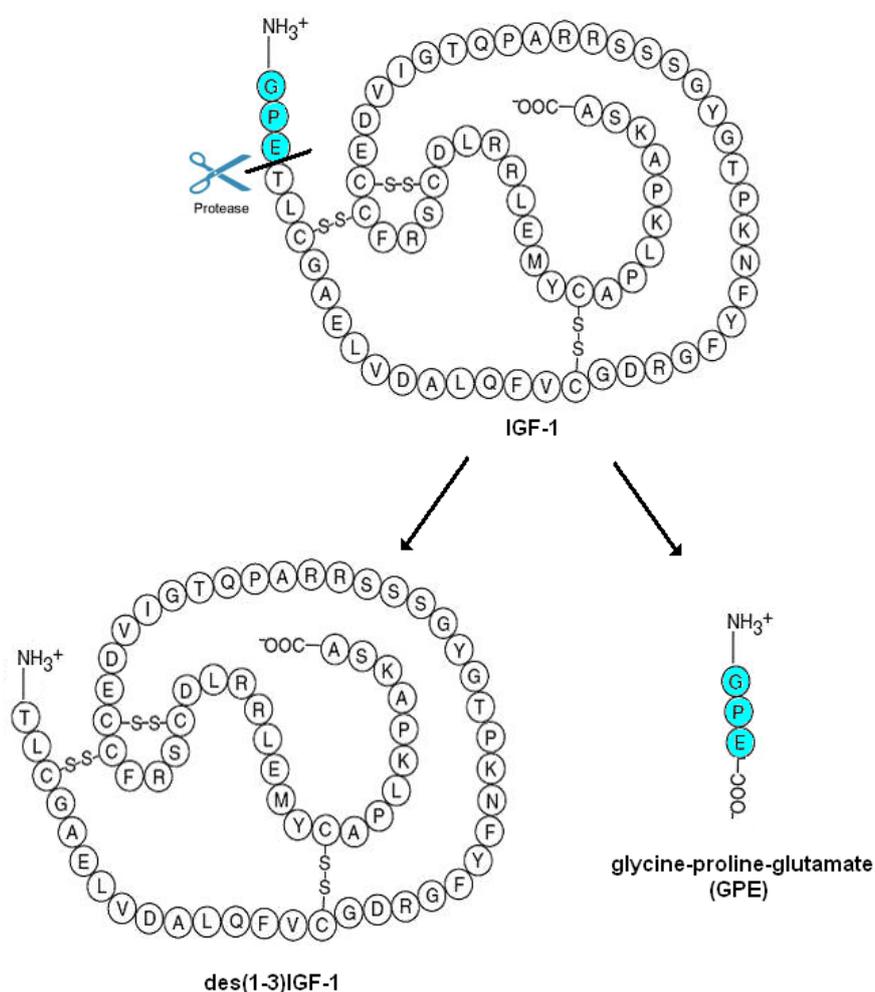


Figure 9 : Clivage d'IGF-1 en des(1-3)IGF-1 et GPE

¹³ Beilharz, E. J.; Klemp, N. D.; Kelmp, M.; Sirimanne, E.; Dragunow, M.; Gluckman, P. D. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1993**, *18*, 209-215.

¹⁴ Yamamoto, H.; Murphy, L. J. *Endocrinology* **1994**, *135*, 2432-2439.

Différentes études ont montré l'effet neuroprotecteur induit par l'injection de GPE.^{15,16} Cependant le GPE est la cible des protéases et possède un temps de demi-vie très court dans le plasma (de 2 à 4 minutes selon le mode d'injection). Le potentiel neuroprotecteur intéressant et la grande simplicité structurale du GPE en font un candidat prometteur pour le traitement des maladies du SNC et des désordres neurodégénératifs. Ainsi des études ont été réalisées pour synthétiser des analogues du GPE qui conserveraient ou exalteraient l'activité neuroprotectrice tout en améliorant la stabilité métabolique pour permettre une meilleure biodisponibilité.

2.2. Le GPE et ses analogues : Etude structure-activité

Deux groupes internationaux, celui de M. A. Brimble et celui de T. Garcia-Lopez, se sont intéressés à la synthèse et l'évaluation pharmacologique des analogues du GPE. Leurs études portent sur la modification de chaque aminoacide, la glycine, la proline et l'acide glutamique (**Figure 10**).

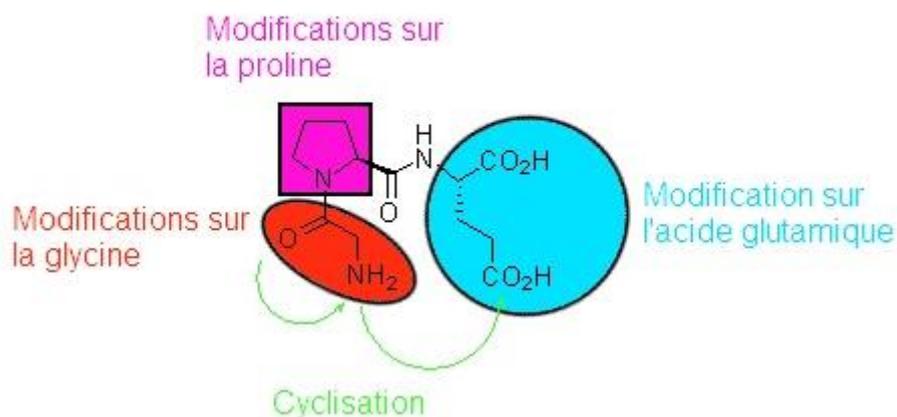


Figure 10 : Modifications structurales effectuées sur le GPE

Différents aminoacides aromatiques (phénylalanine), acides (acide aspartique), basiques (lysine) et aliphatiques (L-alanine, D-alanine, acide α -aminoisobutyrique, norleucine, isoleucine et deux aminoacides α,α -cycloalkyle) ont été proposés pour remplacer la glycine. Les composés comprenant la L-alanine, la D-alanine et la phénylalanine conservent une activité tandis que l'incorporation de résidus acides, basiques ou aliphatiques plus encombrés sur cette position conduit à une baisse de l'activité neuroprotectrice. Sauf dans le cas de la

¹⁵ Guan, J.; Krishnamurthi, R.; Waldvogel, H. J.; Faull, R. L. M.; Clark, R.; Gluckman, P. *Brain Res.* **2000**, 859, 286-292.

¹⁶ Sizonenko, S. V.; Sirimanne, E. S.; Williams, C. E.; Gluckman, P. D. *Brain Res.* **2001**, 922, 42-50.

N,N-diméthylglycine, la modification de la glycine conduit à des analogues ayant une activité équivalente ou réduite (**Figure 11**).^{17,18}

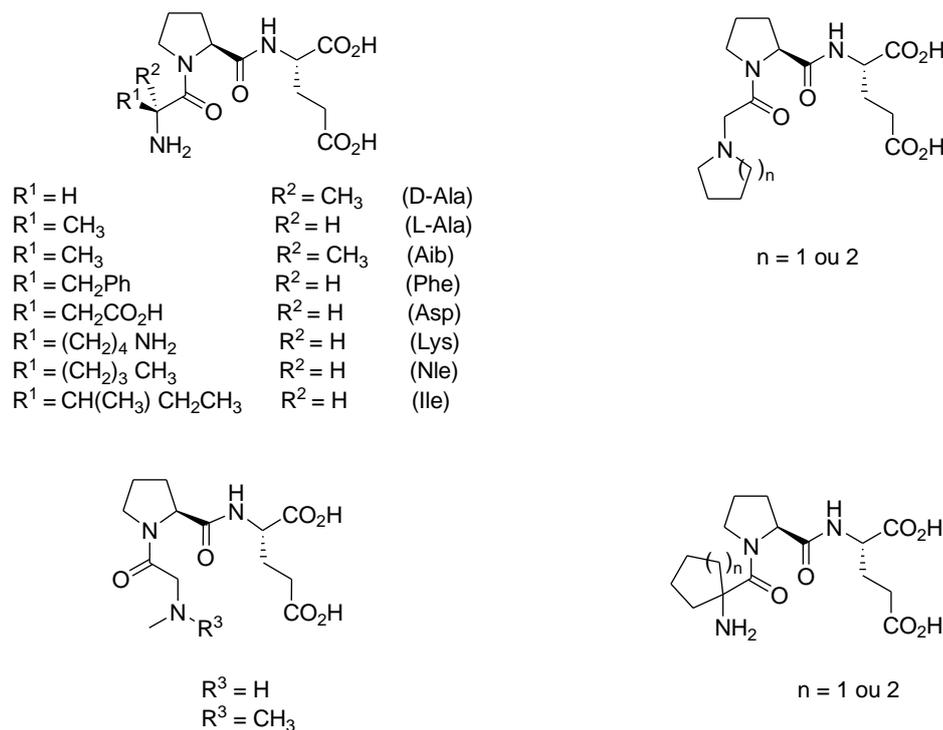


Figure 11 : Analogues du GPE modifiés sur la glycine

La plupart des modifications de l'acide glutamique conduisent à des composés inactifs, bien que le remplacement du résidu acide glutamique par une glycine ou le carboxylate C-terminal par un *N,N*-diméthylcarboxamide conduit à des composés ayant une activité proche du GPE (**Figure 12**).^{19,20,21}

¹⁷ Lai, M. Y. H.; Brimble, M. A.; Callis, D. J.; Harris, P. W. R.; Levi, M. S.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 533-548.

¹⁸ Alonso De Diego, S. A.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Perez de Vega, M. J.; Casabona, D.; Cativiela, C.; Gonzalez-Muniz, R.; Herranz, R.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Rio, J.; Jimeno, M. L; Garcia-Lopez, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1392-1396.

¹⁹ Trotter, N. S.; Brimble, M. A.; Callis, D. J.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 501-517.

²⁰ Brimble, M. A.; Trotter, N. S.; Harris, P. W. R.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 519-532.

²¹ Alonso De Diego, S. A.; Munoz, P.; Gonzalez-Muniz, R.; Herranz, R.; Martin-Martinez M.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Rio, J.; Jimeno, M. L; Garcia-Lopez, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2279-2283.

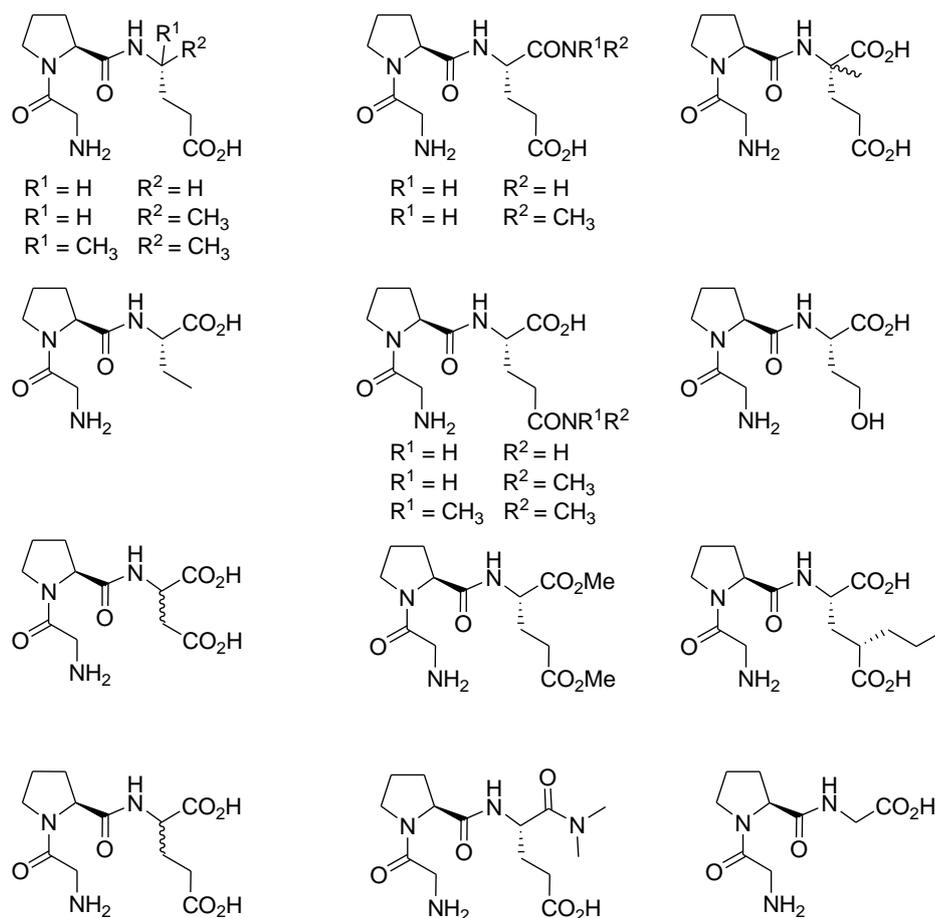


Figure 12 : Analogues du GPE modifiés sur l'acide glutamique

Etant données les propriétés conformationnelles induites par la proline sur la structure des protéines,²² le résidu proline est considéré comme jouant un rôle important dans l'activité biologique du GPE, comme c'est le cas pour les peptides biologiquement actifs contenant des résidus Xaa-Pro.²³ L'incorporation d'une unité proline augmente l'isomérisation *cis-trans* de la liaison peptidyl-prolyle (Schéma 1).

²² Schimd, F. X.; Mayr, L. M.; Mücke, M.; Schönbrunner, E. R. *Adv. Prot. Chem.* **1993**, *44*, 25.

²³ Yaron, A.; Naider, F. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *28*, 31.

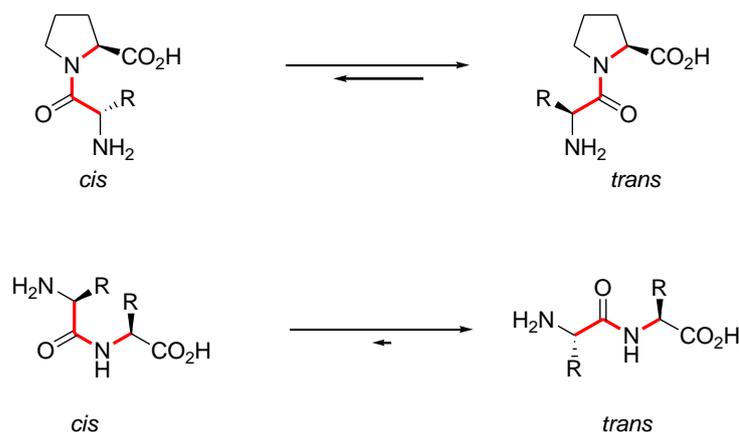


Schéma 1 : Equilibre cis/trans de la liaison amide d'un peptide AA-Pro par rapport à un peptide ne contenant pas de proline

En effet, la plupart des liaisons peptidiques adoptent de façon majoritaire la conformation *trans* (99.9% dans des conditions non contraintes). Ceci est lié à la gêne stérique plus importante entre la chaîne latérale des deux acides aminés dans la conformation *cis*, qu'entre la chaîne latérale du premier acide aminé avec le proton amide dans la conformation *trans*. Dans le cas de la proline, la différence de gêne stérique entre la conformation *cis* et la *trans* est fortement réduite, ce qui conduit à une proportion de *cis* de 10 à 40% selon l'acide aminé qui précède la proline.

La conformation de cette liaison peut affecter de manière très importante les propriétés biologiques d'un peptide, en effet il semblerait que certaines protéases ne reconnaissent que la liaison *trans*. L'existence d'isomérases spécifiques peptidyl-prolyl isomérase (PPIases), qui jouent un rôle crucial dans les maladies neurodégénératives et dans la réplication du HIV-1 semblent confirmer cette hypothèse. C'est pourquoi les groupes de M. A. Brimble et de T. Garcia-Lopez ont synthétisé divers analogues avec des modifications sur la partie proline pour étudier d'une part leur affinité avec les récepteurs glutamate (GluRs), d'autre part la prévention de la mort neuronale induite par l'excitotoxicité du NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate) et la privation d'oxygène et de glucose.^{24,25}

L'importance de l'orientation des chaînes latérales a été étudiée par le remplacement séquentiel de la L-proline et de l'acide L-glutamique par leurs formes énantiomères D-proline et acide D-glutamique. Afin d'évaluer l'importance de l'isomérie *cis/trans*, la proline a été

²⁴ Harris, P. W. R.; Brimble, M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2696-2709.

²⁵ Alonso De Diego, S. A.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Perez de Vega, M. J.; Gonzalez-Muniz, R.; Herranz, R.; Martin-Martinez M.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Rio, J.; Jimeno, M. L.; Garcia-Lopez, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3396-3400.

remplacée par des alkylprolines (5,5-diméthylproline,^{21,25} diverses 2-alkylprolines^{24,25,26}), des prolines substituées (4-hydroxyproline, 4-aminoproline),¹⁸ des dérivés d'acide carboxylique 1-amino-cycloalkane,¹⁸ des homologues de la proline (acide 2-carboxyazétidine, acide pipécolique) ou des pseudoproline dérivées de la cystéine (**Figure 13**).^{21,25,26}

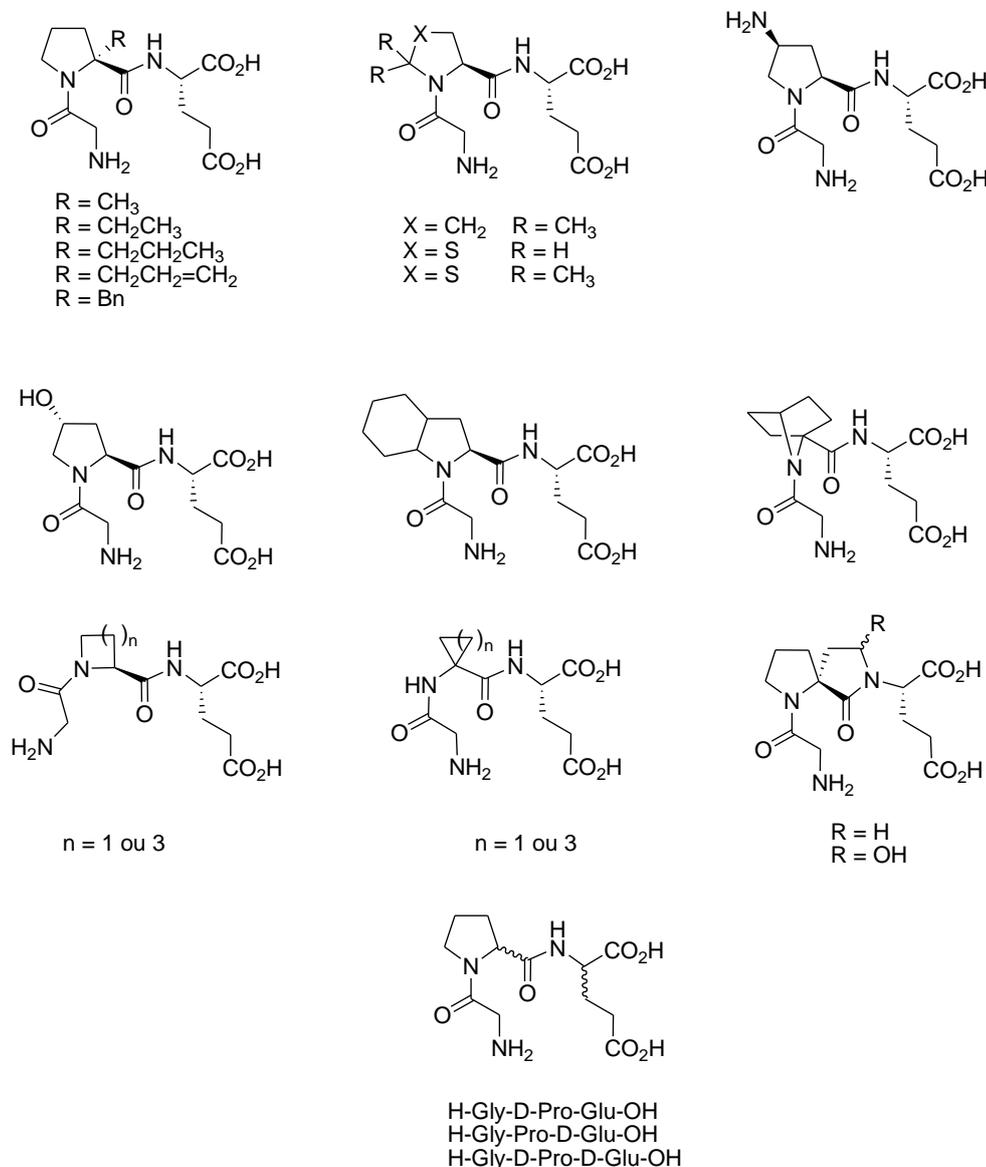


Figure 13 : Analogues du GPE modifiés sur la proline

L'évaluation biologique de ces tripeptides a montré que la majorité des analogues du GPE ont une affinité pour les récepteurs glutamates équivalente ou accrue par rapport à celle du GPE (**Figure 14**).

²⁶ Harris, P. W. R.; Brimble, M. A.; Muir, V. J.; Lai, M. Y. H.; Trotter, N. S.; Callis, D. J. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10018-10035.

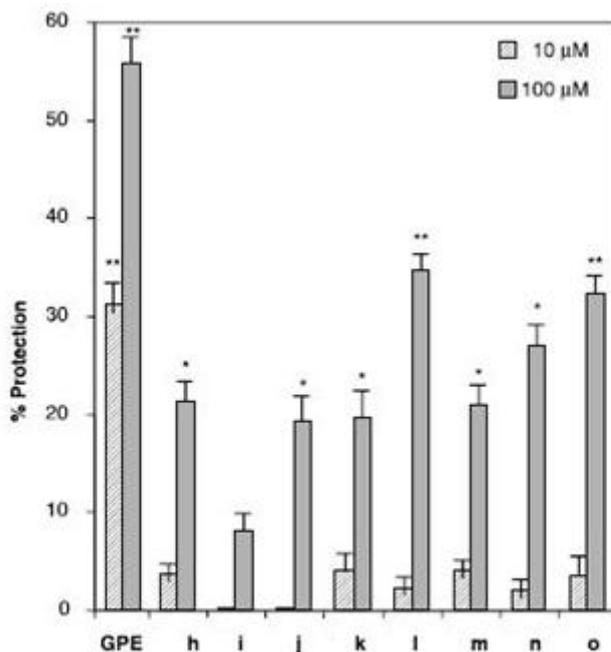
Composé Final	Xaa	K_i (μm) ^a
GPE	(Pro)	31.24 ± 15.62
h	(Amp)	15.54 ± 4.78
i	(Hyp)	9.24 ± 1.74
j	(Oic)	22.37 ± 5.30
k	(b ₇ Pro)	0.48 ± 0.09
l	(Aze)	> 100
m	(Pip)	2.39 ± 0.17
n	(Acp)	> 100
o	(Ach)	> 100

^a Déplacement du L-[³H]glutamate dans des membranes synaptiques provenant de cerveau de rat

Figure 14 : Affinité d'analogues du GPE sur les récepteurs glutamates¹⁸

Des tests de survie neuronale contre l'excitotoxicité ont été effectués sur ces composés, mais tous possèdent une activité neuroprotectrice inférieure à celle du GPE, même ceux possédant une meilleure affinité pour les récepteurs NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate). Ainsi, on

peut voir que l'affinité pour les récepteurs glutamates et la protection neuronale ne sont pas directement liées (**Figure 15**).



Percentage of protection of rat hippocampal neurons from NMDA (100 μM) excitotoxicity. Cell survival was estimated by measuring the activity of mitochondrial dehydrogenase on the tetrazolium derivative MTT. Values are means of 8–13 experiments. Asterisks indicate difference from control (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Student's t -test).

Figure 15 : Test de neuroprotection du GPE et d'analogues contre l'excitotoxicité¹⁸

Les dérivés 2-méthylproline et 5,5-diméthylproline, qui induisent majoritairement une conformation de la liaison glycine-proline *trans* et *cis* respectivement, ont une meilleure affinité que le GPE, celle-ci est comparable à celle de D-AP5, l'un des antagonistes les plus efficace et sélectif du récepteur NMDA (**Figure 16**) (**Figure 17**).

Composé	K_i (μm)
L-Glutamate	0.87 ± 0.21
D-AP5	3.83 ± 1.76
GPE (H-Gly-Pro-Glu-OH)	31.24 ± 15.65
H-Gly-P ^{Me} -Glu-OH	7.96 ± 1.83
H-Gly-dmP-Glu-OH	3.79 ± 0.53

Figure 16 : Affinité du GPE et de ses analogues sur les récepteurs glutamates²¹

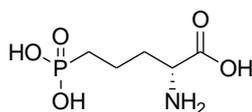


Figure 17 : D-AP5 (Acide (2R)-amino-5-phosphonopentanoïque)

Ces résultats suggèrent que la conformation de la liaison amide glycine-proline n'est pas cruciale pour l'interaction avec le récepteur NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate). Cependant la perte à la fois de l'affinité avec les récepteurs glutamates et de l'activité neuroprotectrice observées avec les systèmes cycliques de type spirolactame semble confirmer l'importance de la conformation de la liaison amide proline-acide glutamique. Le manque d'affinité observé avec les analogues stéréoisomériques du GPE (avec des résidus D-proline et/ou acide D-glutamique) montre que les prérequis spaciaux pour l'interaction GPE-récepteurs NMDA sont stricts.

Des tests biologiques de survie sur des neurones hippocampaux de rats ont été réalisés pour comparer l'activité neuroprotectrice de certains analogues avec celle du GPE. Le pourcentage de survie cellulaire induit par les dérivés 2-méthylproline (ou NNZ-2566) et 5,5-diméthylproline (dmP), a ainsi été comparé avec celui du GPE. Le taux de survie cellulaire pour les rats traités avec ces deux analogues est comparable avec les résultats obtenus pour le GPE pour ce qui est de l'excitotoxicité et meilleur pour la privation d'oxygène-glucose (**Figure 18**).²¹

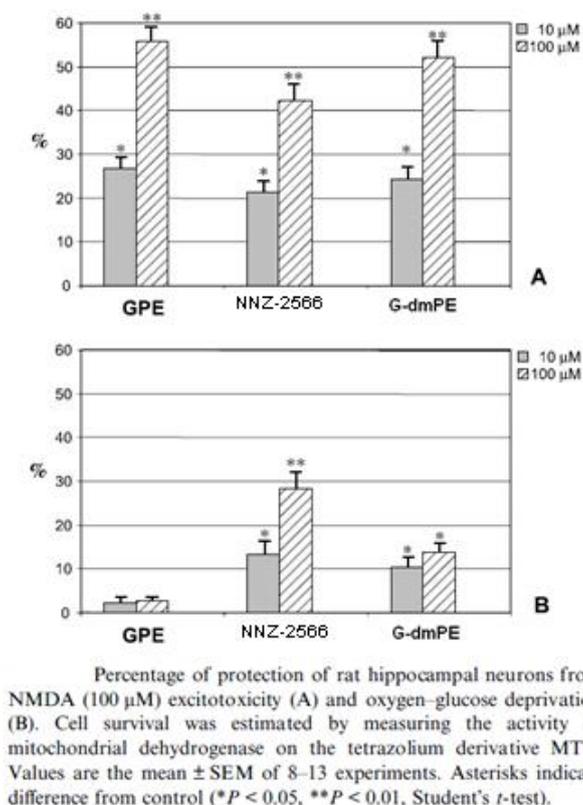


Figure 18 : Test de neuroprotection du GPE et d'analogues contre l'excitotoxicité et la privation d'oxygène-glucose²¹

3. Utilisation des peptides en thérapeutique : Intérêts et limitations

Le médicament idéal est un mythe : il s'agirait d'une molécule de faible poids moléculaire, soluble, capable de mimer chimiquement et structurellement de manière quasi parfaite un ligand naturel sans en avoir les effets, d'être éliminée rapidement de l'organisme après son action mais sans induire d'effets secondaires. En outre, sa production devrait être facile et peu coûteuse. Finalement, son administration au patient devrait être aussi aisée que possible.²⁷ La chimie du médicament est basée depuis toujours sur l'exploitation et la transformation de substances médicinales naturelles, notamment de produits issus des plantes, copiant en cela l'utilisation qu'en faisaient nos ancêtres. Cependant même si le nombre de nouvelles molécules à visée thérapeutique approuvées chaque année (new drug approvals, NDAs) reste à peu près stable, le coût de la R&D est en très forte augmentation (**Figure 19**).

²⁷ Edwards, C. M. B.; Cohen, M. A.; Bloom, S. R. *Q. J. Med.* **1999**, *92*, 1-4.

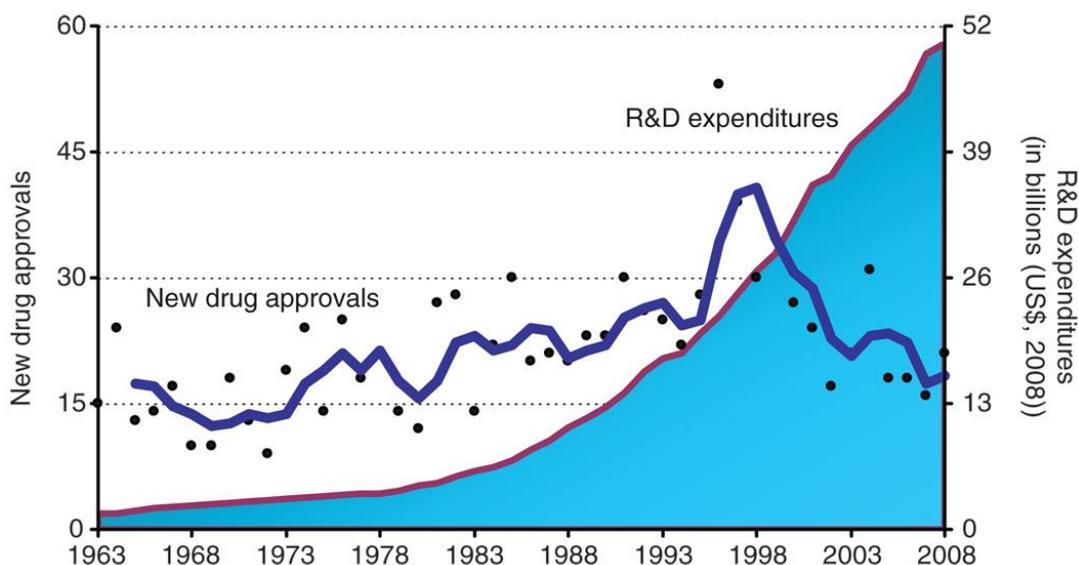


Figure 19 : Nombre de nouveaux médicaments potentiels versus les investissements R&D aux Etats-Unis entre 1970 et 2008²⁸

Un moyen de plus en plus fréquemment envisagé par les laboratoires pharmaceutiques pour proposer des alternatives thérapeutiques originales est de concevoir des médicaments de type peptidique ou peptidomimétique.²⁹ Aujourd’hui de nombreux médicaments parmi les 200 meilleures ventes sont des peptides, on peut par exemple citer entre autre Copaxone[®], Lupron[®] et Zoladex[®] (**Figure 20**).

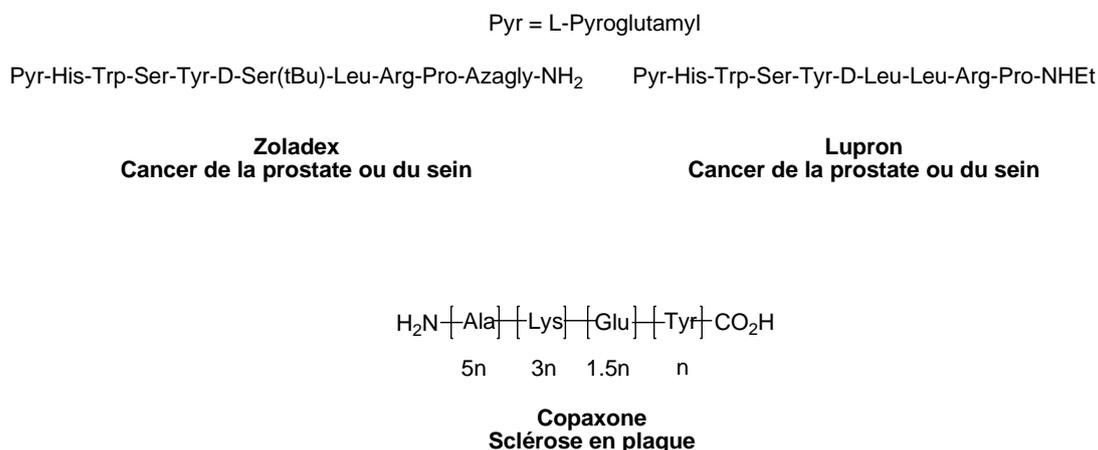


Figure 20 : Structure des médicaments Copaxone[®], Lupron[®] et Zoladex[®]

Il y a de plus, tous les dérivés d’insuline et de l’érythropoïétine (EPO) qui représentent plusieurs milliards de dollars de vente.

²⁸ Kaitin, K. I. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, 87, 3, 356-361.

²⁹ Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatskiy, M. *Drug Discov. Today* **2010**, 15, 40-56.

3.1. Avantages des peptides

Les peptides offrent plusieurs avantages par rapport aux petites molécules qui constituent les médicaments traditionnels. Le premier est que, représentant souvent la plus petite partie fonctionnelle d'une protéine, ils offrent une efficacité, une sélectivité et une spécificité que les concepteurs de petites molécules ont du mal à atteindre.³⁰ Un deuxième avantage, et non des moindres, est que les produits de dégradation des peptides sont des acides aminés, ce qui élimine grandement les risques de toxicité ainsi que les interactions médicamenteuses.³¹ Troisièmement, les peptides s'accumulent peu dans les tissus en raison de leur temps de demi-vie court, ce qui, il est vrai, constitue aussi un désavantage quand il est question de durée d'action.

3.2. Limitations des peptides

Les peptides ont de nombreux avantages mais leur utilisation thérapeutique est complexe à cause de nombreux problèmes comme le coût de production à l'échelle industrielle qui est plus important que pour des petites molécules. L'une des limitations majeures est la faible biodisponibilité par voie orale des peptides à cause de l'environnement gastrique très acide, de l'importante activité protéolytique intestinale et la haute perméabilité de la barrière intestinale. Il y a donc souvent la nécessité d'effectuer une injection intraveineuse, ce mode d'administration est très contraignant pour le patient et affecte de manière importante la qualité de vie de ces derniers dans le cas de maladies chroniques. De plus, les enzymes protéolytiques dégradent rapidement les peptides ce qui conduit à une demi-vie dans l'organisme très court et souvent insuffisant pour atteindre la cible de manière efficace.

Différentes techniques ont été mises en œuvre pour surmonter ces désavantages, comme l'administration par les muqueuses nasales³² ou pulmonaires.³³ D'autres stratégies ont été développées comme la modification des peptides pour leur conférer une meilleure résistance aux protéases, en utilisant par exemple des acides aminés D, β ou non naturels.

Malgré les technologies employées pour réduire ces désavantages, les peptides gardent une image négative en tant que médicament car ils doivent généralement être injectés. Ce qui n'empêche pas certains peptides, comme l'érythropoïétine (EPO) ou l'insuline, de rester des blockbusters même s'ils ne peuvent pas être utilisés oralement.

³⁰ Hummel, G.; Reineke, U.; Reimer, U. *Mol. Biosyst.* **2006**, *2*, 499-508.

³¹ Loffet, A. *J. Peptide Sci.* **2002**, *8*, 1-7.

³² Maggio, E. T. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2006**, *3*, 529-539.

³³ Quattrin, T.; Bélanger, A.; Bohannon, N. J. V. Schwartz, S. L. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 2622-2627.

4. Des acides aminés trifluorométhylés aux peptides

4.1. Le Fluor : Généralités

Le fluor est le treizième élément le plus abondant dans l'écorce terrestre (0.028%). Il existe trois sources de fluor dans la nature, la fluorite (CaF_2), la fluorapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) et la cryolite (Na_3AlF_6). Pourtant, en dépit de l'abondance du fluor par rapport aux autres halogènes, très peu de composés organofluorés sont présent dans la nature (**Schéma 2**).³⁴

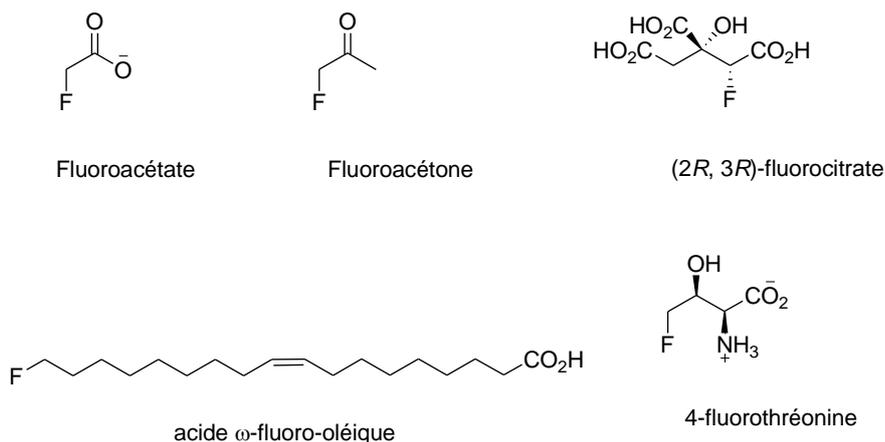


Schéma 2 : Composés organofluorés naturels

Le difluor est extrêmement réactif et forme des composés avec la plupart des autres éléments, y compris certains gaz rares comme le xénon ou le radon. Son pouvoir oxydant est puissant et la plupart des substances (métaux, verre) s'enflamment au contact de difluor. Jusqu'à une étude très récente qui a montré son existence en très faible quantité dans un minéral appelé antozonite, la communauté scientifique pensait que ce gaz n'était pas présent à l'état naturel.³⁵

Le fluor a été isolé en 1886 par Henri Moissan par électrolyse, ce qui lui valut le prix Nobel de chimie en 1906.³⁶ Aujourd'hui le fluor est toujours synthétisé par la méthode élaborée par Moissan.^{37,38} La première utilisation du fluor en industrie est liée au projet Manhattan, pour réaliser la synthèse de l'hexafluorure d'uranium (UF_6) nécessaire pour l'enrichissement de l'uranium. Depuis le fluor est utilisé dans un grand nombre d'applications

³⁴ O'Hagan, D.; Harper D. B. *J. Fluorine Chem.* **1999**, *100*, 127-133.

³⁵ Schmedt, J.; Mangsti, M.; Kraus, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1-4.

³⁶ Tressaud, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6792-6796.

³⁷ Moissan, H. C. *R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1886**, *102*, 1543-1544.

³⁸ Jaccaud, M.; Nicolas, F. *Techniques de l'Ingénieur* **1990**, J6020-J1453.

comme la chimie organique,³⁹ les sciences des matériaux,⁴⁰ les polymères⁴¹ et les médicaments.^{42,43}

L'atome de fluor a des propriétés physico-chimiques particulières. C'est l'élément le plus électronégatif, l'un des plus petits et l'un des moins polarisables. C'est sa structure électronique $1s^2 2s^2 2p^5$ qui lui confère ces propriétés spécifiques (**Tableau 1**).

	H	F	Cl
Configuration électronique	$1s^2$	$1s^2 2s^2 2p^5$	$\dots 3s^2 3p^5$
Electronégativité (Pauling)	2.20	3.98	3.16
Rayon de van der Waals (Å)	1.20	1.47	1.75
Polarisabilité (Å ³)	0.667	0.557	2.18
Energie de liaison de C-X dans CX ₄ (kJmol ⁻¹)	446.4	546.0	305.0

Tableau 1 : Comparaison entre H, F et Cl

L'importante électronégativité du fluor rend la liaison C-F hautement polarisée, les électrons sont fortement attirés vers l'atome de fluor (**Figure 21**).⁴⁴



Figure 21 : Polarisation de la liaison C-F

La présence d'un atome de fluor a d'importants effets sur la stabilité des espèces chargées. Les carbocations en α du fluor sont stabilisés par délocalisation du doublet non liant du fluor dans l'orbitale p vacante du carbocation. Les carbocations en β sont eux déstabilisés à cause de l'effet inductif attracteur du fluor (**Figure 22**).

³⁹ Uneyama, K. *Organofluorine Chemistry*, Blackwell, Malden, USA, **2006**.

⁴⁰ Nakajima, T.; Zemva, B.; Tressaud, A. *Advanced Inorganic Fluorides : Synthesis, Characterization and Applications*, Elsevier, Dordrecht, **2000**.

⁴¹ Ameduri, B.; Boutevin, B. *Well-Architected Fluoropolymers*, Elsevier, Dordrecht, **2004**.

⁴² Bégué, J. P.; Bonnet-Delpon, D. *Chimie Bioorganique et Médicinale du Fluor*, EDP-Sciences, Paris, **2005**.

⁴³ Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 320-330.

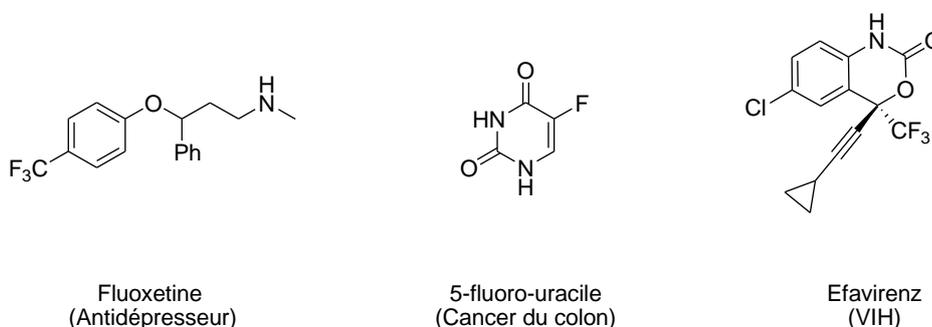
⁴⁴ O'Hagan, D. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 308-319.



Stabilisation en α Déstabilisation en β

Figure 22 : Effet du fluor sur un carbocation

D'un point de vue stérique, l'atome de fluor a une taille comprise entre un atome d'oxygène et un atome d'hydrogène. Le remplacement d'un atome d'hydrogène par un atome de fluor dans une molécule lui confère des propriétés physiques et biologiques différentes (température d'ébullition, miscibilité, lipophilie, solubilité).⁴⁵ Ces changements de propriétés sont utilisés par l'industrie pharmaceutique, en effet aujourd'hui de nombreux médicaments commercialisés possèdent des atomes de fluor (**Figure 23**).



Fluoxetine
(Antidépresseur)

5-fluoro-uracile
(Cancer du colon)

Efavirenz
(VIH)

Figure 23 : Exemples de composés organofluorés utilisés comme médicaments

La tomographie par émission de positron (TEP) est un autre domaine d'application importante du fluor en médecine. C'est une méthode d'imagerie médicale utilisée pour mesurer l'activité métabolique des cellules basée sur l'utilisation des isotopes radioactifs qui émettent des positrons. Ces isotopes sont produits dans un cyclotron, puis intégrés immédiatement à la molécule qui sert de traceur avant usage. La plupart des atomes radiomarqués utilisés ont un temps de demi-vie très court ^{11}C ($t_{1/2} = 20$ min), ^{13}N ($t_{1/2} = 10$ min), ^{15}O ($t_{1/2} = 2$ min). Le ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ min) possède une demi-vie plus longue ce qui présente un avantage important. Le principal traceur utilisé pour cette technique d'imagerie est le fluorodesoxyglucose marqué au fluor 18 (^{18}F -FDG) (**Figure 24**).

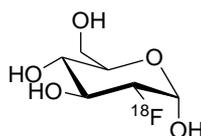


Figure 24 : Fluorodesoxyglucose (^{18}F)

⁴⁵ Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 320-330.

D'autre part, la présence d'atome de fluor au sein d'une molécule perturbe fortement l'acido-basicité des groupements voisins. Ainsi l'acidité des acides carboxyliques est augmentée alors que la basicité des amines se trouve très diminuée. M. Schlosser a étudié ce phénomène en comparant les pKa de l'acide carboxylique et de l'amine de l'alanine, de la β -fluoroalanine, de la β,β -difluoroalanine et de la β,β,β -trifluoroalanine (**Figure 25**).⁴⁶

X ¹	X ²	X ³	$\Delta pK_a^{\text{COOH}}$	$\Delta pK_a^{+\text{NH}_3}$
H	H	H	0.0	0.0
F	H	H	+ 0.1	- 0.1
F	F	H	- 0.8	- 1.5
F	F	F	- 1.1	- 4.5

Figure 25 : Variation des pKa des fonctions acide et amine de l'alanine β fluorée en fonction du nombre d'atomes de fluor⁴⁶

Les effets de l'atome de fluor peuvent aussi avoir des conséquences sur la conformation des molécules. Ainsi, le remplacement d'un groupement CH_2 par un groupement CF_2 dans une chaîne carbonée modifie l'angle dièdre $\text{C-CX}_2\text{-C}$ ($\theta = 109.5^\circ$ pour $\text{X} = \text{H}$ et $\theta = 115\text{-}119^\circ$ pour $\text{X} = \text{F}$). La conformation gauche n'est donc pas moins défavorisée que la conformation « zigzag » dans le cas de la molécule fluorée, contrairement à son analogue non fluoré (**Figure 26**).

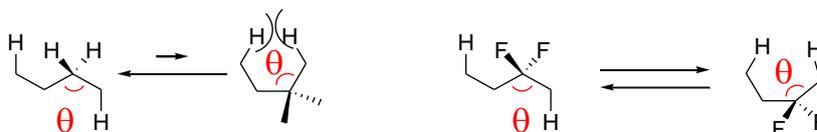


Figure 26 : Effet gauche

Le groupement trifluorométhyle (CF_3) a la même électronégativité qu'un atome de chlore (3.2) et provoque une gêne stérique semblable à celle d'un groupement isopropyle (*i*-Pr), même si ce dernier est plus volumineux.⁴⁷

4.2. Les acides aminés α -trifluorométhylés

Parmi les nombreuses méthodes décrivant la synthèse d'acides aminés α -trifluorométhylés (α -Tfm AAs),^{48,49} certaines concernent la synthèse d'acides aminés cycliques

⁴⁶ Schlosser, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *110*, 1496-1513.

⁴⁷ Furuya, T.; Kamlet, A. S.; Ritter, T. *Nature* **2011**, *473*, 470-477.

avec un groupement CF₃ dans diverses positions. Les CF₃-prolines et leurs analogues de type pyrrolidine ont suscité un intérêt particulier.^{50,51,52,53,54} Les acides aminés trifluorométhylés en position α (α -Tfm AAs) sont un type particulier d'acides aminés α,α -dialkylés qui donnent la possibilité d'induire des structures secondaires comme des hélices et des coudes β .

En dépit du nombre croissant de méthodes pour leur synthèse,^{55,56} très peu de choses sont connues sur l'introduction d'un groupement CF₃ en position α des dérivés de la proline.^{57,58,59,60} Il faut noter que notre laboratoire est le seul à décrire la synthèse de chaque énantiomère de l' α -CF₃-proline^{61,62} et de l'acide α -CF₃-pyroglutamique.⁶³ Il y a donc toujours un besoin pour des synthèses asymétriques permettant la production de CF₃-AAs, notamment les cycliques, sous forme énantiopure et à l'échelle du gramme.

Il existe deux stratégies pour introduire le groupement trifluorométhyle dans une molécule organique : la fluoration directe ou l'utilisation de synthons fluorés. Même si la première solution semble plus directe, la régio- et stéréosélectivité sont souvent difficiles à obtenir. De plus, la réactivité importante des agents de fluoration rend nécessaire la protection des différents groupements fonctionnels de la molécule. En outre, une grande partie des réactifs actuellement utilisés pour l'introduction de groupements fluorés sont chers, toxiques, corrosifs et même parfois explosifs. C'est pourquoi la stratégie utilisant des synthons fluorés représente une alternative intéressante pour le développement d'acides aminés trifluorométhylés. Les synthons utilisés sont généralement des cétones ou des imines trifluorométhylées (**Figure 27**).

⁴⁸ Qiu, X.-L.; Qing, F.-L. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3261-3278.

⁴⁹ Acena, J. L.; Sorochinsky, A. E.; Soloshonok, V. A. *Synthesis*, **2012**, 44, 1974-1976.

⁵⁰ Qiu, X.-L.; Qing, F.-L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2002**, 1, 2052.

⁵¹ Qiu, X.-L.; Meng, W.-D.; Qing, F.-L. *Tetrahedron* **2004**, 60, 6711-6745.

⁵² Qiu, X.-L.; Qing, F.-L. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 7162-7164.

⁵³ Qiu, X.-L.; Qing, F.-L. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 3614-3617.

⁵⁴ Del Valle, J. R.; Goodman, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1600.

⁵⁵ Smiths, R.; Cadicamo, C. D.; Burger, K.; Koksich, B. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1727-1739.

⁵⁶ Brigaud, T.; Chaume, G.; Huguenot, F.; Pytkowicz, J. *Chemistry Today* **2007**, 25, 8-10.

⁵⁷ Burger, K.; Mutze, K.; Osipov, S. N.; Tsouker, P.; Schier, A. *Monatsh. Chem.* **2003**, 134, 69-80.

⁵⁸ Osipov, S. N.; Artyushin, O. I.; Kolomiets, A. F.; Bruneau, C.; Picquet, M.; Dixneuf, P. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3891-3897.

⁵⁹ Eckert, M.; Monnier, F.; Shchetnikov, G. T.; Titanyuk, I. D.; Osipov, S. N.; Toupet, L.; Derien, S.; Dixneuf, P. H. *Org. Lett.* **2005**, 7, 3741-3743.

⁶⁰ Osipov, S. N.; Bruneau, C.; Picquet, M.; Kolomiets, A. F.; Dixneuf, P. H. *Chem. Commun.* **1998**, 2053-2054.

⁶¹ Chaume, G.; Van Severen, M. C.; Marinkovic, S.; Brigaud, T. *Org. Lett.* **2006**, 8, 6123-6126.

⁶² Caupène, C.; Chaume, G.; Ricard, L.; Brigaud, T. *Org. Lett.* **2009**, 11, 209-212.

⁶³ Chaume, G.; Van Severen, M. C.; Ricard, L.; Brigaud, T. *J. Fluorine Chem.* **2008**, 129, 1104-1109.

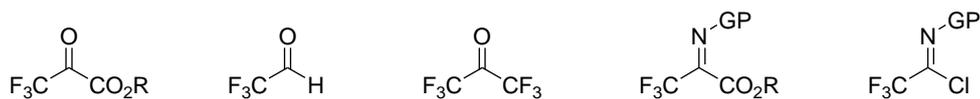


Figure 27 : Synthons trifluorométhylés communément utilisés

Diverses réactions sont ensuite réalisées sur ces synthons pour introduire la fonction acide, amine ou la chaîne latérale. Une des méthodes très utilisée est l'utilisation de la réaction de Strecker pour former un aminonitrile qui sera ensuite hydrolysé pour conduire à l'acide aminé correspondant.⁶⁴ De même, Lu et coll. mettent en œuvre cette stratégie pour synthétiser l' α -Tfm-phénylglycine. Une réaction de Strecker stéréosélective sur une sulfinylimine chirale suivie d'une hydrolyse en milieu acide conduit à l' α -Tfm-phénylglycine énantio pure avec de bons rendements (**Schéma 3**).⁶⁵

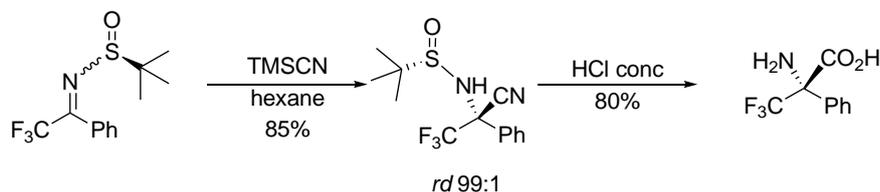


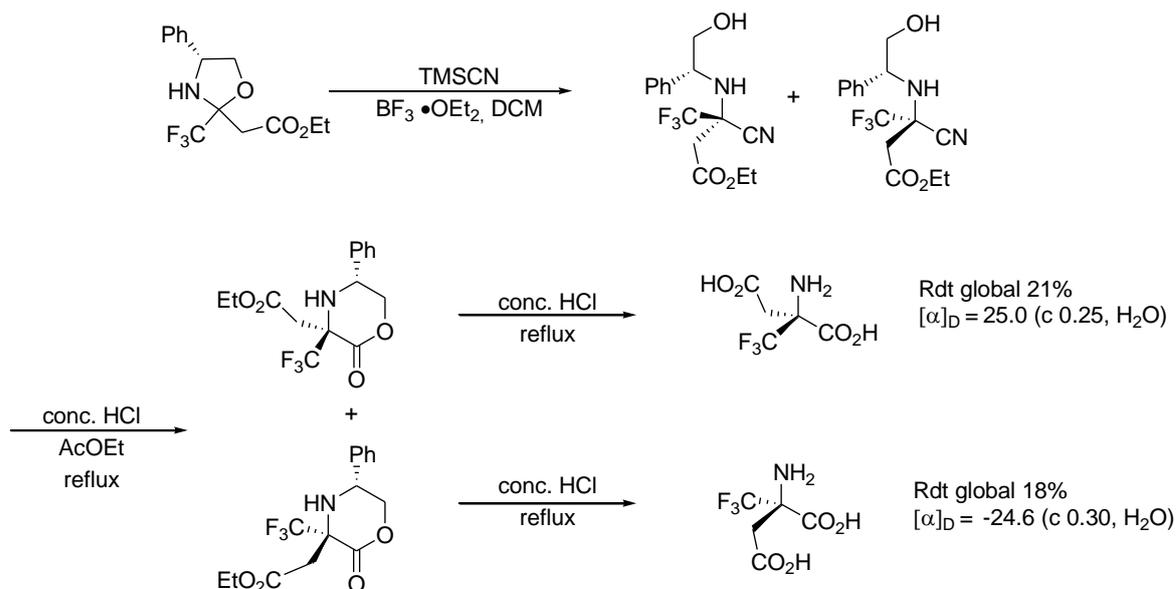
Schéma 3 : Synthèse de l' α -Tfm-phénylglycine

Notre laboratoire a également utilisé cette stratégie pour réaliser la synthèse des deux énantiomères de l' α -Tfm-sérine ainsi que de l'acide α -Tfm-aspartique.⁶⁶ Pour la synthèse de l'acide α -Tfm-aspartique une réaction de Strecker est réalisée sur l'oxazolidine dérivée du trifluoroacétoacétate d'éthyle et du (*R*)-phénylglycinol. Les aminonitriles sont ensuite hydrolysés par de l'acide chlorhydrique concentré dans l'acétate d'éthyle pour former les morpholinones qui sont alors séparées par chromatographie sur gel de silice puis hydrolysées par de l'acide chlorhydrique concentré pour conduire à chaque énantiomère de l'acide α -Tfm-aspartique (**Schéma 4**).

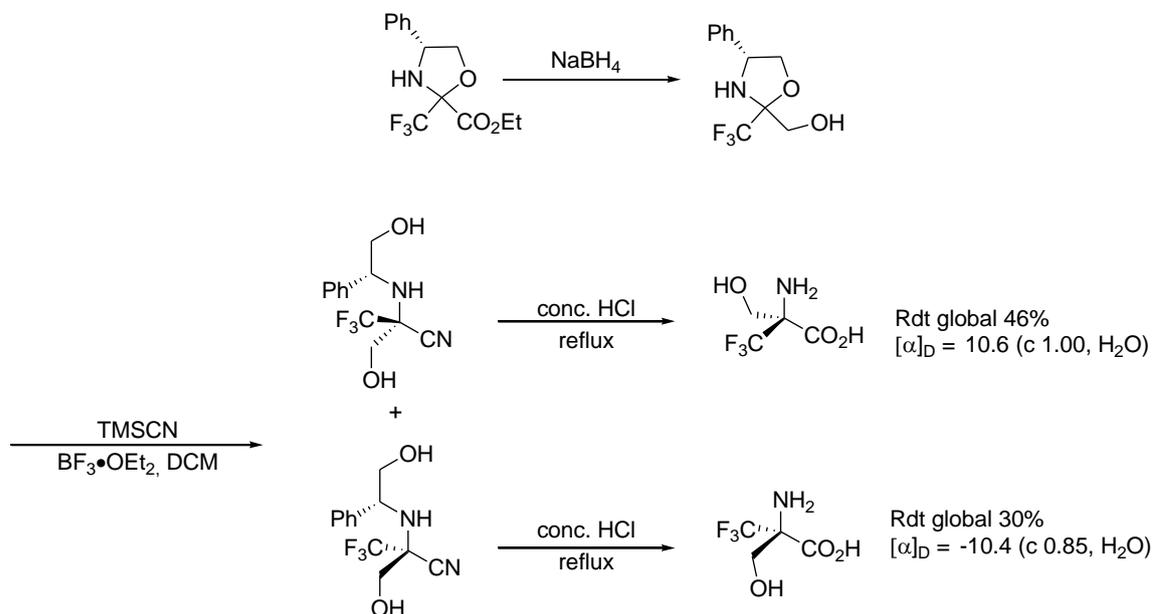
⁶⁴ Huguenot, F.; Brigaud, T. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7075-7078.

⁶⁵ Wang, H.; Zhao, X.; Li, Y.; Lu, L. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1379.

⁶⁶ Simon, J.; Nguyen, T. T.; Chelain, E.; Lensen, N.; Pytkowicz, J.; Chaume, G.; Brigaud, T. *Tetrahedron : Asymm.* **2011**, *22*, 309-314.



Une réaction de Strecker sur l'oxazolidine dérivée du trifluoropyruvate d'éthyle et du (*R*)-phénylglycinol, préalablement réduite par NaBH_4 conduit aux aminonitriles qui sont séparés par chromatographie sur gel de silice puis hydrolysés par de l'acide chlorhydrique concentré pour conduire à chaque énantiomère de l' α -Tfm-sérine (**Schéma 5**).



Une autre méthode pour accéder rapidement à des aminoacides trifluorométhylés est d'effectuer une réaction d'alkylation sur des imines dérivées du trifluoropyruvate. Elle permet de synthétiser, sous forme racémique, en peu d'étapes des aminoacides contenant des chaînes

latérales alkylées. Cette méthode a été utilisée pour la synthèse de l' α -Tfm-alanine, l' α -Tfm-phénylglycine et l' α -Tfm-norleucine (**Schéma 6**).^{67,68}

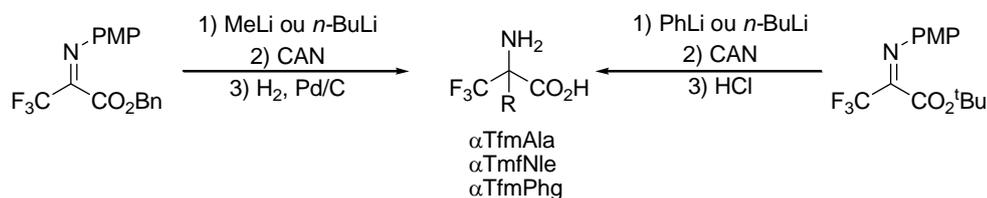


Schéma 6 : Alkylation d'imines dérivées du trifluoropyruvate

4.3. Les peptides trifluorométhylés

L'incorporation d'acides aminés trifluorométhylés (Tfm-AA) dans des peptides, surtout en position α , est très prometteuse car les Tfm-AA pourraient influencer la biodisponibilité de manière importante en augmentant la stabilité enzymatique, mais aussi en augmentant la lipophilie pour permettre un meilleur passage des barrières cellulaires. Un autre avantage de l'incorporation de fluor est d'augmenter la stabilité chimique et thermique des peptides.

Kochsch a réalisé une étude sur la stabilité métabolique de peptides contenant un résidu trifluorométhylé à diverses positions, vis-à-vis de l' α -chymotrypsine (une enzyme qui clive la liaison peptidique du côté carboxylique après un résidu de type tyrosine, phénylalanine ou tryptophane) (**Figure 28**).⁶⁹

⁶⁷ Watanabe, H.; Hashizume, Y.; Uneyama, K. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4333.

⁶⁸ Amii, H.; Kishikawa, Y.; Kageyama, K.; Uneyama, K. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3404.

⁶⁹ Kochsch, B.; Sewald, N.; Jakubke, H. –D. Synthesis and Incorporation of α -Trifluoromethyl-Substituted Amino Acids into Peptides. In *Biomedical Frontiers of Fluorine Chemistry*. ACS Symp. Series 639. Ojima, I.; McCarthy, J. R.; Welch, J. T. (Eds.); Am. Chem. Soc.: Washington DC, **1996**, 42-58.

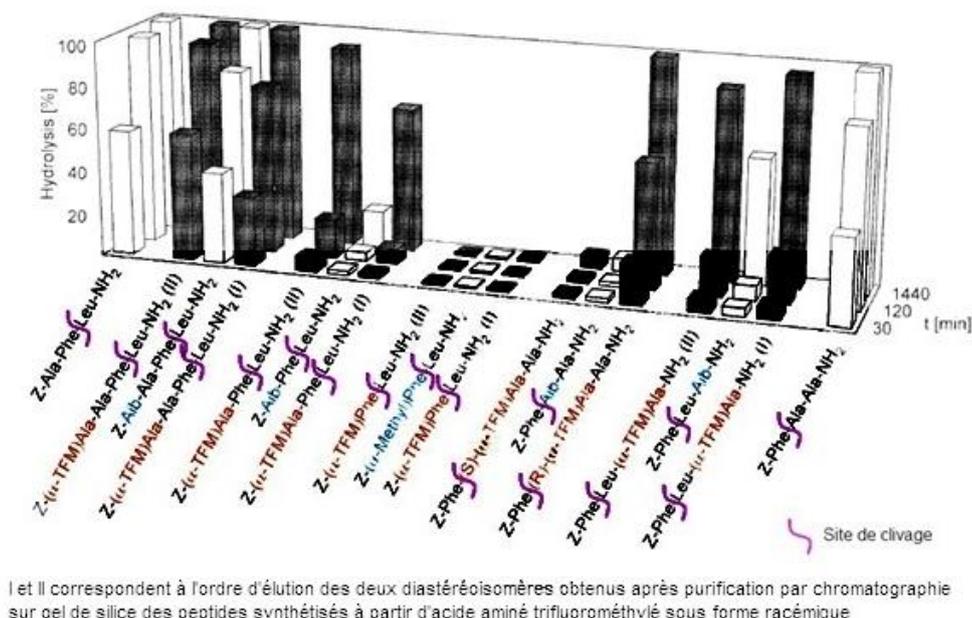


Figure 28 : Etude de l'hydrolyse de différents peptides avec l' α -chymotrypsine

Différents peptides contenant une liaison peptidique de type phénylalanine-AA qui sera clivée par l'enzyme, ont été préparés. L'incorporation d'un acide aminé trifluorométhylé ou $C^{\alpha,\alpha}$ substitué a été effectuée à diverses positions par rapport à la liaison peptidique phénylalanine-AA. La stabilité apportée par les acides aminés trifluorométhylés est importante et comparable à celle d'un acide aminé $C^{\alpha,\alpha}$ substitué. L'étude a montré que la configuration de l'acide aminé fluoré peut avoir une importance dans certains cas. En effet, le peptide contenant la liaison phénylalanine- α -Tfm-(S)-alanine est très stable, comme son équivalent phénylalanine-acide α -aminoisobutyrique. En revanche, le peptide possédant la liaison phénylalanine- α -Tfm-(R)-alanine est peu stable et sa stabilité est proche du peptide avec une liaison phénylalanine-alanine. Cette importante différence de stabilité est expliquée par l'auteur comme étant due à l'interaction du groupement trifluorométhyle avec le site actif de l'enzyme dans le cas de l'énantiomère (R) qui surpasse l'effet de gêne stérique.

La présence de fluor permet de réaliser des études conformationnelles grâce à la RMN ^{19}F comme l'ont montré de nombreux auteurs. Ainsi, dans l'équipe d'A. Ulrich, la RMN ^{19}F à l'état solide a été utilisée pour réaliser des études conformationnelles sur des peptides actifs sur des membranes afin de déterminer leur conformation, leur alignement et leur comportement dynamique dans des bicouches lipidiques.^{70,71,72}

⁷⁰ Mikhaïliuk, P. K.; Afonin, S.; Chernega, A. N.; Rusanov, E. B.; Platonov, M. O.; Dubinina, G. G.; Berditsch, M.; Ulrich, A. S.; Komarov, I. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1-4.

⁷¹ Maisch, D.; Wadhvani, P.; Afonin, S.; Böttcher, C.; Koksche, B.; Ulrich, A. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15596-15597.

De plus, l'IRM ^{19}F est de plus en plus développée, avec par exemple l'utilisation d'éther 15-couronne-perfluoré (perfluoro-15-crown-5-ether PFCE) ou de chélatants fluorés et pourrait à l'avenir permettre le suivi pharmacocinétique de peptides trifluorométhylés (**Figure 29**).^{73,74}

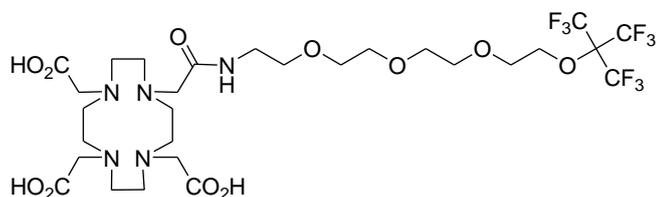


Figure 29 : Structure d'un chélatant fluoré

5. Conclusion

Les acides aminés et les peptides trifluorométhylés sont des composés intéressants pour le développement de nouveaux médicaments en raison des variations potentielles des propriétés physico-chimique apportées par les atomes de fluor. Néanmoins, la synthèse d'acides aminés trifluorométhylés sous forme énantiopure reste un challenge important, notamment en ce qui concerne les acides aminés cycliques. De plus, l'incorporation de ces acides aminés trifluorométhylés dans des chaînes peptidiques représente une difficulté importante.

Dans le prochain chapitre, la synthèse de divers α -Tfm-AAs cycliques énantiopurs sera présentée. Le couplage de ces derniers avec différents acides aminés sera également abordé.

⁷² Mykhailiuk, P. K.; Afonin, S.; Palamarchuchuk, G. V.; Shishkin, O. V.; Ulrich, A. S.; Komarov, I. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1-4.

⁷³ Terreno, E.; Delli Castelli, D.; Viale, A.; Aime, S. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3019-3042..

⁷⁴ Jiang, Z.-X.; Feng, Y.; Yu, Y. B. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7233-7235.

Chapitre 2 : Synthèse d'acides aminés α -trifluorométhylés cycliques et étude méthodologique de la réaction de couplage

« L'expérience ne se trompe jamais, ce sont nos jugements qui se trompent »

Léonard de Vinci

1. Synthèse des acides aminés α -trifluorométhylés

1.1. Rappels bibliographiques

1.1.1. Les 2-Tfm-Prolines (2-CF₃-Pro)

Au laboratoire, la stratégie mise en œuvre pour la synthèse d' α -Tfm-proline est l'utilisation d'un produit commercial possédant déjà le groupement trifluorométhyle et le précurseur de la fonction acide carboxylique, le trifluoropyruvate d'éthyle. La chiralité est introduite *via* la formation d'une oxazolidine avec le (*R*)-phénylglycinol suivie d'une réaction d'allylation. La formation du cycle pyrrolidine est réalisée par une iodocyclisation. La réaction d'allylation n'étant pas totalement diastéréosélective, les deux diastéréoisomères sont séparés avant le clivage de la copule chirale ce qui conduit à la proline trifluorométhylée (Schéma 7).^{61,62}

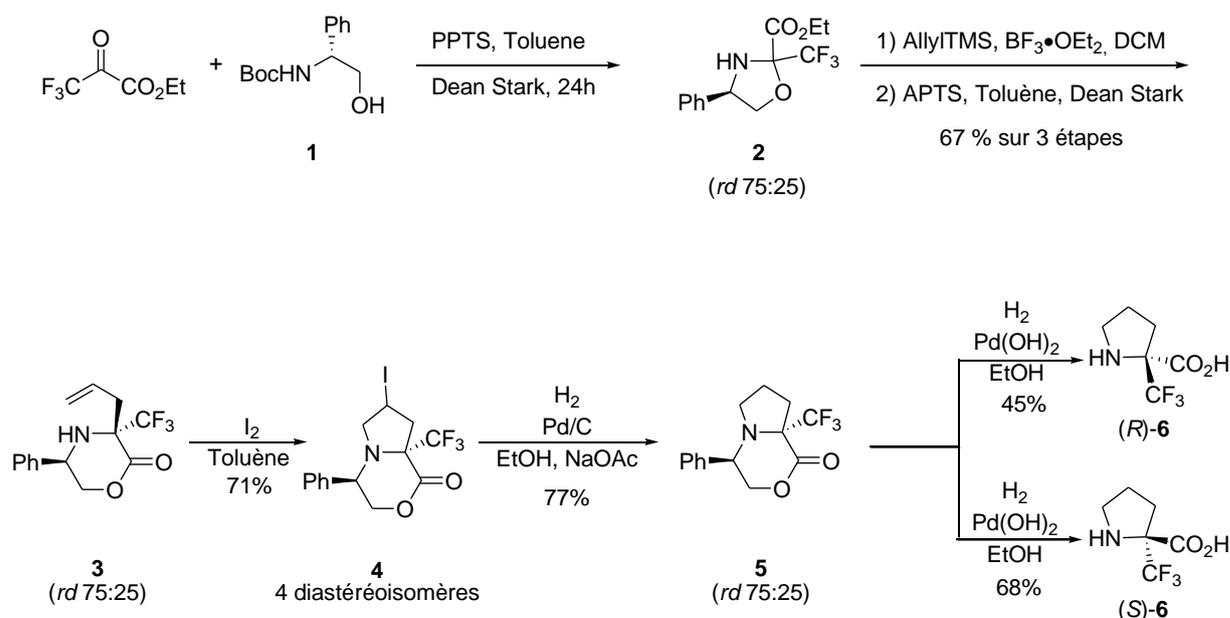


Schéma 7 : Préparation des α -Tfm-prolines

La séquence débute par la formation de l'oxazolidine **2**, obtenue par la condensation du Boc-(*R*)-phénylglycinol **1** sur le trifluoropyruvate d'éthyle. Cette oxazolidine est ensuite engagée dans une réaction d'allylation en présence d'acide de Lewis. L'hydroxyester résultant est ensuite lactonisé pour former l'allylmorpholinone **3**. Cette dernière est engagée dans une réaction d'iodocyclisation pour conduire aux composés **4** sous forme d'un mélange de quatre diastéréoisomères. La déshalogénéation en présence d'acétate de sodium, de palladium et d'hydrogène conduit aux composés bicycliques **5**. Une étape de séparation des deux

diastéréoisomères par chromatographie sur gel de silice, suivie du clivage de la chaîne phénylglycinol conduit à chaque énantiomère de l' α -Tfm-proline **6**. Cette synthèse a permis d'obtenir environ 1 gramme de (*S*)-Tfm-proline **6** et 20 milligrammes de (*R*)-Tfm-proline **6**.

1.1.2. La 5-Tfm-Proline (5-CF₃-Pro)

La synthèse de la 5-Tfm-proline a été décrite par Hodney Lubin dans sa thèse⁷⁵ et est inspirée des travaux de Kadouri et Mangeney (**Schéma 8**).⁷⁶

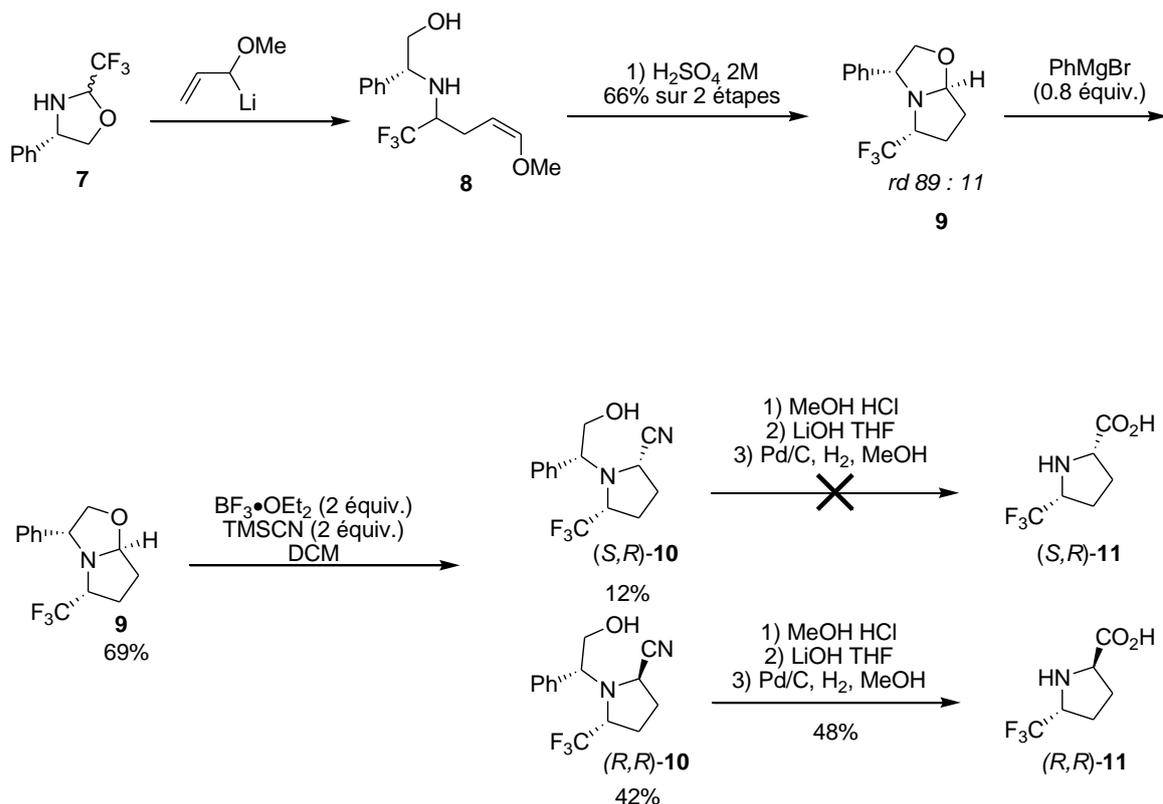


Schéma 8 : Préparation de la 5-CF₃-proline

L'oxazolidine **7** est préparée par condensation du (*R*)-phénylglycinol sur l'hydrate de trifluoroacétaldéhyde. L'addition de l'anion, issu de la déprotonation de l'allylméthyléther par le *sec*-butyllithium, sur l'oxazolidine **7** conduit à l'aminoalcool **8**. Ce dernier est alors cyclisé en milieu acide pour conduire au bicyclic **9** sous forme d'un mélange de diastéréoisomères inséparables par chromatographie sur gel de silice. La résolution cinétique par une réaction avec le bromure de phénylmagnésium permet d'obtenir le bicyclic **9** énantiopur. Une réaction de Strecker sur le composé **9** conduit aux diastéréoisomères (*S,R*)-**10** et (*R,R*)-**10** séparables

⁷⁵ Lubin, H. Synthèse d'oxazolidines et de pyrrolidines trifluorométhylées chirales – Applications en synthèse asymétrique, Université de Cergy Pontoise, 2010.

⁷⁶ Alladoum, J.; Roland, S.; Vrancken, E.; Mangeney, P.; Kadouri-Puchot, C. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9771-9774.

par chromatographie sur gel de silice. Une méthanolyse acide de la fonction nitrile du cyanoalcool (**(R,R)-10**), une saponification de l'ester ainsi obtenu suivie d'une hydrogénolyse palladocatalysée conduisent à la (*R,R*)-5-Tfm-proline **11**. La même séquence réactionnelle appliquée à la (*S,R*)-**10** n'a pas permis pour le moment, d'obtenir (*S,R*)-5-Tfm-proline souhaitée.

1.1.3. Les Tfm-pseudoprolines issues de la sérine : Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)

La formation d'unités CF₃-pseudoprolines nécessite la condensation d'un aminoacide fonctionnalisé (sérine, cystéine ou thréonine) sur une cétone ou un aldéhyde trifluorométhylé. Mutter et coll. ont défini les pseudoprolines par Xaa(Ψ^{R^1,R^2} Pro) où Xaa est l'acide aminé dont est issue la pseudoproline, et R¹R² les substituants en position 5 (**Schéma 9**).⁷⁷

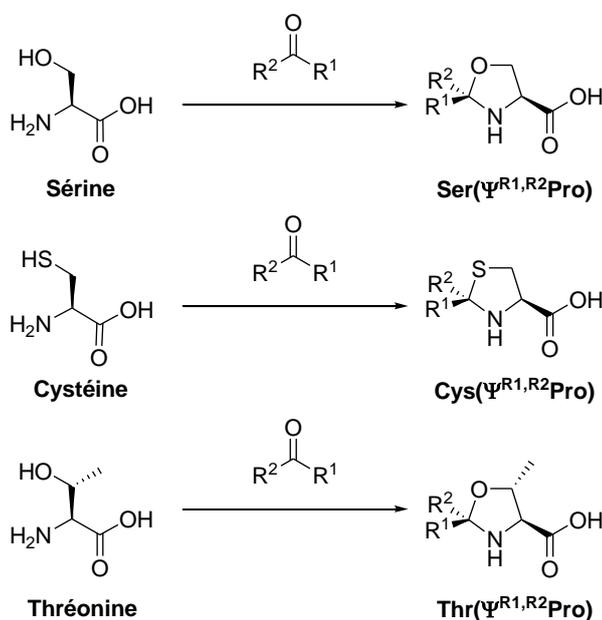


Schéma 9 : Formation des pseudoprolines et nomenclature

Les pseudoprolines Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro) **13** ont été obtenues par condensation à partir de la sérine et du fluoral avec de bons rendements (**Schéma 10**).⁷⁸

⁷⁷ Mutter, M.; Nafzi, A.; Sato, T.; Sun, X.; Wahl, E.; Wöhr, T. *Pept. Res.* **1995**, 8, 145.

⁷⁸ Chaume, G.; Barbeau, O.; Lesot, P.; Brigaud, T. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 4135-4145.

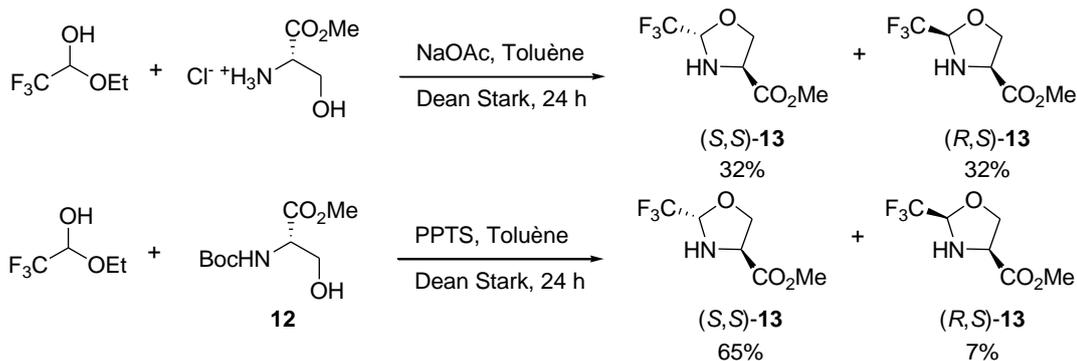


Schéma 10 : Préparation des CF₃-pseudoprolines Ser(Ψ ^{CF₃,H}Pro)

La condensation de l'ester méthylique de la sérine protégée par un groupement Boc sur le fluorol permet d'obtenir les pseudoprolines **13**. Afin de nous affranchir de l'étape de protection de l'amine par un groupement Boc nous avons tenté l'utilisation directe du chlorhydrate d'ammonium de l'ester méthylique de la sérine en présence d'acétate de sodium, ceci conduit aux pseudoprolines **13** attendues avec un rendement satisfaisant. L'utilisation de l'ester méthylique de la sérine protégée par un groupement Boc conduit aux pseudoprolines **13** avec un meilleur rendement, une meilleure pureté et avec une meilleure reproductibilité. Les deux diastéréoisomères sont séparables par chromatographie sur gel de silice et cette méthode est applicable à l'échelle du gramme.

1.2. Résultats et discussion

1.2.1. Les 2-Tfm-Prolines (2-CF₃-Pro)

La synthèse de la 2-Tfm-proline a été réalisée en suivant le même mode opératoire décrit précédemment au laboratoire (**Schéma 7**, p 51).

La réaction d'allylation en présence d'acide de Lewis à partir des oxazolidines **2** dérivées du Boc-(R)-phénylglycinol **1** puis la lactonisation de l'hydroxyester résultant en l'allylmorpholinone **3**, est une méthode optimisée qui n'a pas été changée (**Schéma 11**).

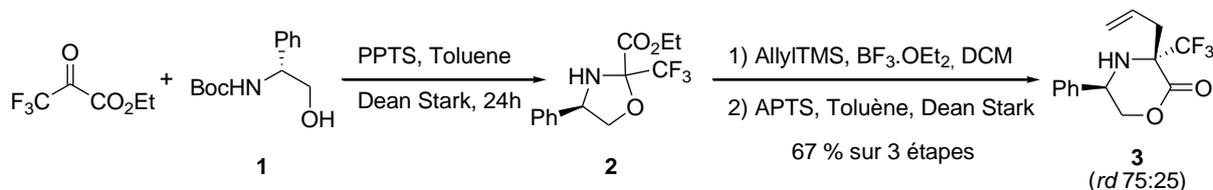


Schéma 11 : Synthèse de l'allylmorpholinone

En effet, une seule purification est nécessaire, la synthèse en trois étapes permet la préparation d'une importante quantité du composé **3** (environ 25 g) et le rendement global sur les 3 étapes est bon (67%). Le groupement protecteur Boc est clivé *in situ* lors de la réaction de formation de l'oxazolidine.

Le Boc-(*R*)-phénylglycinol **1** est commercial mais en raison de son coût élevé, nous l'avons préparé à partir du (*R*)-phénylglycinol et de l'anhydride de di-*tert*-butyle dicarbonate (Boc₂O) en présence de triéthylamine dans le THF (**Schéma 12**).

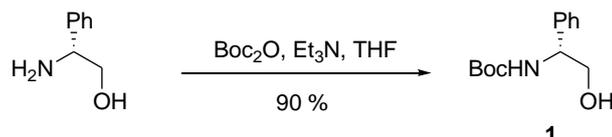


Schéma 12 : N-protection du phénylglycinol par un groupement Boc

La réaction d'iodocyclisation de l'allylmorpholinone **3** a été réalisée dans les conditions déjà décrites au laboratoire pour conduire aux composés bicycliques **4**. L'augmentation d'échelle de la réaction (de 1 g à 10 g) a été effectuée, cependant le rendement de la réaction est moins bon (58% pour 10 g contre 71% pour 1 g) et la purification est plus laborieuse (**Schéma 13**).

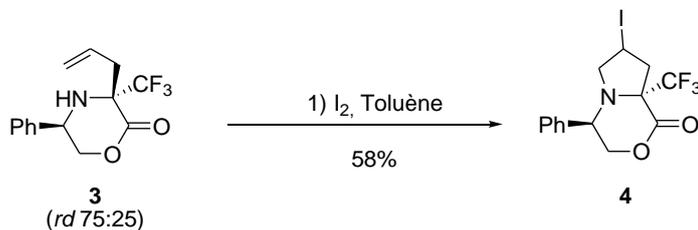


Schéma 13 : Réaction d'iodocyclisation

Contrairement aux premières étapes de la synthèse qui sont simples à mettre en œuvre sur grande échelle et avec de bons rendements, cette étape nous a paru être un point à améliorer. Pour ce faire, divers essais ont été réalisés en utilisant soit le *N*-iodosuccinimide (NIS) soit le *N*-bromosuccinimide (NBS) dans différents solvants (CH₃CN, DCM, Toluène) (**Schéma 14**).

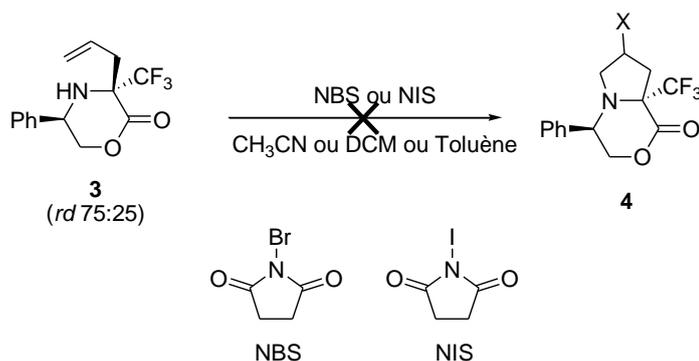


Schéma 14 : Essais de cyclisation avec NBS et NIS

Aucune des conditions opératoires testées n'a permis d'obtenir le produit bicyclique à 5 chaînons attendu. Dans tous les cas la formation du même produit indésirable est décelée, le composé bicyclique à 4 chaînons, déjà observé au laboratoire dans certaines conditions basique (**Figure 30**).

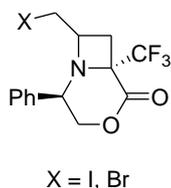


Figure 30 : Produit secondaire bicyclique à 4 chaînons obtenu lors de l'iodocyclisation

Les différentes conditions réactionnelles (réactifs, solvant, température, temps de réaction) utilisées lors de cette réaction de cyclisation sont récapitulées dans le tableau suivant (**Tableau 2**).

Entrée	Solvant	Réactif	Température	Temps	Rdt
1	DCM	NIS	t.a.	24h	0% ^a
2	CH ₃ CN	NIS	t.a.	3h	57%
3	CH ₃ CN	NIS	60°C	3h	60%
4	CH ₃ CN	NBS	t.a.	3h	54%
5	Toluène	NBS	110°C	96h	7% ^a

^a Récupération du produit de départ

Tableau 2 : Réaction de cyclisation avec NBS et NIS

L'utilisation du dichlorométhane comme solvant ne permet pas d'obtenir de réaction même après 24 heures (entrée 1). Le meilleur solvant pour réaliser cette réaction est l'acétonitrile, il conduit en 3 heures à température ambiante au produit cyclique à 4 chaînons avec un bon rendement (entrées 2 et 4). L'augmentation de la température n'augmente pas

sensiblement le rendement (entrée 3). L'utilisation de toluène pour permettre un chauffage à plus haute température n'est pas du tout efficace et conduit à un très faible rendement même après un temps de réaction prolongé (entrée 5).

Au vu des échecs rencontrés pour améliorer la réaction, la formation du bicyclic iodé **4** est effectuée dans les conditions préalablement développées au laboratoire. Le bicyclic **4** est transformé en bicyclics non-iodés (**R,R**)-**5** et (**R,S**)-**5**, par hydrogénolyse catalysée par du palladium sur charbon, en présence d'acétate de sodium, sous 5 bars d'hydrogène. Les deux diastéréoisomères (**R,R**)-**5** et (**R,S**)-**5** sont aisément séparés par chromatographie sur gel de silice (**Schéma 15**).

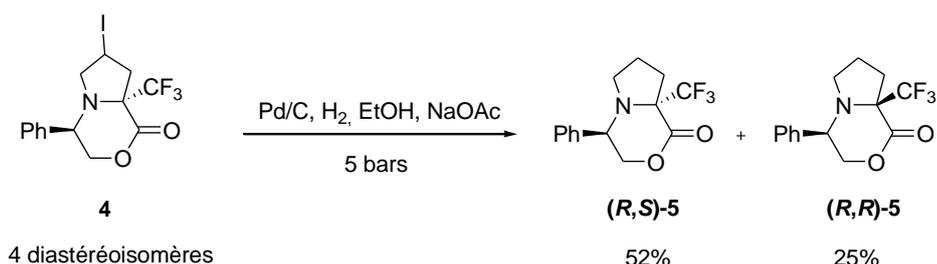


Schéma 15 : Réduction de la liaison carbone-iodure des bicyclics iodés

L'hydrogénolyse des bicyclics (**R,R**)-**5** et (**R,S**)-**5** est réalisée sous 5 bars d'hydrogène en présence d'hydroxyde de palladium pour conduire aux prolines (**S**)-**6** et (**R**)-**6** (**Schéma 16**).

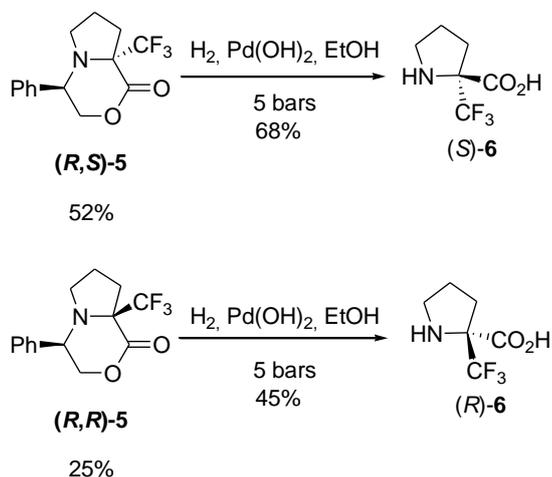


Schéma 16 : Synthèses des deux énantiomères de la 2-CF₃-proline

La synthèse de la (**S**)-**6** a été réalisée sur la même échelle (environ 1 gramme). La synthèse de la (**R**)-**6** a par contre été réalisée également à l'échelle du gramme contre quelques dizaines de milligrammes auparavant.

La synthèse des deux énantiomères de la 2-CF₃-proline a été réalisée avec succès à l'échelle du gramme et les différentes étapes ont été effectuées sur une plus grande échelle. La réaction d'iodocyclisation n'a pas pu être améliorée et cela pourrait faire l'objet d'une étude ultérieure.

1.2.2. La Tfm-pseudoproline issue de la sérine : Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)

La sérine est méthylée dans un mélange chlorure d'acétyle/méthanol puis *N*-protégée avec un groupement Boc par l'anhydride de di-*tert*-butyle dicarbonate (Boc₂O) en présence de triéthylamine dans le THF pour conduire à l'ester méthylique de la Boc-sérine **12** (Schéma 17).⁷⁸

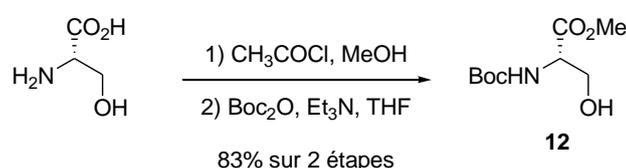


Schéma 17 : Estérification et *N*-protection de la L-sérine par un groupement Boc

Les pseudoprolines Ser($\Psi^{CF_3,H}$ pro)-OMe **13** ont été préparées dans les conditions décrites au laboratoire par condensation de l'ester méthylique de la Boc-sérine **12** avec le fluoral en présence de *paratoluène* sulfonate de pyridinium (PPTS) dans le toluène. L'augmentation d'échelle de la réaction a permis d'obtenir 18 g des pseudoprolines Ser($\Psi^{CF_3,H}$ pro)-OMe **13** avec un excellent rendement (Schéma 18).

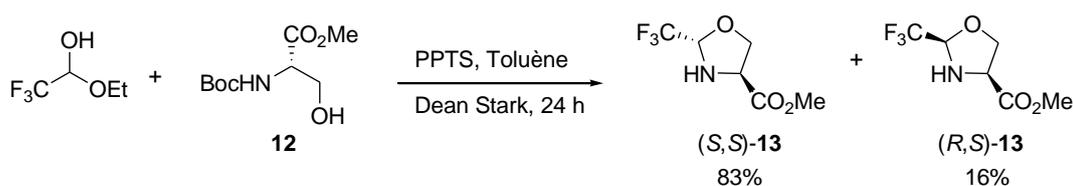


Schéma 18 : Synthèse des L-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)

Comme pour la L-sérine, la D-sérine est méthylée dans un mélange chlorure d'acétyle/méthanol puis *N*-protégée avec un groupement Boc par l'anhydride de di-*tert*-butyle dicarbonate (Boc₂O) en présence de triéthylamine dans le THF pour conduire à l'ester méthylique de la *N*-Boc-D-sérine **16** (Schéma 19).

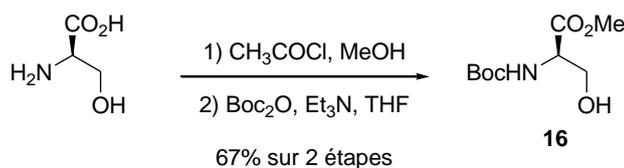


Schéma 19 : Estérification et *N*-protection de la D-sérine par un groupement Boc

De la même manière, la synthèse de la D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ pro)-OMe **17** est réalisée par condensation de l'ester méthylique de la *N*-Boc-D-sérine **16** avec le fluoral en présence de PPTS dans le toluène. La synthèse a été effectuée sur une échelle moindre et le rendement est moins bon que pour les pseudoprolines dérivées de la L-sérine, mais 3.5 g des D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe ont néanmoins pu être synthétisés. (**Schéma 20**)

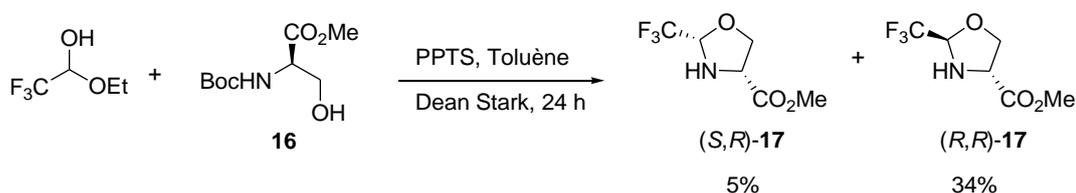


Schéma 20 : Synthèse des D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)

La synthèse des quatre stéréoisomères possibles des pseudoprolines a ainsi été réalisée, en une seule étape, sur une échelle de plusieurs grammes. Ces pseudoprolines séparables par chromatographie permettent d'obtenir rapidement et sur grande échelle des mimes de proline trifluorométhylé. L'HPLC chirale a permis de caractériser chacun des quatre énantiomères par son temps de rétention.

1.2.3. La Tfm-pseudoproline issue de la cystéine : Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)

Comme dans les exemples précédents, l'ester méthylique de la cystéine est *N*-protégé avec un groupement Boc par l'anhydride de di-*tert*-butyle dicarbonate (Boc_2O) en présence de triéthylamine dans le THF pour conduire à l'ester méthylique de la *N*-Boc-cystéine **18** (**Schéma 21**).

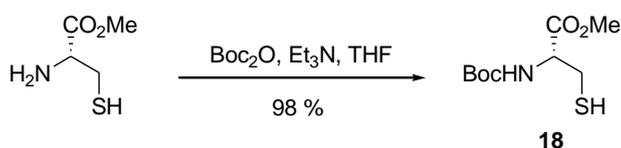


Schéma 21 : *N*-protection de la L-cystéine par un groupement Boc

Les pseudoprolines Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ pro)-OMe **19** ont été préparées dans les mêmes conditions que les pseudoprolines issues de la sérine, par condensation de l'ester méthylique de la *N*-Boc-cystéine **18** avec le fluoral en présence de PPTS dans le toluène. La réaction a permis

d'obtenir 18 g des pseudoprolines Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ pro)-OMe **19** avec un excellent rendement (**Schéma 22**).

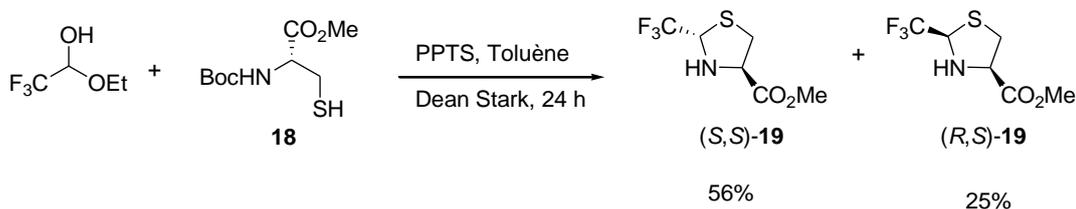


Schéma 22 : Synthèse des Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)

La synthèse des thiazolidines Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe a été réalisée également sur plusieurs grammes et en une seule étape. Comme pour les pseudoprolines dérivées de la sérine, cela nous donne un accès rapide et en grosse quantité à un mime de proline trifluorométhylée.

1.2.4. Les Tfm-pseudoprolines

L'oxazolidine **2** dérivée du (*R*)-phénylglycinol a été utilisée dans la synthèse de la 2- CF_3 -proline (**Schéma 11**, p 54). Elle peut de plus être utilisée en tant que mime de proline, l'encombrement stérique généré par le groupement phényle pourra induire des effets conformationnels importants. Elle est préparée par condensation du *N*-Boc-(*R*)-phénylglycinol **1** avec le trifluoropyruvate d'éthyle en présence de PPTS dans le toluène (**Schéma 23**).

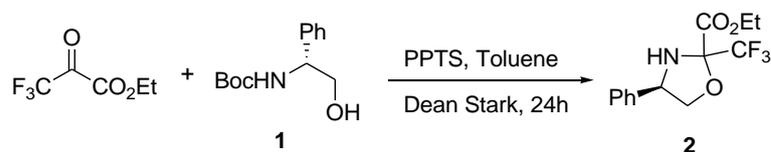


Schéma 23 : Synthèse de l'oxazolidine dérivée du (*R*)-phénylglycinol

L'éthanolamine est *N*-protégée avec un groupement Boc par l'anhydride de di-*tert*-butyle dicarbonate (Boc_2O) en présence de triéthylamine dans le THF pour fournir la *N*-Boc-éthanolamine **20** (**Schéma 24**).

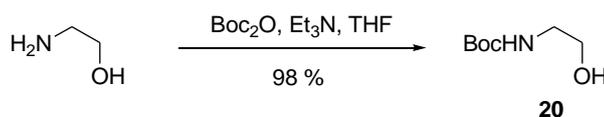


Schéma 24 : N-protection de l'éthanolamine par un groupement Boc

La synthèse d'un analogue **21**, stériquement moins encombré, a été effectuée à partir de l'éthanolamine protégée par un groupement Boc **20** (Schéma 25).

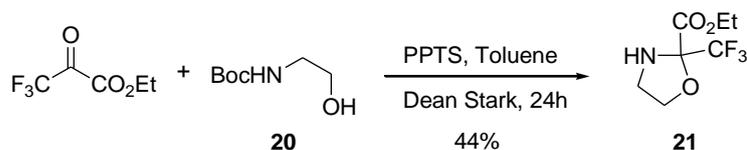


Schéma 25 : Synthèse de l'oxazolidine dérivée de l'éthanolamine

La synthèse des oxazolidines dérivées du (*R*)-phénylglycinol et de l'éthanolamine a été effectuée en une seule étape et à l'échelle de plusieurs grammes. Comme dans le cas des autres pseudoprolines, c'est un moyen rapide et efficace d'obtenir des mimes de proline trifluorométhylée. Contrairement aux pseudoprolines dérivées de la sérine ou de la cystéine, elles sont quaternarisées comme la Tfm-proline.

2. De l'acide aminé trifluorométhylé au peptide

2.1. Rappels bibliographiques

2.1.1. Généralités sur le couplage peptidique en solution

La synthèse peptidique requiert la formation d'une liaison amide entre la fonction acide carboxylique d'un acide aminé *i* et la fonction amine de l'acide aminé suivant *i+1* (Figure 31).

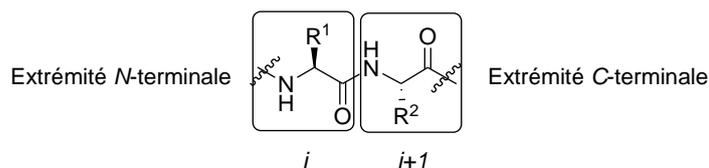
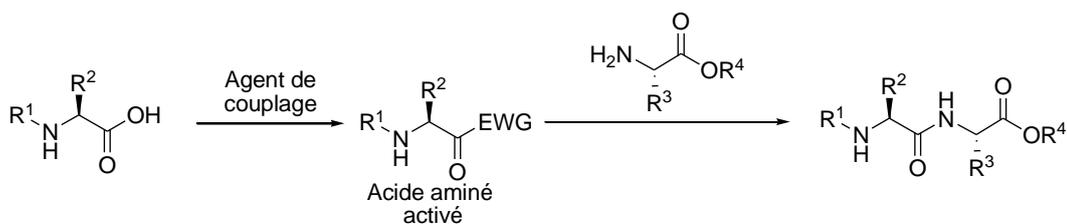


Figure 31 : Résidu *i* et *i+1* d'une chaîne peptidique

Le couplage entre ces deux fonctions implique une déshydratation qui n'a pas lieu de façon spontanée à température ambiante et nécessite des températures élevées qui ne sont généralement pas compatibles avec l'intégrité des substrats. C'est pourquoi la fonction acide carboxylique est généralement activée par conversion du -OH en un groupement activateur. Cette réaction est effectuée par ce qu'on appelle un agent de couplage (Schéma 26).



EWG = Groupement électrotracteur

Schéma 26 : La réaction de couplage peptidique

Les réactions de couplage peptidique sont en général réalisées à partir des acides aminés dont les fonctions réactives non impliquées dans le couplage sont protégées afin d'éviter la formation de produits secondaires. Les conditions de synthèse peptidique doivent, de plus, préserver la stéréochimie des acides aminés. Ainsi la cyclisation de l'acide aminé activé sous forme d'oxazolone (**Schéma 27**) doit être évitée pour limiter l'épimérisation du centre en α .

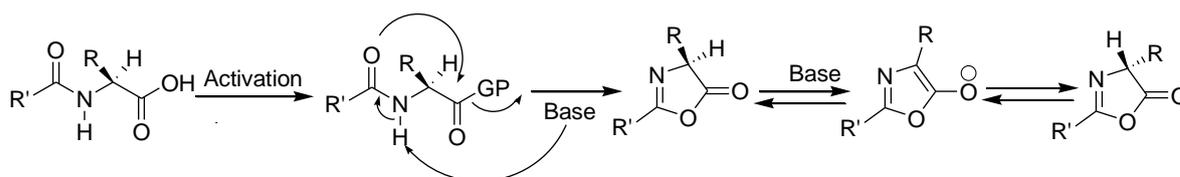


Schéma 27 : Formation et épimérisation de l'oxazolone

La synthèse peptidique s'effectue généralement de l'extrémité C-terminale à l'extrémité N-terminale. En effet, la protection de la fonction amine par un groupement carbamate (Boc, Z ou Fmoc) (**Schéma 28**) permet de diminuer l'acidité du proton stéréogène de l'acide aminé activé. Ceci réduit la formation de la forme oxazolone dont la tautomérisation est responsable de l'épimérisation.

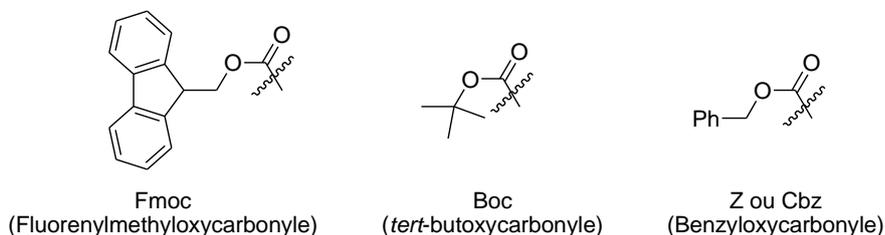


Schéma 28 : Exemples de groupements carbamates

De très nombreux réactifs de couplages ont été développés pour activer la fonction acide carboxylique de l'acide aminé à coupler. Quelques méthodes de couplages parmi les plus utilisées seront décrites dans cette partie bibliographique, non exhaustive du fait du très grand

nombre d'agents de couplage décrits dans la littérature. De nombreuses revues ont été écrites à ce jour.^{79,80,81}

2.1.1.1. Les carbodiimides

La méthode traditionnelle pour former une liaison peptidique est d'utiliser les carbodiimides comme le dicyclohexylcarbodiimide (DCC). La réaction entre l'acide et le carbodiimide génère une espèce activée appelée *O*-acylisourée qui subit une aminolyse en présence du second acide aminé pour former le peptide correspondant et comme sous-produit une urée (**Schéma 29**).

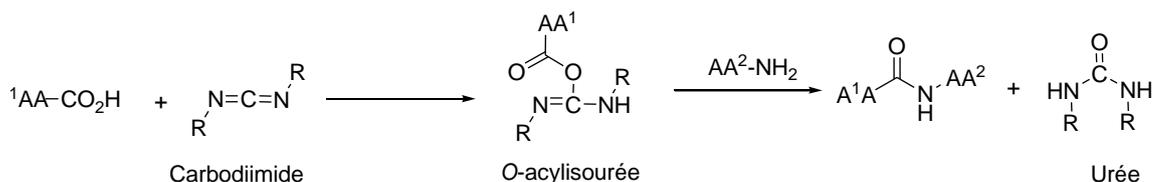


Schéma 29 : Réaction entre un acide aminé et un carbodiimide

D'autres réactions peuvent avoir lieu après la formation de la *O*-acylisourée. Celle-ci peut réagir avec une seconde molécule d'acide aminé pour former l'anhydride symétrique qui est ensuite aminolysé pour conduire au peptide, mais cela consomme un équivalent d'acide aminé. Elle peut également se cycliser pour former l'oxazolone. Celle-ci permet également d'obtenir le peptide par aminolyse cependant la formation de l'oxazolone peut racémiser l'acide aminé (**Schéma 27**, p 62). La *O*-acylisourée peut aussi subir un réarrangement et former la *N*-acylurée qui n'est pas réactive, cette réaction secondaire est irréversible et consomme l'acide aminé sans conduire à la formation du peptide (**Schéma 30**).

⁷⁹ El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602

⁸⁰ Prasad, K.V.S.R.G.; Barathi, K.; Haseena B. B. *IJPSRR*, **2011**

⁸¹ Joullié, M.; Lassen, K. *ARKIVOC*, **2010**, 189-250

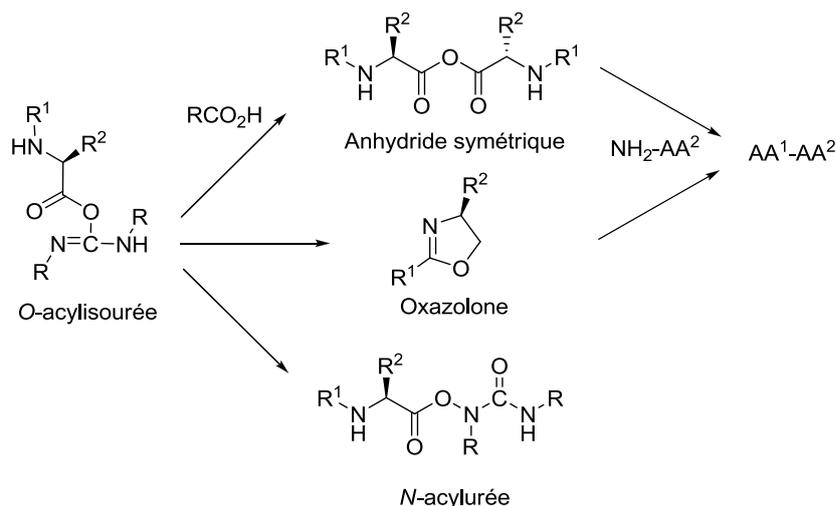


Schéma 30 : Réactions possibles après formation de la O-acylisourée

Pour la synthèse en solution, le DCC pose des problèmes lors de la purification, en effet la *N,N'*-dicyclohexylurée (DCU) formée lors de la réaction est très difficile à séparer du peptide même après une chromatographie sur colonne. D'autres carbodiimides peuvent être utilisés comme le diisopropylcarbodiimide (DIC) ou le chlorhydrate de *N*-éthyle-*N'*-(3-diméthylaminopropyle) carbodiimide (EDCI), ce dernier est particulièrement utile pour la synthèse en solution car il est soluble dans l'eau et l'urée formée lors de la réaction l'est également (**Figure 32**).

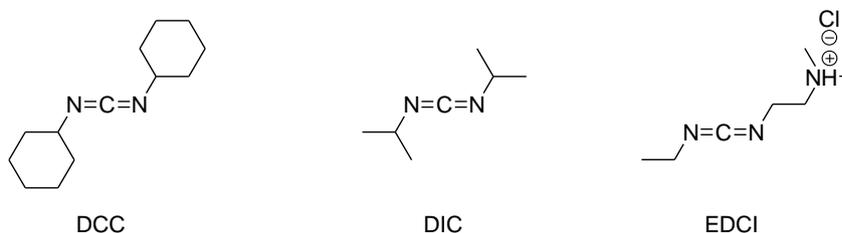


Figure 32 : Quelques exemples de carbodiimides couramment utilisés

Les carbodiimides sont généralement utilisés en présence d'un additif de type *N*-hydroxyde comme les *N*-hydroxybenzotriazoles (HOXt) qui limite les réactions secondaires. Il protonne la O-acylisourée, empêchant ainsi les réactions intramoléculaires (formation de la N-acylurée et de l'oxazolone) et conduit à la formation d'un ester activé. Ils améliorent ainsi les rendements et réduisent le taux d'épimérisation. Des additifs comme le 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) ou le 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) sont couramment utilisés mais de nombreuses alternatives existent comme par exemple l'éthyle 2-cyano-2-

(hydroxyimino)acétate (Oxyrna Pure) qui présente des risques d'explosions moins importants (**Figure 33**).^{82,83}

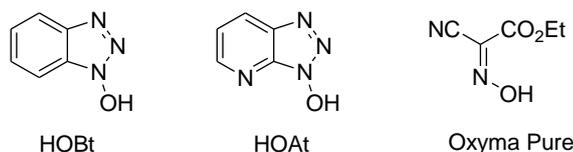


Figure 33 : Exemples d'additifs utilisés avec les carbodiimides

2.1.1.2. Les anhydrides symétriques et les anhydrides mixtes

Dans cette méthode de couplage, l'acide aminé *N*-terminal est activé sous forme d'un anhydride soit avec une seconde unité du même acide aminé (anhydride symétrique) soit avec un chloroformiate (anhydride mixte) (**Figure 34**).

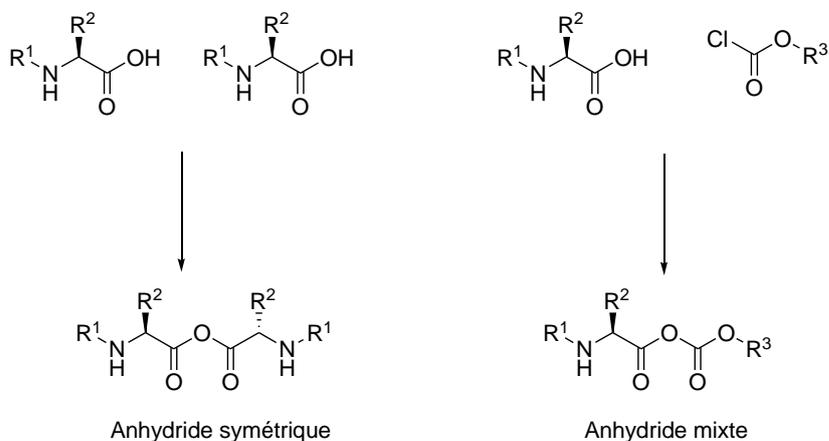


Figure 34 : Anhydride symétrique et anhydride mixte

Les anhydrides symétriques sont généralement préparés en faisant réagir l'acide aminé à coupler avec 0.5 équivalent de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans le DCM. La *N,N*-dicyclohexylurée (DCU) formée durant la réaction est filtrée et le solvant est parfois remplacé par du DMF puis l'anhydride est ajouté au second acide aminé (**Schéma 31**).

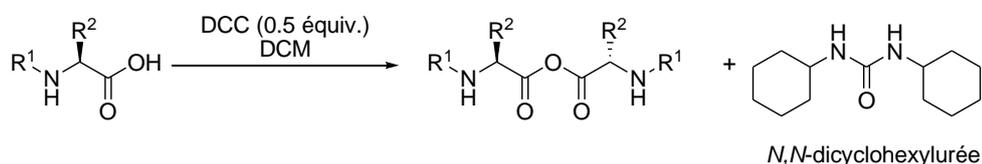


Schéma 31 : Formation d'anhydride symétrique

⁸² Subiros-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9394-9403.

⁸³ El-Faham, A.; Albericio, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 1499-1501.

La réaction de formation de l'anhydride n'est pas réalisée directement dans un solvant polaire car celui-ci empêche sa formation. Les anhydrides symétriques peuvent être isolés mais pas stockés. Cette méthode présente l'avantage de ne pas être dépendante de la régiosélectivité, en effet l'aminolyse de l'un ou l'autre des carbonyles de l'anhydride conduit au peptide attendu et à 0.5 équivalent de l'acide aminé qui peut être récupéré. Cependant la récupération de l'acide n'est généralement pas aisée, ce qui limite grandement l'utilité de cette méthode.

L'autre méthode consiste à utiliser un anhydride mixte, et ainsi ne pas perdre la moitié de l'acide aminé que l'on souhaite coupler. L'anhydride mixte est généralement formé par réaction d'un chloroformiate avec l'anion de l'acide aminé *N*-protégé généré par déprotonation de l'acide par une amine tertiaire telle que la *N*-méthylmorpholine (NMM). L'utilisation de cette dernière permet de diminuer l'isomérisation par rapport à la triéthylamine (pKa NMM : 7.38, pKa Et₃N : 10.75). La réaction de formation de l'anhydride est de l'ordre de quelques minutes puis l'acide aminé à coupler est ajouté. Ces réactions sont réalisées à basse température (-5 à -15°C) pour éviter les réactions secondaires (formation de l'uréthane selon la voie B) (**Schéma 32**).

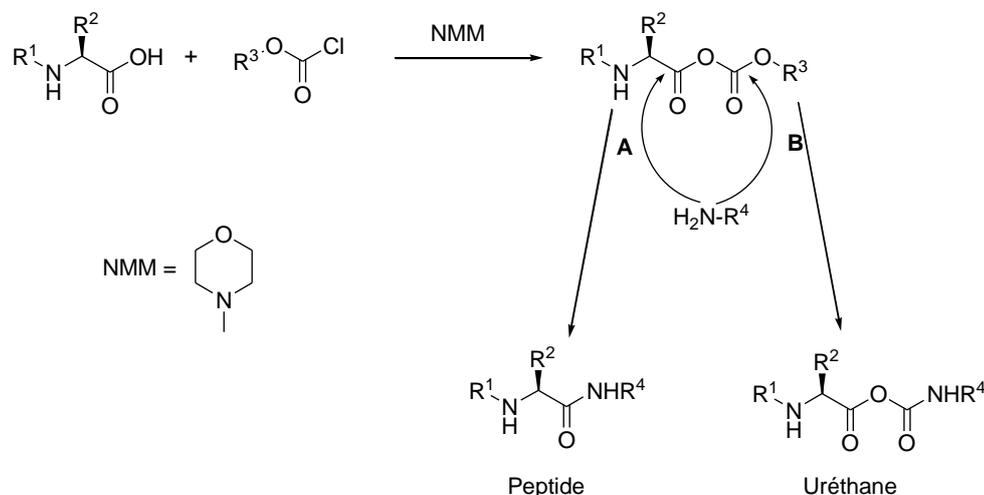


Schéma 32 : Réaction de couplage avec un anhydride mixte

Un autre type d'anhydride mixte parfois utilisé pour réaliser des couplages peptidiques est l'utilisation d'anhydride carboxylique/phosphinique. L'avantage de l'utilisation de ce type d'anhydride est la gestion de la régiosélectivité. En effet, dans le cas des réactions sur les anhydrides mixtes de type dicarboxylique, la régiosélectivité est régie par des effets électroniques et stériques, alors que pour les anhydrides mixtes de type carboxylique/phosphinique, elle est fonction de la nature du nucléophile. Pour un nucléophile

azoté, comme un acide aminé, la réaction à lieu préférentiellement sur le site carboxylique (**Figure 35**).

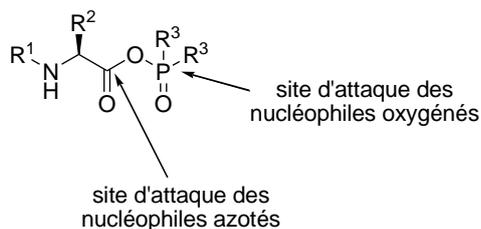


Figure 35 : Anhydride mixte carboxylique/phosphinique

Pour réaliser ce type d'anhydride mixte, de nombreux réactifs organophosphorés ont été développés, le composé de cette famille le plus utilisé est le chlorure de bis(2-oxo-3-oxazolidinyle)phosphorodiamidique (BOP-Cl) (**Figure 36**).

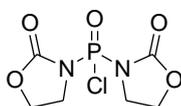


Figure 36 : Structure du BOP-Cl

Une autre stratégie utilisée pour réaliser des réactions de couplage est celle des *N*-carboxyanhydrides (NCA) aussi appelés anhydrides de Leuch. Ce type d'anhydride peut être préparé à partir d'un acide aminé non protégé et de phosgène (**Schéma 33**).

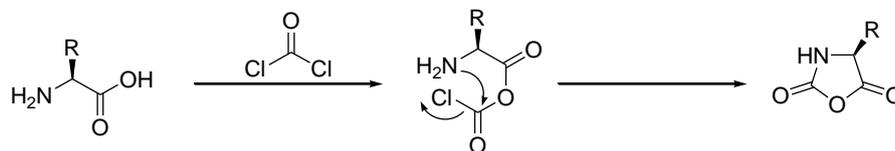


Schéma 33 : Formation de l'anhydride de Leuch

2.1.1.3. Les sels de phosphonium/uronium

Kenner et coll.⁸⁴ furent les premiers à décrire l'utilisation de sels de phosphonium pour réaliser des couplages peptidiques mais ces réactifs ne furent largement utilisés qu'après une étude approfondie effectuée par Castro et Coste.⁸⁵ Les sels de phosphonium utilisés sont souvent des sels d'agents suppresseurs de racémisation tel le HOBt comme dans le cas de l'hexafluorophosphate benzotriazole-1-ylxytris(diméthylamino)-phosphonium (BOP). Ce réactif est un excellent agent de couplage mais il génère un sous-produit toxique

⁸⁴ Gawne, G.; Kenner, G. W.; Sheppard, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 5670.

⁸⁵ Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Evin, G.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205.

l'hexaméthylphosphorotriamide (HMPT). De nombreuses alternatives ont été développées pour éviter la formation de ce sous-produit, on peut ainsi citer des réactifs tels que l'hexafluorophosphate benzotriazole-1-yloxytri(pyrrolidino)phosphonium (PyBOP) où le motif diméthylamine a été remplacé par une pyrrolidine (**Figure 37**).

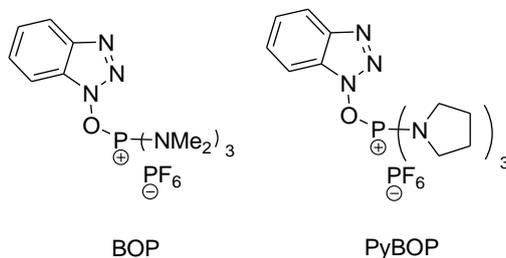


Figure 37 : Exemples de sels de phosphoniums

Des sels d'uroniums, où un atome de carbone remplace celui de phosphore sont également très utilisés pour réaliser des couplages peptidiques. On peut citer par exemple le 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyl uronium hexafluorophosphate méthanaminium (HATU) ou le O-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium tétrafluoroborate (TBTU) qui sont deux sels d'uronium largement utilisés pour la synthèse peptidique (**Figure 38**).

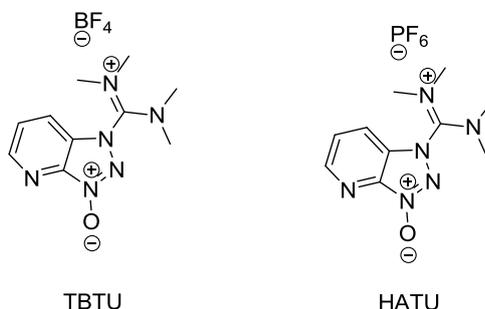


Figure 38 : Exemples de sels d'uronium

2.1.1.4. Les halogénures d'acyle

L'utilisation d'halogénure d'acyle pour réaliser des couplages peptidique est une méthode ancienne qui fût introduite par Fisher en 1903 avec l'utilisation d'un chlorure d'acyle d'acide aminé protégé par un groupement *N*-éthoxycarboxyle.⁸⁶ Cependant le clivage de ce groupement protecteur n'étant pas possible sans détruire la liaison amide, cette méthode n'a donc pas pu être appliquée à la synthèse peptidique. Le groupement benzyloxycarboxyle (Z) a permis les premières utilisations de cette méthode pour la synthèse de peptides, cependant les chlorures d'acyle d'acides aminés protégés par un groupement Z ne sont pas très stables et se

⁸⁶ Fischer, E.; Otto, E. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 2106.

décomposent en *N*-carboxyanhydride (anhydride de Leuch). De plus, dans le cas d'acides aminés $C^{\alpha,\alpha}$ alkylés comme l'acide aminoisobutyrique, la formation du chlorure d'acyle de l'acide aminé protégé par un groupement *Z* conduit exclusivement à la formation de l'oxazolone. Le développement du groupement 9-fluorenylméthoxycarbonyle (Fmoc) a permis la synthèse de chlorures d'acyle stables et l'utilisation de conditions de déprotection douces.

Les chlorures d'acyle sont facilement obtenus en faisant réagir l'acide aminé avec un agent de chloration comme par exemple le chlorure de thionyle (SOCl_2) (**Schéma 34**).

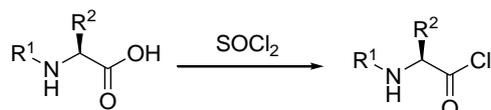


Schéma 34 : Préparation d'un chlorure d'acyle

Cette méthode est simple et permet de réaliser des couplages avec des acides aminés très encombrés et/ou faiblement nucléophiles.

Cependant l'importante activation pose certains problèmes comme la racémisation de l'acide aminé activé. En effet, la présence de base est nécessaire pour effectuer la réaction afin de neutraliser l'acide chlorhydrique libéré. Cependant sa présence convertit le chlorure d'acyle en oxazolone qui réagit plus lentement et qui conduit à l'épimérisation de l'acide aminé (**Schéma 27**, p 62). Pour minimiser le contact entre la base et le chlorure d'acyle, la réaction peut être effectuée dans des conditions de Schotten-Baumann, c'est-à-dire un système biphasique DCM/solution aqueuse de carbonate potassium.

Une autre limitation de cette méthode est l'impossibilité d'utiliser des groupements protecteurs labiles dans des conditions acides comme le groupe *tert*-butyle (*t*-Bu). Malgré ces limitations, l'utilisation de chlorures d'acyle est particulièrement efficace pour réaliser des couplages d'acides aminés encombrés et/ou faiblement nucléophiles.

L'utilisation de fluorure d'acyle est également une solution pour réaliser des couplages difficiles dans des conditions standards. L'avantage de cette méthode est qu'elle est compatible avec l'utilisation de groupements labiles en milieu acide. Les fluorures d'acyle sont généralement préparés en faisant réagir la trifluorotriazine, toxique, avec l'acide aminé (**Schéma 35**).

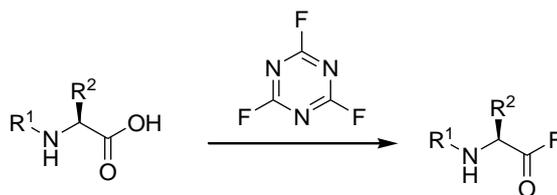


Schéma 35 : Préparation d'un fluorure d'acyle

Des bromures d'acyle sont parfois utilisés pour réaliser des couplages très délicats. Cette méthode est cependant limitée car du fait de leur très grande réactivité, les bromures d'acyle ne supportent que peu de groupements protecteurs sur l'amine. Ainsi l'utilisation du groupement Fmoc n'est pas appropriée à cause de la décomposition rapide de l'acide aminé en anhydride de Leuch (Schéma 36).

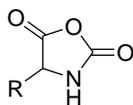


Schéma 36 : Anhydride de Leuch

Quelques groupements protecteurs compatibles avec cette méthode ont été rapportés comme les groupes de type phtaloyle (Pht), arylsulfonyle (Nbs), dithiasuccinoyle (Dts), 1,1-diméthylthiométhyle ((MeS)₂-C=) ou azoture (Figure 39).

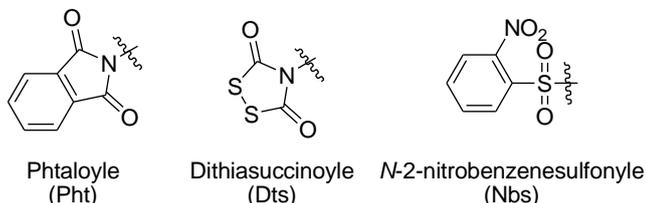


Figure 39 : Exemples de groupements protecteurs compatibles avec les bromures d'acyle

Pour former le bromure d'acyle, la 1-bromo-*N,N*-2-triméthyl-1-propénylamine est souvent utilisée car elle permet de réaliser la réaction dans des conditions douces (sans chauffer). Cependant, elle n'est pas commerciale et sa préparation est délicate. (Schéma 37).⁸⁷

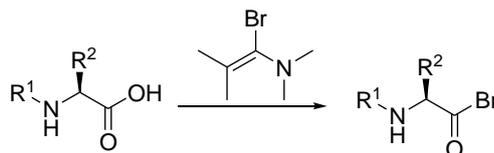


Schéma 37 : Formation d'un bromure d'acyle

⁸⁷ Ghosez, L.; George-Koch, I.; Patiny, L.; Houtekie, M.; Bovy, P.; Nshimyumukiza, P.; Phan, T. *Tetrahedron*, **1998**, 9207-9222.

2.1.1.5. Les esters activés

Les esters activés d'acides aminés sont des espèces qui sont assez stables pour être stockées mais assez réactives pour réagir avec un groupement amine. Ils sont souvent utilisés en synthèse peptidique et peuvent être préparés, purifiés et stockés. Certains acides aminés sous forme de pentafluorophényle (Pfp) sont commerciaux (**Figure 40**).

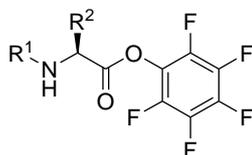


Figure 40 : Acide aminé activé sous forme de pentafluorophényle

Les esters activés d'acides aminés sont généralement préparés en utilisant des méthodes standards de formation d'ester comme l'utilisation de DCC avec un phénol substitué (ex : pentafluorophényle) ou une hydroxylamine substituée (ex : HOBt) (**Schéma 38**).

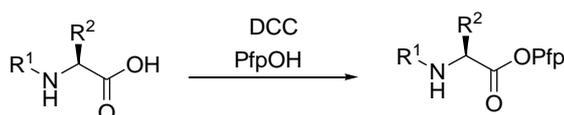


Schéma 38 : Formation d'un ester activé sous forme de pentafluorophényle

2.1.2. Le couplage d'acides aminés α -trifluorométhylés : un challenge

Malgré les effets prometteurs attendus par l'incorporation d'acides aminés trifluorométhylés dans des peptides, il y a peu d'exemples de peptides fluorés.^{88,89,90,91,92,93,94,95,96} Les peptides nécessitant un couplage sur l'azote d'acides aminés α -trifluorométhylés (α -Tfm-AA) s'avèrent très difficiles à synthétiser. En effet, il existe deux effets défavorables pour la réalisation de ce couplage. Tout d'abord, l'encombrement stérique important, le couplage d'acides aminés $C^{\alpha,\alpha}$ disubstitué est en soi une difficulté non négligeable. Le second facteur qui rend le couplage des α -Tfm-AA difficile est la faible nucléophilie de l'azote induite par le fort effet électroattracteur du groupement CF_3 . Ces deux facteurs réunis font du couplage d' α -Tfm-AA un challenge important. Seulement trois

⁸⁸ Bilgicer, B.; Xing, X.; Kumar, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11815-11816.

⁸⁹ Bilgicer, B.; Fichera, A.; Kumar, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4393-4399.

⁹⁰ Tang, Y.; Ghirlanda, G.; Vaidehi, N.; Kua, J.; Mainz, D. T.; Goddard III, W. A.; DeGrado, W. F.; Tirell, D. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2790-2796.

⁹¹ Jackel, C.; Seufert, W.; Thust, S.; Koksche, B. *Chem. Bio. Chem.* **2004**, *5*, 717-720.

⁹² Binkert, C.; Frigerio, M.; Jones, A.; Meyer, S.; Pesenti, C.; Prade, L.; Viani, F.; Zanda, M. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, *7*, 181-186.

⁹³ Jackel, C.; Salwiczek, M.; Koksche, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4198-4203.

⁹⁴ Son, S.; Tanrikulu, C.; Tirell, D. A. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, *7*, 1251-1257.

⁹⁵ Smiths, R.; Koksche, B. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1483.

⁹⁶ Kitamoto, T.; Marubayashi, S.; Yamazaki, T. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1888-1894.

équipes (Koksch, Dal Pozzo, Brigaud) ont décrit des réactions de couplages avec des α -Tfm-AA. Les seules méthodes décrites dans la littérature pour le couplage sur l'azote des α -Tfm-AA sont l'utilisation d'anhydrides mixtes^{97,98,99} ou d'halogénures d'acides.^{100,101,102,103,104} Les autres méthodes décrites font intervenir la synthèse peptidique catalysée par des protéases^{105,106,107,108,109} ou des voies indirectes.^{110,111,112,113} Tous les exemples décrits dans la littérature ont été réalisés seulement à partir d'acides aminés linéaires α -Tfm-alanine, α -Tfm-phénylalanine, α -Tfm-leucine et sous forme racémique.

2.1.2.1. Couplage C-terminal

Les réactions de couplages menées sur l'extrémité carboxylique sont réalisées dans des conditions classiques. Ainsi, Dal Pozzo et coll. décrivent la synthèse du peptide α -Tfm-Orn-Gly-Asp(OtBu)-Phe-NH₂ en effectuant, en présence de DCC, le couplage entre l' α -Tfm-Ornithine sous forme racémique protégée et le peptide Gly-Asp(OtBu)-Phe-NH₂ avec un rendement satisfaisant (**Schéma 39**).¹¹¹

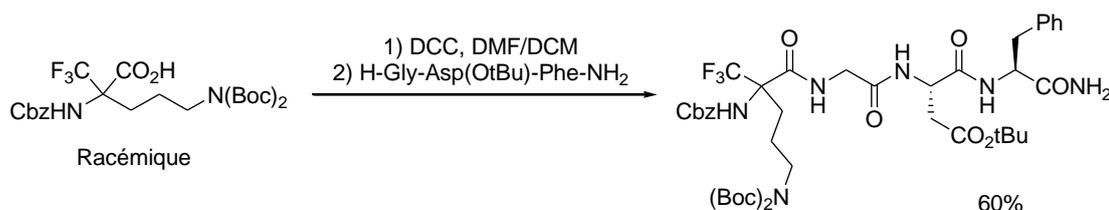


Schéma 39 : Couplage de l' α -Tfm-Arg

⁹⁷ Koksch, B.; Sewald, N.; Hofmann, H. -J.; Burger, K. *J. Pept. Sci.* **1997**, *3*, 157-167.

⁹⁸ Burger, K.; Mutze, K.; Hollweck, W.; Koksch, B. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5915-5928.

⁹⁹ Koksch, B.; Dahl, C.; Radics, G.; Vocks, A.; Arnold, K.; Arnhold, J.; Sieler, J.; Burger, K. *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 67-81.

¹⁰⁰ Chaume, G.; Lensen, N.; Caupène, C.; Brigaud, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5717-5724.

¹⁰¹ Dal Pozzo, A.; Dikovskaya, K.; Moroni, M.; Fagnoni, M.; Vanini, L.; Bergonzi, R.; de Castiglione, R.; Bravo, P.; Zanda, M. *J. Chem. Res.* **1999**, 468-469.

¹⁰² DalPozzo, A.; Bergonzi, R.; Ni, M. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3925-3927.

¹⁰³ DalPozzo, A.; Ni, M.; Muzi, L.; Caporale, A.; de Castiglione, R.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Formaggio, F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6372-6375.

¹⁰⁴ Dal Pozzo, A.; Ni, M.; Muzi, L.; de Castiglione, R.; Mondelli, R.; Mazzini, S.; Penco, S.; Pisano, C.; Castorina, M.; Giannini, G. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1808-1817.

¹⁰⁵ Koksch, B.; Sewald, N.; Burger, K.; Jakubke, H. -D. *Amino Acids* **1996**, *11*, 425-434.

¹⁰⁶ Jakubke, H. -D. *J. Chin. Chem. Soc.* **1994**, *41*, 355.

¹⁰⁷ Bordusa, F.; Dahl, C.; Jakubke, H. -D.; Burger, K.; Koksch, B. *Tetrahedron: Asymm.* **1999**, *10*, 307-313.

¹⁰⁸ Thust, S.; Koksch, B. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2290-2296.

¹⁰⁹ Thust, S.; Koksch, B. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1163-1165.

¹¹⁰ Sewald, N.; Hollweck, W.; Mutze, K.; Schierlinger, C.; Seymour, L. C.; Gaa, K.; Burger, K.; Koksch, B.; Jakubke, H. -D. *Amino Acids* **1995**, *8*, 187-194.

¹¹¹ Dal Pozzo, A.; Muzi, L.; Moroni, M.; Rondanin, R.; de Castiglione, R.; Bravo, P.; Zanda, M. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 6019-6028.

¹¹² Koksch, B.; Mutze, K.; Osipov, S. N.; Gobulev, A. S.; Burger, K. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3825-3828.

¹¹³ Koksch, B.; Quaedflieg, P. J. L. M.; Michel, T.; Burger, K.; Broxterman, Q. B.; Schoemaker, H. E. *Tetrahedron: Asymm.* **2004**, *15*, 1401-1407.

Kochsch et coll. utilisent également des carbodiimides pour réaliser, avec de bons rendements, les couplages de la *Z*- α -Tfm-alanine racémique et de la *Z*- α -Tfm-phénylalanine racémique avec l'alanine-NH₂ et la leucine-NH₂ respectivement (**Schéma 40**).

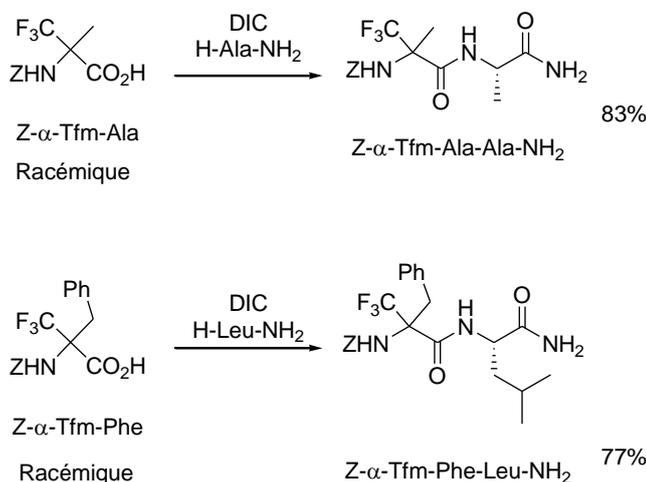


Schéma 40 : Couplage de l' α -Tfm-Ala et l' α -Tfm-Phe

Burger et coll. décrivent l'utilisation d'anhydride de Leuch pour réaliser le couplage de différents acides aminés trifluorométhylés sous forme racémique.¹¹⁴ L'acide aminé trifluorométhylé protégé par un groupement Z est chauffé à 80°C dans le SOCl₂ pour former l'anhydride de Leuch correspondant, puis l'aminolyse de ce dernier par un acide aminé protégé sur sa fonction acide carboxylique conduit aux dipeptides attendus (**Schéma 41**).

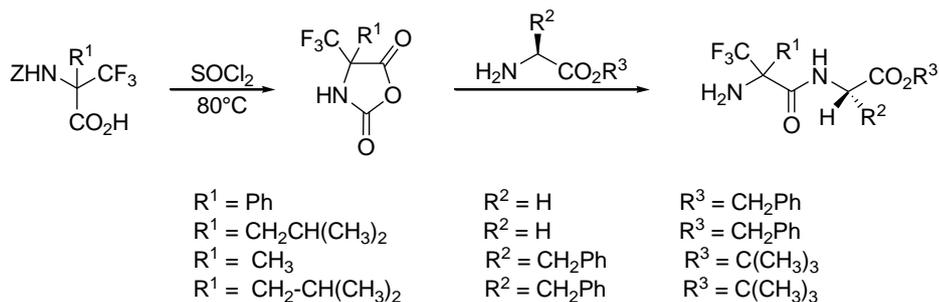


Schéma 41 : Couplage C-terminal d'acides aminés trifluorométhylés via la formation d'anhydride de Leuch

Burger et coll. effectuent la synthèse de différents dipeptides trifluorométhylés sans réaliser de réaction de couplage. Ils forment un hémiaminal par addition d'un acide aminé Z protégé sur le trifluoropyruvate de méthyle, puis une dicétopipérazine est formée en retirant le

¹¹⁴ Schierlinger, C.; Burger, K. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 2, 193-194.

groupement protecteur par une réaction d'hydrogénolyse catalysée au palladium (**Schéma 42**)¹¹⁵.

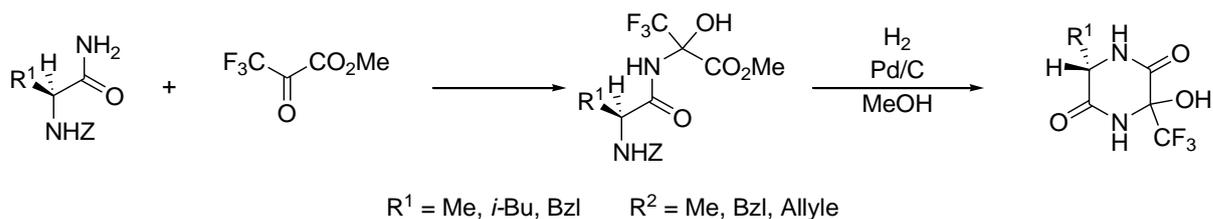


Schéma 42 : Formation d'une dicétopipérazine trifluorométhylée

Cette dicétopipérazine est ensuite trifluoroacétylée par de l'anhydride trifluoroacétique puis la réaction avec un organomagnésien conduit à la génération *in situ* à basse température d'une imine cyclique sur laquelle s'additionne l'organométallique pour conduire à 2 dicétopipérazines diastéréoisomères *cis* et *trans* en proportions inéquivalentes (**Schéma 43**).

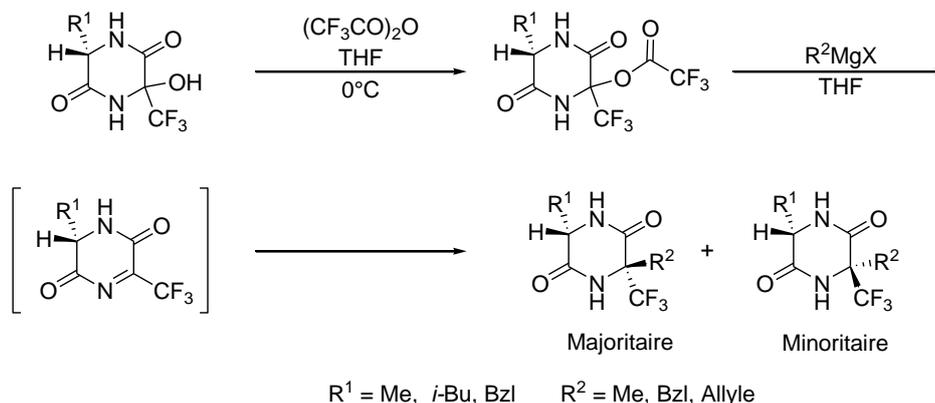


Schéma 43 : Addition d'organométalliques sur des dicétopipérazines trifluorométhylées

L'acidolyse de la dicétopipérazine majoritaire conduit au dipeptide attendu, qui ne se recyclise pas en dicétopipérazine du fait de la nucléophilie réduite du groupement amine positionné en α du CF_3 (**Schéma 44**).

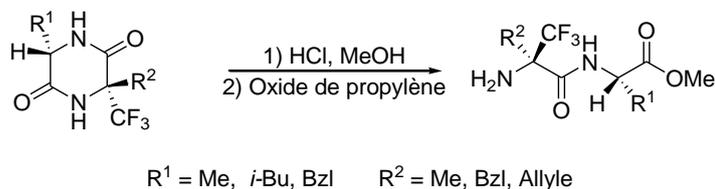


Schéma 44 : Formation du dipeptide par acidolyse de la dicétopipérazine trifluorométhylée

¹¹⁵ Sewald, N.; Seymour, L.; Burger, K.; Osipov, S. N.; Kolomiets, A. F.; Fokin, A. V. *Tetrahedron : Asym.* **1994**, 5, 1051-1060.

Röschenthaler et coll. réalisent également la synthèse de dipeptides trifluorométhylés sans effectuer de réaction de couplage, pour ce faire ils utilisent la réaction de Ugi pour obtenir des dipeptides α -Tfm-Pro-AA à partir d'une imine trifluorométhylée, de l'acide trifluoroacétique et des dérivés d'acide isocyanoacétique.¹¹⁶ Ainsi, des dipeptides composés d' α -Tfm-proline et d'alanine, de phénylalanine, de méthionine, d'acide glutamique et de tryptophane sont synthétisés en une étape avec de bons rendements. Les dipeptides sont obtenus sous forme de mélange racémique (**Schéma 45**).

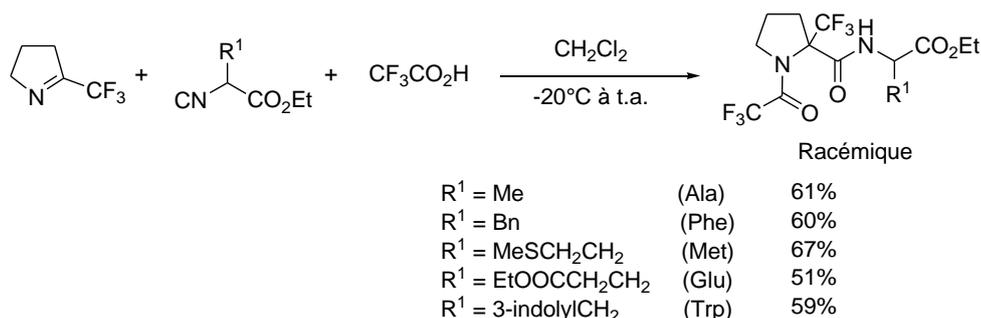


Schéma 45 : Synthèse de dipeptides α -Tfm-Pro-AA sous forme racémique via la réaction de Ugi

Au laboratoire des travaux ont été réalisés sur le couplage de la 2-Tfm-proline et l' α -Tfm-alanine.¹⁰⁰ Ces travaux ont permis l'optimisation de la réaction de couplage entre la 2-Tfm-proline et l'alanine protégée par un benzyle. L'utilisation des agents de couplage HOBt/EDCI dans le DMF en présence de triéthylamine permet d'obtenir le dipeptide attendu. Cependant, le rendement n'est que de 53% et la formation de 27% de dicétopipérazine est observée. Afin de diminuer la formation de dicétopipérazine une addition inverse a été réalisée dans des conditions strictement stœchiométriques. Malheureusement il n'y a aucune amélioration par rapport à l'addition normale. En revanche, l'addition inverse sur 2 équivalents d'alanine permet d'améliorer de façon sensible le rendement jusqu'à 95% et évite la formation de la dicétopipérazine. De plus, aucune épimérisation n'a été observée (**Schéma 46**).

¹¹⁶ Gulevich, A. V.; Schevchenko, N. E.; Balenkova, E. S.; Röshenthaler, G.-V.; Nenajdenko, V.G. *Synlett* **2009**, 3, 403-406.

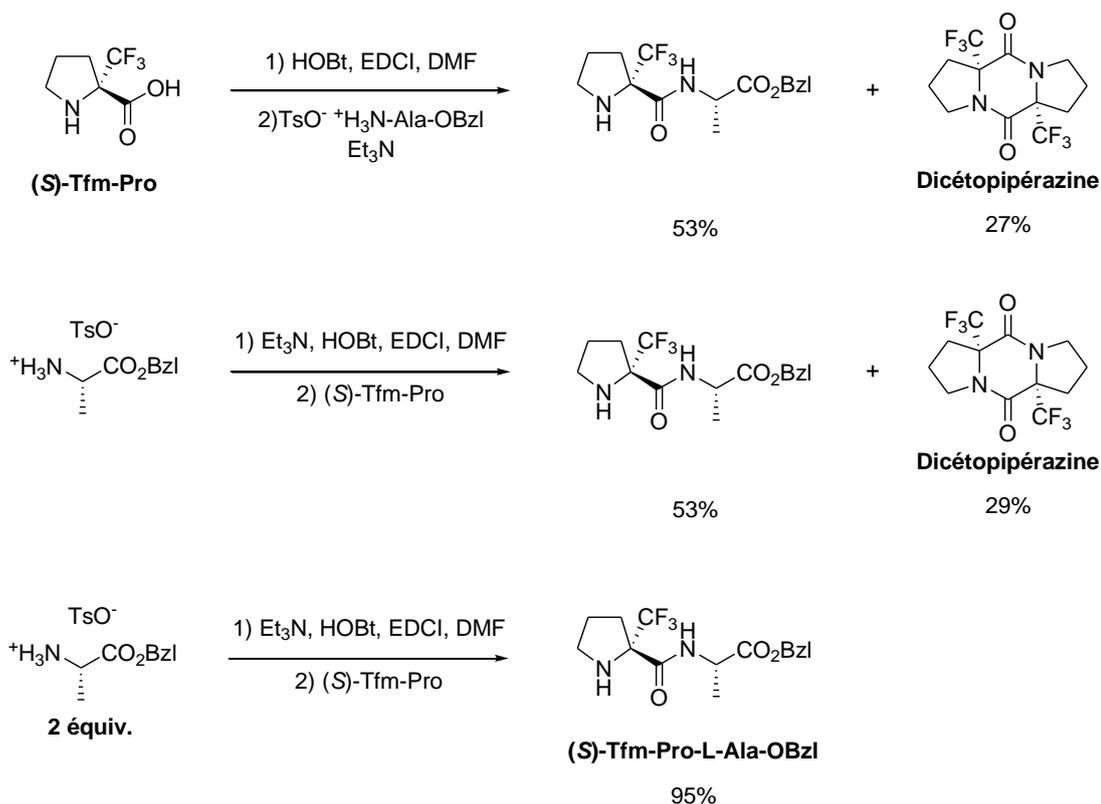
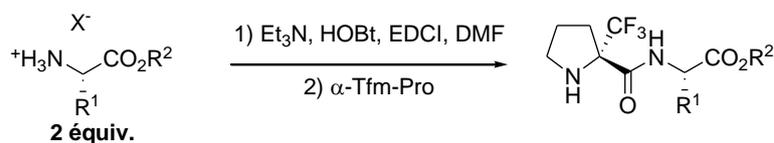


Schéma 46 : Optimisation du couplage C-terminal de l' α -Tfm-Pro

Cette méthode optimisée a permis de coupler l' α -Tfm-proline avec d'autres acides aminés comme l'alanine, la valine, la leucine et la phénylalanine (Schéma 47).



X	R ¹	R ²	α -Tfm-Pro	Rdt
TsO	Me	Bn	S	95%
TsO	Me	Bn	R	87%
Cl	iPr	tBu	S	87%
Cl	Bn	tBu	S	76%
TsO	iBu	Bn	S	80%

Schéma 47 : Synthèse de dipeptides avec l' α -Tfm-Pro

La même méthode de couplage a été utilisée avec succès pour réaliser le couplage de l' α -Tfm-alanine avec l'alanine, la valine, la leucine et la phénylalanine (Schéma 48).

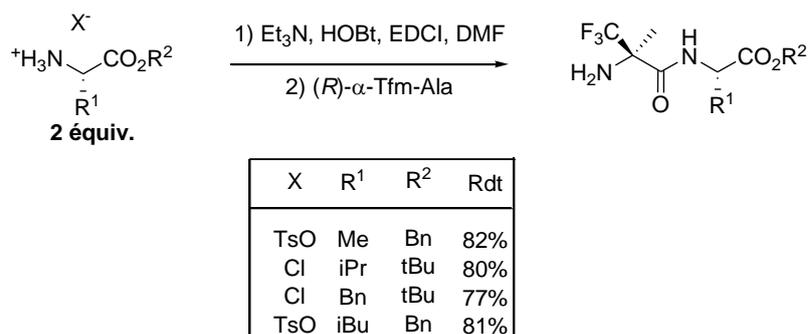


Schéma 48 : Synthèse de dipeptides avec l' α -Tfm-Ala

Les dipeptides synthétisés en série α -Tfm-proline et α -Tfm-alanine sont très stables, et aucune cyclisation en dicétopipérazine n'est observée après plusieurs mois de stockage, cette stabilité est liée à la faible nucléophilie de l'azote. Il est à noter que cette faible nucléophilie de l'azote qui a été un frein pour mettre au point la réaction de couplage a également été très bénéfique puisque les couplages peuvent être effectués sans protection de la fonction amine de l' α -Tfm-AA. Cette possibilité de non protection d'une fonction généralement réactive est très intéressante puisqu'elle limite les étapes de protection et déprotection.

2.1.2.2. Couplage *N*-terminal

Les réactions de couplages sur l'azote d' α -Tfm-AAs sont délicates et nécessitent des méthodes drastiques qui peuvent conduire à l'épimérisation de l'acide aminé que l'on souhaite coupler. Kokschi et coll. décrivent le couplage d' α -Tfm-leucine et d' α -Tfm-phénylalanine en utilisant des anhydrides mixtes fortement activés. L' α -Tfm-AA est converti préalablement en isocyanate qui est couplé avec l'autre acide aminé *N*-protégé *via* la formation d'un anhydride mixte (**Schéma 49**).⁹⁸

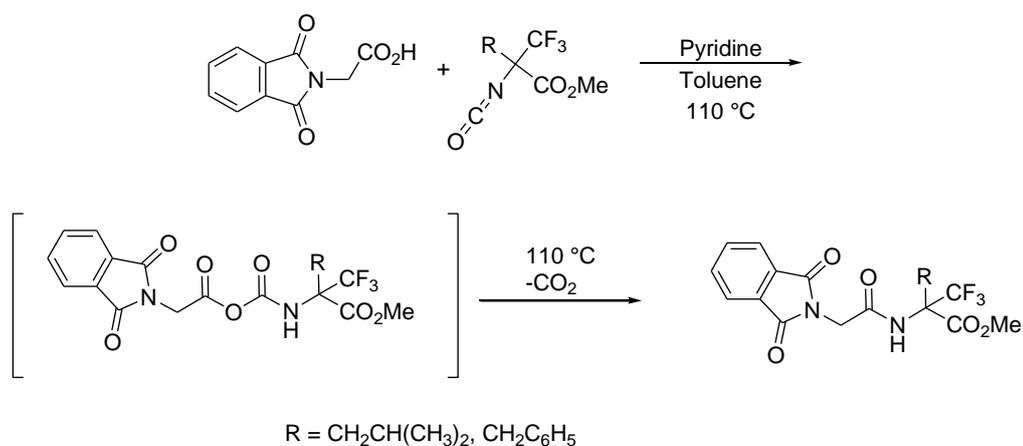


Schéma 49 : Couplage sur l'azote de l' α -Tfm-Leu et l' α -Tfm-Phe

Koksch et coll. réalisent le couplage de l' α -Tfm-alanine amide sous forme racémique avec la Z-leucine *via* la formation d'un anhydride mixte. L'acide aminé *N*-protégé par un groupement Z est converti en anhydride mixte en présence de chloroformiate d'isobutyle et de *N*-méthylmorpholine (NMM) dans l'acétate d'éthyle. L' α -Tfm-alanine amide est ensuite ajouté pour conduire à la formation du dipeptide avec un bon rendement (**Schéma 50**).⁹⁷

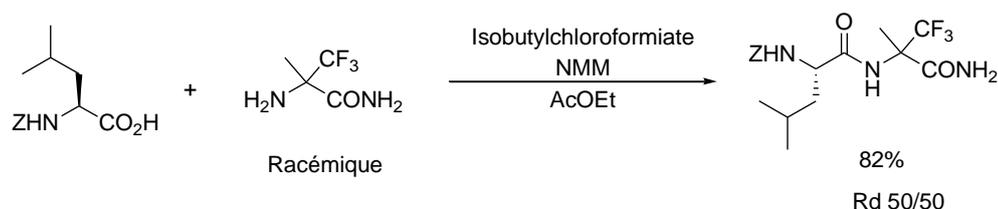


Schéma 50 : Couplage de la Z-Leu avec l' α -Tfm-Ala-NH₂

Koksch et coll. utilisent la même méthode pour effectuer le couplage de la Z-phénylalanine avec le dipeptide α -Tfm-Ala-Ala-NH₂ pour former le tripeptide Z-Phe- α -Tfm-Ala-Ala-NH₂ avec un bon rendement sous forme de mélange de diastéréoisomères (**Schéma 51**).⁹⁷

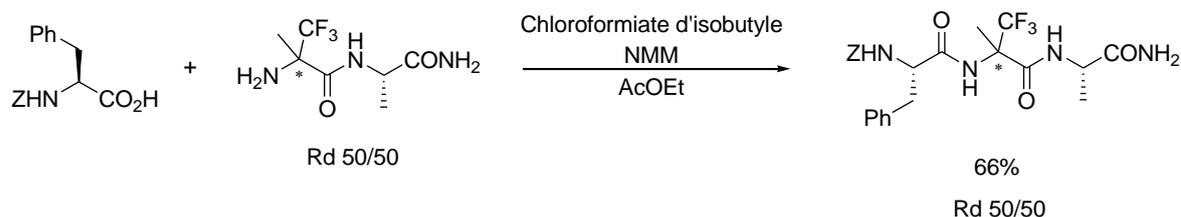


Schéma 51 : Couplage de Couplage de la Z-Phe avec le dipeptide α -Tfm-Ala-Ala-NH₂

Koksch et coll. réalisent la synthèse d'un autre tripeptide Boc-Met- α -Tfm-Ala-Phe-NH₂ sous forme énantiopure toujours en utilisant la méthode « anhydride mixte ». Chaque diastéréoisomère isolé du dipeptide α -Tfm-Ala-Phe-NH₂ est couplé avec la Boc-méthionine préalablement convertie en anhydride mixte en présence de chloroformiate d'isobutyle et de *N*-méthylmorpholine (NMM) dans le DMF pour conduire aux tripeptides Boc-Met-(*R*)- α -Tfm-Ala-Phe-NH₂ et Boc-Met-(*S*)- α -Tfm-Ala-Phe-NH₂ (**Schéma 52**).¹¹⁷

¹¹⁷ Koksch, B.; Dahl, C.; Radics, G.; Vocks, A.; Arnold, K.; Arnhold, J.; Sieler, J.; Burger, K. *J. Peptide Sci.* **2004**, *10*, 67-81.

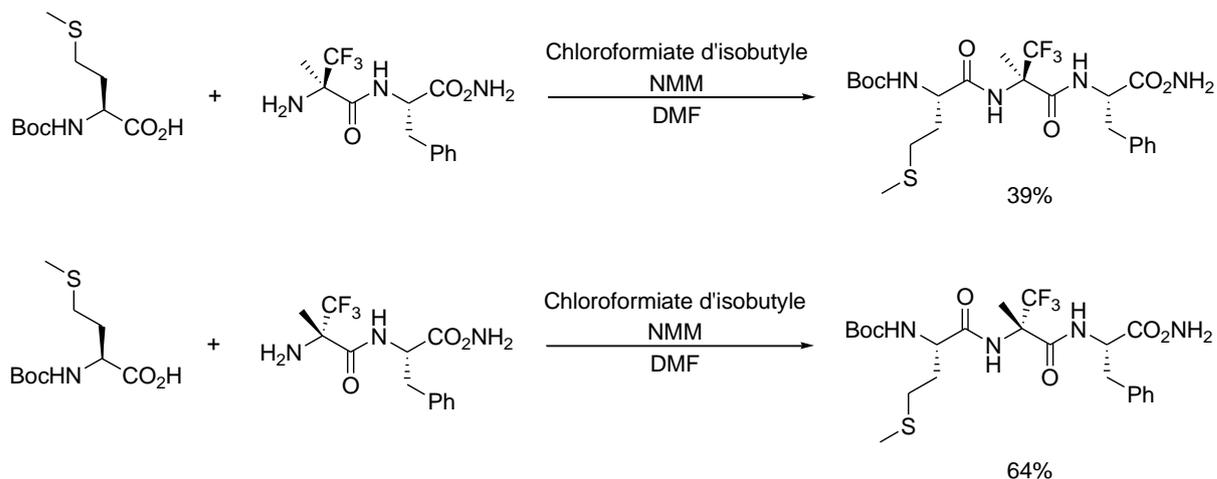


Schéma 52 : Couplage de la Boc-Met avec le dipeptide α -Tfm-Ala-Phe-NH₂

Dal Pozzo et coll. utilisent des bromures d'acyle d'acides aminés pour réaliser le couplage de la phénylalanine avec un mélange racémique d' α -Tfm-phénylalanine.^{102,103} Pour cela, ils forment le bromure d'acyle de la phénylalanine convenablement protégée sur l'azote (Pht, N₃ ou *o*-Nbs) *in situ* avec la 1-bromo-*N,N*-2-triméthyl-1-propénylamine développée par Ghose.⁸⁷ Le bromure d'acyle est ensuite ajouté à une solution d' α -Tfm-phénylalanine et de collidine dans le DCM pour conduire au dipeptide avec un bon rendement (**Schéma 53**).

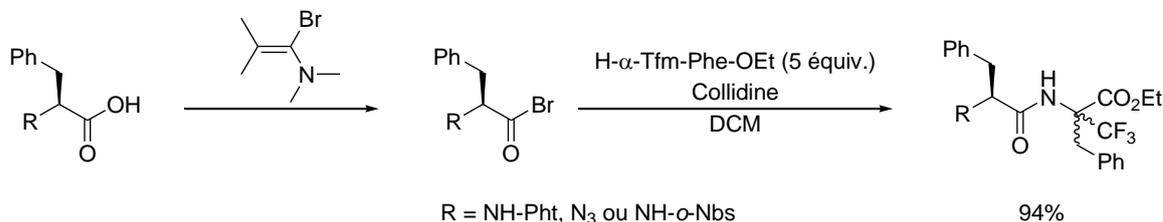


Schéma 53 : Couplage de la Phe-Br sur l'azote de l' α -Tfm-Phe

L'inconvénient de cette méthode est la nécessité de synthétiser l'acide aminé protégé et son utilisation en large excès (5 équivalents). Il faut de plus préparer la 1-bromo-*N,N*-2-triméthyl-1-propénylamine.

Au laboratoire, l'utilisation du chlorure d'acyle de la Fmoc-alanine dans le DCM en présence de diisopropyléthylamine (DIEA) a permis de réaliser le couplage sur l'azote du dipeptide α -Tfm-Ala-Leu-OBzl avec un bon rendement (**Schéma 54**).¹⁰⁰

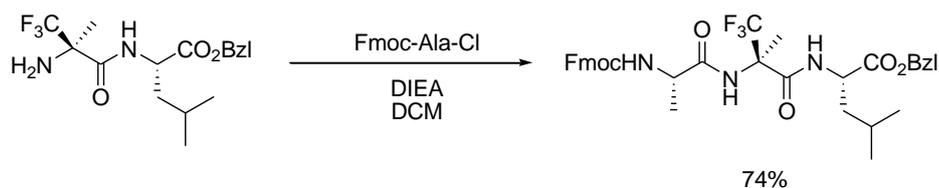


Schéma 54 : Couplage sur l'azote du dipeptide α -Tfm-Ala-Leu-OBzl

2.2. Etude méthodologique du couplage d'acides aminés fluorés : Résultats et discussion

2.2.1. Couplage avec la 2-Tfm-Proline

Comme l'ont montré les travaux antérieurs réalisés au laboratoire, il n'est pas nécessaire de protéger la fonction amine de l' α -Tfm-proline pour réaliser le couplage du coté C-terminal. Le groupement trifluorométhyle, fortement électroattracteur, en position α abaisse fortement le caractère nucléophile de l'azote. Ainsi, il est suffisamment peu réactif pour ne pas réagir lors du couplage réalisé sur l'acide carboxylique. Ceci permet d'éviter une étape de protection/déprotection habituellement nécessaire lorsque l'on réalise des réactions de couplages peptidiques. Les réactions de couplage de la 2-Tfm-proline ont donc tout d'abord été réalisées sur la position C-terminale pour profiter de cet avantage.

2.2.1.1. Le couplage C-Terminal

Afin de déterminer si les conditions de couplage conduisent à une épimérisation de l'acide glutamique, le couplage de chaque énantiomère de l' α -Tfm-proline **6** a été réalisé avec les deux énantiomères de l'acide glutamique.

L'application des conditions de couplage préalablement mises au point au laboratoire a permis de réaliser le couplage de la (*R*) et (*S*) α -Tfm-proline **6** respectivement avec les acides L et D glutamiques pour conduire aux quatre diastéréoisomères **22**, **23**, **24** et **25** (Schéma 55).

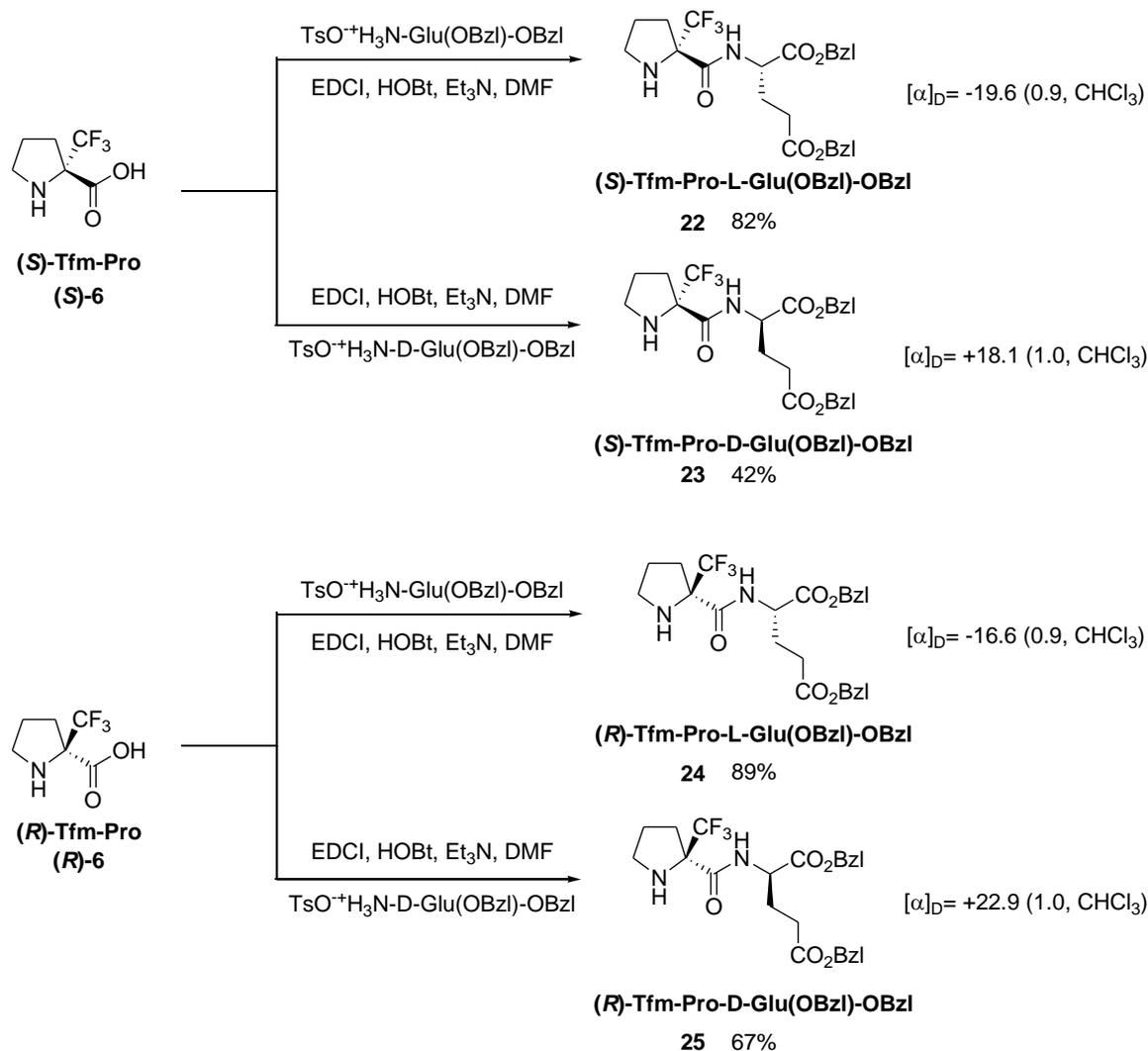


Schéma 55 : Couplage de l' α -Tfm-Pro avec l'acide glutamique

L'acide aminé trifluorométhylé est ajouté à une solution d'acide glutamique dans le DMF, en présence de HOBT/EDCI/Et₃N. Les réactions de couplages avec l'analogue non naturel de l'acide glutamique donnent de moins bon rendements, mais restent néanmoins satisfaisantes. De plus, aucune trace de dicétopipérazine ou d'épimérisation n'a été décelée. Les pouvoirs rotatoires de chacun des quatre diastéréoisomères ont été mesurés et leurs caractéristiques physico-chimiques comparées. Ainsi, chaque couple d'énantiomères a des propriétés physico-chimiques identiques et une valeur de pouvoir rotatoire opposée.

Comme expliqué précédemment, contrairement aux réactions de couplages du côté C-terminal qui ne nécessitent pas de conditions particulières, les réactions de couplages du côté N-terminal des acides aminés α -trifluorométhylés sont difficiles à cause de la forte baisse de nucléophilie induite par l'effet électroattracteur du groupement trifluorométhyle. Ces réactions de couplages sont le challenge principal de la synthèse de peptides contenant un

motif trifluorométhyle. Les exemples de la littérature sont peu nombreux et n'ont jamais été réalisés sur des acides aminés cycliques comportant une amine secondaire.

2.2.1.2. Le couplage *N*-terminal : Les anhydrides

Dans la littérature le couplage d'acides aminés trifluorométhylés est réalisé soit avec des anhydrides mixtes, soit avec des halogénures d'acyle. Nous nous sommes intéressés à la première méthode en utilisant un anhydride mixte formé avec du chloroformiate d'isobutyle et de la *Z*-glycine. Deux essais de couplages dans ces conditions ont été réalisés sur le dipeptide **22**, un dans l'acétate d'éthyle et l'autre dans le DMF. L'anhydride mixte est préparé par réaction entre le chloroformiate d'isobutyle et la *Z*-glycine en présence de *N*-méthylmorpholine (NMM) pendant 10 minutes puis le dipeptide **22** en solution est ajouté. Dans les deux cas aucun produit de couplage n'a pu être obtenu et seul le produit de départ est récupéré (**Schéma 56**).

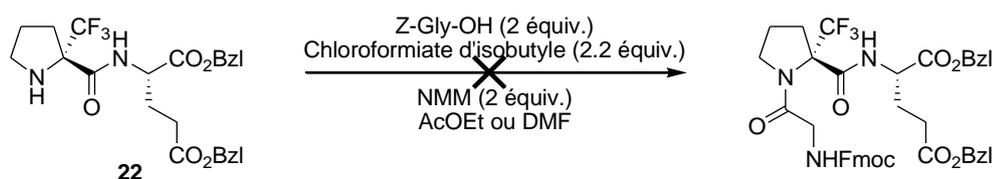


Schéma 56 : Couplage du dipeptide α -Tfm-Pro-Glu(OBzl)-OBzl avec la *Z*-Gly via la formation d'un anhydride mixte

L'utilisation d'anhydride mixte ne nous a pas semblé être adaptée pour réaliser le couplage de nos acides aminés trop peu réactifs et très encombrés. Nous avons alors décidé de nous tourner vers des méthodes de couplages mettant en jeu des espèces plus réactives tels que les halogénures d'acides. Nous avons choisi de commencer par les fluorures d'acyle qui sont souvent utilisés en synthèse peptidique pour réaliser des couplages difficiles.

2.2.1.3. Le couplage *N*-terminal : Les fluorures d'acyle

Le fluorure d'acyle de la Fmoc-glycine a été préparé avec de la trifluorotriazine dans le DCM en présence de pyridine selon la méthode d'Olah (**Schéma 57**).¹¹⁸

¹¹⁸ Olah, G.; Nokima, M.; Kerekes, I. *Synthesis* **1973**, 487.

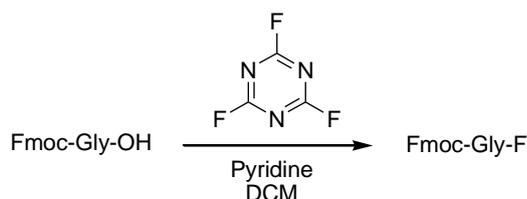


Schéma 57 : Préparation du fluorure d'acyle de la Fmoc-Gly

Un essai de couplage entre le fluorure d'acyle ainsi préparé et le peptide **22** préalablement activé, avec du *N,O*-bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA), a été réalisé (**Schéma 58**).

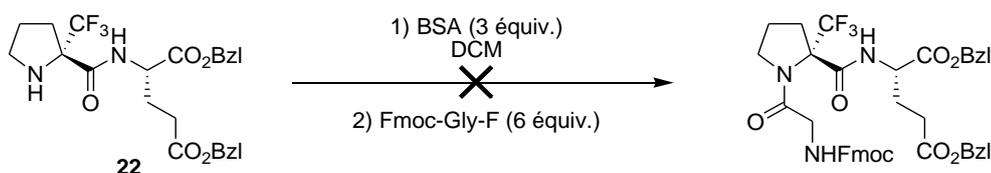


Schéma 58 : Couplage du dipeptide α -Tfm-Pro-Glu(OBzl)-OBzl avec Fmoc-Gly-F

Le dipeptide **22** est intermédiairement *N*-silylé par réaction avec le BSA dans le DCM, ce qui permet d'augmenter sa réactivité vis-à-vis du fluorure d'acyle.¹¹⁹

Après 72 h de réaction à température ambiante seul le produit de départ est récupéré et aucune trace du tripeptide attendu n'est décelée. Nous n'avons pas poursuivi l'étude des fluorures d'acyle après cet échec. En effet, il nous a paru plus judicieux d'essayer les chlorures d'acyle, plus réactifs, et dont la préparation est plus simple et nécessite des réactifs moins coûteux et moins toxiques. Par contre de par leur réactivité, ils peuvent être source d'épimérisation.

2.2.1.4. Les chlorures d'acyle

Dans une étude précédente réalisée au laboratoire,¹⁰⁰ le couplage du dipeptide Tfm-Ala-Leu-OBzl avec la glycine a été réalisé en utilisant le chlorure d'acyle de la glycine dans le DCM en présence de DIEA pour conduire au tripeptide correspondant avec un rendement de 74% (**Schéma 54**, p 80). Ces conditions réactionnelles ont été appliquées pour réaliser les réactions de couplages entre la Fmoc-glycine et le dipeptide **22**. Le chlorure d'acyle de la Fmoc-glycine est préparé selon la méthode décrite par Babu.¹²⁰ La Fmoc-glycine est « soniquée » avec un large excès de chlorure de thionyle dans le DCM pendant 1 heure puis

¹¹⁹ Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Winter, R.; Bienert, M.; Ionescu, D.; Carpino, L.A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *31*, 5483-5486.

¹²⁰ Kantharaju; Patil, B. S.; Babu, V.V. S. *Letters in Peptide Science*, **2002**, 227-229.

après évaporation de l'excès de chlorure de thionyle et du DCM, on additionne à ce brut réactionnel le peptide **22** en solution dans le DCM (**Schéma 59**).

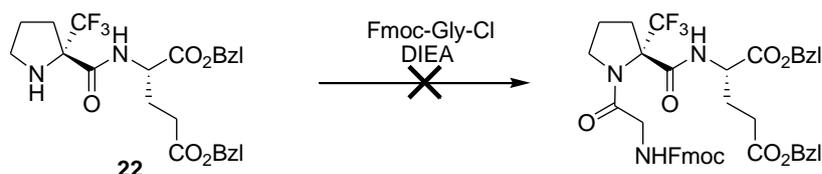


Schéma 59 : Couplage de la Fmoc-Gly avec le dipeptide α -Tfm-Pro-Glu(OBzl)-OBzl

Un premier essai, avec 2 équivalents de chlorure d'acyle en présence de diisopropyléthylamine à température ambiante pendant 24 h, a donné un résultat encourageant avec un rendement de 30%. Cependant, ce résultat s'est avéré peu reproductible. En effet de nombreuses expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions mais n'ont jamais permis d'obtenir le tripeptide attendu.

L'augmentation du nombre d'équivalent de chlorure d'acyle, l'augmentation du temps de réaction ou le chauffage n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats. Le chauffage micro-onde étant souvent utilisé dans la littérature¹²¹ pour effectuer des réactions de couplages difficiles, nous avons appliqué ces conditions à notre cas mais sans succès.

Après ces nombreuses tentatives infructueuses, nous avons pensé qu'il serait bénéfique d'isoler le chlorure d'acyle avant de l'utiliser pour nos réactions de couplage, afin d'être sûrs de sa qualité. Celui-ci est donc préparé dans les mêmes conditions que précédemment, mais au lieu d'être utilisé directement dans la réaction de couplage comme nous pouvions le faire, il est dilué dans du DCM puis précipité avec du pentane. Cette méthode présente plusieurs avantages, le chlorure d'acyle ainsi obtenu est d'une meilleure pureté et peut être stocké au réfrigérateur pendant une longue période sous atmosphère inerte. De nouvelles réactions ont alors été testées avec le chlorure d'acyle isolé par précipitation (**Tableau 3**).

Entrée	Fmoc-Gly-Cl	Base	Température	Temps	Rdt
1	2	DIEA	t.a.	24h	0% ^a
2	2	DIEA	t.a.	48h	0% ^a
3	2	DIEA	60°C	24h	15%
4	2	Sans	Micro-ondes	30 min	54%
5	2	Sans	60°C	24h	77 à 88%

^a : récupération du produit de départ

Tableau 3 : Réactions de couplage avec la Fmoc-Gly-Cl

¹²¹ Santagada, V.; Fiorino, F.; Perissutti, E.; Severino, B.; De Filippis, V.; Vivencio, B.; Caliendo, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 5171-5173.

Comme résumé dans le Tableau 3, à température ambiante, aucune réaction n'a eu lieu et seul le produit de départ est récupéré, même après 48 h de réaction (entrées 1 et 2). Le chauffage dans un tube scellé à 60°C conduit à un rendement de 15% (entrée 3). Il n'y donc aucune amélioration par rapport aux résultats précédents, obtenus sans purification du chlorure d'acyle. L'utilisation d'une base pour neutraliser l'acide chlorhydrique formé lors de la réaction, est classique dans ce type de réaction pour éviter de protoner l'azote de l'acide aminé que l'on souhaite coupler et donc garder sa réactivité. Pensant que cette base pourrait être la source de nos problèmes et comme l'azote de notre acide aminé est fortement désactivé, nous avons pensé que la formation du chlorhydrate devrait être suffisamment difficile pour que le HCl libéré dans la réaction ne soit pas problématique et nous avons donc tenté la réaction sans base. L'utilisation des micro-ondes sans base a permis d'obtenir le peptide attendu avec 54% de rendement (entrée 4). Pour vérifier que ce résultat n'était pas dû aux micro-ondes nous avons repris les conditions préalablement utilisées (entrée 3) mais sans base. Le chauffage en tube scellé sans base pendant 24h à 60°C conduit au produit attendu avec de bons rendements (entrée 5). Ces résultats sont reproductibles et le produit de couplage est obtenu avec un bon rendement allant de 77 à 88%.

Cette méthode de couplage optimisée permet d'obtenir de bons résultats, de manière reproductible et est facile à mettre en œuvre. Ainsi les tripeptides **26**, **27**, **28** et **29** sont obtenus à partir des dipeptides **22**, **23**, **24** et **25** (Schéma 60).

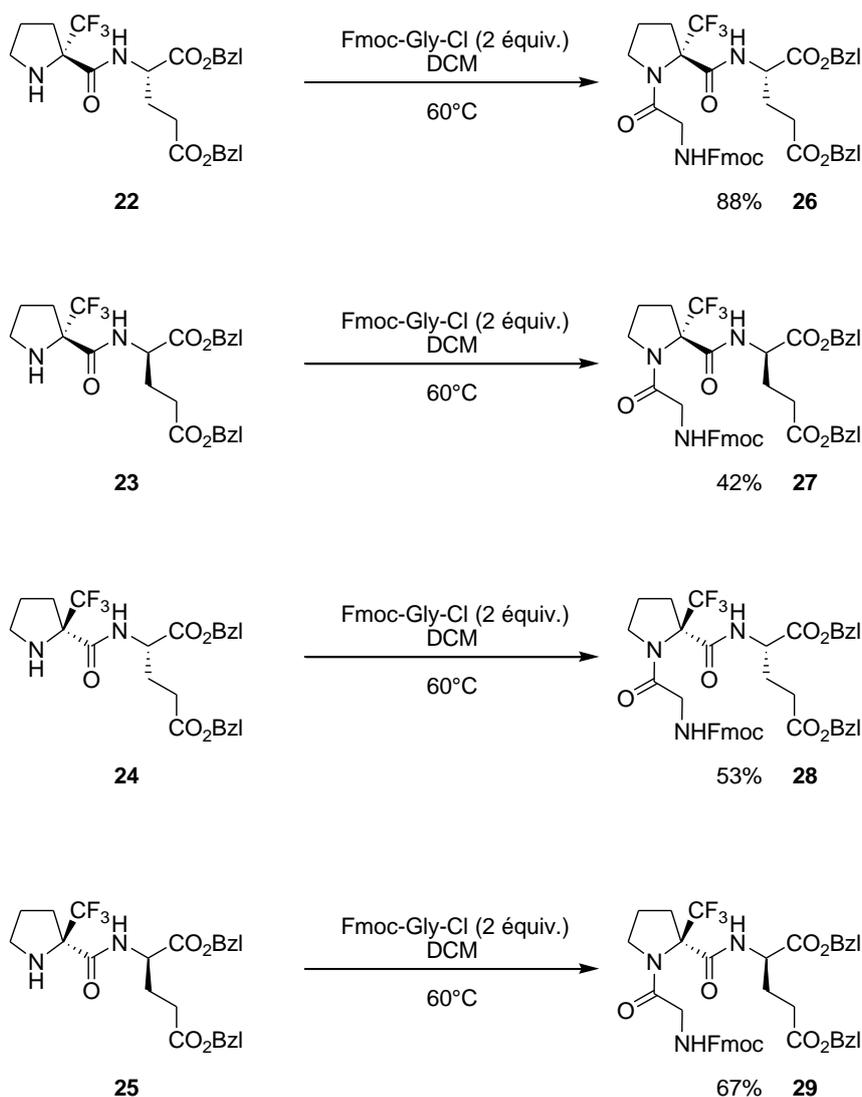


Schéma 60 : Synthèse du GPE en série 2- CF_3 -proline

La synthèse des quatre diastéréoisomères a permis de démontrer qu'aucune épimérisation n'a lieu au niveau de l'acide glutamique.

La réalisation de ces réactions de couplages a permis de lever le verrou scientifique le plus important et ainsi de pouvoir accéder au tripeptide cible en série 2- CF_3 -proline.

2.2.2. Couplage avec la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)

Les conditions de couplages sur l'azote, étant au point en série 2- CF_3 -proline, nous nous sommes ensuite intéressés au couplage de la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$) pour réaliser les analogues trifluorométhylés du GPE en série pseudoproline. Nous avons choisi de garder la même séquence réactionnelle que celle utilisée pour la proline en réalisant tout d'abord le couplage C-terminal de la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$) avec l'acide glutamique. L'intérêt de ces pseudoprolines repose sur la position du CF_3 qui devrait favoriser la conformation *cis* de la liaison amide.

2.2.2.1. Couplage C-terminal

Le couplage des deux énantiomères de la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ pro) **13** avec l'acide glutamique est réalisé dans les mêmes conditions que pour la proline, après saponification de la fonction ester par LiOH dans le THF (**Schéma 61**).

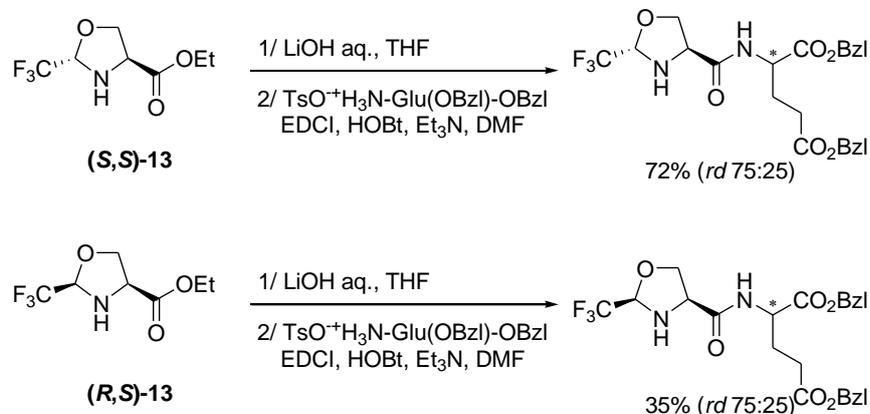


Schéma 61 : Synthèse de dipeptides N-terminaux en série pseudoproline

Ces réactions de couplage conduisent aux dipeptides attendus, mais on observe une épimérisation, qui peut avoir lieu soit sur l'acide glutamique soit sur la pseudoproline. L'épimérisation au niveau de la pseudoproline ne peut s'expliquer que par l'existence d'un équilibre entre une forme ouverte et une forme cyclique. Afin d'éviter ce phénomène nous avons choisi de changer l'ordre de la séquence de couplage et de réaliser le couplage N-terminal en premier. En effet, une étude précédente menée au laboratoire a montré que la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ pro) est plus stable et ne s'ouvre plus lorsqu'elle est acylée.

2.2.2.2. Couplage N-terminal

Des expériences préliminaires, concernant le couplage de la pseudoproline **13** avec le chlorure d'acyle de la Fmoc-alanine, en présence de diisopropyléthylamine, avaient été effectuées au laboratoire. Le dipeptide **30** est obtenu sous forme d'un mélange de diastéréoisomères. Le rapport diastéréoisomérique est le même à partir du composé (*S,S*) **13**, de (*R,S*)-**13** ou d'un mélange de diastéréoisomères (**Schéma 62**).

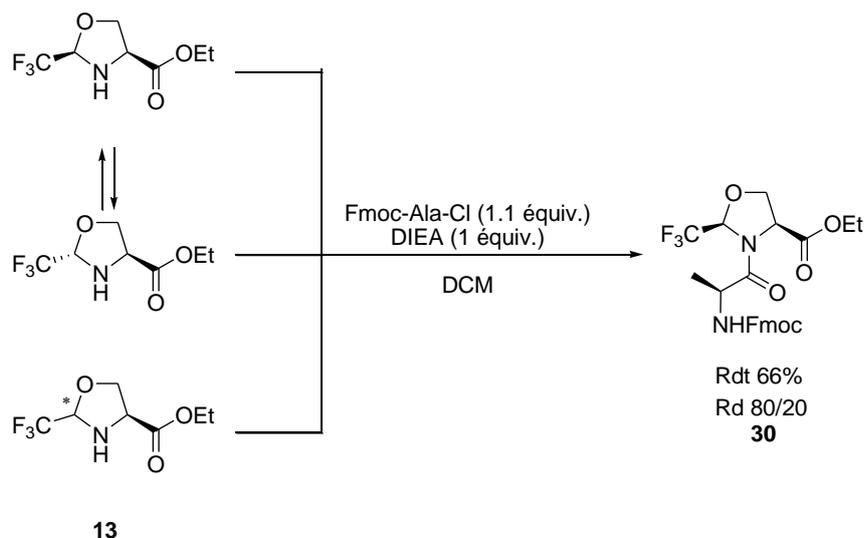


Schéma 62 : Réaction de couplage de la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro) avec la Fmoc-Ala en présence de diisopropyléthylamine

Après étude RMN (*nOe*), il s'avère que le dipeptide où la pseudoproline est de configuration *cis* (*R,S*) est dans tous les cas obtenu majoritairement. Dans un premier temps, les hypothèses les plus probables étaient que le second produit était soit le dipeptide où la pseudoproline est de configuration *trans* (*S,S*) soit qu'il y ai eu épimérisation de l'alanine, de plus amples informations développées plus tard dans ce chapitre montreront que ce n'est pas le cas. La pseudoproline peut s'ouvrir et ainsi s'épimériser au niveau du carbone portant le groupement trifluorométhyle. Comme le même rapport diastéréoisomérique est obtenu quelle que soit la configuration de l'oxazolidine de départ, cela montre que la pseudoproline de configuration *cis* réagit plus rapidement que la *trans* (**Schéma 63**).

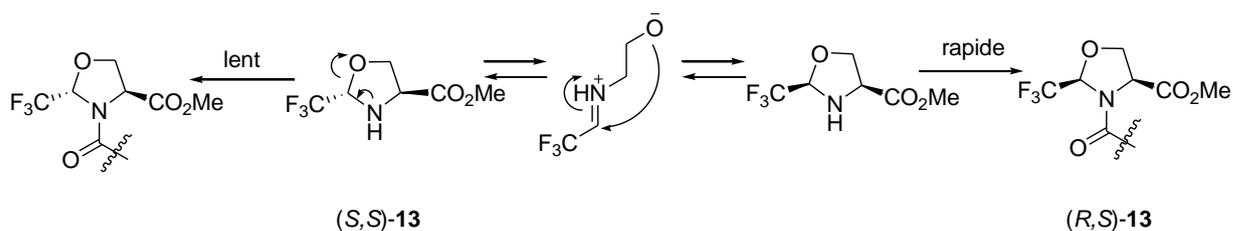


Schéma 63 : Equilibre entre les oxazolidines (*S,S*) et (*R,S*)

Nous avons appliqué la méthode de couplage développée avec la 2-Tfm-proline aux deux diastéréoisomères de la pseudoproline **13**, c'est-à-dire en présence de chlorure d'acyle mais sans base (**Schéma 64**). Le couplage de cette dernière est plus aisé que celui de la proline. Des conditions opératoires plus douces peuvent être utilisées, en effet un léger excès de 10% de chlorure d'acyle est suffisant et la réaction a lieu à température ambiante.

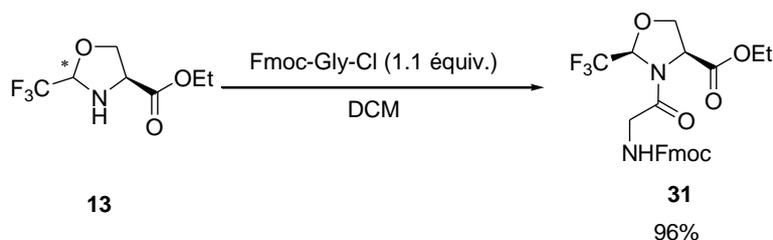


Schéma 64 : Réaction de couplage de la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro) avec la Fmoc-Gly sans base

Contrairement aux résultats obtenus en présence de base, seule la formation du dipeptide avec la pseudoproline de configuration *cis* **31** est observée à partir du composé (*S,S*)-**13**, de (*R,S*)-**13** ou d'un mélange des deux diastéréoisomères. Comme les expériences précédentes l'ont montré, il semblerait que les deux oxazolidines soient en équilibre et que l'oxazolidine (*R,S*)-**13** réagisse plus rapidement. L'oxazolidine (*S,S*)-**13** s'épimériserait, par ouverture, au niveau du carbone portant le CF_3 , pour former l'oxazolidine (*R,S*)-**13** qui réagit alors pour former le dipeptide avec la pseudoproline de configuration *cis* (Schéma 63, p 88).

La mise au point d'une synthèse rapide et efficace de pseudoprolines à l'échelle du gramme nous a permis d'envisager, en parallèle de la synthèse d'analogues du GPE, l'étude du couplage *N*-terminal d'un aminoacide trifluorométhylé avec d'autres aminoacides sous forme Fmoc-AA-Cl pour réaliser une librairie de dipeptides. Il nous a paru important de réaliser cette étude pour vérifier l'absence d'épimérisation de l'acide aminé couplé. La synthèse d'analogues du GPE ne nous permettait pas d'obtenir cette information, la glycine ne possédant pas de centre asymétrique. De plus, l'étude conformationnelle de ces dipeptides par RMN nous permettra d'obtenir des données sur l'influence possible de l'acide aminé couplé sur la nature *cis/trans* de la liaison amide (Figure 41).

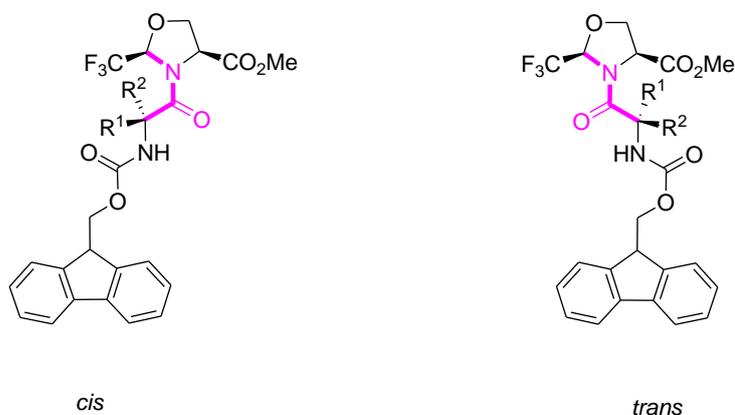


Figure 41 : Liaison amide *cis/trans*

Nous avons donc réalisé le couplage de la pseudoproline **13** avec différents chlorures d'acyle d'acides aminés tel que l'alanine, la valine, la proline, en série D et en série L (**Schéma 65**).



Schéma 65 : Couplage de chlorures d'acyle sur la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)

Le couplage des différents acides aminés protégés par un groupement Fmoc avec la pseudoproline **13** donne de bons résultats. Dans tous les cas, les acides aminés non naturels (série D) (entrées 2, 4 et 6) semblent donner de meilleurs résultats que l'analogue naturel (série L) (entrées 1, 3 et 5). L'encombrement stérique des acides aminés utilisés influence également le rendement. Ainsi, comme on peut s'y attendre, les acides aminés encombrés conduisent à un rendement inférieur (entrée 8). Pour chaque composé, le rapport *cis/trans* de la liaison amide a été déterminé par RMN (*nOe*) (**Tableau 4**).

Entrée	Dipeptides	Rdt (%)	% <i>cis/trans</i> ^a	$[\alpha]_D$	Temps de rétention (min) ^b	N° produit
1	Fmoc-L-Ala-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe	66	12:88	-81.2	5.32	30
2	Fmoc-D-Ala-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe	79	92:8	-47.5	4.96	32
3	Fmoc-L-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe	59	7:93	-74.9	4.90	33
4	Fmoc-D-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe	79	95:5	-29.9	5.78	34
5	Fmoc-L-Pro-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe	56	0:100	-56.1	8.68	35
6	Fmoc-D-Pro-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe	92	86:14	-78.0	5.84	36
7	Fmoc-Gly-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe	97	61:39	-36.0	6.47	31
8	Fmoc-Aib-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe	55	85:15	-28.4	4.29	37

^a : Rapport *cis/trans* de la liaison amide déterminé par RMN

^b : Colonne Daicel chiralpak 1A 0.46 cm * 25 cm. Débit 1 ml/min. Isocratique hexane/isopropanol 10 min

Tableau 4 : Dipeptides Fmoc-AA-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe

Nous avons également réalisé le couplage de ces chlorures d'acyle d'acides aminés sur la pseudoproline **17** issue de la D-sérine dans les mêmes conditions. Comme dans les

expériences précédentes un seul composé est obtenu, le dipeptide de configuration *cis* (Schéma 66).

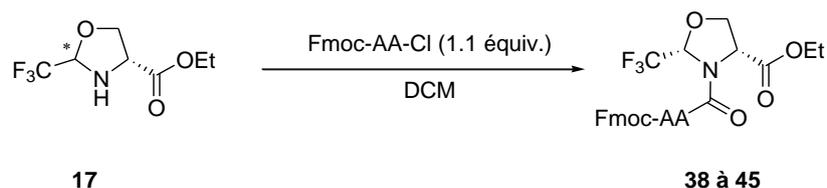


Schéma 66 : Couplage de chlorures d'acycles sur la D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)

Pour chaque composé, le rapport *cis/trans* de la liaison amide a été déterminé par RMN (*nOe*) (Tableau 5).

Entrée	Dipeptides	Rdt (%)	% <i>cis/trans</i> ^a	$[\alpha]_D$	Temps de rétention (min) ^b	N° produit
1	Fmoc-L-Ala-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)-OMe	56	92:8	+43.2	4.48	39
2	Fmoc-D-Ala-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)-OMe	73	12:88	+80.3	5.64	40
3	Fmoc-L-Val-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)-OMe	67	95:5	+30.2	-	41
4	Fmoc-D-Val-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)-OMe	53	7:93	+83.3	5.68	42
5	Fmoc-L-Pro-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)-OMe	78	86:14	+79.2	-	43
6	Fmoc-D-Pro-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)-OMe	54	0:100	+53.0	6.13	44
7	Fmoc-Gly-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)-OMe	63	61:39	+44.0	6.04	38
8	Fmoc-Aib-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)-OMe	55	85:15	+28.4	-	45

^a : Rapport *cis/trans* de la liaison amide déterminé par RMN

^b : Colonne Daicel chiralpak 1A 0.46 cm * 25 cm. Débit 1 ml/min. Isocratique hexane/isopropanol 10 min

Tableau 5 : Dipeptides Fmoc-AA-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)-OMe

Dans tous les cas, les réactions de couplage ont lieu sans épimérisation de l'acide aminé couplé et avec de bons rendements. Chaque composé a été caractérisé et les différents énantiomères ont bien des caractéristiques physico-chimiques identiques, un pouvoir rotatoire de signe opposé et un temps de rétention différent en HPLC chirale.

La synthèse des différents diastéréoisomères du dipeptide Fmoc-Ala-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)-OMe et leur caractérisation complète ont permis de déterminer de façon certaine que le composé minoritaire obtenu lors du couplage en présence de base n'est pas la pseudoproline de configuration *trans* (Schéma 62, p 88). En fait, le composé isolé est le même que celui obtenu en couplant la Fmoc-alanine avec la D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)-OMe. Pour expliquer ce résultat on peut supposer que la base provoque l'épimérisation du carbone en α de l'ester. Ensuite, il y a

ouverture/fermeture de la pseudoproline avec épimérisation du centre en α du CF_3 ce qui conduit à l'oxazolidine *cis* énantiomère et comme l'ont montré les résultats précédents (**Schéma 63**, p 88) seule cette dernière réagit, ce qui permet de déplacer l'équilibre (**Schéma 67**).

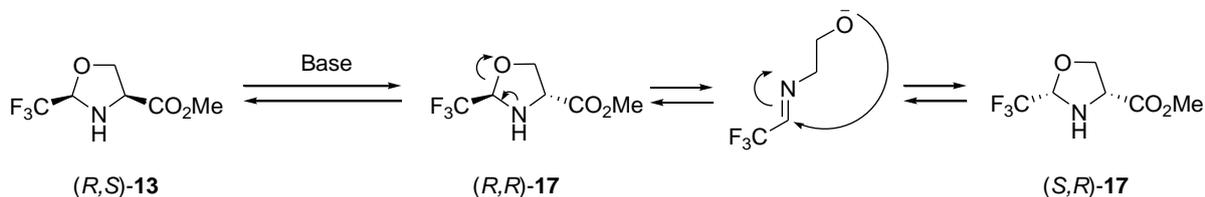


Schéma 67 : Epimérisation de la Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}\text{Pro}$)

En ce qui concerne la conformation de la liaison peptidique, il semble que la nature *cis/trans* de la liaison peptidique dépend fortement de l'acide aminé couplé.

Ainsi sur la pseudoproline issue de la L-sérine, la présence d'un groupement R^2 différent de H (acides aminés de la série D et Aib) semble favoriser fortement la conformation *cis* (entrées 2, 4, 6 et 8, **Tableau 4**). L'existence d'un groupement R^1 différent de H (acide aminé de la série L) favorise la conformation *trans* (entrées 1, 3 et 5, **Tableau 4**). L'absence de contrainte sur les groupements R^1 , R^2 , dans le cas de la glycine, conduit à une liaison peptidique dont la conformation *cis* est légèrement avantagée (61% de *cis*) (entrée 7, **Tableau 4** et **Tableau 5**). En ce qui concerne la pseudoproline issue de la D-sérine, les résultats sont identiques avec ceux de la L-sérine lorsque les groupements R^1 , R^2 sont identiques puisque les composés obtenus sont énantiomères (glycine, Aib) (entrées 7 et 8, **Tableau 5**). Les rapports *cis/trans* sont inversés dans les autres cas (entrées 1, 2, 3, 4, 5 et 6, **Tableau 5**) (**Figure 42**).

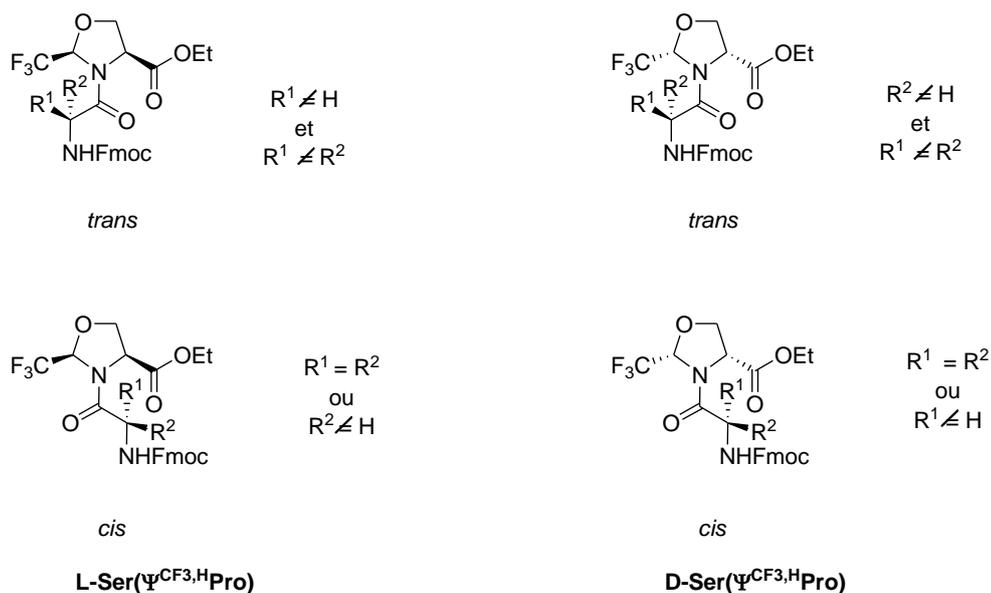


Figure 42 : Liaison amide *cis/trans* des Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}\text{Pro}$) et D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}\text{Pro}$)

Nous nous sommes ensuite intéressés au couplage C-terminal du dipeptide Fmoc-Gly-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro) avec l'acide glutamique pour réaliser le GPE en série pseudoproline.

2.2.2.3. Couplage C-terminal sur le dipeptide Fmoc-Gly-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)

La saponification du dipeptide **31** est réalisée dans des conditions douces pour ne pas cliver le groupement Fmoc. L'utilisation de soude dans un mélange isopropanol/eau en présence de chlorure de calcium permet d'effectuer la réaction de saponification et d'obtenir l'acide **46** qui est utilisé dans l'étape suivante sans purifications (**Schéma 68**).

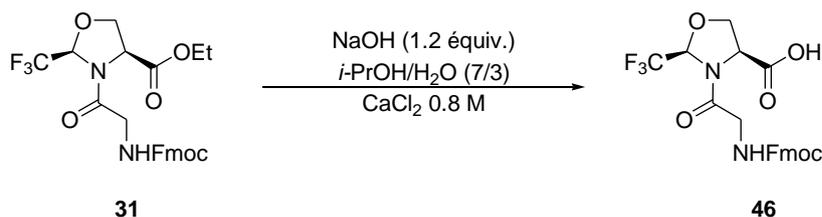


Schéma 68 : Saponification du dipeptide Fmoc-Gly-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe

Les mêmes conditions de couplage que celles utilisées pour la proline ont été mises en œuvre pour réaliser le couplage C-terminal. Ainsi, le dipeptide **46** est mis en réaction avec chaque énantiomère de l'acide glutamique, en présence de HOBt/EDCI/Et₃N dans le DMF (**Schéma 69**). Dans les deux cas, seuls des produits de dégradation ont pu être observés.



Schéma 69 : Couplage du dipeptide Fmoc-Gly-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OH avec l'acide glutamique en utilisant HOBt/EDCI

Nous nous sommes alors orientés vers d'autres réactifs de couplages tel le BOP-Cl. Le dipeptide **46**, en solution dans le DCM, est couplé avec chaque énantiomère de l'acide

glutamique, en présence de BOP-Cl et de triéthylamine, pour conduire aux tripeptides **47** et **48** (Schéma 70). Dans ces conditions aucune trace d'épimérisation n'est détectée.

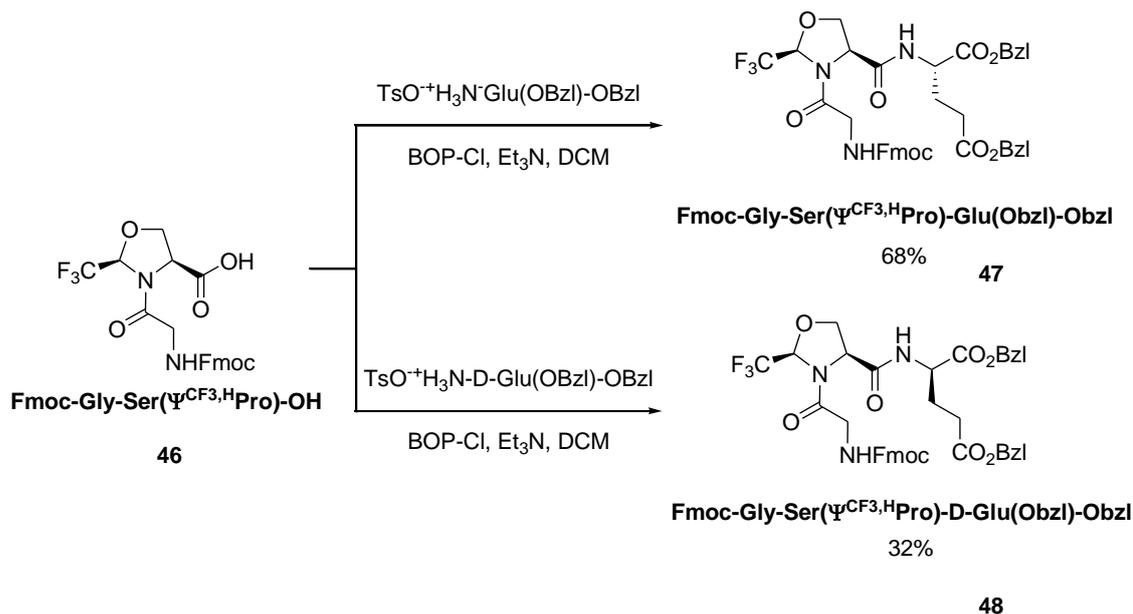


Schéma 70 : Couplage du dipeptide Fmoc-Gly-Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$)-OH avec l'acide glutamique en utilisant BOP-Cl

2.2.3. Couplage avec la Cys($\Psi^{CF_3,H}Pro$)

La même approche que celle employée pour la Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$) a été utilisée pour la Cys($\Psi^{CF_3,H}Pro$), commencer par le couplage *N*-terminal puis réaliser le couplage *C*-terminal.

2.2.3.1. Couplage *N*-terminal

Le couplage de chaque diastéréoisomère de la Cys($\Psi^{CF_3,H}Pro$) **19** a été réalisé dans les mêmes conditions que celles mise en œuvre pour le couplage de la Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$) (Schéma 71).

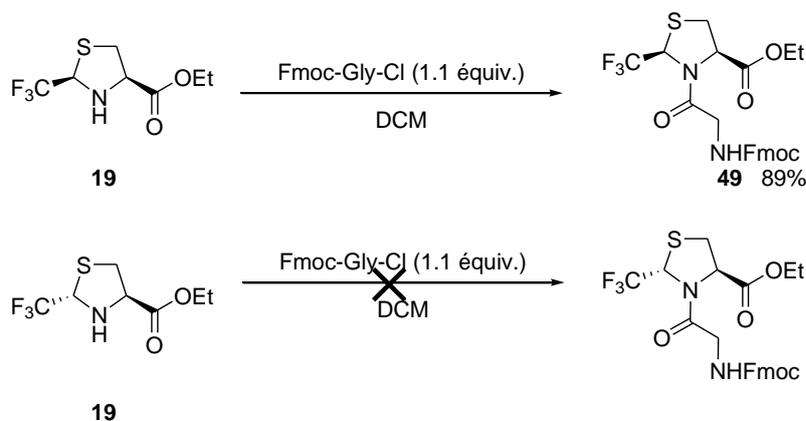


Schéma 71 : Couplage de la Fmoc-Gly-Cl sur la Cys($\Psi^{CF_3,H}Pro$)

Le couplage du diastéréoisomère *cis* avec la Fmoc-Gly-Cl conduit au dipeptide **49** attendu avec un rendement de 89%. La *trans*-Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-**19** quant à elle ne réagit pas du tout dans ces conditions, ainsi comme dans le cas de la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$) la forme *cis* est la seule à réagir et la forme *trans* ne réagit pas.

Pour passer de la forme *trans* à la forme *cis* il faut qu'il y ait ouverture de la thiazolidine. Il semblerait donc que conformément à nos attentes, cette dernière soit plus difficile à ouvrir que l'oxazolidine comme d'autres études l'ont montré en série non fluorée.¹²² L'oxazolidine et la thiazolidine *trans* ont donc été traitées par un acide de Lewis (BF_3OEt) dans le DCM. Pour l'oxazolidine, il y a bien l'ouverture/fermeture de cycle avec épimérisation du centre en α du CF_3 . Pour la thiazolidine, il n'y a pas d'ouverture du cycle et le composé *trans* est intégralement récupéré. L'utilisation d'acides de Lewis plus forts ($\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_3\text{Cl}$ et $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4$) ne conduisent pas non plus à l'épimérisation de la thiazolidine. Des acides de Lewis encore plus puissants (SnCl_4 et TiCl_4) dégradent complètement la thiazolidine (**Schéma 72**).

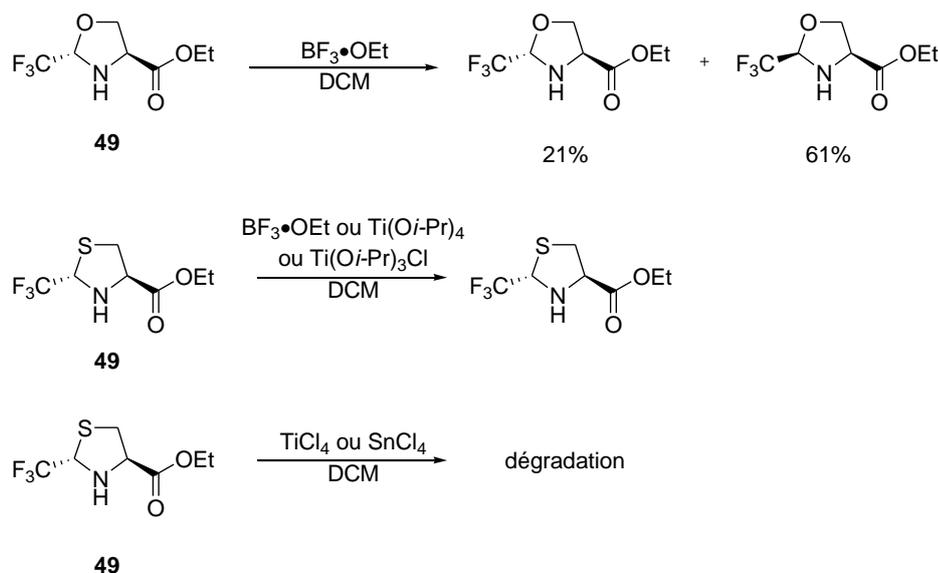


Schéma 72 : Comparaison de l'épimérisation entre la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$) et la Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)

L'augmentation du nombre d'équivalents de chlorure d'acyle et de la température n'apporte pas d'amélioration pour le couplage de la *trans*-Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$) **19**. L'utilisation de micro-ondes comme méthode d'activation ne conduit pas non plus à la formation du dipeptide.

¹²² Wöhr, T.; Wahl, F.; Nefzi, A.; Rohwedder, B.; Sato, T.; Sun, X.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218-9227.

2.2.3.2. Couplage C-terminal

La saponification du dipeptide Fmoc-Gly-Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe **49** est réalisée par de la soude dans un mélange isopropanol/eau en présence de chlorure de calcium pour conduire au dipeptide **50** (Schéma 73).

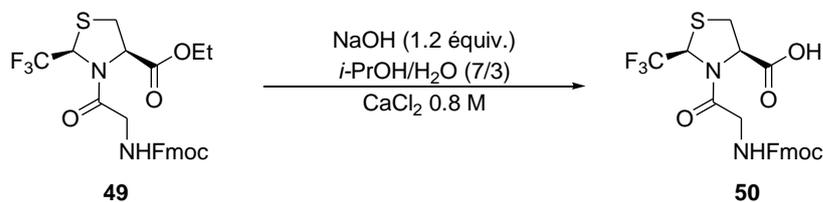


Schéma 73 : Saponification du dipeptide Fmoc-Gly-Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe

Le dipeptide Fmoc-Gly-Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OH **50** est couplé avec l'acide glutamique, en présence de HOBt/EDCI/Et₃N dans le DMF (Schéma 74).

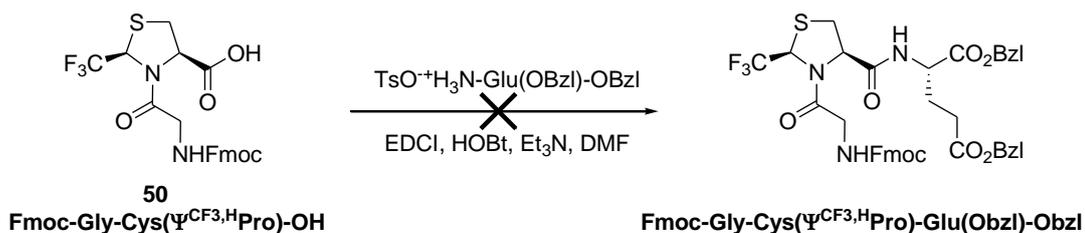


Schéma 74 : Couplage du dipeptide Fmoc-Gly-Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OH avec l'acide glutamique en utilisant HOBt/EDCI

Comme dans le cas des couplages réalisés sur les dipeptides contenant la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$), aucune trace du produit de couplage n'est décelée et seul le produit de départ est récupéré après la réaction. Nous avons essayé de remplacer le HOBt par le 2-cyano-2-(hydroxyimino)acétate d'éthyle (Oxyma Pure), mais sans succès. Nous nous sommes alors tournés vers les conditions qui nous ont permis de réaliser les couplages avec la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$), l'utilisation de BOP-Cl. Le dipeptide Fmoc-Gly-Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OH **50** est couplé avec l'acide glutamique, en présence de BOP-Cl et d'une base (triéthylamine ou diisopropyléthylamine) dans le DCM (Schéma 75).

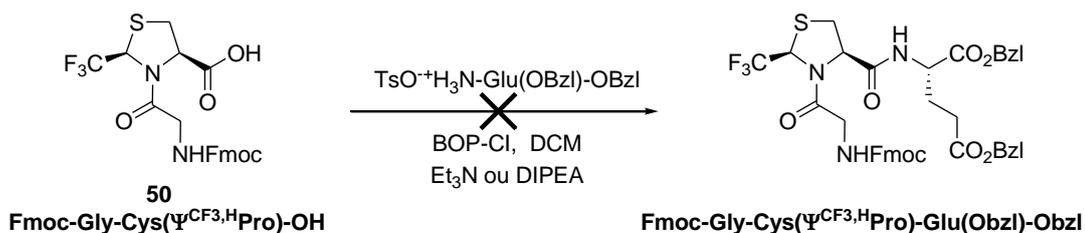


Schéma 75 : Couplage du dipeptide Fmoc-Gly-Cys(Ψ^{CF₃,H}Pro)-OH avec l'acide glutamique en utilisant le BOP-Cl

Ces conditions opératoires et après plusieurs essais, n'ont pas permis d'obtenir le tripeptide attendu, et seul le produit de départ est récupéré. Nous avons alors essayé de réaliser ce couplage en formant un anhydride mixte avec le chloroformiate d'isobutyle. La formation de l'anhydride mixte est réalisé avec le dipeptide Fmoc-Gly-Cys(Ψ^{CF₃,H}Pro)-OH **50** et le chloroformiate d'isobutyle en présence d'une base (*N*-méthylmorpholine ou triéthylamine) dans le DMF ou le DCM. L'acide glutamique est ensuite ajouté pour effectuer la réaction de couplage (**Schéma 76**).

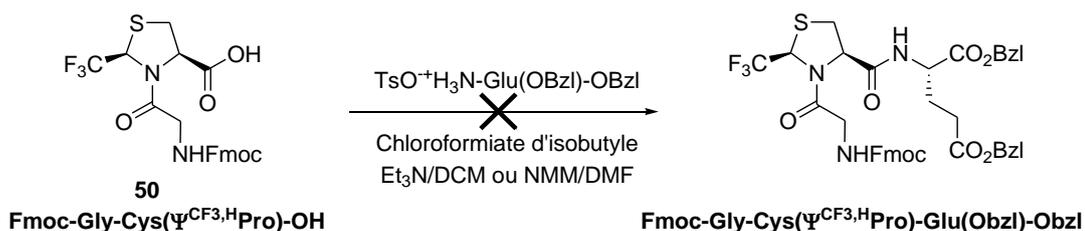


Schéma 76 : Couplage du dipeptide Fmoc-Gly-Cys(Ψ^{CF₃,H}Pro)-OH avec l'acide glutamique en utilisant l'isobutylchloroformiate

Cette méthode n'a pas permis d'obtenir la réaction de couplage attendue et seul le produit de départ est récupéré. Ce manque total de réactivité est très étonnant dans la mesure où nous n'avons pas observé de trace de tripeptide. Le cycle thiazolidine semble être responsable de ce manque de réactivité dans la mesure où en série oxazolidine nous n'avons pas rencontré de problème en utilisant l'agent de couplage BOP-Cl.

2.2.4. Couplage avec les oxazolidines

Pour réaliser les réactions de couplages sur les oxazolidines dérivées du phénylglycinol ou de l'éthanolamine, la même approche que pour la Ser(Ψ^{CF₃,H}Pro) et la Cys(Ψ^{CF₃,H}Pro) a été choisie. Le couplage *N*-terminal sera réalisé avec un chlorure d'acyle suivi du couplage *C*-terminal dans des conditions classiques.

2.2.4.1. Couplage *N*-terminal

Le couplage de l'oxazolidine **21** sous forme de mélange racémique est réalisé avec la Fmoc-Gly-Cl dans le DCM et conduit au dipeptide attendu **51** avec un rendement de 75% (**Schéma 77**).

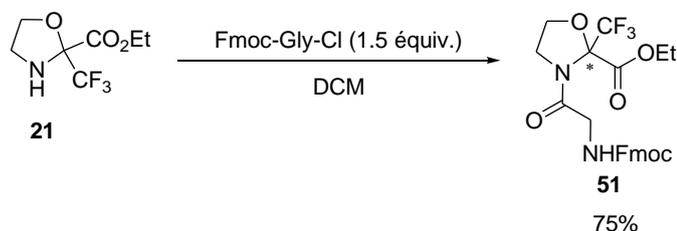


Schéma 77 : Couplage de la Fmoc-Gly-Cl sur l'oxazolidine dérivée de l'éthanolamine

Par contre le couplage de l'oxazolidine **2** est plus difficile du fait, probablement, de l'encombrement stérique généré par le groupement phényle, ainsi l'utilisation de Fmoc-Gly-Cl dans le DCM n'a pas conduit à la formation du dipeptide souhaité (**Schéma 78**).

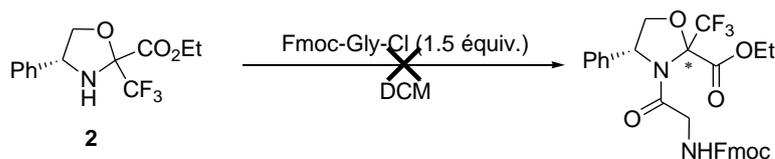


Schéma 78 : Couplage de la Fmoc-Gly-Cl sur l'oxazolidine dérivée du (*R*)-phénylglycinol

L'augmentation du nombre d'équivalents de chlorure d'acyle, de la température, l'utilisation des micro-ondes, le changement de solvant (THF, toluène) ou l'utilisation de zinc¹²³ n'ont pas permis d'obtenir le produit de couplage. L'utilisation d'espèces encore plus réactives que les chlorures d'acyle, tels que les bromures d'acyle, qui ont été utilisés dans la littérature pour effectuer des couplages très délicats, nous a paru être une alternative intéressante.¹²⁴ Pour des raisons de stratégies nous avons choisi de protéger la fonction amine de l'acide aminé à coupler par transformation en azoture. En effet le peptide final pourra ensuite être obtenu par simple étape d'hydrogénation.

La N_3 -glycine a été facilement synthétisée en suivant le protocole décrit par Lundquist, c'est-à-dire par action de NaN_3 sur l'acide bromoacétique dans le DMSO.¹²⁵ Pour avoir accès

¹²³ Gopi, H. N.; Babu, V. V. S *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9769-9772.

¹²⁴ DalPozzo, A.; Bergonzi, R.; Ni, M. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 3925-3927.

¹²⁵ Lundquist, J. T.; Pelletier, J. C. *Org. Lett.* **2001**, 3, 781-783.

au bromure d'acyle correspondant, la 1-bromo-*N,N*-2-triméthyl-1-propénylamine a été synthétisée selon la méthode développée par Ghosez (**Schéma 79**).⁸⁷

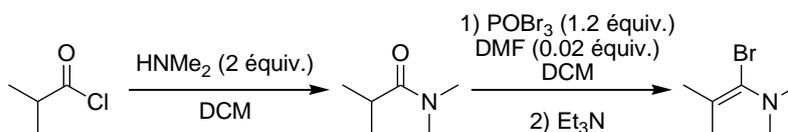


Schéma 79 : Synthèse de la 1-bromo-*N,N*-2-triméthyl-1-propénylamine

Une réaction d'amination du chlorure d'isobutyryle par la diméthylamine dans le DCM permet d'obtenir la *N,N*-2-triméthyl-1-propénylamine. Celle-ci conduit à la 1-bromo-*N,N*-2-triméthyl-1-propénylamine, après sa bromation par du POBr₃ en présence d'une quantité catalytique de DMF dans le DCM suivie d'un traitement par Et₃N.

Pour réaliser le couplage, le bromure d'acyle est préparé *in situ* par réaction de la 1-bromo-*N,N*-2-triméthyl-1-propénylamine sur la N₃-glycine dans le DCM à 0°C pendant 15 minutes, puis l'oxazolidine **2** est ajoutée. Que ce soit avec 3 ou 5 équivalents de N₃-Gly-Br, en présence ou non de collidine (2,4,6-triméthylpyridine) en tant que base, aucune réaction de couplage n'a été détectée même après 24h d'agitation (**Schéma 80**).

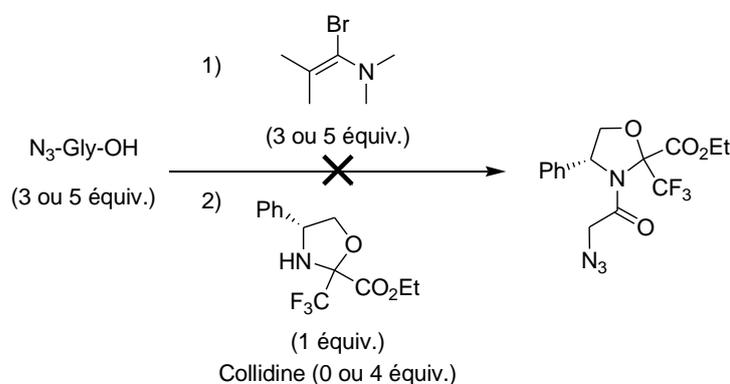


Schéma 80 : Couplage de N₃-Gly-Br sur l'oxazolidine dérivée du (*R*)-phénylglycinol

Afin de vérifier que le problème ne provenait pas de la formation du dérivé bromé nous avons réalisé un piégeage par du MeOH. Nous avons bien obtenu le produit de méthanolyse attendu. Les réactifs ne semblent donc pas être la cause de ce manque de réactivité mais cela est probablement dû à l'encombrement stérique très important.

2.2.4.1. Couplage C-terminal

Après saponification de l'ester éthylique du dipeptide **51** par de la soude dans un mélange isopropanol/eau en présence de chlorure de calcium, l'acide **55** correspondant est obtenu. Le

couplage de ce dernier est réalisé dans le DCM en présence de BOP-Cl et de triéthylamine pour conduire au tripeptide protégé **56** avec un rendement de 52%. Deux diastéréoisomères sont obtenus dans un rapport 57/43. Aucune épimérisation au niveau de l'acide glutamique n'a été observé (**Schéma 81**).

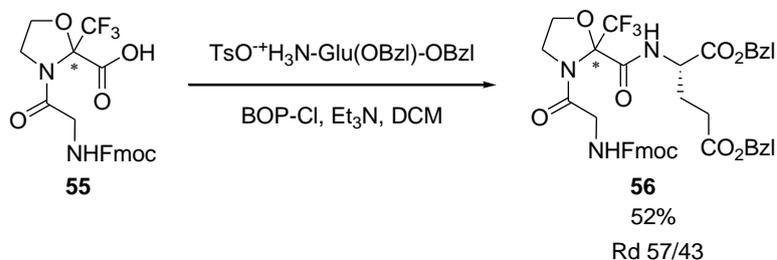


Schéma 81 : Couplage de l'acide glutamique avec le dipeptide Fmoc-Gly-1,3-oxazolidine

Les deux diastéréoisomères sont séparables par chromatographie sur gel de silice.

2.2.5. La synthèse sur support solide (SPPS)

Une brève étude du couplage de nos acides aminés fluorés par SPPS a été réalisée au cours d'une collaboration avec le laboratoire PeptLab situé à Florence. L'objectif était de tester la faisabilité de l'incorporation d'acides aminés trifluorométhylés dans un peptide *via* la SPPS, ce qui n'avait pas encore été réalisé à notre connaissance. Ce travail nous a paru intéressant à réaliser étant donné l'importance de la SPPS dans la synthèse peptidique depuis sa création par Robert Bruce Merrifield. Le principe de la SPPS est de lier l'acide aminé de l'extrémité C-terminale sur des petites billes de polymères insolubles. L'acide aminé N-protégé à coupler est ensuite ajouté en excès avec les agents de couplages. Le peptide formé est facilement séparé des réactifs par simple filtration. Après déprotection du groupement protecteur de l'amine, l'acide aminé suivant peut être couplé selon la même méthode. La SPPS permet de réaliser rapidement et de manière automatisée des peptides qui seront clivés de la résine en fin de synthèse.

2.2.5.1. Couplage de la CF₃-Alanine avec le décapeptide FLAPYGWML

Les premiers essais de couplage ont été réalisés sur un décapeptide (FLAPYGWML) (**Figure 43**) greffé sur une résine Wang (**Figure 44**). Le choix de ce décapeptide s'explique pour des raisons de disponibilité.

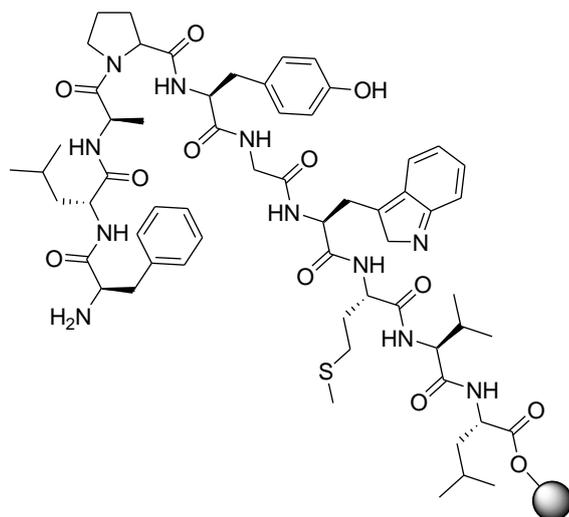


Figure 43 : Décapeptide FLAPYGWMLV

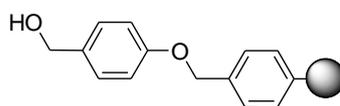


Figure 44 : Résine Wang

La réaction de couplage entre le décapeptide et l'alanine trifluorométhylée a été effectuée dans des conditions classiques de SPPS pour conduire majoritairement au produit attendu (Schéma 82).

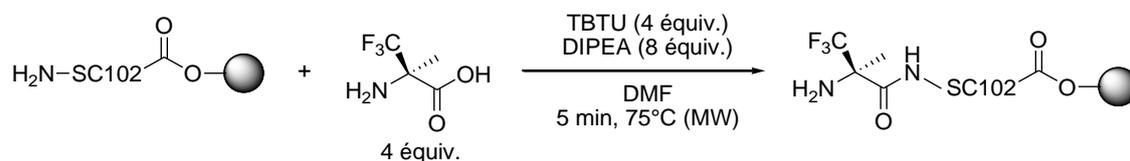


Schéma 82 : Couplage de l' α -Tfm-Ala avec le décapeptide FLAPYGWMLV

L'analyse du chromatogramme LC/MS, a permis de détecter, en plus du produit attendu (90%), la présence d'un produit comportant deux Tfm-Alanine (5%) et un second produit contenant trois Tfm-alanine (traces) ainsi que du produit de départ n'ayant pas réagi (5%). La formation de produits issus de multiples couplages successifs est problématique, cependant la forte différence de temps de rétention en LC/MS (de l'ordre de la minute) entre le produit de monocouplage et celui de dicouplage laisse envisager une séparation aisée de ces composés. Ce résultat semble indiquer que l'amine de l'alanine trifluorométhylée est assez réactive dans ces conditions pour réagir avec un autre équivalent d'alanine trifluorométhylée, dont la fonction acide est activée par la présence du groupement trifluorométhyle. Ce premier résultat

est très intéressant puisque c'est à notre connaissance le premier couplage réalisé avec un α -Tfm-AA en SPPS.

2.2.5.2. Couplage du peptide contenant la CF_3 -Alanine avec de la Fmoc-Glycine

Le couplage du peptide obtenu avec de la Fmoc-glycine a été réalisé dans le DMF suivant deux méthodes, soit l'utilisation de TBTU, soit d'un chlorure d'acyle (**Schéma 83**).

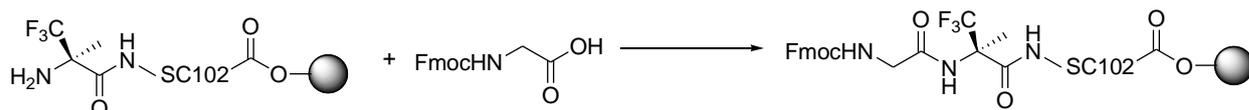


Schéma 83 : Couplage de la Fmoc-Gly sur le peptide α -Tfm-Ala-FLAPYGWMVL

L'azote de l'alanine étant fortement désactivé par la présence du groupement CF_3 , l'utilisation de réactif de couplage classique (TBTU/DIPEA) n'a donné aucun résultat malgré le très large excès employé (entrée 1). L'ajout de chlorure d'acyle sans base (entrées 2 et 3) conduit à la formation du peptide attendu. La conversion reste faible mais ces résultats préliminaires sont encourageants, le solvant utilisé (DMF) n'étant peut être pas le plus approprié pour l'utilisation de chlorures d'acyle.

Entrée	Aminoacide	Amino acide (équiv.)	TBTU (équiv.)	DIPEA (équiv.)	Temps	°C	conversion LCMS (%)
1	Fmoc-Gly-OH	20	20	40	5 min	75	0
2	Fmoc-Gly-Cl	4	0	0	5 min	75	5
3	Fmoc-Gly-Cl	20	0	0	10 min	60	20

Tableau 6 : Couplage de la Fmoc-Gly sur le peptide α -Tfm-Ala- FLAPYGWMVL

Après ces premiers résultats, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un tripeptide. La trifluorométhylproline étant moins réactive que la trifluorométhylalanine, la synthèse du tripeptide GAE a dans un premier temps été envisagée.

2.2.5.3. Couplage de la CF_3 -Alanine avec l'acide glutamique greffé

Le couplage de l'acide glutamique, greffé sur une résine Wang, avec la Tfm-alanine a été réalisé dans des conditions classiques pour conduire au composé attendu (**Schéma 84**).

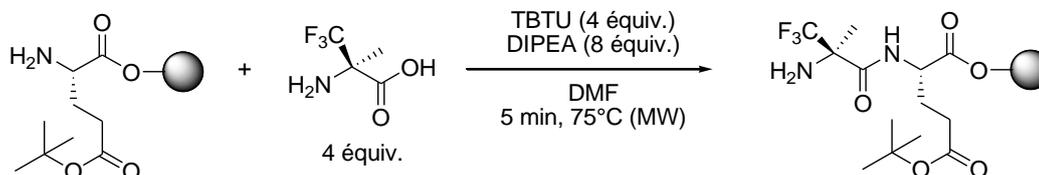


Schéma 84 : Couplage de l' α -Tfm-Ala avec l'acide glutamique greffé

Afin de déterminer si la réaction de couplage est totale nous avons réalisé un test de Kaiser. En effet celui-ci permet de déterminer s'il reste des fonctions amines libres (**Annexe 2**, p 208). Un blanc a été réalisé avec l' α -Tfm-alanine pour voir si l'azote désactivé réagissait ou non. Le témoin reste négatif en présence de l' α -Tfm-alanine. Le résultat négatif du test effectué après la réaction de couplage indique donc qu'il ne reste plus de fonction amine libre autre que celle de l'alanine et que le couplage est total. L'injection directe de la solution après clivage de la résine a permis l'observation du produit en LC/MS (**Figure 45**).

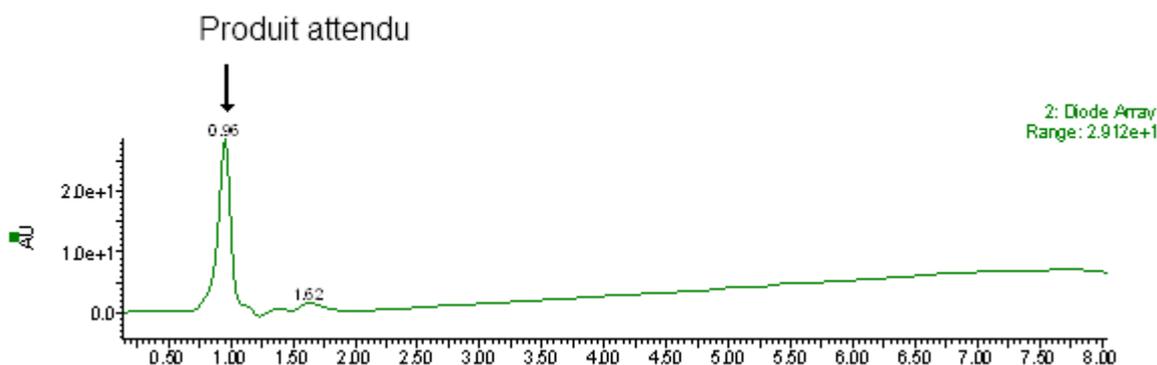


Figure 45 : Chromatogramme du couplage de l' α -Tfm-Ala avec l'acide glutamique greffé

2.2.5.4. Couplage du dipeptide CF_3 -Alanine-acide Glutamique avec la Fmoc-Glycine

L'utilisation d'un large excès de Fmoc-Gly-Cl et un temps de réaction de 2 heures, ont permis d'observer le peptide attendu (**Schéma 85**). Après clivage du groupement Fmoc en utilisant un mélange DMF/pipéridine (20%), le composé déprotégé a été détecté en LC/MS. Malgré la très faible conversion (10%) ce résultat reste néanmoins prometteur puisqu'il est le seul connu à ce jour et à notre connaissance.

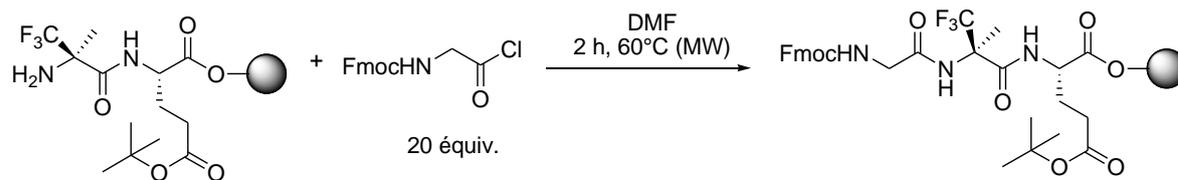


Schéma 85 : Couplage de la Fmoc-Gly avec le dipeptide α -Tfm-Ala-Glu

Nous avons également voulu tester le couplage en condition SPPS de l' α -Tfm-Proline et ainsi vérifier si la proline, qui possède un azote secondaire et qui est plus difficile à coupler, était une limitation de la méthode. Le couplage de l'acide glutamique greffé sur une résine Wang avec la trifluorométhyle proline a été réalisé dans des conditions classiques pour conduire au peptide attendu (**Schéma 86**).

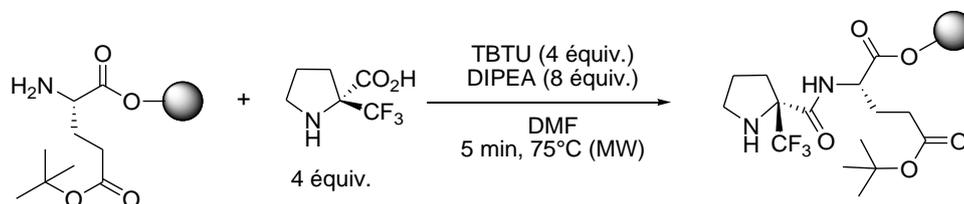


Schéma 86 : Couplage de l' α -Tfm-Pro avec l'acide glutamique greffé

Comme dans le cas de l'alanine le test de Kaiser indique l'absence de groupement amine libre sur la résine, l'injection directe de la solution après clivage a permis l'observation du produit attendu en LC/MS (**Figure 46**).



Figure 46 : Chromatogramme du couplage de l' α -tTm-Pro avec l'acide glutamique greffé

2.2.5.5. Couplage du dipeptide CF_3 -Proline-acide Glutamique avec la Fmoc-Glycine

Le dipeptide est mis en jeu dans une réaction de couplage avec la Fmoc-Gly-Cl. Malgré le fort excès utilisé et le temps de réaction de 20 minutes, aucun produit n'a pu être décelé en LC/MS (**Schéma 87**).

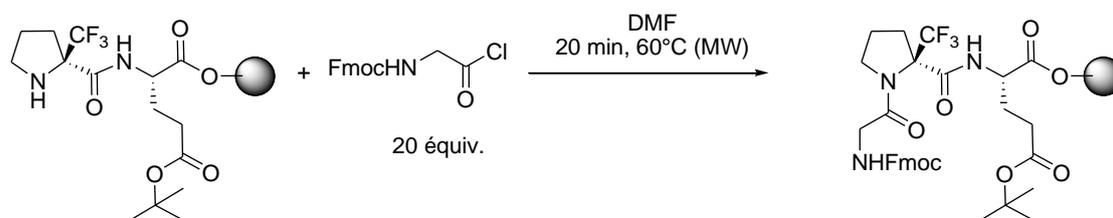


Schéma 87 : Couplage de la Fmoc-Gly avec le dipeptide α -Tfm-Pro-Glu

Ce résultat n'est pas étonnant car, comme pour les réactions en solution, le couplage du côté *C*-terminal ne présente pas de problème majeur et peut être réalisé dans des conditions standards. Mais le couplage du côté *N*-terminal est très délicat du fait de l'encombrement stérique et de l'utilisation de la proline portant une fonction amine secondaire. Une des alternatives pour contourner ce problème sera d'effectuer le couplage *N*-terminal en solution, puis d'utiliser le dipeptide obtenu en SPPS.

2.2.6. Etude structurale des dipeptides Fmoc-AA-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe par RMN

Cette étude RMN a été réalisée en collaboration avec Emeric Miclet du laboratoire des biomolécules à l'université de Paris 6 (UMR 7203).

2.2.6.1. Détermination de la conformation de cycle de la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)

Les pseudoprolines Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$) sont définies par les angles (ω , ω' , ϕ , ψ , χ_1 , χ_2 , χ_3 et χ_4) comme le montre la figure ci-dessous (**Figure 47**).

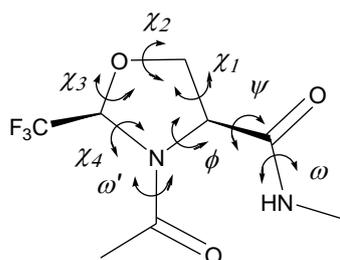


Figure 47 : Représentation d'une pseudoproline

Elles peuvent adopter deux conformations (O_γ *exo* et O_γ *endo*) aussi appelées respectivement plissement de cycle haut et bas (*up-puckering* et *down-puckering*) (**Figure 48**).

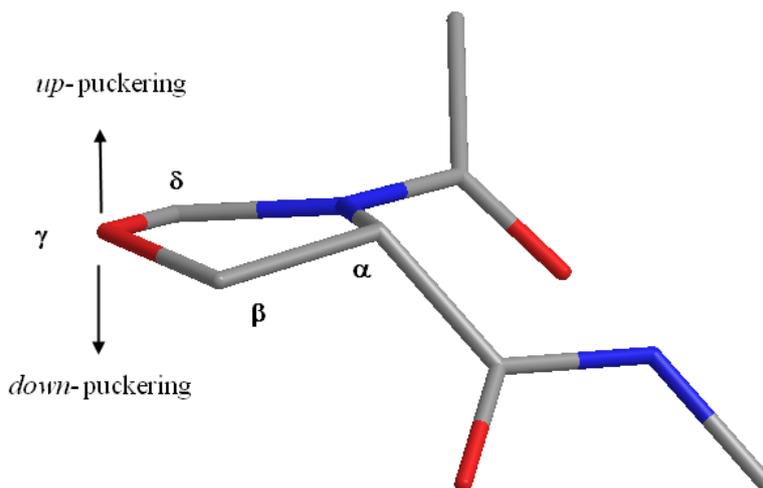


Figure 48 : Puckering des pseudoprolines

La détermination de la conformation du cycle est effectuée par RMN 1D en comparant les constantes de couplage $^3J_{H_\alpha H_{\beta 2}}$ et $^3J_{H_\alpha H_{\beta 3}}$. On peut voir sur la représentation de Newman ci-dessous (selon l'angle χ_1 ou axe $C_\alpha C_\beta$) que pour un *up-puckering*, l'angle entre H_α et $H_{\beta 2}$ est proche de 180° et celui entre H_α et $H_{\beta 3}$ est proche de 0° . Pour un *down-puckering*, ces angles sont relativement proches, respectivement de 90° et 0° (**Figure 49**).

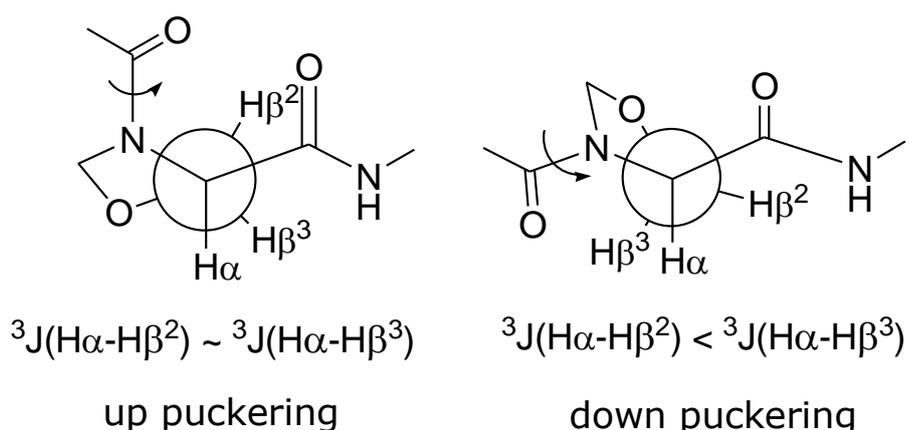


Figure 49 : Représentation de Newman des conformations de cycle up-puckering et down-puckering

La courbe de Karplus permet de relier les angles entre les protons en 3J et les constantes de couplage. Ainsi, pour un *up*-puckering les valeurs de $^3J_{H\alpha H\beta 2}$ et $^3J_{H\alpha H\beta 3}$ sont élevées (8-10 Hz) et similaires (angles proches de 0° et 180°). Par contre, pour un *down*-puckering la constante de couplage $^3J_{H\alpha H\beta 2}$ sera faible (2-4 Hz) (angle proche de 90°) et l'autre constante $^3J_{H\alpha H\beta 3}$ élevée (8-10 Hz) (angle proche de 0°) (Figure 50).¹²⁶

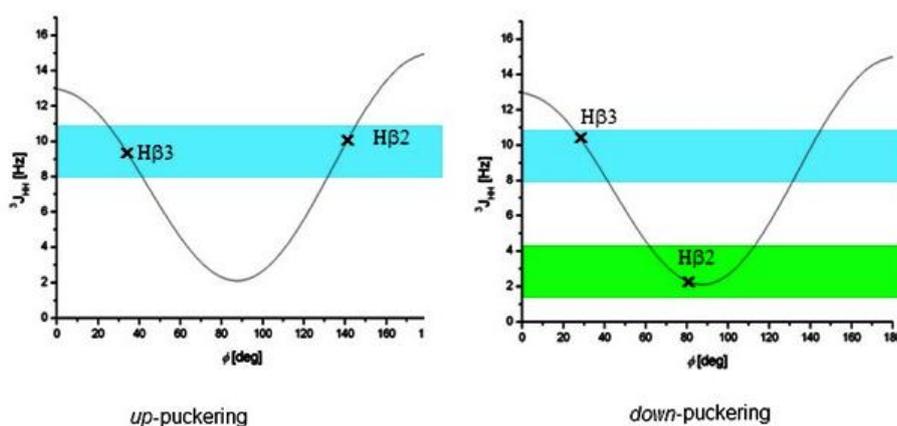


Figure 50 : Courbe de Karplus

Donc, dans le cas du *up*-puckering on a $^3J_{H\alpha H\beta 2} \approx ^3J_{H\alpha H\beta 3}$, le signal observé en RMN pour H_α sera donc de type triplet. En revanche, pour un *down*-puckering on a $^3J_{H\alpha H\beta 2} < ^3J_{H\alpha H\beta 3}$ donc le signal observé en RMN pour H_α sera plutôt équivalent à un doublet de doublet (Figure 51).

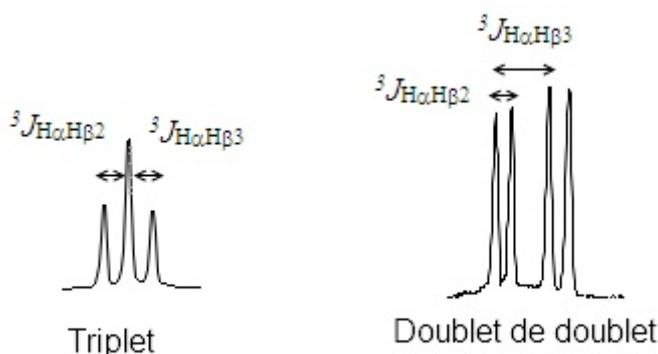


Figure 51 : Signaux RMN observé selon le puckering

On peut ainsi déterminer la conformation du cycle pseudoproline avec les constantes de couplages $^3J_{H\alpha H\beta 2}$ et $^3J_{H\alpha H\beta 3}$. Comme on peut le voir sur l'exemple ci-dessous du dipeptide

¹²⁶ Karplus, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11-15.

Fmoc-L-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe, le H_α a un signal de la forme triplet, ce qui correspond à un *up*-puckering (**Figure 52**).

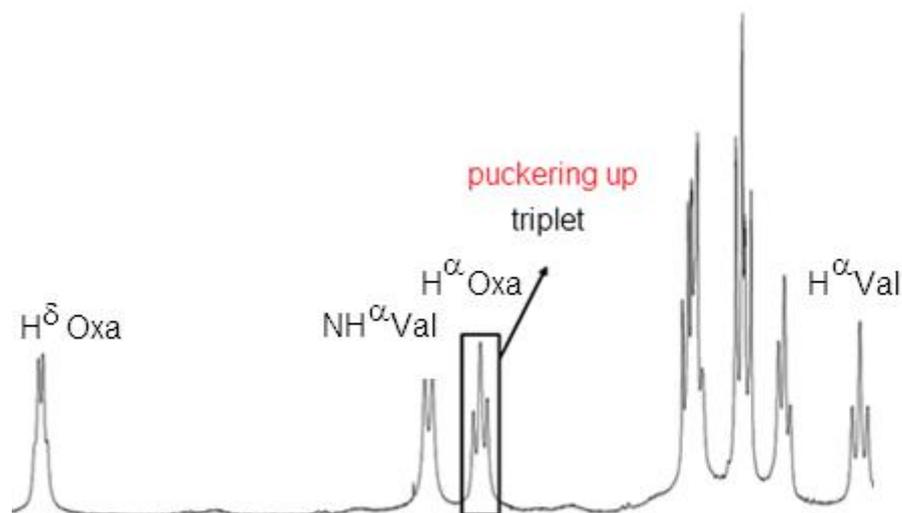


Figure 52 : Exemple de détermination du puckering avec le spectre RMN du dipeptide Fmoc-L-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe

Dans le cas du dipeptide Fmoc-D-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe, le signal observé pour H_α est équivalent à un doublet de doublet, c'est donc un *down*-puckering (**Figure 53**).

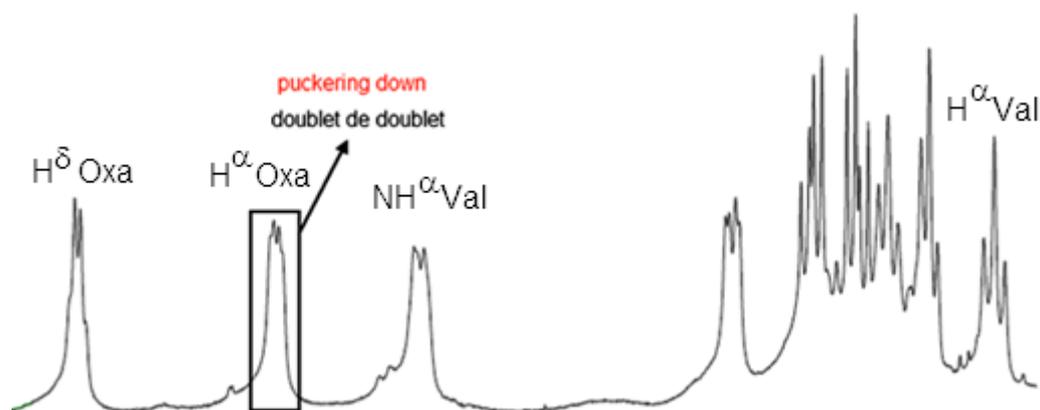


Figure 53 : Exemple de détermination du puckering avec le spectre RMN du dipeptide Fmoc-D-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe

2.2.6.2. Détermination de la configuration absolue de la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)

La détermination de la configuration absolue de la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$) a été réalisée en utilisant l'effet nucléaire Overhauser (nOe). Cette technique permet de déterminer si des protons sont plus ou moins proches dans l'espace (distance $< 5 \text{ \AA}$) en fonction de l'intensité

du signal observé. La détermination préalable du puckering est nécessaire pour aboutir à la configuration absolue. En effet, la proximité spatiale entre le H_δ et les H_β dépend à la fois de la configuration absolue du carbone portant le CF_3 et du « puckering ». Les quatre pseudoprolines possibles ont été modélisées afin d'obtenir les distances entre les protons considérés (H_δ et H_α , $H_{\beta 2}$, $H_{\beta 3}$), les valeurs sont résumées dans le tableau ci-dessous (**Figure 54**) (**Tableau 7**).

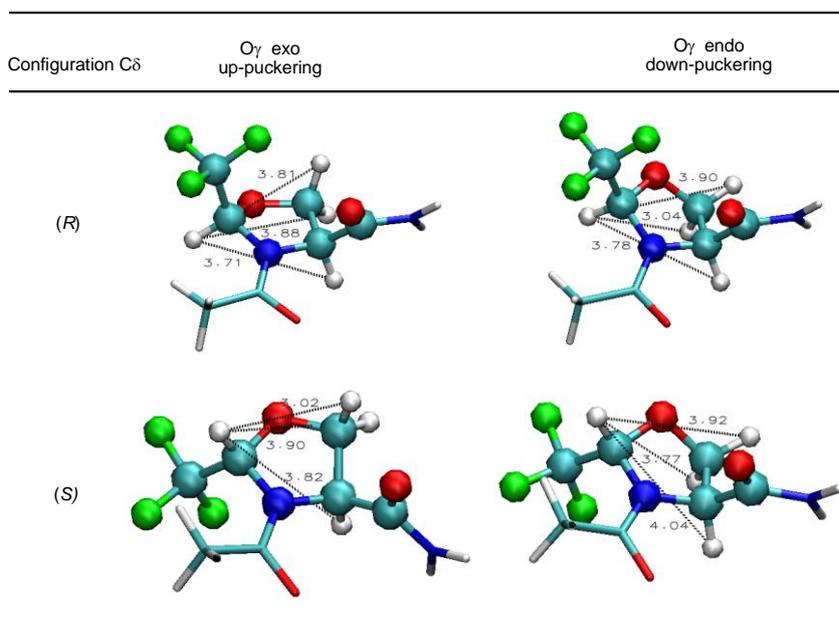


Figure 54 : nOe entre le H_δ et H_α , $H_{\beta 2}$, $H_{\beta 3}$ en fonction de la conformation du cycle Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)

Ψ Pro	2R <i>down</i>	2R <i>up</i>	2S <i>down</i>	2S <i>up</i>
3J	$^3J_{H\alpha-H\beta 3} > ^3J_{H\alpha-H\beta 2}$	$^3J_{H\alpha-H\beta 3} \approx ^3J_{H\alpha-H\beta 2}$	$^3J_{H\alpha-H\beta 3} > ^3J_{H\alpha-H\beta 2}$	$^3J_{H\alpha-H\beta 3} \approx ^3J_{H\alpha-H\beta 2}$
d (H^δ - H^α)	3.78	3.71	4.04	3.82
d (H^δ - $H^{\beta 3}$)	3.04	3.88	3.77	3.90
d (H^δ - $H^{\beta 2}$)	3.90	3.81	3.92	3.02

Tableau 7 : Distances interatomiques dans les différentes configurations et conformations de la Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)

Ainsi, dans l'exemple du dipeptide Fmoc-L-Val-L-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe qui possède un *up*-puckering, si la configuration absolue du C_δ est *S* alors $d_{H\delta-H\beta 2} < d_{H\delta-H\beta 3}$ donc on observera $I_{H\delta-H\beta 2} > I_{H\delta-H\beta 3}$ étant donné que les intensités sont inversement proportionnelles à la distance

entre les atomes. A l'inverse si la configuration absolue du C_δ est R alors $d_{H\delta-H\beta 2} \approx d_{H\delta-H\beta 3}$ on observera donc $I_{H\delta-H\beta 2} \approx I_{H\delta-H\beta 3}$. Sur le spectre RMN NOESY du dipeptide on n'observe pas de tache de corrélations pour $H_\delta-H\beta 2$ et $H_\delta-H\beta 3$ on peut donc attribuer la configuration R à C_δ . (Figure 55).

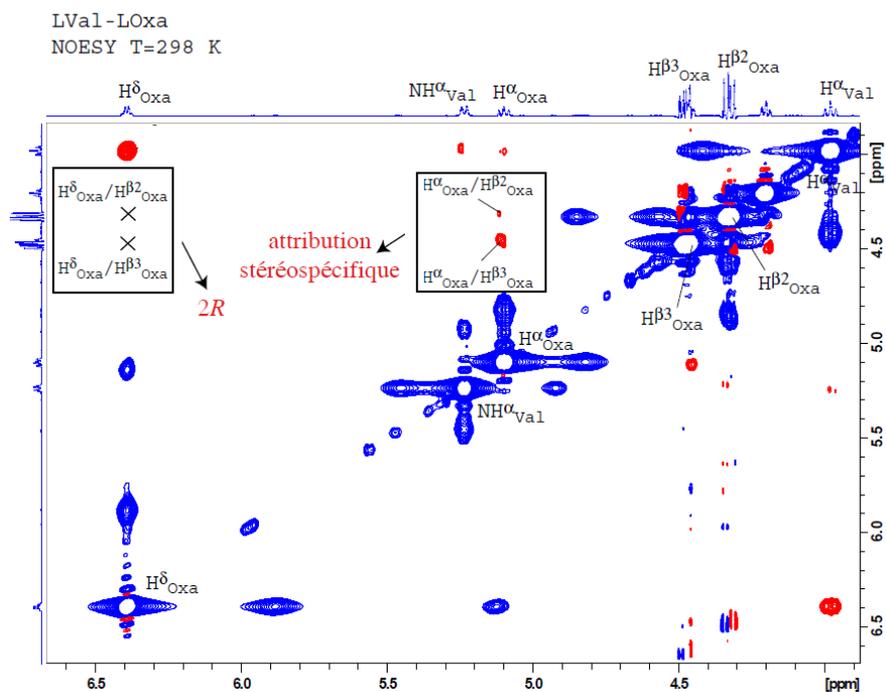


Figure 55 : Exemple de détermination de la configuration absolue avec le spectre RMN du dipeptide Fmoc-L-Val-L-Ser($\Psi^{CF_3, H}$ Pro)-OMe

De plus, d'après la modélisation, les distances $H_\alpha-H\beta 2$ et $H_\alpha-H\beta 3$ sont différentes avec $d_{H\alpha-H\beta 3} > d_{H\alpha-H\beta 2}$ dans le cas d'un *up*-puckering. De ce fait, on peut attribuer les $H\beta 2$ et $H\beta 3$ de manière stéréospécifique (Figure 56).

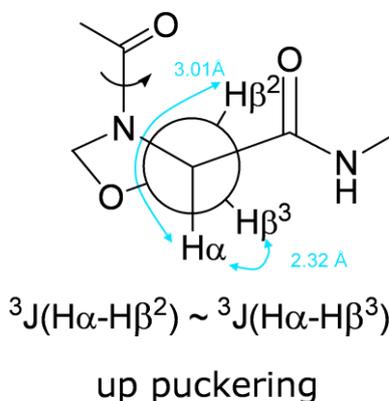


Figure 56 : Distances $H_\alpha H\beta 2$ et $H_\alpha H\beta 3$ pour un *up*-puckering

Dans le cas du dipeptide Fmoc-D-Val-L-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe qui possède un *down-puckering*, si la configuration absolue du C_δ est *S* $d_{H\delta-H\beta 2} \approx d_{H\delta-H\beta 3}$ donc $I_{H\delta-H\beta 2} \approx I_{H\delta-H\beta 3}$. Et si la configuration absolue du C_δ est *R* alors $d_{H\delta-H\beta 2} > d_{H\delta-H\beta 3}$ donc $I_{H\delta-H\beta 2} < I_{H\delta-H\beta 3}$. On observe cette fois ci deux signaux de corrélations d'intensité différente. Ainsi, la configuration absolue du centre C_δ est *R* et l'attribution stéréospécifique $H_{\beta 2}$ et $H_{\beta 3}$ est faite en fonction de l'intensité ($I_{H\delta-H\beta 2} < I_{H\delta-H\beta 3}$) (**Figure 57**).

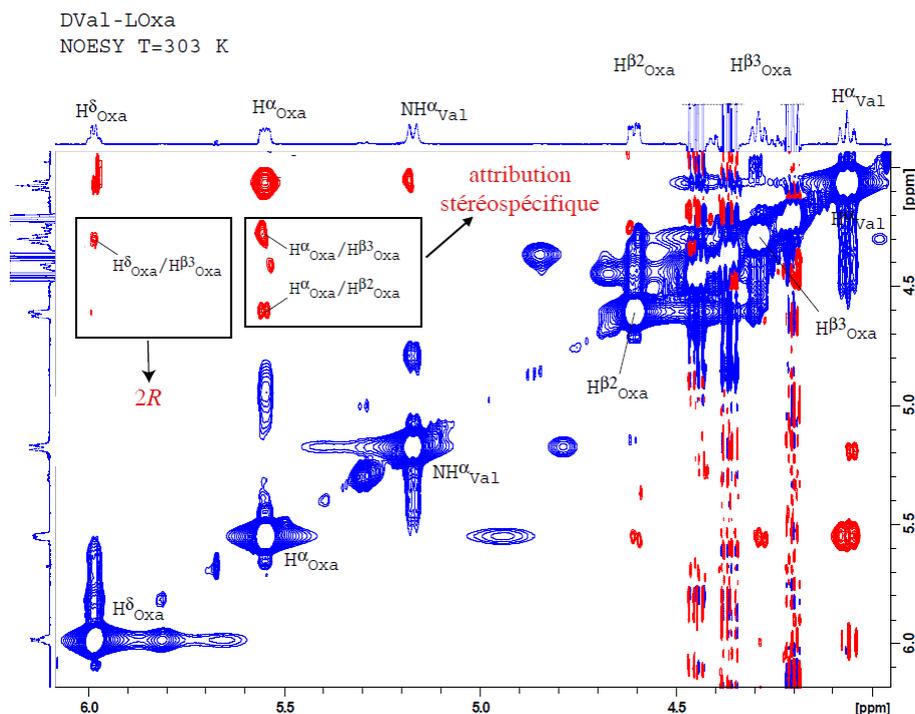


Figure 57 : Exemple de détermination de la configuration absolue avec le spectre RMN du dipeptide Fmoc-D-Val-L-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe

2.2.6.3. Détermination de l'isomérisie *cis/trans* de la liaison amide des dipeptides Fmoc-AA-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe

La détermination de l'isomérisie *cis/trans* de la liaison amide a été effectuée par RMN grâce à l'effet nucléaire Overhauser. En effet, on peut observer une proximité spatiale entre le proton H_δ de la pseudoproline et le proton H_α de l'autre acide aminé lorsque la liaison amide est *trans*. Lorsque la liaison amide est *cis* le proton H_α de l'autre acide aminé est proche dans l'espace du proton H_α de la pseudoproline (**Figure 58**).

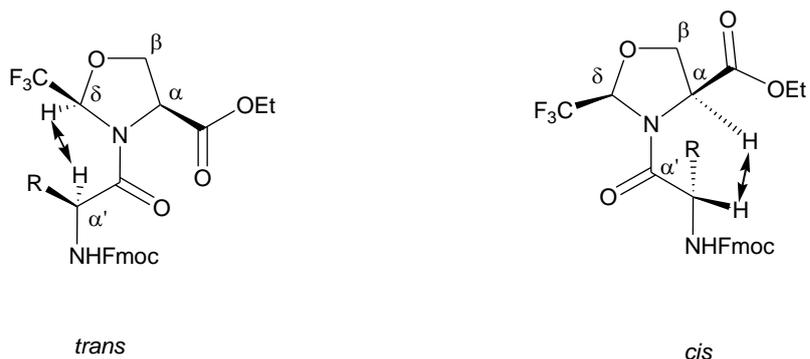


Figure 58 : Représentation de la proximité spatiale du proton H_α du Fmoc-AA avec le proton H_α ou H_δ de la pseudoproline en fonction de l'isomérisie *cis/trans* de la liaison amide

Lorsque l'acide aminé couplé ne possède pas de H_α (Aib), c'est le H_β qui est utilisé pour déterminer l'isomérisie de la liaison amide. La figure ci-dessous (réalisée avec Chem3D avec minimisation de la gêne stérique) montre la proximité spatiale entre H_α Ala et H_α Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro) lorsque la liaison amide est de conformation *cis* (**Figure 59**).

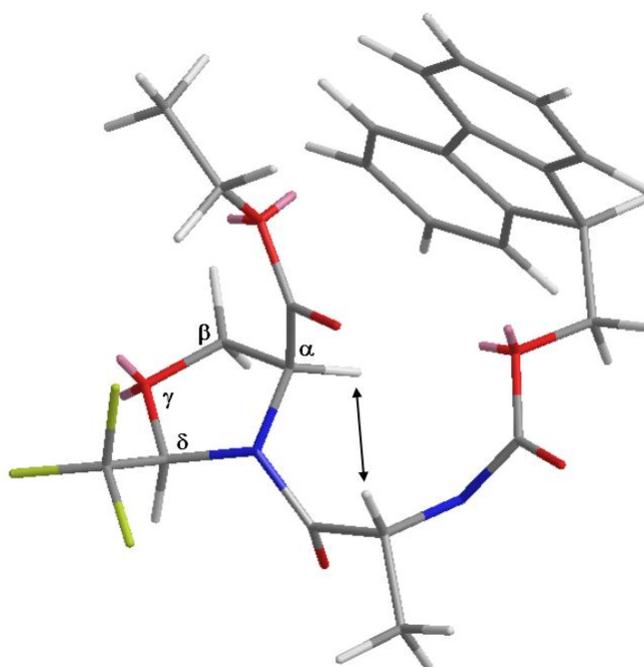


Figure 59 : Liaison amide *cis* du dipeptide Fmoc-Ala-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe

Lorsque la liaison amide est *trans* ce sont les protons H_α Ala et H_δ Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro) qui sont proches dans l'espace (**Figure 60**).

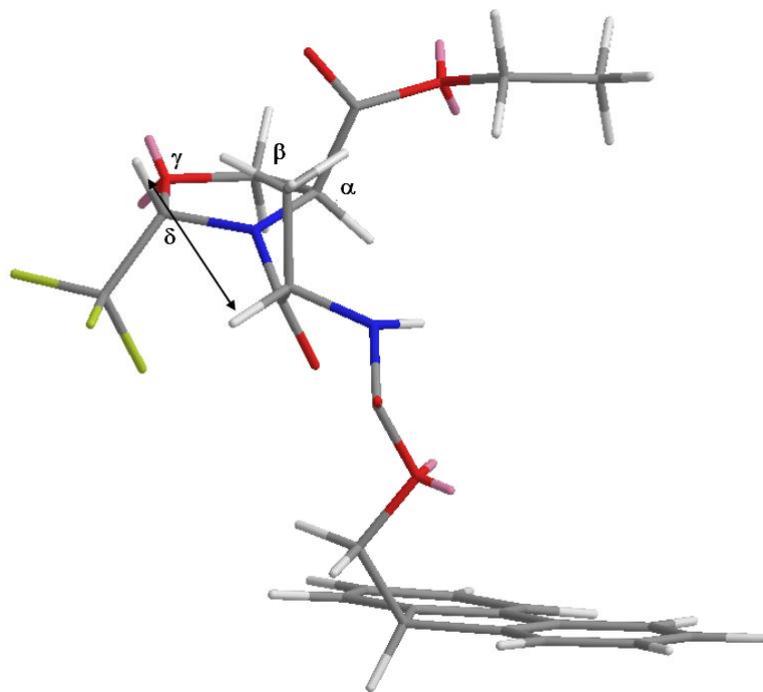


Figure 60 : Liaison amide *trans* du dipeptide Fmoc-Ala-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe

Le spectre NOESY du dipeptide Fmoc-L-Val-L-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe montre une corrélation entre $H_{\alpha}Oxa$ et $H_{\alpha}Val$, la liaison amide est donc de conformation *trans* (Figure 61).

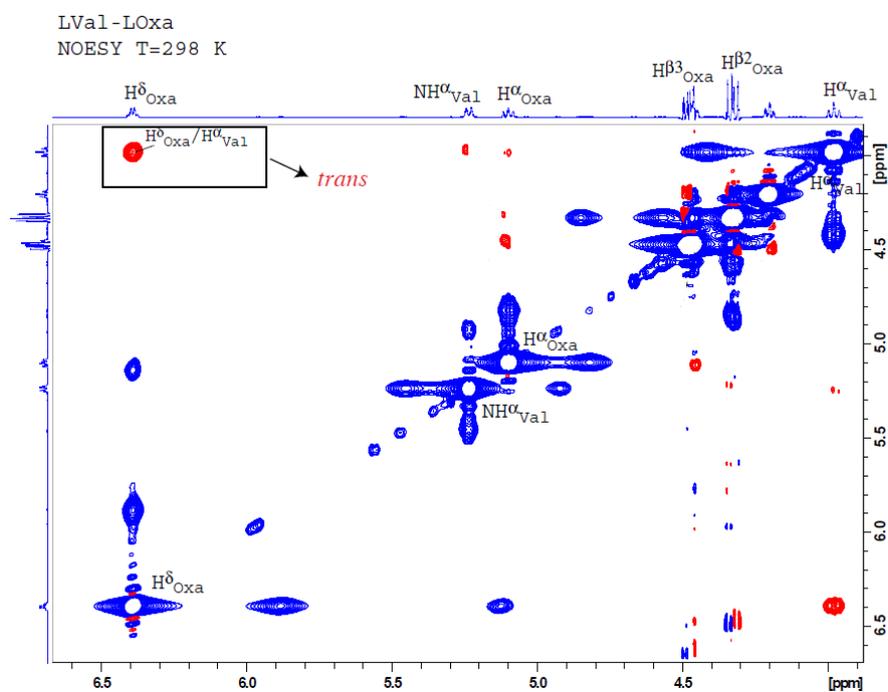


Figure 61 : Exemple de détermination de conformation de la liaison amide avec le spectre RMN du dipeptide Fmoc-L-Val-L-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe

A l'inverse, le spectre NOESY du dipeptide Fmoc-D-Val-L-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe ne montre aucune corrélation entre $H_{\alpha}Oxa$ et $H_{\alpha}Val$ mais entre $H_{\delta}Oxa$ et $H_{\alpha}Val$ ce qui correspond à une liaison amide de conformation *cis* (Figure 62).

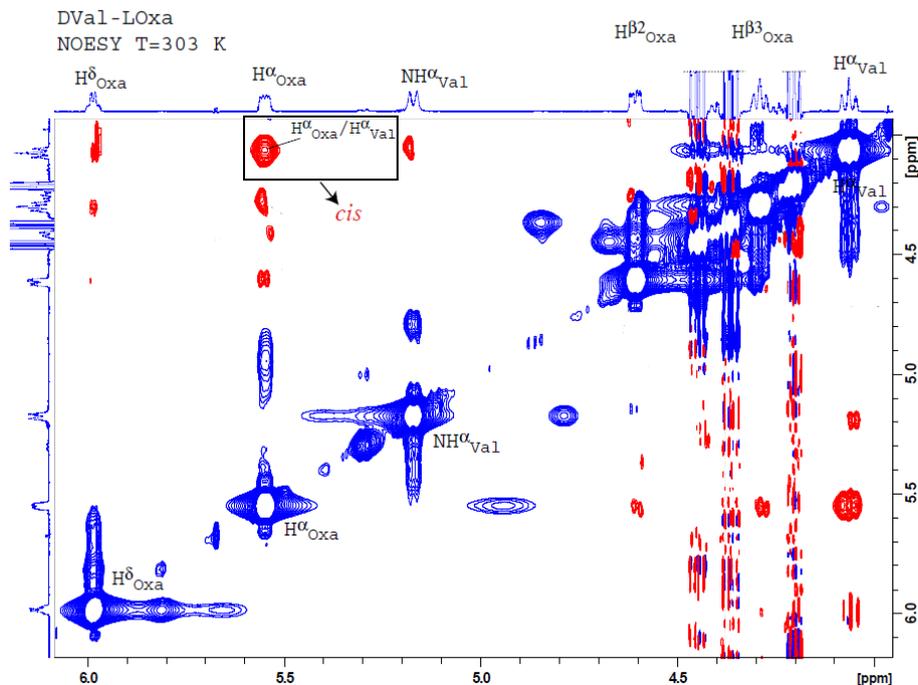


Figure 62 : Exemple de détermination de conformation de la liaison amide avec le spectre RMN du dipeptide Fmoc-D-Val-L-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe

La RMN a été un outil très puissant pour obtenir des informations structurales sur les dipeptides Fmoc-AA-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe. En effet, elle nous a permis d'obtenir la configuration absolue du motif pseudoproline ainsi que son puckering. De plus, nous avons pu déterminer la conformation de la liaison amide.

3. Conclusion

L'objectif de cette partie était de mettre au point des méthodes efficaces pour réaliser le couplage d'acides aminés trifluorométhylés et de synthétiser des analogues du GPE. Ces objectifs ont été atteints, le couplage de différents acides aminés trifluorométhylés cycliques (proline, pseudoproline) a été effectué pour conduire aux analogues protégés du GPE en série trifluorométhylés (**Schéma 88**).

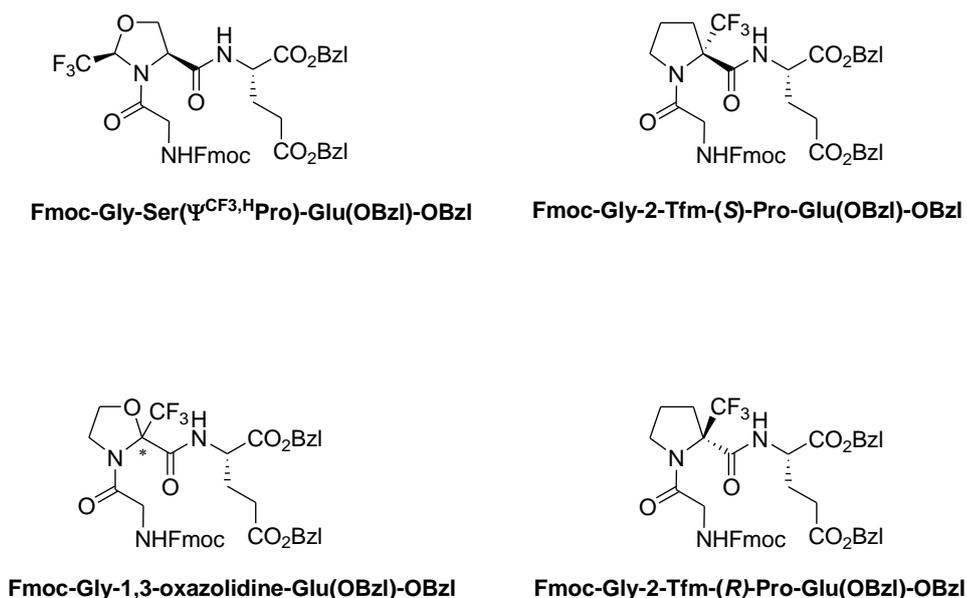


Schéma 88 : Analogues trifluorométhylés du GPE

La synthèse des différents diastéréoisomères des Fmoc-AA-Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$)-OMe a, de plus, permis d'étudier par RMN la conformation *cis/trans* de la liaison amide. La synthèse de ces composés a en outre été accomplie à l'échelle de plusieurs grammes, ce qui permettra de les utiliser comme mimes de prolines pour étudier l'effet de l'incorporation du groupement trifluorométhyle sur des peptides.

Chapitre 3 : Synthèse d'analogues trifluorométhylés du GPE en série proline

« Si le problème a une solution, il ne sert à rien de s'inquiéter. Mais s'il n'en a pas,
s'inquiéter ne changera rien »

Proverbe Tibétain

1. Rappels bibliographiques

Dans la littérature, de nombreux analogues du GPE avec une proline modifiée ont été décrits par les groupes de M. A. Brimble et de T. Garcia-Lopez.

Ainsi, le groupe de M. A. Brimble a par exemple synthétisé des analogues du GPE avec différentes prolines alkylées ou benzylées en position 2 (**Schéma 89**).²⁶

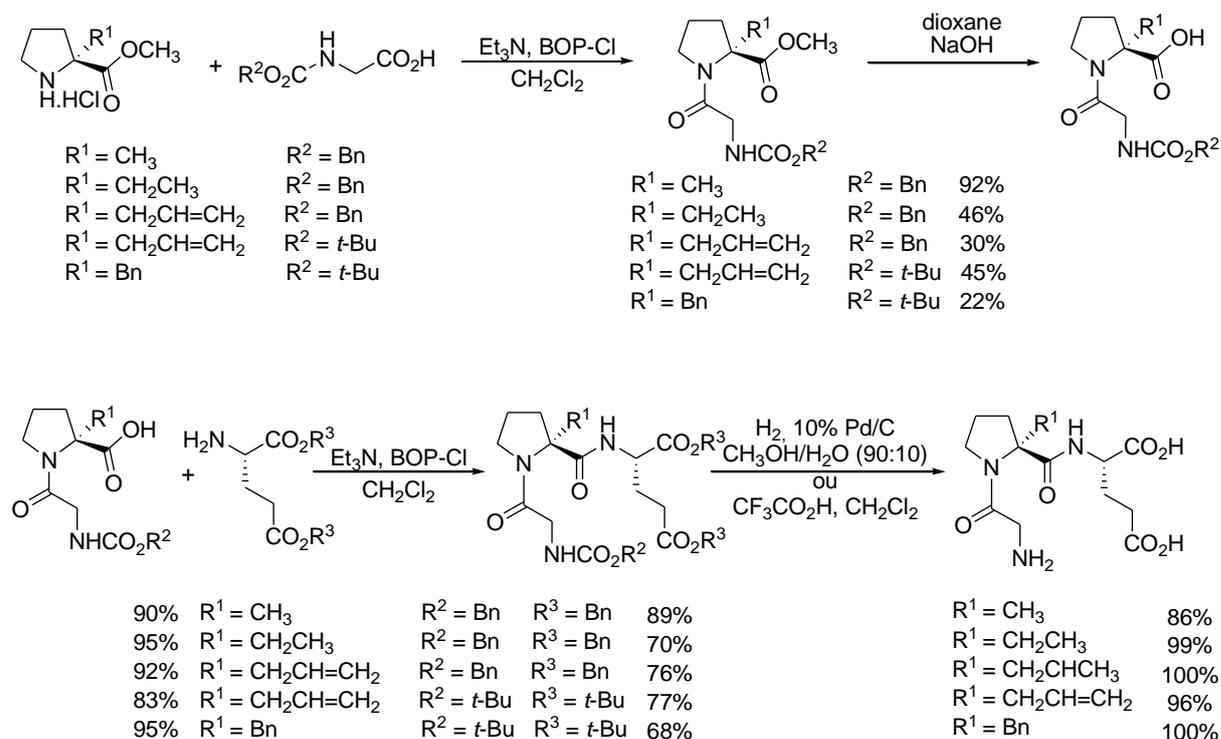


Schéma 89 : Synthèses des analogues de type G-2-alkyl-PE

Les prolines alkylées ou benzylées en position 2 (méthyle, éthyle, allyle et benzyle) sont couplées, par du BOP-Cl dans le DCM en présence de triéthylamine, avec une glycine protégée (benzyle ou *tert*-butyle). L'ester méthylique du dipeptide obtenu est ensuite saponifié, puis une réaction de couplage avec l'acide glutamique protégé (benzyle ou *tert*-butyle) est réalisée par du BOP-Cl dans le DCM en présence de triéthylamine pour conduire au tripeptide protégé. Le clivage des groupements protecteurs est effectué par une hydrogénolyse catalysée par du palladium sur charbon dans un mélange méthanol/eau dans le cas des groupements benzyles. Pour les peptides protégés par un *tert*-butyle, le clivage est réalisé dans le DCM par l'acide trifluoroacétique (TFA).

Le groupe de T. Garcia-Lopez a également synthétisé des analogues du GPE modifiés sur la proline, avec par exemple la 5,5-diméthylproline (dmP) ou avec la D-proline (**Schéma 90**).

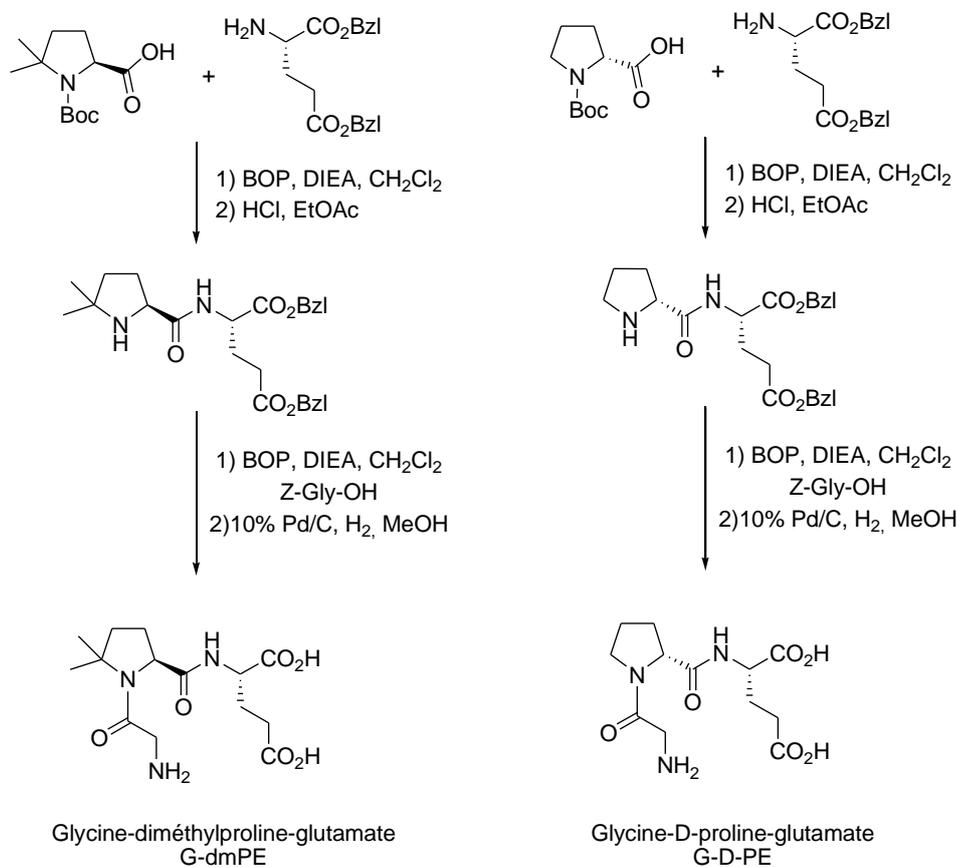
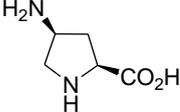
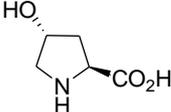
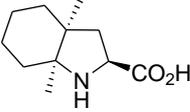
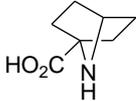
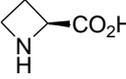
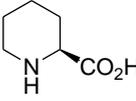
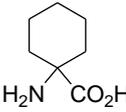


Schéma 90 : Synthèses des analogues G-dmPE et G-D-PE

La dmP ou la D-proline, protégées par un Boc, sont couplées par du BOP (hexafluorophosphate benzotriazole-1-yloxytris(diméthylamino)-phosphonium) dans le DCM en présence de DIEA avec l'acide glutamique protégé par des groupements benzyles. Le groupement Boc est clivé en milieu acide, puis le dipeptide est couplé avec la Z-glycine par du BOP dans le DCM en présence de DIEA. Les tripeptides déprotégés sont obtenus par hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon dans le méthanol.

Le groupe de T. Garcia-Lopez a utilisé la SPPS afin de synthétiser de nombreux autres analogues du GPE avec des prolines modifiées et de mesurer leur affinité pour les récepteurs glutamates (**Figure 14**, p 34) (**Figure 63**).²⁵

Composé Final	Xaa	Rendement ^a
h	 (Amp)	80 %
i	 (Hyp)	68 %
j	 (Oic)	93 %
k	 (b ₇ Pro)	81 %
l	 (Aze)	89 %
m	 (Pip)	96 %
n	 (Acp)	71 %
o	 (Ach)	76 %

^a Rendement en produit isolé

Figure 63 : Synthèse d'analogues du GPE par SPPS

Ainsi, des analogues du GPE avec différentes prolines substituées (Hyp, Amp), des analogues de prolines conformationnellement restreints (Oic, b₇Pro) et des homologues de proline (Aze, Pip) ont été préparés par SPPS.

Le groupe de M. A. Brimble a synthétisé des analogues du GPE en remplaçant la proline par des thiazolidines. La thiazolidine Cys($\Psi^{\text{H,H}}$ Pro) ou la 2,2-diméthylthiazolidine Cys

($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{Pro}$) est préparée par condensation de la cystéine avec le formaldéhyde ou le 2,2-diméthoxypropane respectivement (**Schéma 91**).

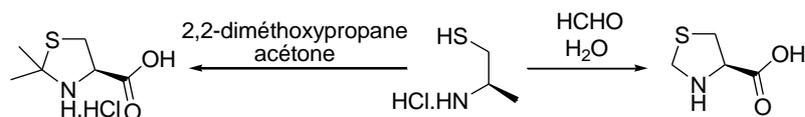


Schéma 91 : Synthèse des Cys($\Psi^{\text{H,H}}\text{Pro}$) et Cys($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{Pro}$)

Ces deux thiazolidines ont été incorporées à la place de la proline pour réaliser deux analogues du GPE. Elles sont couplées avec une glycine protégée, *via* la formation d'un anhydride mixte avec le chloroformiate d'isobutyle pour la Cys($\Psi^{\text{H,H}}\text{Pro}$).

La Cys($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{Pro}$), plus encombrée, nécessite une méthode de couplage plus efficace, ainsi l'utilisation d'un fluorure d'acyle permet de réaliser cette réaction de couplage. Les dipeptides obtenus sont couplés avec l'acide glutamique protégé *via* un anhydride mixte formé avec le chloroformiate d'éthyle. Le clivage des groupements protecteurs conduit aux deux analogues du GPE (**Schéma 92**).

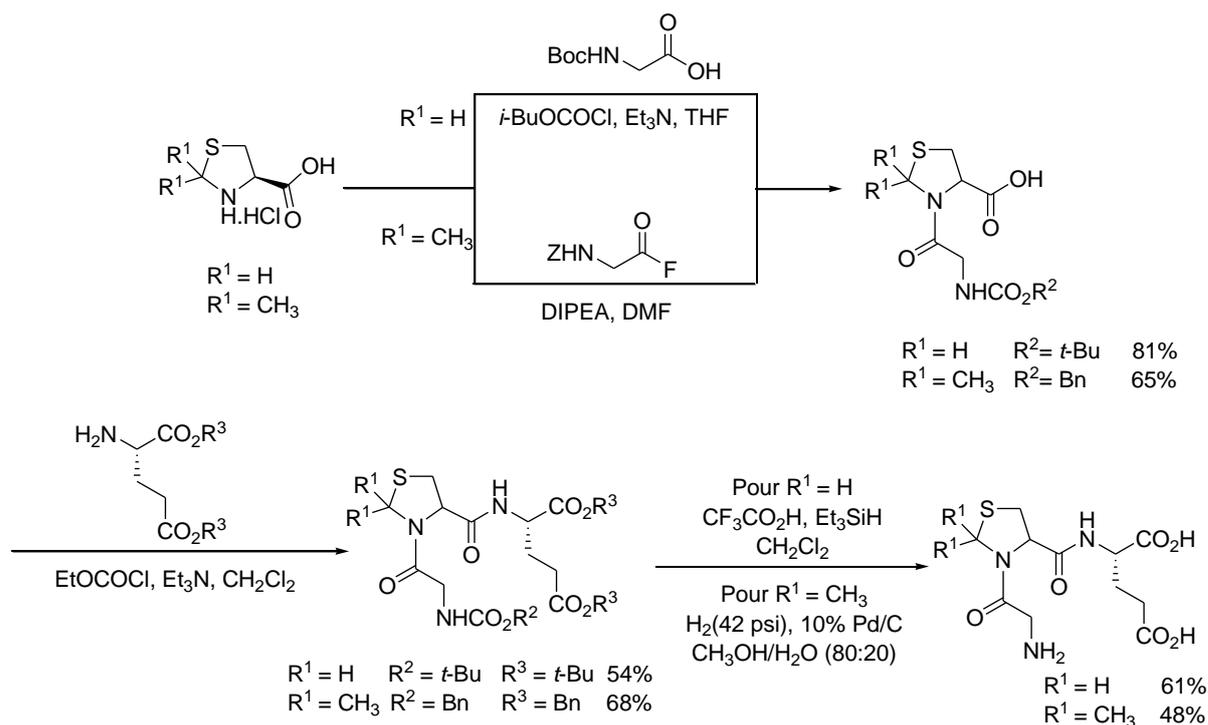


Schéma 92 : Synthèse des analogues G-Cys($\Psi^{\text{H,H}}\text{Pro}$)E et G-Cys($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{Pro}$)E

2. Synthèse du GPE en série proline : Résultats et discussion

2.1. Le GPE en série (S)-2-CF₃-proline

Pour obtenir le GPE en série (S)-2-CF₃-proline, à partir du tripeptide protégé Fmoc-Gly-(S)-2-CF₃-Pro-Glu(OBzl)-OBzl **26**, deux étapes de déprotection sont nécessaires. L'une pour cliver le groupement Fmoc, l'autre pour les deux groupements benzyles. Nous avons envisagé de réaliser la déprotection du groupement Fmoc en milieu basique suivie d'une hydrogénéolyse des groupements benzyles.

La déprotection du groupement Fmoc du tripeptide **26** a été réalisée dans des conditions classiques avec de la pipéridine dans le DMF (**Schéma 93**).

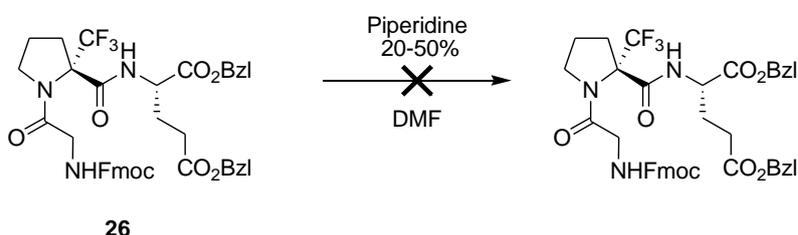


Schéma 93 : Déprotection du Fmoc en série (S)-2-CF₃-proline avec de la pipéridine

Cette réaction, avec diverses concentrations de pipéridine (entre 20% et 50%), n'a pas permis d'obtenir le tripeptide déprotégé, seuls des produits de dégradations sont observés. D'autres conditions classiques de déprotection du groupement Fmoc comme l'utilisation du 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) ont été testées, également sans succès (**Schéma 94**).

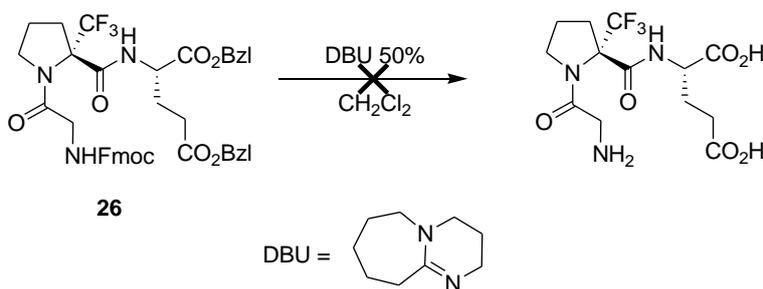


Schéma 94 : Déprotection du Fmoc en série (S)-2-CF₃-proline avec le DBU

Après l'échec des conditions classiquement utilisées pour le clivage du groupement Fmoc nous nous sommes intéressés à des méthodes moins couramment utilisées. Dans la littérature, certains auteurs ont décrit l'utilisation de palladium sur charbon pour catalyser

l'hydrogénolyse du groupement Fmoc.¹²⁷ D'après cette publication, l'utilisation d'acétonitrile ou d'une pression de 3 bars améliorent la vitesse de réaction. Cette méthode est intéressante, car elle permettrait de réaliser le clivage de tous nos groupements protecteurs en une seule étape.

Les premiers essais ont été réalisés sur le peptide protégé **26** qui est hydrogénolysé en présence de palladium sur charbon sous 3 ou 5 bars d'hydrogène dans le méthanol (**Schéma 95**).

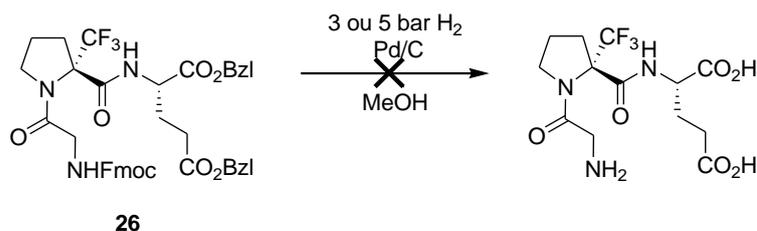


Schéma 95 : Hydrogénolyse sous 3 ou 5 bars d'hydrogène pour obtenir le tripeptide G-(S)-2-CF₃-PE

Dans ces conditions seuls des produits de décomposition (clivage de la liaison peptidique et récupération du dipeptide α -Tfm-Pro-Glu) sont observés. Afin d'éviter la dégradation du tripeptide, nous avons alors utilisé des conditions réactionnelles plus douces, une pression d'hydrogène moins importante (1 bar) en présence d'acétonitrile (**Schéma 96**).

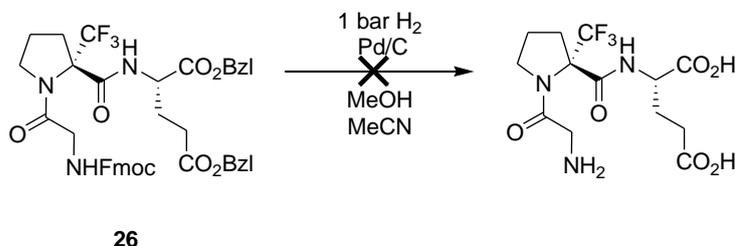


Schéma 96 : Hydrogénolyse sous 1 bar d'hydrogène en présence d'acétonitrile pour obtenir le tripeptide G-(S)-2-CF₃-PE

Encore une fois, seuls des produits de dégradation sont obtenus. Nous avons alors essayé de réaliser l'hydrogénolyse du tripeptide protégé **26** avec 1 bar d'hydrogène mais sans acétonitrile (**Schéma 97**).

¹²⁷ Maegawa, T.; Fujiwara, Y.; Ikawa, T. *Amino Acids* **2009**, *36*, 493-499.

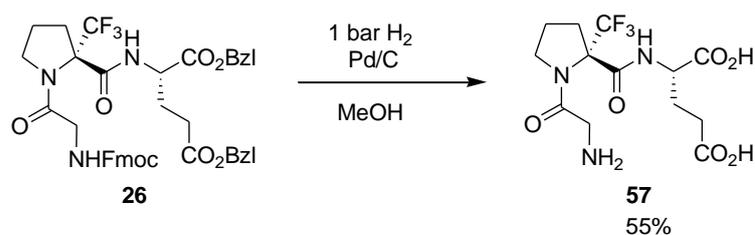


Schéma 97 : Hydrogénolyse sous 1 bar d'hydrogène sans acétonitrile pour obtenir le tripeptide G-(S)-2-CF₃-PE

Dans ces conditions, le tripeptide totalement déprotégé G-(S)-2-CF₃-PE **57** est obtenu avec un rendement de 55%.

Cette méthode de déprotection dans des conditions douces permet de réaliser le clivage de tous les groupements protecteurs en une seule étape et d'obtenir le tripeptide totalement déprotégé G-(S)-2-CF₃-PE **57** avec un rendement correct et reproductible. Le premier analogue du GPE a donc été réalisé avec succès en série (S)-2-CF₃-proline et pourra faire l'objet d'évaluations biologiques afin de déterminer son affinité pour les récepteurs glutamates et ses potentiels effets neuroprotecteurs (**Figure 64**).

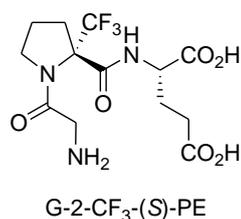


Figure 64 : Le tripeptide G-(S)-2-CF₃-PE

Cette étude biologique pourra donner des informations intéressantes sur le rôle du fluor en comparant les résultats obtenus avec ceux du NNZ-2566. En effet, la seule différence entre les deux composés est la présence du groupement trifluorométhyle à la place du groupement méthyle (**Figure 65**).

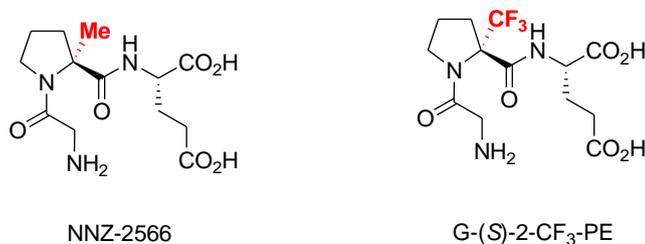


Figure 65 : Structures du NNZ-2566 et du G-(S)-2-CF₃-PE

2.2. Le GPE en série (R)-2-CF₃-proline

Les mêmes conditions de réaction sont appliquées au tripeptide diastéréoisomère issu de l'autre énantiomère de la 2-CF₃-proline. Ainsi, le tripeptide Fmoc-Gly-(R)-2-CF₃-Pro-Glu(OBzl)-OBzl **28** est hydrogénéolysé en présence de palladium sur charbon dans le méthanol pour conduire au peptide totalement déprotégé G-(R)-2-CF₃-PE **58** avec un rendement de 54% (**Schéma 98**).

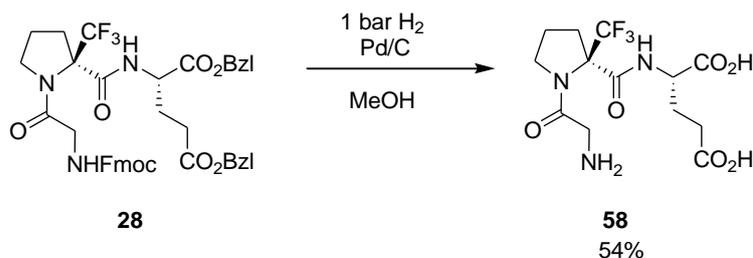


Schéma 98 : Hydrogénolyse sous 1 bar d'hydrogène sans acétonitrile pour obtenir le tripeptide G-(R)-2-CF₃-PE

Comme dans le cas de l'autre énantiomère de la proline, le tripeptide totalement déprotégé G-(R)-2-CF₃-PE **58** est obtenu avec un rendement correct en une seule étape à partir du tripeptide protégé **28**. Ce second analogue du GPE fera également l'objet de tests biologiques pour déterminer son activité neuroprotectrice et effectuer un comparatif avec le NNZ-2566 et l'analogue issu de la (S)-2-CF₃-proline (**Figure 66**).

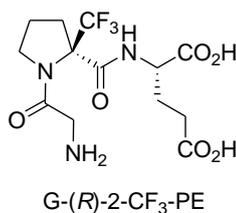


Figure 66 : Le tripeptide G-(R)-2-CF₃-PE

2.3. La série oxazolidine dérivée de la sérine : Ser(Ψ^{CF₃,H}Pro)

Pour réaliser le clivage des groupements protecteurs Fmoc et benzyle, nous avons appliqué la même méthode que celle utilisée pour le GPE en série 2-CF₃-proline, l'hydrogénolyse.

Le tripeptide protégé Fmoc-Gly-Ser(Ψ^{CF₃,H}Pro)-Glu(OBzl)-OBzl **47** est hydrogénéolysé sous 1 bar d'hydrogène dans le méthanol en présence de palladium sur charbon pour conduire au tripeptide déprotégé G-Ser(Ψ^{CF₃,H}Pro)E **59** (**Schéma 99**).

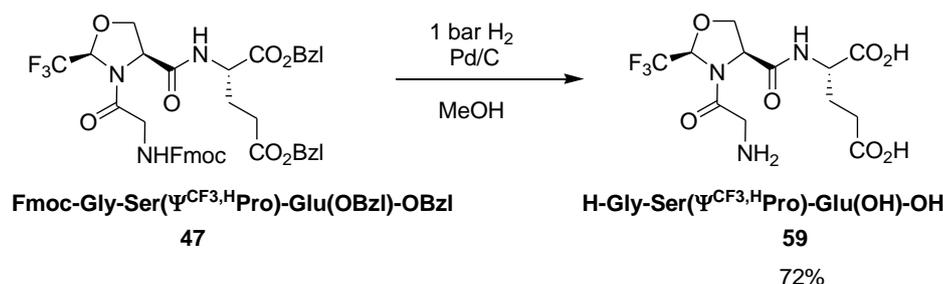


Schéma 99 : Hydrogénolyse sous 1 bar d'hydrogène pour obtenir le tripeptide G-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)E

Comme dans le cas des analogues en série 2-CF₃-proline, la réaction d'hydrogénolyse permet d'effectuer le clivage de tous les groupements protecteurs en une seule étape et d'obtenir un nouvel analogue trifluorométhylé du GPE. De plus, l'échelle importante sur laquelle les pseudoprolines ont été réalisées a permis la synthèse de cette analogue à l'échelle du gramme.

Des tests biologiques seront réalisés sur ce nouvel analogue du GPE et pourront permettre d'évaluer les propriétés apportées par le remplacement d'un atome de carbone dans le cycle proline par un atome d'oxygène ainsi que par la position différente du groupement trifluorométhyle par rapport aux analogues issus de la 2-CF₃-proline.

2.4. La série oxazolidine dérivée de l'éthanolamine

La même méthode d'hydrogénolyse des groupements protecteurs appliquées en série 2-CF₃-proline et Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro) est effectuée sur le tripeptide contenant l'oxazolidine dérivée de l'éthanolamine. Ainsi, le tripeptide protégé **56** est hydrogénolysé sous 1 bar d'hydrogène dans le méthanol en présence de palladium sur charbon pour conduire au tripeptide déprotégé **60** (Schéma 100).

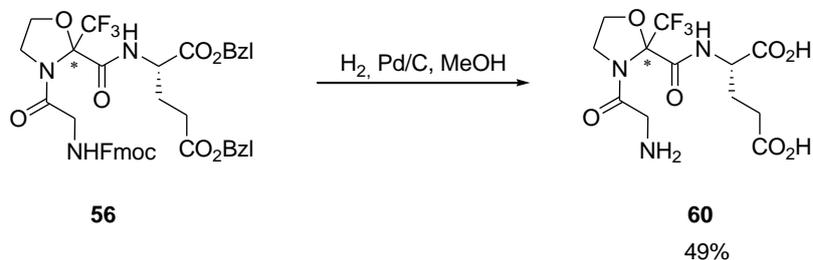


Schéma 100 : Hydrogénolyse sous 1 bar d'hydrogène pour obtenir le tripeptide contenant l'oxazolidine issue de l'éthanolamine

De la même manière que précédemment, cette réaction d'hydrogénolyse permet de retirer tous les groupements protecteurs en une seule étape.

3. Conclusion

L'objectif de cette partie était de réaliser le clivage des groupements protecteurs des différents analogues trifluorométhylés du GPE synthétisés précédemment. Les méthodes de clivages classiques du groupement Fmoc (pipéridine, DBU) n'ont pas abouti au peptide déprotégé dans le cas du GPE en série α -Tfm-proline. L'utilisation de l'hydrogénolyse catalysée au palladium nous a permis de contourner cette difficulté et de réaliser le clivage de tous les groupements protecteurs en une seule étape.

Cette méthode s'est également avérée efficace en série pseudoproline, et ainsi une seule étape de déprotection est suffisante pour obtenir les différents analogues du GPE à partir des peptides protégés correspondants (**Schéma 101**).

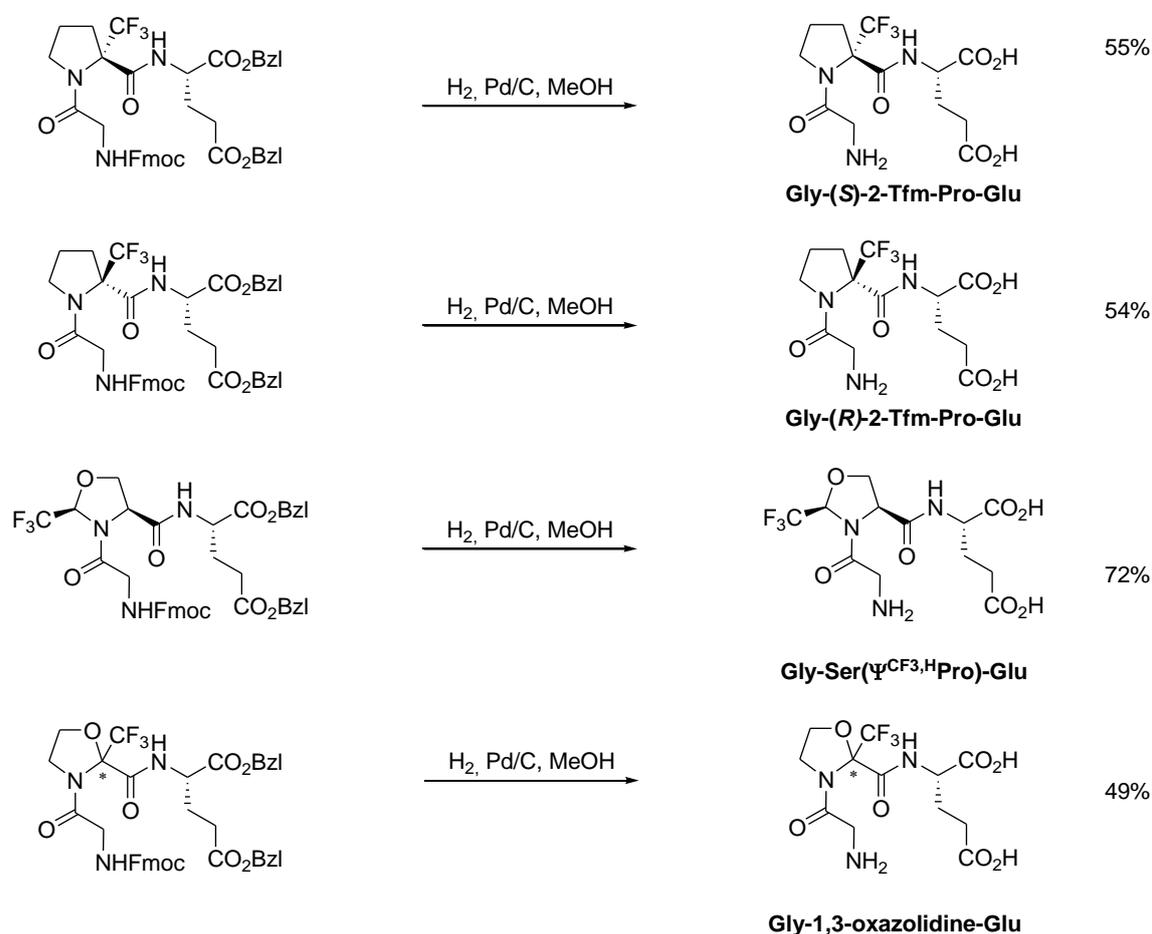


Schéma 101 : Clivage des groupements protecteurs des analogues trifluorométhylés du tripeptide GPE

Conclusion générale

« Ils ne savaient pas que c'était impossible, alors ils l'ont fait. »

Mark Twain

Les objectifs de ce travail de thèse étaient la synthèse à l'échelle du gramme de prolines et pseudoprolines trifluorométhylées, de mettre au point des méthodes de couplage de ces acides aminés trifluorométhylés efficaces pour synthétiser des peptides, et enfin, d'effectuer la synthèse d'analogues trifluorométhylés du GPE pour permettre leur évaluation biologique.

La synthèse de différentes prolines et pseudoprolines trifluorométhylées a été réalisée avec succès à l'échelle du gramme, soit par une mise à l'échelle de réactions préalablement développées au laboratoire (proline, pseudoproline issue de la sérine), soit par de nouvelles réactions (pseudoprolines issues de la cystéine ou de l'éthanolamine) (**Figure 67**).

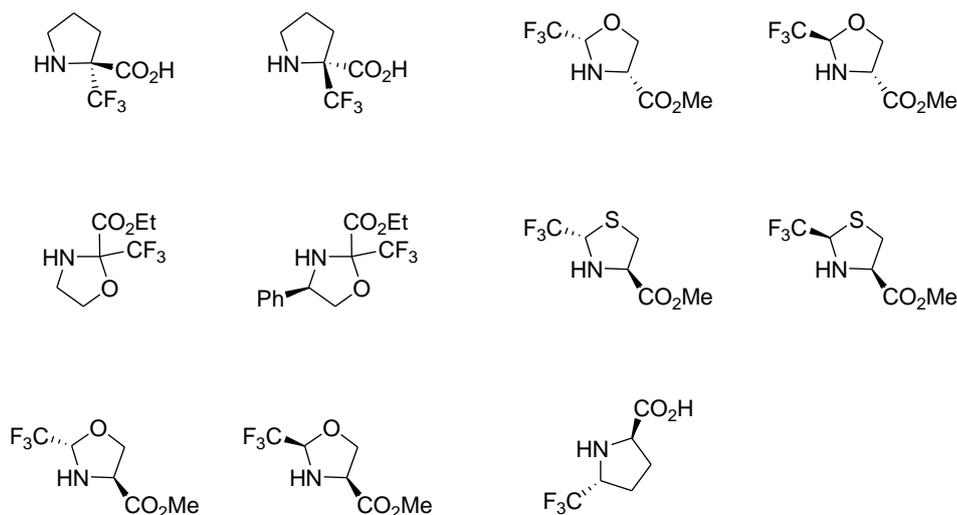


Figure 67 : Acides aminés cycliques trifluorométhylés synthétisés

L'utilisation de chlorures d'acyle a permis de réaliser le couplage sur l'azote fortement désactivé de ces acides aminés cycliques trifluorométhylés. Cette méthode de couplage nous a permis de réaliser de nombreux dipeptides contenant nos acides aminés trifluorométhylés et de réaliser une étude conformationnelle de la liaison amide en fonction de l'acide aminé couplé (**Figure 68**).

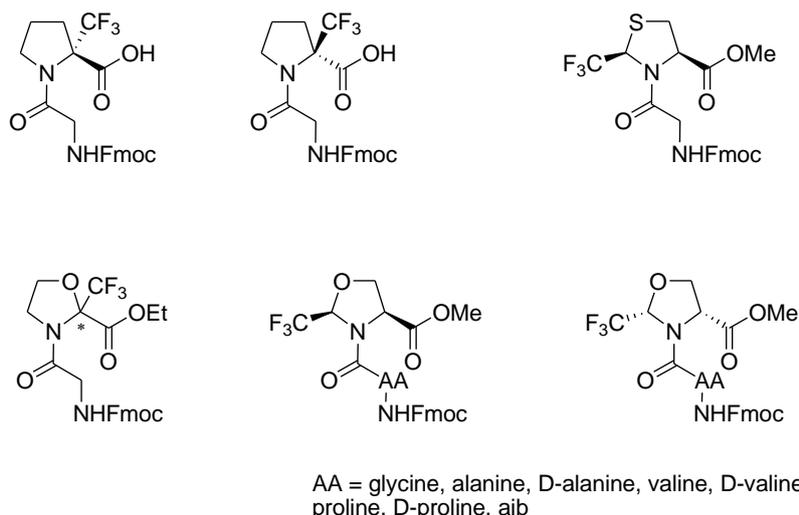


Figure 68 : Dipeptides synthétisés à partir des prolines et pseudoprolines trifluorométhylés

Le couplage de ces dipeptides avec l'acide glutamique puis le clivage des groupements protecteurs nous a permis de réaliser l'objectif principal de ce travail de thèse : la synthèse des deux analogues trifluorométhylés du GPE en série 2-CF₃-proline (**Figure 69**).

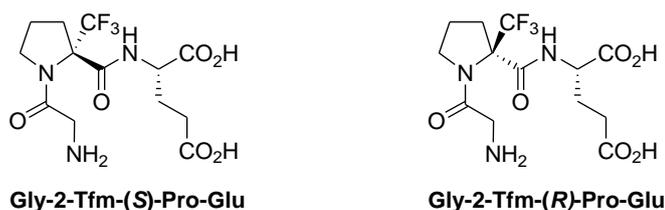


Figure 69 : Analogues trifluorométhylés du GPE en série 2-CF₃-proline

La synthèse de ces analogues est une importante réussite et l'évaluation biologique de ces composés représente un intérêt certain. En effet, la structure de ces analogues se rapproche très fortement de celle du NNZ-2566 (**Figure 65**, p 123). La comparaison des activités biologiques ainsi que des propriétés physico-chimiques (lipophilie, temps de demi-vie dans le plasma, etc...) de ces composés par rapport au NNZ-2566 permettra d'obtenir de précieuses informations sur le rôle du fluor sur les propriétés physico-chimiques et biologiques de ce peptide. De plus, des analogues du GPE incorporant des pseudoprolines trifluorométhylées ont été réalisés et pourront faire également l'objet de tests biologiques pour déterminer leur activité (**Figure 70**).

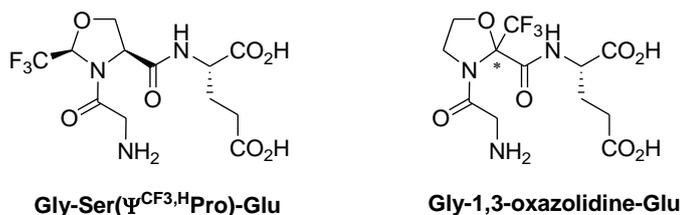


Figure 70 : Analogues trifluorométhylés du GPE en série pseudoproline

Par ailleurs, le suivi de ces analogues trifluorométhylés par IRM ^{19}F pourrait fournir des renseignements sur les mécanismes biologiques mis en jeu lors du processus de neuroprotection. Une étude de la toxicité des nos composés sur les récepteurs NMDA est actuellement réalisée au centre CYCERON à Caen par le Dr D. Vivien.

Ces peptides pourront aussi être testés sur d'autres maladies impliquant des phénomènes de neurodégénération ou des désordres neurologiques, comme par exemple le syndrome de Rett ou la maladie de Parkinson. Des tests biologiques sont d'ailleurs effectués actuellement dans la faculté de médecine de La Timone par le Dr L. Villard et le Dr. J. C. Roux sur des souris MECP2 mutées (modèle du syndrome de Rett). D'autres tests, effectués par le Dr A. Fournier et le Dr D. Chatenet, sont également en cours à l'INRS de Laval au Québec pour tester l'activité neuroprotectrice de ces composés vis-à-vis de la maladie de Parkinson. Les premiers résultats de ce laboratoire sur la toxicité de nos composés ont montré qu'ils étaient non toxiques sur la lignée cellulaire étudiée.

Experimental part

Solvents purification:

Solvents were dried and distilled as follow:

- THF and diethyl ether were distilled over sodium and benzophenone under argon atmosphere.
- Dichloromethane was distilled over calcium hydride.
- Toluene was distilled over sodium.
- DMF was distilled over 4Å molecular sieves

Chromatography:

Reactions were monitored by TLC on SDS silica gel 60 F254 sheets. TLC sheets were visualised under 254 nm UV light and revealed with either a 10% phosphomolibdic acid solution in ethanol or a KMNO₄ solution.

Purifications by silica gel chromatography were performed on Macherey-Nagel 70-230 mesh ASTM silica.

Products characterisation:

¹H NMR spectra, ¹³C NMR spectra and ¹⁹F NMR spectra were recorded on a JEOL ECX-400 (400 MHz ¹H, 100.5 MHz ¹³C and 376.2 MHz ¹⁹F). Chemical shift values (δ) were reported in ppm downfield from Me₄Si (δ 0.0 ppm), C₆F₆ (δ -164.9 ppm) or CDCl₃ as internal standard (δ 77.16 ppm). Data are reported as follows: chemical shift (δ ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, p = pentet, m = multiplet), coupling constant (Hz), integration.

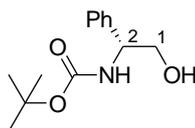
Infrared (IR-FT) spectra were performed on a Bruker Tensor.

Specific rotations were measured on a JASCO P1010 polarimeter.

Microanalysis were performed by the Service Central d'Analyses du CNRS

HRMS analyses were performed on a JEOL JMS-GC Mate II.

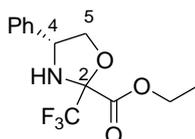
Melting points (uncorrected) were measured in a capillary tube on a Büchi apparatus.

***N*-Boc-(*R*)-Phenylglycinol (1)**

To a solution of (*R*)-Phenylglycinol (50.000 g, 365.0 mmol, 1 equiv) in THF (865 mL) at 0°C was added Et₃N (40.547 g, 401.5 mmol, 1.1 equiv) and Boc₂O (87.518 g, 401.5 mmol, 1.1 equiv). The mixture is stirred for 24 h then cooled to 0°C and quenched with H₂O (300 mL) and stirred for 30 min. The aqueous solution was extracted with ethyl acetate (3 × 400 mL). The combined organic layers were washed with a diluted HCl solution (0.1 M) (2 x 100 mL) and a saturated NaCl solution (2 x 100 mL). The organic extracts were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give protected (*R*)-phenylglycinol **1** 78.02 g (90 %). The crude product was used without further purification. NMR data are in accordance with literature data.¹²⁸

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.45 (s, 9H, H_{Boc}), 3.56 (dd, ³J = 10.9, 6.4 Hz, 1H, H₁), 3.65 (dd, ³J = 10.9, 4.4 Hz, 1H, H₁'), 4.79-4.84 (m, 1H, H₂), 5.05 (bs, 1H, NH), 7.02-7.21 (m, 6H, H_{Ar})

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 28.4 (CH₃ Boc), 57.2 (C₂), 66.6 (C₁), 80.0 (C Boc), 126.6, 127.7, 128.7, 140.0 (C_{Ar}), 156.9 (CO_{Boc})

4-phenyl-2-trifluoromethyl-2carboxyethyl-1,3-oxazolidine (2)

To a stirred solution of (*R*)-*N*-Boc-phenylglycinol **1** (30.000 g, 126.00 mmol, 1.0 equiv) in toluene (1.5 L) at room temperature, were added pyridinium *p*-toluenesulfonate (4.700 g, 18.90 mmol, 0.15 equiv) and ethyl trifluoropyruvate (18.40 mL, 139.00 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred for 1 h at room temperature, refluxed with a Dean-Stark apparatus for 20 h, then cooled to 0 °C with an ice-bath. The resulting mixture was filtered and toluene was evaporated to afford the corresponding oxazolidine (75:25 diastereomeric mixture) **2**. The crude product was used without further purification. Pure analytical samples of the two

¹²⁸ Tiecco, M.; Testaferri, L.; Marini, F.; Sternativo, S.; Santi, C.; Bagnoli, L.; Temperini, A. *Tetrahedron : Asymm.* **2003**, *14*, 2651-2657.

diastereomers were isolated by flash chromatography for the determination of their analytical data.

Major-2

MW : 289.25 g.mol⁻¹

Aspect : Colorless oil

[α]_D = +14.8 (*c* 2.0, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.39 (t, ³*J* = 7.1 Hz, 3H, H_{Et}), 3.52 (d, ³*J* = 9.2 Hz, 1H, NH), 3.76 (t, ³*J* = 8.3, 1H, H₄), 4.30 (dq, ³*J* = 10.6, 7.1 Hz, 1H, H_{Et}), 4.32 (dq, ³*J* = 10.6, 7.1 Hz, 1H, H_{Et}), 4.36 (t, ³*J* = 8.3, 1H, H₅), 4.45 (dt, ³*J* = 9.2, 8.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.34-7.44 (m, 5H, H_{Ar})

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 13.8 (C_{Et}), 62.2 (C_{Et}), 63.6 (C₄), 74.4 (C₆), 93.6 (q, ²*J* = 32.6 Hz, C₂), 122.7 (q, ¹*J* = 286.0 Hz, CF₃), 126.9, 128.6, 129.0, 136.7 (C_{Ar}), 166.4 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -83.2 (s, 3F, CF₃)

IR (v.cm⁻¹) 3355, 2986, 2903, 1741, 1459, 1263, 1157 cm⁻¹

Anal Calc. C, 53.98; H, 4.88; N, 4.84. Found C, 53.77; H, 4.97; N, 4.78.

MS(EI) *m/z* 216 (M⁺-CO₂Et) (100), 198, 103

Minor-2

MW : 289.25 g.mol⁻¹

Aspect : Colorless oil

[α]_D = -79.5 (*c* 2.0, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.37 (t, ³*J* = 7.1 Hz, 3H, H_{Et}), 3.63 (d, ³*J* = 6.3 Hz, 1H, NH), 3.89 (t, ³*J* = 8.7 Hz, 1H, H₄), 4.34 (dq, ³*J* = 10.7, 7.1 Hz, 1H, H_{Et}), 4.37 (dq, ³*J* = 10.7, 7.1 Hz, 1H, H_{Et}), 4.42 (m, 1H, H₅), 4.64 (q, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, H_{5'}), 7.30-7.35 (m, 3H, H_{Ar}), 7.40-7.45 (m, 2H, H_{Ar})

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 13.9 (C_{Et}), 60.7 (C_{Et}), 63.4 (C₄), 76.2 (C₅), 92.4 (q, ²*J* = 33.6 Hz, C₂), 122.8 (q, ¹*J* = 288.0 Hz, CF₃), 126.9, 128.3, 128.8, 137.8 (C_{Ar}), 167.0 (CO)

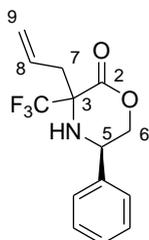
¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -83.1 (s, 3F, CF₃)

IR ($\nu\text{.cm}^{-1}$) 3355, 2986, 2903, 1741, 1459, 1263, 1157 cm^{-1}

Anal Calc. C, 53.98; H, 4.88; N, 4.84. Found C, 53.77; H, 4.97; N, 4.78.

MS(EI) m/z 216 ($M^+ - \text{CO}_2\text{Et}$) (100), 198, 103

(5R)-3-Allyl-3-trifluoromethyl-5-phenylmorpholin-2-ones (3)



To a stirred solution of a mixture of oxazolidines **2** (36.320 g, 126.00 mmol, 1.0 equiv) in dichloromethane (380 mL) was slowly added, under inert atmosphere at room temperature, allyltrimethylsilane (19.200 mL, 126 mmol, 1.0 equiv) and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ complex (16.000 mL, 126.00 mmol, 1.0 equiv). Reaction was stirred for 24 h and another 1.0 equiv of allyltrimethylsilane and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ complex was added. The resulting mixture was stirred at room temperature until the reaction was completed (^{19}F NMR monitoring, usually 3 days), then carefully poured into an aqueous NaHCO_3 solution (400 mL). The mixture was vigorously stirred for one hour. The layers were separated and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (2 x 200 mL). Combined organic extracts were dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. After silica gel purification (80:20 cyclohexane/ethyl acetate), the resulting allylic hydroxyester (33.870 g) was obtained as a 75:25 mixture of diastereomers. To a stirred solution of this allylic hydroxyester mixture (33.870 g, 102.00 mmol, 1.0 equiv) in toluene (1.8 L) was added *p*-toluenesulfonic acid (1.940 g, 10.00 mmol, 0.10 equiv). The mixture was warmed to reflux with a Dean-Stark apparatus for 24 h, then cooled to 0 °C. The resulting mixture was filtered and toluene was evaporated. Purification by flash chromatography (90:10 cyclohexane/ethyl acetate) gave the lactones **3** (23.860 g, 67 % from **1**) as a 75:25 diastereomeric mixture. Pure analytical samples of the two diastereomers were isolated for the determination of their analytical data.

Major ((3S, 5R)- 3)

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}_2$

MW : 285.26 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect : White solid

m.p.: 48°C

$[\alpha]_D$ = -15.9 (*c* 1.8, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.27 (bs, 1H, NH), 2.54 (dd, ³*J* = 13.5, 6.7 Hz, 1H, H₇), 2.95 (dd, ³*J* = 13.5, 7.7 Hz, 1H, H₇'), 4.28 (t, ³*J* = 10.5 Hz, 1H, H₆), 4.36 (ddd, ³*J* = 10.5, 3.6, 2.2 Hz, 1H, H₅), 4.57 (dt, ³*J* = 10.5, 2.2 Hz, 1H, H₆'), 5.34 (d, ³*J* = 15.4 Hz, 1H, H₉), 5.34 (d, ³*J* = 10.4 Hz, 1H, H₉'), 5.95 (dddd, ³*J* = 15.4, 10.4, 7.7, 6.7 Hz, 1H, H₈), 7.35-7.45 (m, 5H, H_{Ar})

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 39.2 (C₇), 52.6 (C₅), 66.0 (q, ²*J* = 24.7 Hz, C₃), 75.0 (C₆), 121.7 (C₉), 125.1 (q, ¹*J* = 290.7 Hz, CF₃), 127.0, 128.9, 130.0, 136.6 (C_{Ar}), 142.1 (C₈), 163.8 (C₂)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -76.5 (s, 3F, CF₃)

IR (v.cm⁻¹) 3335, 1741, 1211, 1171, 1143, 703 cm⁻¹

Anal Calc. C, 58.95; H, 4.95; N, 4.91. Found C, 59.03; H, 5.15; N, 5.11.

MS(EI) *m/z* 285 (M⁺), 244 (100), 188, 104, 91

Minor ((3*R*, 5*R*)- 3)

C₁₄H₁₄F₃NO₂

MW : 285.26 g.mol⁻¹

Aspect : White solid

m.p.: 48°C

$[\alpha]_D$ = -15.9 (*c* 1.8, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.15 (bs, 1H, NH), 2.53 (dd, ³*J* = 13.8, 8.1 Hz, 1H, H₇), 3.15 (dd, ³*J* = 13.8, 6.5 Hz, 1H, H₇'), 4.20-4.40 (m, 3H, H₅ and H₆), 5.27 (dd, ³*J* = 16.9, 1.2 Hz, 1H, H₉), 5.32 (d, ³*J* = 9.2 Hz, 1H, H₉'), 5.82 (dddd, ³*J* = 16.9, 9.2, 8.1, 6.5 Hz, 1H, H₈), 7.35-7.45 (m, 5H, H_{Ar})

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 39.5 (C₇), 52.7 (C₅), 65.4 (q, ²*J* = 26.5 Hz, C₃), 74.1 (C₆), 121.9 (C₉), 125.1 (q, ¹*J* = 290.7 Hz, CF₃), 127.0, 128.9, 129.0, 129.8, 133.6 (C_{Ar}), 136.7 (C₈), 164.9 (C₂)

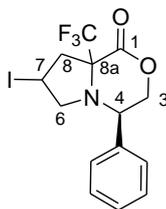
¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -79.8 (s, 3F, CF₃)

IR (v.cm⁻¹) 3335, 1741, 1211, 1171, 1143, 703 cm⁻¹

Anal Calc. C, 58.95; H, 4.95; N, 4.91. Found C, 59.03; H, 5.15; N, 5.11.

MS(EI) m/z 285 (M^+), 244 (100), 188, 104, 91

7-Iodo-4-phenyl-8a-trifluoromethylhexahydropyrrolo[2,1-c][1,4]oxazin-1-one (4)



To a stirred solution of a 75:25 mixture of allylic morpholinone **3** (1.000 g, 3.50 mmol, 1.0 equiv) in toluene (10.5 mL) was added iodine (1.330 g, 5.26 mmol, 1.5 equiv). The reaction mixture was protected from the light and heated at 95 °C for 48 h. The solution was cooled and diluted with ethyl acetate (15 mL). The organic layer was washed with a saturated $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution (20 mL) and a saturated NaHCO_3 solution (20 mL). The aqueous solution was extracted with ethyl acetate (3×20 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (95:5 cyclohexane/ethyl acetate) gave the bicyclic iodinated compounds **4** (1.020 g, 71 %) as a mixture of four diastereomers. Pure analytical samples of the four diastereomers were isolated for the determination of their analytical data.

(4R, 8aS)-7-Iodo-4-phenyl-8a-trifluoromethylhexahydropyrrolo[2,1-c][1,4]oxazin-1-one((R,S)- 4 major).

$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{INO}_2$

MW : 411.16 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect : White solid

m.p.: 112 °C

$[\alpha]_{\text{D}} = -9.0$ (c 1.25, CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 2.72 (dd, $^3J = 14.5, 10.1$ Hz, 1H, H_8), 3.20 (dd, $^3J = 14.5, 7.8$ Hz, 1H, H_8'), 3.28 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, H_6), 3.76 (quint, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, H_7), 4.62 (dd, $^3J = 7.8, 3.2$ Hz, 1H, H_3), 4.72 (dd, $^3J = 11.4, 7.8$ Hz, 1H, H_4), 4.95 (dd, $^3J = 11.4, 3.2$ Hz, 1H, H_3'), 7.23-7.26 (m, 2H, H_{Ar}), 7.32-7.40 (m, 3H, H_{Ar})

^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3) : δ 11.2 (C_7), 46.1 (C_8), 55.8 (C_4), 59.8 (C_6), 70.1 (C_3), 71.4 (q, $^2J = 28.6$ Hz, $\text{C}_{8\text{a}}$), 124.5 (q, $^1J = 284.1$ Hz, CF_3), 127.2, 128.9, 129.3, 136.4 (C_{Ar}), 166.0 (C_1)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3) : δ -77.0 (s, 3F, CF_3)

IR (v.cm^{-1}) 1742, 1159, 756, 696

Anal Calc. C 40.90, H 3.19, N 3.41. Found C 41.01, H 3.19, N 3.43.

MS(EI) m/z 411 (M+), 342, 226, 104 (100)

(4R, 8aS)-7-Iodo-4-phenyl-8a-trifluoromethylhexahydropyrrolo[2,1-c][1,4]oxazin-1-one((R,S)- 4minor).

$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{INO}_2$

MW : 411.16 g.mol^{-1}

Aspect : White solid

m.p.: 111 °C

$[\alpha]_{\text{D}}$ = - 124.1 (c 1.25, CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 2.62 (dd, $^3J = 14.7, 11.0$ Hz, 1H, H_8), 3.09 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, H_6), 3.14 (dd, $^3J = 14.7, 6.9$ Hz, 1H, H_8'), 4.11 (ddd, $^3J = 11.0, 8.2, 6.9$ Hz, 1H, H_7), 4.77 (dd, $^3J = 11.7, 3.2$ Hz, 1H, H_3), 4.80 (dd, $^3J = 11.7, 3.2$ Hz, 1H, H_3'), 5.10 (t, $^3J = 11.7$ Hz, 1H, H_4), 7.20-7.28 (m, 2H, H_{Ar}), 7.30-7.51 (m, 3H, H_{Ar})

^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3) : δ 10.5 (C_7), 46.3 (C_8), 54.7 (C_4), 58.4 (C_6), 68.0 (C_3), 69.6 (q, $^2J = 27.8$ Hz, $\text{C}_{8\text{a}}$), 124.6 (q, $^1J = 286.5$ Hz, CF_3), 127.6, 128.9, 129.3, 134.9 (C_{Ar}), 165.2 (C_1)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3) : δ - 77.2 (s, 3F, CF_3)

IR (v.cm^{-1}) 1738, 1224, 1140, 1012, 753

Anal Calc. C 40.90, H 3.19, N 3.41. Found C 40.92, H 3.13, N 3.46.

MS (EI) m/z 411 (M+), 342, 226, 104 (100)

(4R, 8aR)-7-Iodo-4-phenyl-8a-trifluoromethylhexahydropyrrolo[2,1-c][1,4]oxazin-1-one ((R,R)- 4major).

$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{INO}_2$

MW : 411.16 g.mol^{-1}

Aspect : Yellow oil

$[\alpha]_{\text{D}}$ = - 50.9 (c 4.15, CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 2.96 (dd, $^3J = 15.1, 8.7$ Hz, 1H, H_8), 3.05 (dd, $^3J = 15.1, 5.9$ Hz, 1H, H_8'), 3.09 (dd, $^3J = 11.0, 7.8$ Hz, 1H, H_6), 3.57 (dd, $^3J = 11.0, 5.9$ Hz, 1H, H_6'), 4.24 (ddd, $^3J = 8.7, 7.8, 5.9$ Hz, 1H, H_7), 4.27 (dd, $^3J = 11.0, 3.6$ Hz, 1H, H_3), 4.32 (dd, $^3J = 11.0, 3.6$ Hz, 1H, H_3'), 4.43 (t, $^3J = 11.0$ Hz, 1H, H_4), 7.38-7.40 (m, 5H, H_{Ar})

^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3) : δ 11.5 (C_7), 46.0 (C_8), 63.7 (C_4), 65.7 (C_6), 71.4 (q, $^2J = 38.3$ Hz, $\text{C}_{8\text{a}}$), 71.5 (C_3), 127.4 (q, $^1J = 284.6$ Hz, CF_3), 127.2, 129.0, 129.1, 136.7 (C_{Ar}), 165.8 (C_1)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3) : δ -78.3 (s, 3F, CF_3)

IR (v.cm^{-1}) 2924, 1755, 1187, 1148, 700

MS (EI) m/z 411 (M⁺), 342 (100), 104.

(4*R*, 8*aR*)-7-Iodo-4-phenyl-8*a*-trifluoromethylhexahydropyrrolo[2,1-*c*][1,4]oxazin-1-one ((*R,R*)- 4*minor*).

$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{INO}_2$

MW : 411.16 g.mol^{-1}

Aspect : White solid

m.p.: 136 °C

$[\alpha]_{\text{D}}$ = - 10.0 (c 0.85, CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 2.62 (dd, $^3J = 13.8, 12.4$ Hz, 1H, H_8), 3.19 (ddd, $^3J = 12.6, 6.0$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, H_8'), 3.27 (t, $^3J = 12.6$ Hz, 1H, H_6), 3.48 (ddd, $^3J = 13.8, 7.3$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, H_6'), 3.85 (dddd, $^3J = 12.6, 12.4, 7.3, 6.0$ Hz, 1H, H_7), 4.00 (dd, $^3J = 11.5, 3.2$ Hz, 1H, H_3), 4.21 (dd, $^3J = 11.5, 3.2$ Hz, 1H, H_3'), 4.35 (t, $^3J = 11.5$ Hz, 1H, H_4), 7.32-7.40 (m, 5H, H_{Ar})

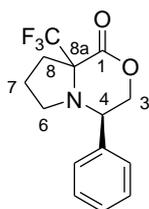
^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3) : δ 9.9 (C_7), 46.3 (C_8), 62.1 (C_4), 64.3 (C_6), 71.2 (C_3), 72.4 (q, $^2J = 29.7$ Hz, $\text{C}_{8\text{a}}$), 124.5 (q, $^1J = 281.8$ Hz, CF_3), 127.4, 129.1, 129.2, 136.9 (C_{Ar}), 165.1 (C_1)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3) : δ -78.8 (s, 3F, CF_3)

IR (v.cm^{-1}) : 1714, 1255, 1200, 1162

Anal Calc. C 40.90, H 3.19, N 3.41. Found C 41.12, H 3.14, N 3.36.

MS (EI) m/z 411 (M⁺), 342 (100), 104

8a-trifluoromethyl-4 phenylhexahydropyrrolo-[2,1-c][1,4]oxazin-1-ones (5)

The mixture of the four diastereomers **4** (3.900 g, 9.47 mmol, 1.0 equiv) in absolute ethanol (100 mL) was hydrogenated over 20% Pd/C (947 mg) in the presence of sodium acetate (2.490 g, 30.31 mmol, 3.2 equiv) at room temperature for 24 h under 5 bars pressure of hydrogen. The reaction mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography to afford pure isolated (**R,R**)-**5** (679 mg, 25 %) and (**R,S**)-**5** (1.392 g, 52 %)

(4R, 8aR)-8a-Trifluoromethyl-4-phenylhexahydropyrrolo[2,1-c][1,4]oxazin-1-one ((R, R)- 5).

$C_{14}H_{14}F_3NO_2$

MW : 285.10 g.mol⁻¹

Aspect : Colorless oil

[α]_D = +10.6 (*c* 0.36, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.75-1.90 (m, 1H, H₇), 1.85-2.00 (m, 1H, H_{7'}), 2.35-2.45 (m, 1H, H₈), 2.59 (ddd, ³*J* = 14.2, 6.9, 2.8 Hz, 1H, H_{8'}), 2.65 (ddd, ³*J* = 10.1, 9.6, 6.4 Hz, 1H, H₆), 3.20 (ddd, ³*J* = 10.1 Hz, 7.3, 2.8 Hz, 1H, H_{6'}), 3.91 (dd, ³*J* = 11.5, 4.1 Hz, 1H, H₃), 4.25 (dd, ³*J* = 11.5, 4.1 Hz, 1H, H_{3'}), 4.42 (t, ³*J* = 11.5 Hz, 1H, H₄), 7.25-7.45 (m, 5H, H_{Ar})

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 23.2 (C₇), 34.6 (C₈), 47.6 (C₄), 55.3 (C₆), 67.8 (C₃), 69.5 (q, ²*J* = 20.1 Hz, C_{8a}), 125.5 (q, ¹*J* = 280.4 Hz, CF₃), 127.4, 128.5, 129.0, 136.0 (C_{Ar}), 167.2 (C₁)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -78.4 (s, 3F, CF₃)

(4R, 8aS)-8a-Trifluoromethyl-4-phenylhexahydropyrrolo[2,1-c][1,4]oxazin-1-one ((R, S)- 5).

$C_{14}H_{14}F_3NO_2$

MW : 285.10 g.mol⁻¹

Aspect : Colorless oil

$[\alpha]_{\text{D}} = +26.4$ (c 0.36, CHCl_3)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 1.75-1.85 (m, 1H, H_7), 1.85-1.95 (m, 1H, H_7'), 2.20-2.30 (m, 1H, H_8), 2.61 (ddd, $^3J = 14.2, 7.0, 2.3$ Hz, 1H, H_8'), 2.75 (ddd, $^3J = 9.2, 6.9, 2.3$ Hz, 1H, H_6), 2.83 (td, $^3J = 9.2, 6.4$ Hz, 1H, H_6'), 4.72 (dd, $^3J = 11.0$ Hz, 3.2 Hz, 1H, H_3), 4.79 (dd, $^3J = 11.0, 3.2$ Hz, 1H, H_3'), 5.00 (t, $^3J = 11.0$ Hz, 1H, H_4), 7.25-7.30 (m, 2H, H_{Ar}), 7.35-7.40 (m, 3H, H_{Ar}).

$^{13}\text{C NMR}$ (100.5 MHz, CDCl_3) : δ 23.2 (C_7), 34.6 (C_8), 47.6 (C_4), 55.3 (C_6), 67.8 (C_3), 69.5 (q, $^2J = 20.1$ Hz, $\text{C}_{8\text{a}}$), 125.5 (q, $^1J = 280.4$ Hz, CF_3), 127.4, 128.5, 129.0, 136.0 (C_{Ar}), 167.2 (C_1)

$^{19}\text{F NMR}$ (376.2 MHz, CDCl_3) : δ -77.3 (s, 3F, CF_3)

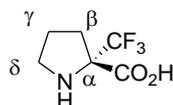
IR (v.cm^{-1}) 1752, 1151, 1110, 701

Anal Calc.: C 58.95; H 4.95; N 4.91. Found C 58.78, H 5.07.

MS (EI) m/z 285 (M^+), 226, 216, 158, 130, 104 (100)

α -Trifluoromethylprolines (**6**)

(*S*)- α -Trifluoromethylproline (*S*)- **6**.



The pure (*R,S*)- **5** diastereomer (2.119 g, 7.43 mmol) in absolute ethanol (78 mL) was hydrogenated over 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (0.227 g) at room temperature for 2 days under 5 bars pressure of hydrogen. The reaction mixture was filtered, evaporated under reduced pressure and washed with ether to afford the (*S*)- α -Tfm proline (*S*)- **6** (0.920 g, 68 %).

$\text{C}_6\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_2$

MW : 183.05 g.mol^{-1}

Aspect : White solid

m.p.: degradation > 198 °C

$[\alpha]_{\text{D}} = -61.0$ (c 1.2, H_2O)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) : δ 1.66-1.78 (m, 1H, H_7), 1.83-1.91 (m, 1H, H_7'), 2.20 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_β), 2.90-3.00 (m, 1H, H_δ), 3.17-3.23 (m, 1H, H_δ')

^{13}C NMR (100.5 MHz, D_2O) : δ 23.8 (C_γ), 31.0 (C_β), 47.7 (C_δ), 73.0 (q, $^2J = 28.3$ Hz, C_α), 123.3 (q, $^1J = 281.8$ Hz, CF_3), 168.7 (CO)

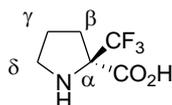
^{19}F NMR (376.2 MHz, D_2O) : δ -74.7 (s, 3F, CF_3)

IR (v.cm^{-1}) 3305, 1659, 1582, 1401, 1365, 1161

MS(EI) m/z 138 ($\text{M}^+-\text{CO}_2\text{H}$) (100), 118, 91.

(*R*)- α -Trifluoromethylproline ((*R*)- 6).

The pure (*R, R*)- 5 diastereomer (2.590 g, 9.09 mmol) in absolute ethanol (95 mL) was hydrogenated over 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (5.180 g) at room temperature for 20 h under 5 bar atmosphere pressure of hydrogen. The reaction mixture was filtered, evaporated under reduced pressure and washed with ether to afford the (*R*)- α -Tfm proline (*R*)- 6 (0.770 g, 46 %).



$\text{C}_6\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_2$

MW : 183.05 g.mol^{-1}

Aspect : White solid

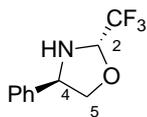
m.p.: degradation over 198 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +54.5 (c 1.6, H_2O)

spectral data of (*R*)- 6 are similar to those of (*S*)- 6.

(4*R*)-2-trifluoromethyl-4-phenyloxazolidine (7)

To a solution of (*R*)-phenylglycinol (25.00 g, 182.2 mmol, 1.0 eq) in toluene (500 mL), at room temperature, were slowly added trifluoroacetaldehyde hydrate (22.20 g, 191.3 mmol, 1.05 eq) and pyridinium *para*-toluenesulfonate (4.61 g, 18.22 mmol, 0.1 eq). The reaction mixture was refluxed for 5 h using a Dean Stark apparatus. The mixture was cooled to 0°C in order to precipitate the PPTS which was then filtered. The filtrate was concentrated to provide 36.09 g (166.2 mmol, 91%) of an inseparable mixture of *cis/trans* (37/63) oxazolidines 7 as a yellow oil.

(S,R)- 7C₁₀H₁₀F₃NOMW: 217.19 g.mol⁻¹

Aspect: colourless oil

[α]_D = -43.0 (c 1.09, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.61 (t, ³J = 7.8 Hz, 1H, NH), 3.76 (t, ³J = 7.8 Hz, 1H, H₅), 4.40 (dd, ²J = 7.8 Hz, ³J = 7.3 Hz, 1H, H_{5'}), 4.51 (dd, ³J = 7.3 Hz, ³J = 7.8 Hz, 1H, H₄), 5.16 (q, ³J = 5.5 Hz, 1H, H₂), 7.31-7.38 (m, 5H, H_{Ar}).

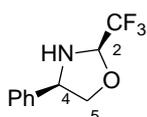
¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 61.0 (C₄), 73.4 (C₅), 88.1 (q, ²J = 33.5 Hz, C₂), 123.7 (q, ¹J = 238.5 Hz, CF₃), 126.8 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 129.2 (C_{Ar}), 138.4 (C_{Ar}).

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ □-84.6 (d, 3F, ³J = 5.5 Hz, CF₃).

IR: (v.cm⁻¹) 2938, 1289, 1147, 1117, 699

Anal. Calc. C, 55.30, H, 4.64, N, 6.45, found C, 55.67, H, 4.72, N, 6.11.

HRMS Calc. 217.0715, found 217.0706

(R,R)- 7C₁₀H₁₀F₃NOMW: 217.19 g.mol⁻¹

Aspect: yellow oil

[α]_D = -56.4 (c 1.17, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ □2.85 (m, 1H, NH), 3.75 (t, ³J = 8.9 Hz, 1H, H₅), 4.33 (dd, ²J = 8.9 Hz, ³J = 8.0 Hz, 1H, H₅), 4.59 (dd, ³J = 8.0 and 8.9 Hz, 1H, H₄), 5.11 (qd, ³J = 5.5 Hz and ³J = 5.2 Hz, 1H, H₂), 7.20-7.40 (m, 5H, H_{Ar}).

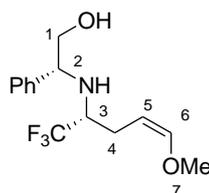
¹³C NMR (62.9 MHz, CDCl₃) : δ □61.1 (C₄), 73.8 (C₅), 87.0 (q, ²J = 34.5 Hz, C₂), 123.6 (q, ¹J = 238.5 Hz, CF₃), 126.7 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 128.6 (C_{Ar}), 138.4 (C_{Ar}).

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3) : δ -84.8 (bs, CF_3)

IR: (v.cm^{-1}) 3364, 2896, 1458, 1291, 1152

Anal. Calc. C, 55.30, H, 4.64, N, 6.45, found C, 55.67, H, 4.72, N, 6.11.

(R)-2-[(1R,Z)-1-trifluoromethyl-4-methoxybut-3-enylamino]-2-phenylethanol (8)



To a solution of allylmethylether (20.226 g, 280.48 mmol, 3.0 eq) in THF (220 mL) under argon atmosphere and at -78°C was added dropwise a solution of *s*-BuLi (251.72 mL, 1.3 M in hexanes, 327.22 mmol, 3.5 eq). The reaction mixture was stirred at -78°C for 45 min. A solution of oxazolidine **7** (20.306 g, 93.49 mmol, 1.0 eq) in THF (220 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at -78°C for 2 h. The reaction was quenched at -78°C with a saturated NH_4Cl solution. The aqueous layer was extracted three times with ethyl acetate. The organic layers were combined, washed with water and brine, dried over MgSO_4 and then filtered and concentrated under reduced pressure to afford the crude product (33.920 g) as an orange oil. The crude mixture was engaged into the next step without any purification. Purification of an analytical sample by silica gel chromatography provided the following characterisations of major diastereoisomer. The desired aminoalcohol **8** was obtained as a mixture of two diastereoisomers (83/17).

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NO}_2$

MW: 289.29 g.mol^{-1}

Aspect: Yellow oil

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -52.2 (*c* 1.0, CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 2.16 (bs, 2H, NH and OH), 2.26-2.34 (ddd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 13.5$ Hz and $^3J = 6.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{4\text{a}}$), 2.59 (ddd, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 8.5$ Hz and $^3J = 5.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{4\text{b}}$), 3.04 (ddq, $^3J = 13.5$ Hz, $^3J = 8.0$ Hz and $^3J = 5.3$ Hz, 1H, H_3), 3.55 (dd, $^2J = 10.9$ Hz and $^3J = 8.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{1\text{a}}$), 3.63 (s, 3H, H_7), 3.70 (dd, $^2J = 10.9$ Hz and $^3J = 4.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{1\text{b}}$), 4.03 (dd, $^3J = 8.1$ Hz and $^3J = 4.4$ Hz, 1H, H_2), 4.44 (ddd, $^3J = 8.5$ Hz, $^3J = 6.6$ Hz and $^3J = 6.2$ Hz, 1H, H_5), 6.09 (d, $^3J = 6.2$ Hz, 1H, H_6), 4.22-4.39 (m, 5H, H_{Ar})

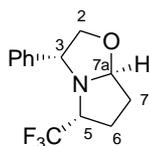
^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3) : δ 23.0 (C_4), 56.6 (q, $^2J = 27.8$ Hz, C_3), 59.8 (C_7), 62.5 (C_2), 67.4 (C_1), 100.4 (C_5), 126.5 (q, $^1J = 282.1$ Hz, CF_3), 127.8 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 128.7 (C_{Ar}), 140.1 (C_{Ar}), 149.4 (C_6)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3) : δ -77.7 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 3F, CF_3)

IR: (v.cm^{-1}) 3341, 2935, 1665, 1454, 1397, 1264, 1224, 1129, 1105, 1025, 931, 758, 700

HRMS Calc. 289.1290, Found 289.1290

(3*R*,5*R*,7*aS*)-3-phenyl-5-trifluoromethyl-hexahydropyrrolo[2,1-*b*]oxazole (9)



To a solution of crude aminoalcohol **8** (13.319 g, 46.04 mmol, 1.0 eq) in diethyl ether (175 mL) was slowly added a sulphuric acid aqueous solution (172.65 mL, 2 M, 345.3 mmol, 7.5 eq). After 2 min. of vigorous stirring, the aqueous layer was extracted three times with diethyl ether. The organic layers were combined, washed with water, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to afford the desired bicyclic oxazolidines (13.34 g) as a mixture of two diastereoisomers (84/16). Purification by silica gel chromatography afforded the pure bicyclic oxazolidines (7.817 g, 30.39 mmol, 66%) as an inseparable mixture of two diastereoisomers *cis*-**9** and *trans*-**9** (84/16).

To a solution of crude mixture of bicyclic oxazolidines **9** (7.800 g, 30.32 mmol, 1.0 eq) in THF (150 mL) under argon atmosphere and at 0°C was slowly added a solution of PhMgCl (3.19 mL, 25% in THF, 6.06 mmol, 0.2 eq). The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The evolution of the reaction was regularly monitored by ^{19}F NMR. A solution of PhMgCl (6.39 mL, 25% in THF, 12.13 mmol, 0.4 eq) was added to allow the reaction to complete after 3 h of stirring. The reaction was quenched at 0°C with a saturated NH_4Cl solution (75 mL). The aqueous layer was extracted three times with DCM. The organic layers were combined, washed with water and brine, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/ ethyl acetate 100/0 to 90/10) to provide the diastereomerically pure bicyclic oxazolidine *cis*-**9** (5.348 g, 20.79 mmol, 69%).

$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}$

MW: 257.25 g.mol^{-1}

Aspect: Colourless oil

$[\alpha]_D = -73,1$ (*c* 1.25, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.96-2.13 (m, 2H, H₆ and H₇), 2.17-2.32 (m, 2H, H₆ and H₇), 3.42 (ddq, ³*J* = 8.0 Hz, ³*J* = 7.6 Hz and ³*J* = 3.7 Hz, 1H, H₅), 3.59 (dd, ²*J* = 8.2 Hz and ³*J* = 6.6 Hz, 1H, H₂), 4.28-4.37 (m, 2H, H₂' and H₃), 4.96 (d, ³*J* = 4.1 Hz, 1H, H_{7a}), 7.23-7.27 (m, 1H, H_{Ar}), 7.31-7.39 (m, 4H, H_{Ar})

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 24.0 (C₇), 29.9 (C₆), 68.2 (q, ²*J* = 29.7 Hz, C₅), 70.6 (C₃), 73.3 (C₂), 98.9 (C_{7a}), 126.3 (C_{Ar}), 126.4 (q, ¹*J* = 278.9 Hz, CF₃), 127.3 (C_{Ar}), 128.6 (C_{Ar}), 141.5 (C_{Ar})

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -79.6 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 3F, CF₃)

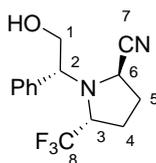
IR: (v.cm⁻¹) 2872, 1497, 1451, 1396, 1376, 1282, 1183, 1153, 1123, 1024, 986, 890, 755, 698

HRMS Calc. 257.1028, Found 257.1025

(2*R*,5*R*)-1-[(*R*)-2-hydroxy-1-phenylethyl]-2-cyano-5-trifluoromethylpyrrolidine (10)

To a solution of bicyclic oxazolidine *cis*-**9** (3.070 g, 11.93 mmol, 1.0 eq), in DCM (35 mL) under argon atmosphere and at 0°C was slowly added boron trifluoride etherate (3.02 mL, 23.87 mmol, 2.0 eq). The reaction mixture was stirred at 0°C for 15 min and then TMSCN (3.18 mL, 23.87 mmol, 2.0 eq) was added dropwise. The reaction mixture was slowly allowed to warm up and was stirred at room temperature overnight. The reaction was quenched at 0°C with a saturated solution of NaHCO₃ (25 mL). The aqueous layer was extracted three times with DCM. The organic layers were combined, washed with NaOH 2 M and water, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification of the crude product (3.712 g, 70% *de*) by silica gel chromatography (cyclohexane/ethylacetate 98/2 to 66/33) afforded the pure pyrrolidines (*R,R*)-**10** (1.423 g, 42 %) and (*S,R*)-**10** (0.395g, 12 %) as yellow oils.

(*R,R*)-10



C₁₄H₁₅F₃N₂O

MW: 284.28 g.mol⁻¹

Aspect: Yellow oil

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.74 (dq, $^2J = 13.5$ Hz and $^3J = 8.9$ Hz, 1H, H_{4a}), 2.00-2.06 (m, 1H, H_{4b}), 2.21 (dd, $^2J = 14.5$ Hz and $^3J = 7.5$ Hz, 2H, H_5), 2.67 (bs, 1H, OH), 3.82 (pd, $^3J = 8.0$ Hz and $^3J = 2.6$ Hz, 1H, H_3), 3.95 (dd, $^2J = 11.5$ Hz and $^3J = 5.3$ Hz, 1H, H_{1a}), 4.07 (dd, $^2J = 11.5$ Hz and $^3J = 8.6$ Hz, 1H, H_{1b}), 4.12 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, H_6), 4.19 (dd, $^3J = 8.6$ Hz and $^3J = 5.3$ Hz, 1H, H_2), 7.29-7.40 (m, 5H, H_{Ar})

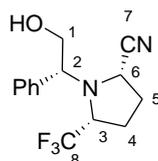
^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3): δ 26.0 (C_4), 30.1 (C_5), 52.0 (C_6), 61.4 (q, $^2J = 29.7$ Hz, C_3), 62.0 (C_1), 66.0 (C_2), 120.2 (C_7), 126.2 (q, $^1J = 280.8$ Hz, C_8), 128.1 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 128.9 (C_{Ar}), 136.4 (C_{Ar})

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3): δ -78.6 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 3F, CF_3)

IR: ($\nu\text{.cm}^{-1}$) 3459, 2887, 1495, 1452, 1381, 1278, 1154, 1117, 1146, 942, 882, 829, 763, 735, 700, 654

HRMS Calc. 284.1136, Found 284.1133

(*S,R*)-10



$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}$

MW: 284.28 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

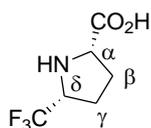
Aspect: Yellow oil

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2.03-2.33 (m, 5H, OH, H_4 and H_5), 3.83 (pd, $^3J = 7.4$ Hz and $^3J = 1.0$ Hz, 1H, H_3), 4.02 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 1H, H_6), 4.13 (dd, $^2J = 11.0$ Hz and $^3J = 5.9$ Hz, 1H, H_{1a}), 4.43 (dd, $^2J = 11.0$ Hz and $^3J = 8.9$ Hz, 1H, H_{1b}), 4.59 (dd, $^3J = 8.9$ Hz and $^3J = 5.9$ Hz, 1H, H_2), 7.27-7.41 (m, 5H, H_{Ar})

^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3): δ 26.1 (C_4), 30.0 (C_5), 52.0 (C_6), 59.3 (q, $^2J = 29.7$ Hz, C_3), 62.3 (C_1), 62.8 (C_2), 121.7 (C_7), 126.4 (q, $^1J = 282.8$ Hz, C_8), 128.4 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 129.1 (C_{Ar}), 136.5 (C_{Ar})

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3): δ -78.5 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 3F, CF_3)

HRMS Calc. 284.1136, Found 284.1150

(*R,R*)-5-Trifluoromethylproline (11)

A solution of (*R,R*)-**10** (1.330 g, 4.68 mmol, 1.0 eq) in MeOH, HCl (25 mL) was stirred at r.t. overnight. The reaction was quenched with NaHCO₃, the aqueous layer was extracted three times with DCM. The organic layers were combined, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (90:10 cyclohexane/ethyl acetate) gave 1.100 g (74 %) of the methyl ester pyrrolidine. Then this pyrrolidine (1.000 g, 3.15 mmol, 1 eq) was dissolved in THF (17 mL) and LiOH (3.47 mg, 3.47 mmol, 1.1 eq) was added at 0°C. The mixture is stirred at r.t. overnight then diluted with water and acidified to pH 1 with HCl. The aqueous layer was extracted three times with AcOEt. The organic layers were combined, washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (90:10 cyclohexane/ethyl acetate) gave 795 mg (83 %) of the *N*-protected 5-Trifluoromethylproline. This compound (660 mg, 2.18 mmol, 1 eq) was hydrogenated over 10% Pd/C (232 mg) in MeOH (22 mL) under 1 bar of H₂ for 1 h. The reaction mixture was filtered, evaporated under reduced pressure and recrystallized with ether/pentane to afford the pure (*R,R*)-5-Tfm-proline **11** (315 mg, 79%).



MW: 183.13 g.mol⁻¹

Aspect: White Solid

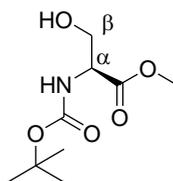
m.p.: 80°C

[α]_D = -63.2 (*c* 1.02, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.92-1.99 (m, 1H, H_γ), 2.05-2.14 (m, 1H, H_γ), 2.17-2.30 (m, 2H, H_β), 3.83 (dd, ³*J* = 6.9 Hz and ³*J* = 5.9 Hz, 1H, H_δ), 4.00 (t, ³*J* = 5.9 Hz, 1H, H_α)

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 25.7 (C_γ), 29.6 (C_β), 59.9 (q, ²*J* = 30.7 Hz, C_δ), 60.1 (C_α), 125.8 (q, ¹*J* = 277.9 Hz, CF₃), 174.5 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -79.2 (d, ³*J* = 6.9 Hz, 3F, CF₃)

Boc-L-Ser-OMe (12)

Acetyl chloride (45.51 mL, 637.7 mmol, 2 equiv) was added dropwise at 0°C to MeOH (475 mL). The solution is stirred for 5 minutes then L-serine (33.480 g, 318.9 mmol, 1 equiv) was added. The solution was refluxed for 2 h then cooled to r.t. The removal of the solvent under reduced pressure gave 40.640 (82%) of the crude L-serine methyl ester hydrochloride as a white crystalline solid that is used without further purification.

To a solution of L-serine methyl ester hydrochloride (40.640 g, 262.2 mmol, 1 equiv) in THF (550 mL) at 0°C was added Et₃N (52.963 g, 524.4 mmol, 2 equiv) and Boc₂O (62.874 g, 288.4 mmol, 1.1 equiv). The mixture is heated at 50°C for 24 h then cooled to 0°C and quenched with H₂O (300 mL) and stirred for 30 min. The aqueous solution was extracted with ethyl acetate (3 × 400 mL). The combined organic layers were washed with a diluted HCl solution (0.1 M) (2 × 100 mL) and a saturated NaCl solution (2 × 100 mL). The organic extracts were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give protected serine **12** 53.030 g (92 %). The crude product **12** was used without further purification. NMR data are in accordance with literature data.¹²⁹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.45 (s, 9H, H_{tBu}), 3.08 (bs s, 1H, OH), 3.78 (s, 3H, H_{Me}), 3.87-3.90 (m, 1H, H_β), 3.95-3.97 (bs, 1H, H_{β'}), 4.38 (bs, 1H, NH), 5.59 (m, 1H, H_α)

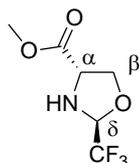
¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 28.2 (C_{tBu}), 52.5 (C_{Me}), 55.6 (C_α), 63.2 (C_β), 80.2 (C_{q tBu}), 155.8 (NCO), 171.4 (CO)

L-Ser(Ψ^{CF₃,H}pro)-OMe (13)

To a solution of crude Boc-L-Ser-OMe **12** (20.000 g, 91.3 mmol, 1 equiv) in toluene (60 mL) was added PPTS (4.583 g, 18.3 mmol, 0.2 equiv) and trifluoroacetaldehyde hydrate (12.713 g, 109.6 mmol, 1.2 equiv). After stirring the mixture for 1 h at room temperature, toluene (600 mL) was added and the reaction was heated to reflux with a dean stark apparatus

¹²⁹ Saito, Y; Ouchi, H.; Takahata, H. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11599-11607.

for 24 h then cooled to 0°C, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product is a mixture of two diastereoisomers (84/16). Purification by flash chromatography (90:10 cyclohexane/ethyl acetate) gave 18.08 g (99 %) of major (*S,S*)-**13** and minor (*R,S*)-**13** mixture. Pure analytical samples of the diastereomers were isolated for the determination of their analytical data.

(*S,S*)- 13:

$C_6H_8F_3NO_3$

MW : 199.13 g.mol⁻¹

Aspect : colorless oil

[α]_D = -50.4 (c 4.95, CHCl₃)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ 3.28 (m, 1H, NH), 3.79 (s, 3H, H_{Me}), 3.83 (ddd, ³J = 7.8, 6.2, 1.0 Hz, 1 H, H _{α}), 4.02 (dd, ³J = 7.8, 6.2 Hz, 1 H, H _{β}), 4.23 (t, ³J = 7.8 Hz, 1H, H _{β'}), 5.04 (q, ³J = 5.7 Hz, 1H, H _{δ})

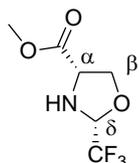
¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 52.9 (C _{α}), 58.5 (C_{Me}), 69.7 (C _{β}), 87.8 (q, ²J = 34.5 Hz, C _{δ}), 123.2 (q, ¹J = 283.6 Hz, CF₃), 171.9 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -85.0 (dd, ³J = 5.7, 1.0 Hz, 3F, CF₃)

IR (v.cm⁻¹) 3338, 2962, 1740, 1439, 1287, 1223, 1158, 1131, 665

MS(EI) m/z = 199 [M⁺], 140 [M⁺ - CO₂Me] (100), 130, 112, 92, 70

HRMS calc. 199.0456, found 199.0457.

(*R,S*)- 13 :

$C_6H_8F_3NO_3$

MW : 199.13 g.mol⁻¹

Aspect : White solid

m.p.: 65 °C

$[\alpha]_D = -17.61$ (c 4.9, CHCl₃)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ 3.18 (m, 1H, NH), 3.71 (s, 3H, H_{Me}), 4.08 (ddq, ³J = 6.5, 6.0, 0.7 Hz, 1H, H _{α}), 4.11 (t, ³J = 6.0 Hz, 1 H, H _{β}), 4.15 (ddq, ³J = 6.5, 6.0, 1.1 Hz, 1H, H _{β'}), 4.89 (q, ³J = 5.2 Hz, 1 H, H _{δ})

¹³C NMR (100.5MHz, CDCl₃) : δ 52.6 (C _{α}), 58.6 (C_{Me}), 68.8 (C _{β}), 87.6 (q, ²J = 34.5 Hz, C _{δ}), 122.9 (q, ¹J = 283.6 Hz, CF₃), 171.1 (CO)

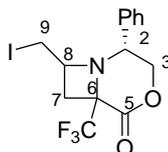
¹⁹F NMR (376.2MHz, CDCl₃) : δ -84.1 (ddd, ³J = 5.2, 1.1, 0.7 Hz, 3F, CF₃)

IR (ν.cm⁻¹) 3309, 1737,1462, 1285, 1231, 1156, 1127, 669

MS (EI) m/z=199 [M⁺], 140 [M⁺ - CO₂Me] (100), 130,112, 92, 70

HRMS calc. 199.0456; found 199.0458.

8-Iodomethyl-2-phenyl-6-trifluoromethyl-4-oxa-1-azabicyclo[4.2.0]octan-5-one (**14**)



To a solution of **3** (245 mg, 0.86 mmol, 1 equiv) in CH₃CN (14 mL) under argon was added NIS (387 mg, 1.72 mmol, 2 equiv). The reaction mixture was heated at 60°C for 3 hours then quenched with NH₄Cl. The aqueous solution was extracted with ethyl acetate (3 × 20 mL). The organic layer was washed with a NaHSO₃ (2 x 20 mL) solution and a saturated NaCl solution (1 x 20 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (90:10 cyclohexane/ethyl acetate) gave bicyclic compound **14** (212 mg, 60%).

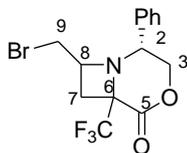
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.35 (dd, ³J = 12.8, 7.3 Hz, 1H, H₉), 2.43 (dd, ³J = 11.7, 4.1 Hz, 1H, H_{9'}), 2.70 (dd, ³J = 12.8, 8.7 Hz, 1H, H₇), 2.81 (t, ³J = 10.5 Hz, 1H, H_{7'}), 3.84 (m, 1H, H₈), 4.42 (dd, ³J = 10.5, 3.7 Hz, 1H, H₃), 4.84 (dd, ³J = 11.9, 3.7 Hz, 1H, H_{3'}), 5.20 (dd, ³J = 11.9, 10.5 Hz, 1H, H₂), 7.36-7.44 (m, 5H, H_{Ar})

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 9.0 (C₉), 31.7 (C₇), 54.0 (C₈), 54.3 (C₂), 68.2 (C₃), 71.3 (q, ²J = 28.7 Hz, C₆), 123.1 (q, ¹J = 281.7 Hz, CF₃), 127.6, 129.1, 129.2, 133.6 (C_{Ar}), 165.4 (C₅)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3) : δ -79.5 (s, 3F, CF_3)

MS (EI) m/z 411 (M^+), 270 ($\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{I}$), 226, 131, 104 (PhC_2H_5^+ , 100), 91, 77.

8-bromomethyl-2-phenyl-6-trifluoromethyl-4-oxa-1-azabicyclo[4.2.0]octan-5-one (15)



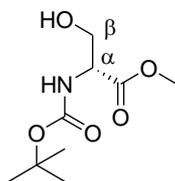
To a solution of **3** (285 mg, 1.00 mmol, 1 equiv) in CH_3CN (14 mL) under argon was added NBS (360 mg, 2.00 mmol, 2 equiv). The reaction mixture was stirred at r.t. for 3 hours then quenched with NH_4Cl . The aqueous solution was extracted with ethyl acetate (3×20 mL). The organic layer was washed with a NaHSO_3 (2×20 mL) solution and a saturated NaCl solution (1×20 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (90:10 cyclohexane/ethyl acetate) gave bicyclic compound **15** (197 mg, 54%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 2.46 (dd, $^3J = 12.8, 6.9$ Hz, 1H, H_9), 2.60 (dd, $^3J = 10.1, 4.3$ Hz, 1H, H_9), 2.70 (dd, $^3J = 12.8, 8.7$ Hz, 1H, H_7), 2.99 (t, $^3J = 10.0$ Hz, 1H, H_7), 3.88 (m, 1H, H_8), 4.36 (dd, $^3J = 10.0, 3.7$ Hz, 1H, H_3), 4.81 (dd, $^3J = 11.9, 3.7$ Hz, 1H, H_3), 5.20 (dd, $^3J = 11.9, 10.0$ Hz, 1H, H_2), 7.36-7.44 (m, 5H, H_{Ar})

^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3) : δ 29.8 (C_9), 34.5 (C_7), 53.3 (C_8), 54.1 (C_2), 68.1 (C_3), 61.5 (q, $^2J = 31.6$ Hz, C_6), 123.1 (q, $^1J = 281.8$ Hz, CF_3), 127.5, 129.1, 129.2, 133.6 (C_{Ar}), 165.5 (C_5)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3) : δ -79.7 (s, 3F, CF_3)

Boc-D-Ser-OMe (16)



Acetyl chloride (27.18 mL, 380.9 mmol, 2 equiv) was added dropwise at 0°C to MeOH (300 mL). The solution is stirred for 5 minutes then D-serine (20.000 g, 190.5 mmol, 1 equiv) was added. The solution was refluxed for 2 h then cooled to r.t. The removal of the solvent under reduced pressure gave 23.890 g (80%) of the crude D-serine methyl ester hydrochloride as a white crystalline solid that is used without further purification.

To a solution of D-serine methyl ester hydrochloride (23.890 g, 154.1 mmol, 1 equiv) in THF (325 mL) at 0°C was added Et₃N (31.134 g, 308.3 mmol, 2 equiv) and Boc₂O (36.960 g, 169.5 mmol, 1.1 equiv). The mixture was heated at 50°C for 24 h then cooled to 0°C and quenched 30 min under stirring. The aqueous solution was extracted with ethyl acetate (3 × 400 mL). The organic layer was washed with a diluted HCl (0.1 M) (2 x 100 mL) solution and a saturated NaCl solution (2 x 100 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give protected serine **16** 27.980 g (84 %). The crude product **16** was used without further purification. NMR data are in accordance with literature data.¹³⁰

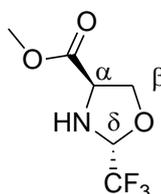
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.45 (s, 9H, H_{tBu}), 3.08 (bs, 1H, OH), 3.78 (s, 3H, H_{Me}), 3.87-3.90 (m, 1H, H_β), 3.95-3.97 (bs, 1H, H_{β'}), 4.38 (bs, 1H, NH), 5.59 (m, 1H, H_α)

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 28.2 (C_{tBu}), 52.5 (C_{Me}), 55.6 (C_α), 63.2 (C_β), 80.2 (C_{q tBu}), 155.8 (NCO), 171.4 (CO)

D-Ser(Ψ^{CF₃,H}pro)-OMe (**17**)

To a solution of crude Boc-D-Ser-OMe **16** (10.000 g, 45.6 mmol, 1 equiv) in toluene (30 mL) was added PPTS (2.300 g, 9.1 mmol, 0.2 equiv) and trifluoroacetaldehyde hydrate (6.360 g, 54.8 mmol, 1.2 equiv). After stirring the mixture for 1 h at room temperature, toluene (300 mL) was added and the reaction was heated to reflux with a dean stark apparatus for 24 h then cooled to 0°C, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product is a mixture of two diastereoisomers (87/13). Purification by flash chromatography (90:10 cyclohexane/ethyl acetate) gave 3.13 g (34 %) of major (**R,R**)-**17** and 0.49 g (5%) of minor (**S,R**)-**17**.

(**R,R**)-**17**:



C₆H₈F₃NO₃

MW : 199.13 g.mol⁻¹

Aspect : colorless oil

¹³⁰ Ollivier, A.; Goubert, M.; Tursun, A.; Canet, I.; Sinibaldi, M.-E. *ARKIVOC* **2010**, 108-126.

$[\alpha]_{\text{D}} = +46.4$ (c 4.95, CHCl_3)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : δ 3.28 (m, 1H, NH), 3.79 (s, 3H, H_{Me}), 3.83 (ddd, $^3J = 7.8$, 6.2, 1.0 Hz, 1 H, H_{α}), 4.02 (dd, $^3J = 7.8$, 6.2 Hz, 1 H, H_{β}), 4.23 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{\beta'}$), 5.04 (q, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, H_{δ})

$^{13}\text{C NMR}$ (100.5 MHz, CDCl_3) : δ 52.9 (C_{α}), 58.5 (C_{Me}), 69.7 (C_{β}), 87.8 (q, $^2J = 34.5$ Hz, C_{δ}), 123.2 (q, $^1J = 283.6$ Hz, CF_3), 171.9 (CO)

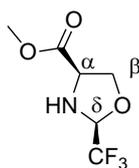
$^{19}\text{F NMR}$ (376.2 MHz, CDCl_3) : δ -85.0 (dd, $^3J = 5.7$, 1.0 Hz, 3F, CF_3)

IR (v.cm^{-1}) 3338, 2962, 1740, 1439, 1287, 1223, 1158, 1131, 665

MS(EI) $m/z = 199$ [M^+], 140 [$\text{M}^+ - \text{CO}_2\text{Me}$] (100), 130, 112, 92, 70

HRMS calc. 199.0456, found 199.0457.

(*S,R*)- 17 :



$\text{C}_6\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$

MW : 199.13 g.mol^{-1}

Aspect : White solid

m.p.: 65 °C

$[\alpha]_{\text{D}} = +19.2$ (c 4.9, CHCl_3)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : δ 3.18 (m, 1H, NH), 3.71 (s, 3H, H_{Me}), 4.08 (ddq, $^3J = 6.5$, 6.0, 0.7 Hz, 1H, H_{α}), 4.11 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 1 H, H_{β}), 4.15 (ddq, $^3J = 6.5$, 6.0, 1.1 Hz, 1H, $\text{H}_{\beta'}$), 4.89 (q, $^3J = 5.2$ Hz, 1 H, H_{δ})

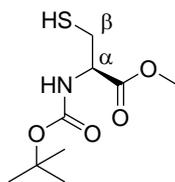
$^{13}\text{C NMR}$ (100.5 MHz, CDCl_3) : δ 52.6 (C_{α}), 58.6 (C_{Me}), 68.8 (C_{β}), 87.6 (q, $^2J = 34.5$ Hz, C_{δ}), 122.9 (q, $^1J = 283.6$ Hz, CF_3), 171.1 (CO)

$^{19}\text{F NMR}$ (376.2 MHz, CDCl_3) : δ -84.1 (ddd, $^3J = 5.2$, 1.1, 0.7 Hz, 3F, CF_3)

IR (v.cm^{-1}) 3309, 1737, 1462, 1285, 1231, 1156, 1127, 669

MS (EI) $m/z = 199$ [M^+], 140 [$\text{M}^+ - \text{CO}_2\text{Me}$] (100), 130, 112, 92, 70

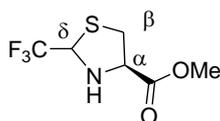
HRMS calc. 199.0456; found 199.0458.

Boc-L-Cys-OMe (18)

To a solution of L-cysteine methyl ester (18.250 g, 106.7 mmol, 1 equiv) in THF (250 mL) at 0°C was added Et₃N (21.558 g, 213.4 mmol, 2 equiv) and Boc₂O (25.593 g, 117.4 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was heated at 50°C for 24 h then cooled to 0°C and quenched 30 min under stirring. The aqueous solution was extracted with ethyl acetate (3 × 200 mL). The organic layer was washed with a diluted HCl (0.1 M) (2 x 50 mL) solution and a saturated NaCl solution (2 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give protected cysteine **18** (22.380 g, 98 %). NMR data are in accordance with literature data ¹²⁹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.46 (s, 9H, H_{tBu}), 1.84 (bs, 1H, OH), 2.95-2.99 (m, 2H, H_β), 3.79 (s, 3H, H_{Me}), 4.61-4.80 (m, 1H, H_α), 5.45 (bs, 1H, SH)

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 27.3 (C_{tBu}), 28.2 (C_{Me}), 52.9 (C_α), 54.8 (C_β), 80.3 (C_q_{tBu}), 155.1 (NCO), 170.8 (CO)

L-Cys(Ψ^{CF₃,H}pro)-OMe (19)

To a solution of Boc-L-Cys-OMe **18** (24.380 g, 103.3 mmol, 1 equiv) in toluene (60 mL) was added PPTS (2.592 g, 10.3 mmol, 0.1 equiv) and CF₃CH(OH)-OH (41.380 g, 124.0 mmol, 1.2 equiv.). After stirring the mixture for 1 h at room temperature, toluene (600 mL) was added and the reaction was heated to reflux with a dean stark apparatus for 24 h then cooled to 0°C, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product is a mixture of two diastereoisomers (66/34). Purification by flash chromatography (90:10 cyclohexane/ethyl acetate) gave 12.435 g (56 %) of **major-19** and 5.553 g (25 %) **minor-19**.

19-min :

C₆H₇F₃NO₂S

MW : 214.19 g.mol⁻¹

Aspect : orange oil

$[\alpha]_D = -31.9$ (*c* 1.05, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.80 (m, 1 H, NH), 3.11 (dd, ³J = 10.5, 9.2 Hz, 1 H, H_β), 3.27 (dd, ³J = 10.5, 6.0 Hz, 1 H, H_{β'}), 3.80 (s, 3 H, H_{Me}), 4.07 (dd, ³J = 9.2, 6.0 Hz, 1 H, H_α), 4.89 (q, ³J = 6.0 Hz, 1 H, H_δ)

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 35.7 (C_β), 52.7 (C_α), 65.2 (C_{Me}), 66.5 (q, ²J = 33.5 Hz, C_δ), 124.4 (q, ¹J = 277.9 Hz, CF₃), 170.5 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -78.0 (d, ³J = 6.0 Hz)

IR (ν.cm⁻¹) 3352, 2956, 1788, 1737, 1438, 1148, 1111

HRMS calc. 215.0228, found 215.0225.

19-maj :

C₆H₇F₃NO₂S

MW : 214.19 g.mol⁻¹

Aspect : orange oil

$[\alpha]_D = -81.6$ (*c* 1.15, CHCl₃)

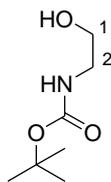
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.97 (dd, ³J = 10.5, 6.9 Hz, 1 H, H_β), 3.20 (m, 1 H, NH), 3.41 (dd, ³J = 10.5, 6.4 Hz, 1 H, H_{β'}), 3.81 (s, 3 H, H_{Me}), 4.12 (dd, ³J = 6.9, 6.4 Hz, 1 H, H_α), 4.89 (q, ³J = 6.0 Hz, 1 H, H_δ)

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 36.8 (C_β), 52.9 (C_α), 64.2 (C_{Me}), 66.5 (q, ²J = 34.5 Hz, C_δ), 124.8 (q, ¹J = 278.8 Hz, CF₃), 171.6 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -79.5 (d, ³J = 6.9 Hz)

IR (ν.cm⁻¹) 3333, 2958, 2853, 1788, 1737, 1438, 1145, 1111

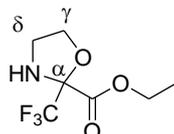
HRMS calc. 215.0228, found 215.0228.

N-(tert-Butoxycarbonyl)ethanolamine (20)

To a solution of ethanolamine (2.0 mL, 33 mmol, 1 equiv) in DCM (100 mL) at 0°C was added Et₃N (6.9 mL, 50 mmol, 1.5 equiv) and Boc₂O (7.200 g, 33 mmol, 1 equiv.). The mixture is stirred at r.t. for 24 h then cooled to 0°C and quenched 30 min under stirring. The aqueous solution was extracted with ethyl acetate (3 × 100 mL). The organic layer was washed with a diluted HCl (0.1 M) (2 x 50 mL) solution and a saturated NaCl solution (2 x 50 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give protected ethanolamine **20** (5.200 g, 98 %). NMR data are in accordance with commercial data.¹³¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ □ 1.44 (s, 9H, H_{tBu}), 3.25 (t, ³J = 3.77 Hz, 2H, H₁), 3.64 (t, ³J = 3.77 Hz, 2H, H₂), 5.16 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ □ 28.3 (C_{tBu}), 43.0 (C₂), 61.9 (C₁), 79.5 (C_{tBu}), 156.4 (CO)

2-trifluoromethyl-2carboxyethyl-1,3-oxazolidine (21)

To a solution of N-Boc-ethanolamine **20** (5.200 g, 33 mmol, 1 equiv) in toluene (100 mL) was added PPTS (829 mg, 3.3 mmol, 0.1 equiv) and ethyltrifluoropyruvate (5.610 g, 102 mmol, 1.2 equiv.). After stirring the mixture for 1 h at room temperature, the reaction was heated to reflux with a dean stark apparatus for 24 h then cooled to 0°C, filtrated and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (90:10 cyclohexane/ethyl acetate) gave 5.320 g (44 %) of oxazolidine **21** as a racemic mixture.

C₇H₁₀F₃NO₃

MW: 213.15 g.mol⁻¹

Aspect: Yellow oil

¹³¹ Varala, R.; Nuvula, S.; Adapa, S. R. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8283-8286.

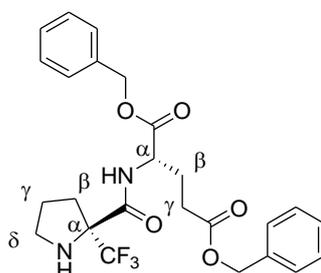
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.35 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, H_{Et}), 3.16 (q, 1H, ³J = 9.9 Hz, H_δ), 3.32 (bs, 1H, NH), 3.38-3.45 (m, 1H, H_{δ'}), 3.77 (q, 1H, ³J = 7.9 Hz, H_γ), 4.15 (ddd, 1H, ³J = 7.9 Hz, ³J = 6.9 Hz and ³J = 2.9 Hz, H_{γ'}), 4.27-4.42 (m, 2H, H_{Et})

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 13.6 (C_{Et}), 46.6 (C_δ), 63.6 (C_{Et}), 68.5 (C_γ), 93.3 (q, ²J = 31.6 Hz, C_α), 122.7 (q, ¹J = 286.6 Hz, CF₃), 166.2 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -83.1 (s, 3F, CF₃)

HRMS Calc. 213.0613

H-(S)-α-Tfm-Pro-L-Glu(OBzl)-OBzl (22)



To a solution of glutamic acid (0.961 g, 1.92 mmol, 2 equiv) in DMF (4 mL) under argon at 0°C was added triethylamine (0.540 mL, 3.94 mmol, 4.1 equiv), HOBT (0.195 g, 1.44 mmol, 1.5 equiv) and EDCI (0.275 g, 1.44 mmol, 1.5 equiv). The reaction mixture was stirred 10 min then (*S*) trifluoromethyl proline (**S**)-**6** (0.176 g, 0.96 mmol, 1 equiv) was added. The mixture was stirred 20 min at 0°C then 24 h at room temperature. The solution was then cooled to 0°C and EDCI was filtrated. The solution was concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate : 90/10) to afford 0.388 g (82 %) of pure isolated peptide **22**.

C₂₅H₂₇F₃N₂O₅

MW : 492.49 g.mol⁻¹

Aspect: colorless oil

[α]_D = -19.6 (c 0.9, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.70 (m, 1H, H_γ Pro), 1.85 (m, 1H, H_{γ'} Pro), 2.07 (m, 1H, H_β Glu), 2.15-2.46 (m, 5H, H_{β'} Glu, H_γ Glu and H_β Pro), 3.08 (t, ³J = 5.9 Hz, 2H, H_δ Pro), 4.62 (ddd, ³J = 8.2 and 8.0 Hz, 1H, H_α Glu), 5.10 (s, 2H, H_{Bzl}), 5.16 (dd, ³J = 12.1 Hz, 2H, H_{Bzl}), 7.30-7.38 (m, 10H, H_{Ar}), 8.1 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, NHCO)

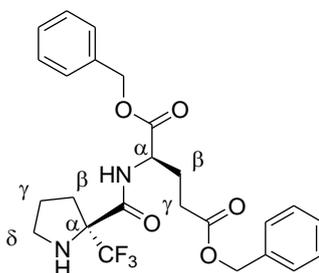
^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3) : δ 25.2 (C_γ Pro), 26.6 (C_β Glu), 29.9 (C_γ Glu), 32.1 (C_β Pro), 47.3 (C_δ Pro), 51.7 (C_α Glu), 66.4, 67.2 (C_{Bzl}), 70.6 (q, $^2J = 26.8$ Hz, C_{α} Pro), 125.7 (q, $^1J = 283.7$ Hz, CF_3), 126.7, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4 (C_{ar}), 134.9, 135.4 (C_{ar}), 169.5, 170.9, 172.2 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3) : δ -77.8 (s, 3F, CF_3)

IR (v.cm^{-1}) : 3021, 1740, 1685

HRMS Calc. 492.1872. Found 492.1873

H-(S)- α -Tfm-Pro-D-Glu(OBzl)-OBzl (23)



To a solution of D-glutamic acid (0.605 g, 1.12 mmol, 2 equiv) in DMF (3 mL) under argon at 0°C was added triethylamine (0.326 mL, 2.46 mmol, 4.1 equiv), HOBT (0.122 g, 0.90 mmol, 1.5 equiv) and EDCI (0.173 g, 0.90 mmol, 1.5 equiv). The reaction mixture was stirred 10 min then (S) trifluoromethyl proline (S)-6 (0.111 g, 0.60 mmol, 1 equiv) was added. The mixture was stirred 20 min at 0°C then 24h at room temperature. The solution was then cooled to 0°C and EDCI was filtrated. The solution was concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate : 90/10) to afford 0.124 g (42 %) of pure isolated peptide **23**.

$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$

MW : 492.49 g.mol^{-1}

Aspect: colorless oil

$[\alpha]_{\text{D}}$ = - 16.6 (c 1.0, CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz) : δ 1.70 (m, 1H, H_γ Pro), 1.79 (m, 1H, $\text{H}_{\gamma'}$ Pro), 2.04 (m, 1H, H_β Glu), 2.11-2.48 (m, 5H, $\text{H}_{\beta'}$ Glu, H_γ Glu and H_β Pro), 3.0 (m, 2H, H_δ Pro), 4.6 (ddd, $^3J = 4.8, 8.5$ and 8.7 Hz, 1H, H_α Glu), 5.08 (s, 2H, H_{Bzl}), 5.14 (dd, $^3J = 10.3$ Hz, 2H, H_{Bzl}), 7.28-7.37 (m, 10H, H_{Ar}), 8.28 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1H, NHCO)

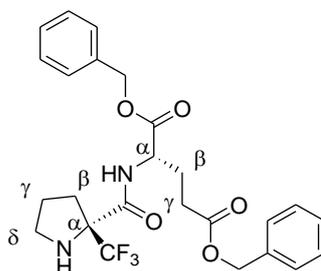
^{13}C NMR (100.5 MHz) : δ 25.1 (C_γ Pro), 26.9 (C_β Glu), 30.2 (C_γ Glu), 32.0 (C_β Pro), 47.5 (C_δ Pro), 51.8 (C_α Glu), 66.5, 67.4 (C_{Bzl}), 71.0 (q, $^2J = 26.8$ Hz, C_α Pro), 125.8 (q, $^1J = 283.7$ Hz, CF_3), 128.2, 128.3, 128.5, 128.6 (C_{ar}), 135.1, 135.7 (C_{ar}), 169.4, 171.1, 172.4 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz) : δ -77.8 (s, 3F, CF_3)

IR ($\nu.\text{cm}^{-1}$) : 3332, 3019, 2925, 1736, 1685

HRMS : Calc. 492.1872 Found 492.1874

H-(*R*)- α -Tfm-Pro-L-Glu(OBzl)-OBzl (24)



To a solution of glutamic acid (0.794 g, 1.53 mmol, 2 equiv) in DMF (3 mL) under argon at 0°C was added triethylamine (0.420 mL, 3.14 mmol, 4.1 equiv), HOBT (0.155 g, 1.15 mmol, 1.5 equiv) and EDCI (0.219 g, 1.15 mmol, 1.5 equiv). The reaction mixture was stirred 10 min then (*R*) trifluoromethyl proline (**R**)-**6** (0.140 g, 0.76 mmol, 1 equiv) was added. The mixture was stirred 20 min at 0°C then 24h at room temperature. The solution was then cooled to 0°C and EDCI was filtrated. The solution was concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate : 90/10) to afford 0.334 g (89 %) of pure isolated peptide **24**.

$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$

MW : 492.49 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: colorless oil

$[\alpha]_{\text{D}}$ = +18.1 (*c* 0.9, CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz) : δ 1.70 (m, 1H, H_γ Pro), 1.79 (m, 1H, $\text{H}_{\gamma'}$ Pro), 2.04 (m, 1H, H_β Glu), 2.11-2.48 (m, 5H, $\text{H}_{\beta'}$ Glu, H_γ Glu and H_β Pro), 3.0 (m, 2H, H_δ Pro), 4.6 (ddd, $^3J = 4.8, 8.5$ and 8.7 Hz, 1H, H_α Glu), 5.08 (s, 2H, H_{Bzl}), 5.14 (dd, $^3J = 10.3$ Hz, 2H, H_{Bzl}), 7.28-7.37 (m, 10H, H_{Ar}), 8.28 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1H, NHCO)

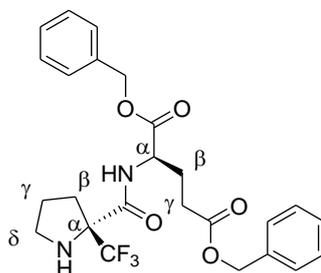
^{13}C NMR (100.5 MHz) : δ 25.1 (C_γ Pro), 26.9 (C_β Glu), 30.2 (C_γ Glu), 32.0 (C_β Pro), 47.5 (C_δ Pro), 51.8 (C_α Glu), 66.5, 67.4 (C_{Bzl}), 71.0 (q, $^2J = 26.8$ Hz, C_α Pro), 125.8 (q, $^1J = 283.7$ Hz, CF_3), 128.2, 128.3, 128.5, 128.6 (C_{ar}), 135.1, 135.7 (C_{ar}), 169.4, 171.1, 172.4 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz) : δ -77.8 (s, 3F, CF_3)

IR ($\nu.\text{cm}^{-1}$) : 3332, 3019, 2925, 1736, 1685

HRMS : Calc. 492.1872 Found 492.1874

H-(R)- α -Tfm-Pro-D-Glu(OBzl)-OBzl (25)



To a solution of D-glutamic acid (0.332 g, 0.67 mmol, 2 equiv) in DMF (1.5 mL) under argon at 0°C was added triethylamine (0.181 mL, 1.36 mmol, 4.1 equiv), HOBT (0.068 g, 0.50 mmol, 1.5 equiv) and EDCI (0.096 g, 0.50 mmol, 1.5 equiv). The reaction mixture was stirred 10 min then (*R*) trifluoromethyl proline (**R**-6) (0.061 g, 0.33 mmol, 1 equiv) was added. The mixture was stirred 20 min at 0°C then 24h at room temperature. The solution was then cooled to 0°C and EDCI was filtrated. The solution was concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate : 90/10) to afford 0.110 g (67 %) of pure isolated peptide **25**.

$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$

MW : 492.49 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: colorless oil

$[\alpha]_D$ = +22.9 (*c* 1.0, CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 1.70 (m, 1H, H_γ Pro), 1.85 (m, 1H, $\text{H}_{\gamma'}$ Pro), 2.07 (m, 1H, H_β Glu), 2.15-2.46 (m, 5H, $\text{H}_{\beta'}$ Glu, H_γ Glu and H_β Pro), 3.08 (t, $^3J = 5.9$ Hz, 2H, H_δ Pro), 4.62 (ddd, $^3J = 8.2$ and 8.0 Hz, 1H, H_α Glu), 5.10 (s, 2H, H_{Bzl}), 5.16 (dd, $^3J = 12.1$ Hz, 2H, H_{Bzl}), 7.30-7.38 (m, 10H, H_{Ar}), 8.1 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1H, NHCO)

^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3) : δ 25.2 (C_γ Pro), 26.6 (C_β Glu), 29.9 (C_γ Glu), 32.1 (C_β Pro), 47.3 (C_δ Pro), 51.7 (C_α Glu), 66.4, 67.2 (C_{Bzl}), 70.6 (q, $^2J = 26.8$ Hz, C_α Pro), 125.7 (q, $^1J = 283.7$

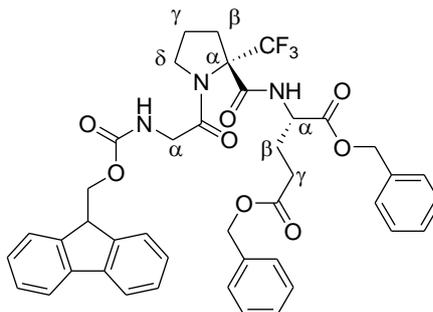
Hz, CF₃), 126.7, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4 (C_{ar}), 134.9, 135.4 (C_{ar}), 169.5, 170.9, 172.2 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -77.8 (s, 3F, CF₃)

IR (ν.cm⁻¹) : 3021, 1740, 1685

HRMS Calc. 492.1872. Found 492.1873

Fmoc-Gly-(S)-α-Tfm-Pro-L-Glu(OBzl)-OBzl (26)



To a solution of peptide **22** (0.552 g, 1.12 mmol, 1 equiv) in anhydrous DCM (4 mL) under argon was added Fmoc-Gly-Cl (0.708 g, 2.24 mmol, 2 equiv). The mixture was refluxed for 24h and then quenched by saturated NaHCO₃ solution (20 mL). The aqueous phase was extracted by DCM (3 x 20 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (70:30 cyclohexane/ethyl acetate) gave 0.757 g (88 %) of peptide **26**.

C₄₂H₄₀F₃N₃O₈

MW: 771.78 g.mol⁻¹

Aspect : White solid

m.p.: 110°C

[α]_D = -53.7 (c 0.23, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.08 (m, 2H, H_γ Pro), 2.24-2.60 (m, 6H, H_β Glu, H_γ Glu and H_β Pro), 3.59 (q, ³J = 8.7 Hz, 1H, H_δ Pro), 3.70 (q, ³J = 8.0 Hz, 1H, H_{δ'} Pro), 4.05 (s, 2H, H_α Gly), 4.20 (t, ³J = 7.1 Hz, 1H, CHFmoc), 4.35 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.65 (m, 1H, H_α Glu), 5.05 (s, 2H, H_{Bzl}), 5.16 (q, ³J = 12.1 Hz, 2H, H_{Bzl}), 5.72 (s, 1H, NHFmoc), 7.20 (d, ³J = 6.9 Hz, 1H, NH), 7.25-7.40 (m, 14H, H_{Ar}), 7.59 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.8 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H, H_{Ar}Fmoc)

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 23.3 (C_γ Pro), 26.4 (C_β Glu), 29.9 (C_γ Glu), 34.1 (C_β Pro), 44.1 (C_α Gly), 47.0 (CHFmoc), 48.5 (C₁₃), 52.7 (C₄), 66.5, 67.1, 67.4 (C_{Bzl} CH₂Fmoc), 72.0 (q, ²J_{CF} = 28.7 Hz, C_α Pro), 119.9 (C_{ar}), 124.9 (q, ¹J_{CF} = 286.6 Hz, CF₃), 125.1, 127.0, 127.6

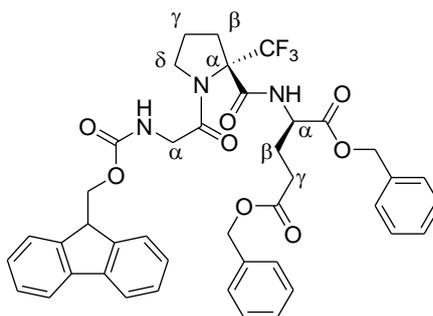
(C_{Fmoc}), 128.1, 128.2, 128.3, 128.5 (C_{ar}), 135.0, 135.6 (C_{ar}), 141.2, 143.8 (C_{Fmoc}), 156.1, 165.9, 167.9, 170.9, 172.9 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ - 71.3 (s, 3F, CF₃)

IR (ν.cm⁻¹) : 3300, 1728, 1681

HRMS : Calc. 771.2767 Found 771.2860

Fmoc-Gly-(S)-α-Tfm-Pro-D-Glu(OBzl)-OBzl (27)



C₄₂H₄₀F₃N₃O₈

Aspect : White solid

m.p.: 110°C

[α]_D = -21.4 (c 0.44, CHCl₃)

MW: 771.78 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.95-2.07 (m, 3H, H_γ Pro and H_β Glu), 2.20 (m, 1H, H_{β'} Glu), 2.34-2.51 (m, 4H, H_γ Glu and H_γ Pro), 3.54 (q, ³J = 8.9 Hz, 1H, H_δ Pro), 3.66 (q, ³J = 6.9 Hz, 1H, H_{δ'} Pro), 3.96 (dd, ³J = 4.3 and 4.1 Hz, 1H, CHFmoc), 4.12-4.18 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.27 (dd, ³J = 10.3 and 7.1 Hz 1H, H_α Gly), 4.37 (dd, ³J = 10.3 and 7.6 Hz 1H, H_{α'} Gly), 4.62 (m, 1H, H_α Glu), 5.01 (d, ³J = 12.1 Hz, 1H, H_{Bzl}), 5.09 (d, ³J = 12.1 Hz, 1H, H_{Bzl}), 5.10 (d, ³J = 12.1 Hz, 1H, H_{Bzl}), 5.18 (d, ³J = 12.1 Hz, 1H, H_{Bzl}), 5.69 (m, 1H, NHFmoc), 7.28-7.42 (m, 14H, H_{Ar}), 7.55-7.62 (m, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.71 (d, ³J = 6.6 Hz, 1H, NH), 7.74-7.78 (m, 2H, H_{Ar}Fmoc)

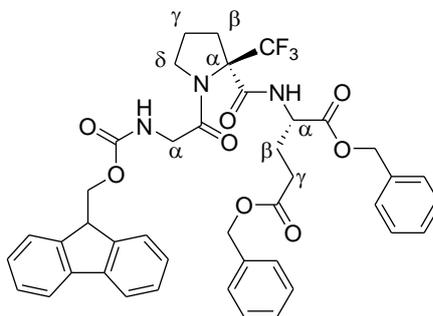
¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 23.0 (C_γ Pro), 25.8 (C_β Glu), 30.0 (C_γ Glu), 34.4 (C_β Pro), 44.3 (C_α Gly), 47.0 (CHFmoc), 48.5 (C_δ Pro), 52.4 (C_α Glu), 66.9, 67.2, 67.4 (C_{Bzl} CH₂Fmoc), 72.2 (q, ²J_{CF} = 28.7 Hz, C_α Pro), 120.0, 125.1 (C_{Fmoc}), 126.1 (q, ¹J_{CF} = 290.4 Hz, CF₃), 120.0, 125.1, 127.0, 127.7 (C_{Fmoc}), 128.0, 128.3, 128.4, 128.6 (C_{ar}), 135.1, 135.4 (C_{ar}), 141.3, 143.8 (C_{Fmoc}), 156.2, 166.2, 167.9, 171.0, 174.1 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -71.1 (s, 3F, CF₃)

IR (ν.cm⁻¹) : 1450, 1519, 1681, 1728

HRMS : Calc. 771.2767 Found 771.2883

Fmoc-Gly-(R)- α -Tfm-Pro-L-Glu(OBzl)-OBzl (28)



To a solution of peptide **24** (0.190 g, 0.39 mmol, 1 equiv) in anhydrous DCM (2 mL) under argon was added Fmoc-Gly-Cl (0.243 g, 0.77 mmol, 2 equiv). The mixture was refluxed for 24h and then quenched by saturated NaHCO₃ solution (10 mL). The aqueous phase was extracted by DCM (3 x 10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (70:30 cyclohexane/ethyl acetate) gave 0.159 g (53 %) of peptide **28**.

C₄₂H₄₀F₃N₃O₈

Aspect : White solid

m.p.: 110°C

[α]_D = +23.1 (c 0.45, CHCl₃)

MW: 771.78 g.mol⁻¹

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.95-2.07 (m, 3H, H _{γ} Pro and H _{β} Glu), 2.20 (m, 1H, H _{β'} Glu), 2.34-2.51 (m, 4H, H _{γ} Glu and H _{γ} Pro), 3.54 (q, ³J = 8.9 Hz, 1H, H _{δ} Pro), 3.66 (q, ³J = 6.9 Hz, 1H, H _{δ'} Pro), 3.96 (dd, ³J = 4.3 and 4.1 Hz, 1H, CHFmoc), 4.12-4.18 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.27 (dd, ³J = 10.3 and 7.1 Hz 1H, H _{α} Gly), 4.37 (dd, ³J = 10.3 and 7.6 Hz 1H, H _{α'} Gly), 4.62 (m, 1H, H _{α} Glu), 5.01 (d, ³J = 12.1 Hz, 1H, H_{Bzl}), 5.09 (d, ³J = 12.1 Hz, 1H, H_{Bzl}), 5.10 (d, ³J = 12.1 Hz, 1H, H_{Bzl}), 5.18 (d, ³J = 12.1 Hz, 1H, H_{Bzl}), 5.69 (m, 1H, NHFmoc), 7.28-7.42 (m, 14H, H_{Ar}), 7.55-7.62 (m, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.71 (d, ³J = 6.6 Hz, 1H, NH), 7.74-7.78 (m, 2H, H_{Ar}Fmoc)

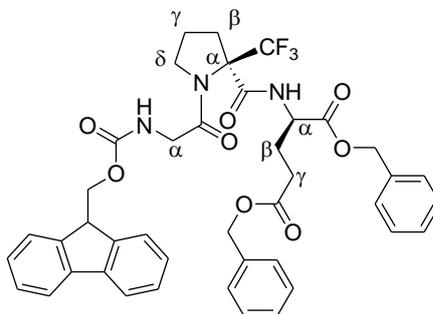
¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 23.0 (C _{γ} Pro), 25.8 (C _{β} Glu), 30.0 (C _{γ} Glu), 34.4 (C _{β} Pro), 44.3 (C _{α} Gly), 47.0 (CHFmoc), 48.5 (C _{δ} Pro), 52.4 (C _{α} Glu), 66.9, 67.2, 67.4 (C_{Bzl} CH₂Fmoc), 72.2 (q, ²J_{CF} = 28.7 Hz, C _{α} Pro), 120.0, 125.1 (C_{Fmoc}), 126.1 (q, ¹J_{CF} = 290.4 Hz, CF₃), 120.0, 125.1, 127.0, 127.7 (C_{Fmoc}), 128.0, 128.3, 128.4, 128.6 (C_{Ar}), 135.1, 135.4 (C_{Ar}), 141.3, 143.8 (C_{Fmoc}), 156.2, 166.2, 167.9, 171.0, 174.1 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -71.1 (s, 3F, CF₃)

IR (v.cm⁻¹) : 1450, 1519, 1681, 1728

HRMS : Calc. 771.2767 Found 771.2883

Fmoc-Gly-(R)- α -Tfm-Pro-D-Glu(OBzl)-OBzl (29)



$C_{42}H_{40}F_3N_3O_8$

MW: 771.78 g.mol⁻¹

Aspect : White solid

m.p.: 110°C

$[\alpha]_D = +52.2$ (c 0.25, CHCl₃)

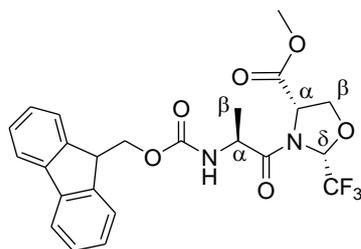
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.08 (m, 2H, H _{γ} Pro), 2.24-2.60 (m, 6H, H _{β} Glu, H _{γ} Glu and H _{β} Pro), 3.59 (q, ³J = 8.7 Hz, 1H, H _{δ} Pro), 3.70 (q, ³J = 8.0 Hz, 1H, H _{δ'} Pro), 4.05 (s, 2H, H _{α} Gly), 4.20 (t, ³J = 7.1 Hz, 1H, CHFmoc), 4.35 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.65 (m, 1H, H _{α} Glu), 5.05 (s, 2H, H_{Bzl}), 5.16 (q, ³J = 12.1 Hz, 2H, H_{Bzl}), 5.72 (s, 1H, NHFmoc), 7.20 (d, ³J = 6.9 Hz, 1H, NH), 7.25-7.40 (m, 14H, H_{Ar}), 7.59 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H, H_{ArFmoc}), 7.8 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H, H_{ArFmoc})

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 23.3 (C _{γ} Pro), 26.4 (C _{β} Glu), 29.9 (C _{γ} Glu), 34.1 (C _{β} Pro), 44.1 (C _{α} Gly), 47.0 (CHFmoc), 48.5 (C₁₃), 52.7 (C₄), 66.5, 67.1, 67.4 (C_{Bzl} CH₂Fmoc), 72.0 (q, ²J_{CF} = 28.7 Hz, C _{α} Pro), 119.9 (C_{ar}), 124.9 (q, ¹J_{CF} = 286.6 Hz, CF₃), 125.1, 127.0, 127.6 (C_{Fmoc}), 128.1, 128.2, 128.3, 128.5 (C_{ar}), 135.0, 135.6 (C_{ar}), 141.2, 143.8 (C_{Fmoc}), 156.1, 165.9, 167.9, 170.9, 172.9 (CO)

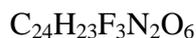
¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -71.3 (s, 3F, CF₃)

IR (ν .cm⁻¹) : 3300, 1728, 1681

HRMS : Calc. 771.2767 Found 771.2860

Fmoc-L-Ala-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (30)

To a solution of **13** (1.000 g, 5.0 mmol, 1 equiv) in DCM (15 mL) was added Fmoc-Ala-Cl (1.812 g, 5.5 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 1.650 g (66 %) of peptide **30**.



MW: 492.44 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: White solid

m.p.: 56-60 $^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}} = -81.2$ (c 0.95, CHCl_3)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 274 K) : (*trans rotamer*) δ 1.46 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, H_{β} Ala), 3.78 (s, 3 H, H_{Me}), 4.20 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.30 (dd, $^3J = 10.5$, 7.3 Hz, 1 H, CH_2Fmoc), 4.31-4.35 (m, 1 H, H_{β} Ψ_{pro}), 4.31-4.37 (m, 1 H, H_{α} Ala), 4.42 (dd, $^3J = 10.5$, 7.1 Hz, 1 H, CH_2 Fmoc), 4.49 (t, $^3J = 8.9$ Hz, 1 H, $\text{H}_{\beta'}$ Ψ_{pro}), 5.06 (t, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, H_{α} Ψ_{pro}), 5.39 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1 H, NH_{Ala}), 6.28 (q, $^3J = 4.8$ Hz, 1 H, H_{δ} Ψ_{pro}), 7.33 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.43 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.58 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.79 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

(*cis rotamer*) δ 1.39 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3 H, H_{β} Ala), 3.78 (s, 3 H, H_{Me}), 4.20 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.30-4.36 (m, 1 H, CH_2Fmoc), 4.38-4.44 (m, 1 H, CH_2Fmoc), 4.52-4.56 (m, 1 H, H_{β} Ψ_{pro}), 4.58-4.61 (m, 1 H, $\text{H}_{\beta'}$ Ψ_{pro}), 4.58-4.66 (m, 1 H, H_{α} Ala), 4.71-4.78 (m, 1 H, H_{α} Ψ_{pro}), 5.69 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, NH_{Ala}), 5.88 (q, $^3J = 4.3$ Hz, 1 H, H_{δ} Ψ_{pro}), 7.33 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.43 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.58 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.79 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 274 K) : (*trans rotamer*) δ 17.8 (C_{β} Ala), 46.8 (CHFmoc), 48.7 (C_{α} Ala), 53.1 (C_{Me}), 56.6 (C_{α} Ψ_{pro}), 67.2 (CH_2Fmoc), 69.0 (C_{β} Ψ_{pro}), 84.9 (q, $^2J = 36.0$ Hz, C_{δ} Ψ_{pro}), 120.0 (C_{Fmoc}), 121.8 (q, $^1J = 286.6$ Hz, CF_3), 125.0, 127.6, 127.7, 140.6, 143.0 (C_{Fmoc}), 155.6, 167.8, 167.9 (CO)

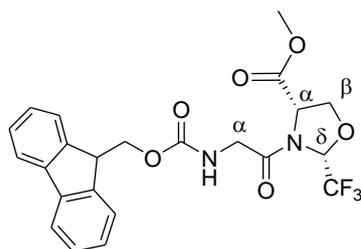
(*cis* rotamer) δ 19.1 (C_{β} Ala), 46.8 (CHFmoc), 48.5 (C_{α} Ala), 53.7 (C_{Me}), 56.8 (C_{α} Ψ_{pro}), 67.2 (CH_2 Fmoc), 70.4 (C_{β} Ψ_{pro}), 84.5 (q, $^2J = 34.0$ Hz, C_{δ} Ψ_{pro}), 120.0 (CH_{Fmoc}), 121.8 (q, $^1J = 286.6$ Hz, CF_3), 125.0, 127.6, 127.7, 140.6, 143.0 (C_{Fmoc}), 155.7, 167.2, 167.9 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz, $CDCl_3$, 298 K) : (*trans* rotamer) δ -82.0 (s, CF_3)
(*cis* rotamer) δ -81.8 (s, CF_3)

IR ($\nu.cm^{-1}$) : 3324, 3015, 2955, 1743, 1684, 1523, 1154, 757, 743

HRMS : Calc. 492.1508 Found 492.1590

Fmoc-Gly-L-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe (31)



To a solution of **13** (7.940 g, 33.9 mmol, 1 equiv) in DCM (120 mL) was added Fmoc-Gly-Cl (13.830 g, 43.9 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated $NaHCO_3$ solution (40 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3 \times 40 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (40 mL). The combined organic extracts were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 18.390 g (96 %) of peptide **31**.

$C_{23}H_{21}F_3N_2O_6$

MW: 478.42 $g.mol^{-1}$

Aspect: White solid

m.p. : 88-92 $^{\circ}C$

$[\alpha]_D = -36.0$ (c 1.06, $CHCl_3$)

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 274 K) : (*trans* rotamer) δ 3.79 (s, 3 H, H_{Me}), 4.00 (m, 1 H, H_{α} Gly), 4.20 (m, 1 H, $H_{\alpha'}$ Gly), 4.23 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.39 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2 H, CH_2 Fmoc), 4.48-4.54 (m, 2 H, H_{β} Ψ_{pro}), 5.05 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, H_{α} Ψ_{pro}), 5.67 (q, $^3J = 4.7$ Hz, 1 H, H_{δ} Ψ_{pro}), 5.70-5.75 (m, 1 H, NH_{Gly}), 7.32 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.42 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.60 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.78 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

(*cis* rotamer) δ 3.82 (s, 3 H, H_{Me}), 4.05 (m, 1 H, H _{α} Gly), 4.22 (m, 1 H, H _{α'} Gly), 4.23 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.39 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2 H, CH₂Fmoc), 4.54 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 2 H, H _{β} Ψ _{pro}), 4.80 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 1 H, H _{α} Ψ _{pro}), 5.70-5.75 (m, 1 H, NH_{Gly}), 5.97 (q, $^3J = 5.0$ Hz, 1 H, H _{δ} Ψ _{pro}), 7.32 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.42 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.60 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.78 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 274 K) : (*trans* rotamer) δ 42.8 (C _{α} Gly), 46.2 (CHFmoc), 52.4 (C_{Me}), 56.3 (C _{α} Ψ _{pro}), 66.8 (CH₂Fmoc), 68.2 (C _{β} Ψ _{pro}), 83.6 (q, $^2J = 36.4$ Hz, C _{δ} Ψ _{pro}), 119.4 (C_{Fmoc}), 121.8 (q, $^1J = 286.6$ Hz, CF₃), 124.9, 126.9, 127.6, 140.6, 143.0 (C_{Fmoc}), 155.7, 167.2, 167.9 (CO)

(*cis* rotamer) δ 42.5 (C _{α} Gly), 46.3 (CHFmo), 53.0 (C_{Me}), 56.1 (C _{α} Ψ _{pro}), 66.7 (CH₂Fmoc), 69.9 (C _{β} Ψ _{pro}), 83.7 (q, $J = 36.4$ Hz, C _{δ} Ψ _{pro}), 119.4 (C_{Fmoc}), 121.8 (q, $J = 286.6$ Hz, CF₃), 124.5, 126.4, 127.1, 140.6, 143.0 (C_{Fmoc}), 155.6, 167.8, 167.9 (CO)

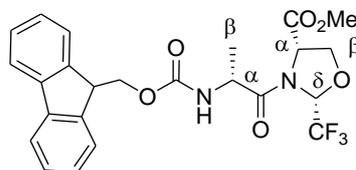
¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃, 298 K) : (*trans* rotamer) δ -81.8 (s, CF₃)

(*cis* rotamer) δ -82.8 (s, CF₃)

IR (ν.cm⁻¹) : 3338, 2955, 1686, 1518, 1150, 727

HRMS : Calc. 478.1352 Found 478.1408

Fmoc-D-Ala-L-Ser(Ψ ^{CF₃,H}Pro)-OMe (32)



To a solution of **13** (2.120 g, 10.6 mmol, 1 equiv) in DCM (30 mL) was added Fmoc-D-Ala-Cl (3.860 g, 11.7 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO₃ solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3 × 10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 2.584 g (49 %) of peptide **32**.

C₂₄H₂₃F₃N₂O₆

MW: 492.44 g.mol⁻¹

Aspect: White solid

m.p. : 64°C

[α]_D = -47.5 (c 1.05, CHCl₃)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 302 K) : (*cis* rotamer) δ 1.47 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 3 H, H_{β} Ala), 3.83 (s, 3 H, H_{Me}), 4.19 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.32-4.42 (m, 3 H, H_{α} Ala, CH_2Fmoc), 4.46 (t, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, H_{β} Ψ_{pro}), 4.52-4.60 (m, 1 H, $\text{H}_{\beta'}$ Ψ_{pro}), 5.30 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 1 H, NH_{Ala}), 5.47 (dd, $^3J = 7.6, 4.4$ Hz, 1 H, H_{α} Ψ_{pro}), 5.98 (q, $^3J = 5.1$ Hz, 1 H, H_{δ} Ψ_{pro}), 7.31 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.41 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.56 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.79 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

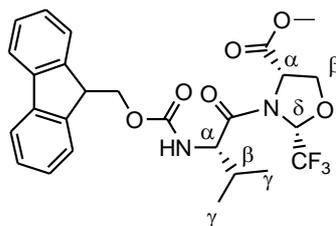
^{13}C NMR (100,5 MHz, CDCl_3 , 323 K) : (*cis* rotamer) δ 18.0 (C_{β} Ala), 47.2 (CHFmoc), 48.6 (C_{α} Ala), 53.0 (C_{Me}), 57.8 (C_{α} Ψ_{pro}), 67.3 (CH_2Fmoc), 70.3 (C_{β} Ψ_{pro}), 84.2 (q, $^2J = 35.5$ Hz, C_{δ} Ψ_{pro}), 120.0 (C_{Fmoc}), 122.6 (q, $^1J = 285.6$ Hz, CF_3), 124.9, 127.0, 127.8, 141.3, 143.6 (C_{Fmoc}), 156.3, 169.2, 173.8 (CO)

^{19}F NMR (376,2 MHz, CDCl_3 , 298 K) : (*cis* rotamer) δ -82.6 (s, CF_3)

IR ($\nu.\text{cm}^{-1}$) : 3326, 2956, 1752, 1686, 1524, 1153, 758, 742.

MS m/z 493.55

Fmoc-L-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (33)



To a solution of **13** (2.000 g, 10 mmol, 1 equiv) in DCM (30 mL) was added Fmoc-Val-Cl (3.950 g, 11 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 3.090 g (59 %) of peptide **33**.

$\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$

MW: 520.50 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect : White solid

m.p. : 112°C

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -74.5 (c 1.0, CHCl_3)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K) : (*trans* rotamer) δ 1.03 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 3 H, H_γ Val), 1.05 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 3 H, H_γ Val), 2.06-2.15 (m, 1 H, H_β Val), 3.75 (s, 3 H, H_{Me}), 3.97 (t, $^3J = 9.0$ Hz, 1 H, H_α Val), 4.19 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.31 (dd, $^3J = 9.8, 6.9$ Hz, 1 H, H_β Ψ_{pro}), 4.33 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, CH_2Fmoc), 4.46 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, CH_2Fmoc), 4.47 (dd, $^3J = 9.8, 6.4$ Hz, 1 H, H_β Ψ_{pro}), 5.10 (t, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, H_α Ψ_{pro}), 5.26 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1 H, NH_{Val}), 6.40 (q, $^3J = 4.6$ Hz, 1 H, H_δ Ψ_{pro}), 7.31 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.40 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.56 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.76 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

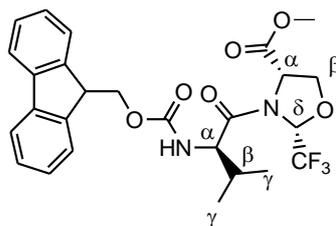
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K) : (*trans* rotamer) δ 18.5 (C_γ Val), 18.6 (C_γ Val), 31.6 (C_β Val), 47.0 (CHFmoc), 52.7 (C_{Me}), 56.5 (C_α Val), 58.6 (C_α Ψ_{pro}), 67.3 (CH_2Fmoc), 68.7 (C_β Ψ_{pro}), 85.0 (q, $^2J = 37.4$ Hz, C_δ Ψ_{pro}), 120.0 (C_{Fmoc}), 122.7 (q, $^1J = 286.6$ Hz, CF_3), 124.9, 127.0, 127.8, 141.3, 143.6 (C_{Fmoc}), 156.5, 168.6, 172.5 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3 , 298 K) : (*trans* rotamer) δ -80.9 (d, $J = 4.6$ Hz)

IR (v.cm^{-1}) 3312, 2928, 2159, 1977, 1764, 1716

HRMS calc. 520.1821 Found 520.1906

Fmoc-D-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (34)



To a solution of **13** (300 mg, 1.51 mmol, 1 equiv) in DCM (5 mL) was added Fmoc-D-Val-Cl (594 g, 1.66 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 620 mg (79 %) of peptide **34**.

$\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$

MW: 520.50 g.mol^{-1}

Aspect : White solid

m.p. : 112°C

$[\alpha]_D = -29.9$ (c 1.0, CHCl_3)

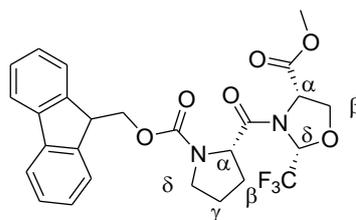
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.02 (d, ³*J* = 6.9 Hz, 6H, H_γ val), 2.12 (m, 1H, H_β val), 3.81 (s, 3H, H_{Me}), 4.05 (t, ³*J* = 8.7 Hz, 1H, H_α val), 4.19 (dd, ³*J* = 7.3, 6.9 Hz, 1H, CHFmoc), 4.25-4.36 (m, 2H, CH₂Fmoc), 4.44 (m, 1H, H_β ψ_{pro}), 4.61 (m, 1H, H_{β'} ψ_{pro}), 5.26 (m, 1H, H_α ψ_{pro}), 5.57 (m, 1H, NH), 5.99 (q, ³*J* = 4.6 Hz, 1H, H_δ ψ_{pro}), 7.30 (t, ³*J* = 7.3 Hz, 2H, H_{FmocAr}), 7.40 (t, ³*J* = 7.3 Hz, 2H, H_{FmocAr}), 7.55 (d, ³*J* = 7.3 Hz, 2H, H_{FmocAr}), 7.76 (d, ³*J* = 7.3 Hz, 2H, H_{FmocAr})

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 18.4 (C_γ val), 19.0 (C_γ val), 31.4 (C_β val), 47.1 (CHFmoc), 52.9 (C_{Me}), 58.0 (C_α ψ_{pro}), 58.4 (C_α val), 67.2 (CH₂Fmoc), 70.4 (C_β ψ_{pro}), 83.9 (q, ²*J* = 41.2 Hz, C_δ ψ_{pro}), 120.0 (C_{Fmoc}), 125.0 (q, ¹*J* = 284.2 Hz, CF₃), 124.9, 125.0, 127.1, 127.8, 141.3, 143.5, 143.6 (C_{Fmoc}), 156.6, 169.1, 173.2 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : δ -82.6 (bs, 3F, CF₃)

IR (ν.cm⁻¹) 3312, 2928, 2159, 1977, 1764, 1716

Fmoc-L-Pro-L-Ser(Ψ^{CF₃,H}Pro)-OMe (**35**)



To a solution of **13** (1.020 g, 5.1 mmol, 1 equiv) in DCM (15 mL) was added Fmoc-Pro-Cl (2.000 g, 5.6 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO₃ solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3 × 10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 1.390 g (52 %) of peptide **35**.

C₂₆H₂₅F₃N₂O₆

MW: 518.48 g.mol⁻¹

Aspect : White solid

[α]_D = -56.1 (c 1.0, CHCl₃)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K) : (*trans* rotamer) δ 1.94-2.05 (m, 1 H, H_γ Pro), 2.10-2.26 (m, 2 H, H_β Pro), 2.27-2.39 (m, 1 H, H_{γ'} Pro), 3.52-3.60 (m, 1 H, H_δ Pro), 3.67-3.74 (m, 1 H, H_{δ'} Pro), 3.77 (s, 3 H, H_{Me}), 4.23 (t, ³*J* = 7.1 Hz, 1 H, CHFmoc), 4.32 (dd, ³*J* = 8.5, 6.9 Hz, 1 H, H_β ψ_{pro}), 4.34 (d, ³*J* = 7.1 Hz, 2 H, CH₂Fmoc), 4.36-4.40 (m, 1 H, 1 H, H_α Pro), 4.50 (t, ³*J* = 8.5

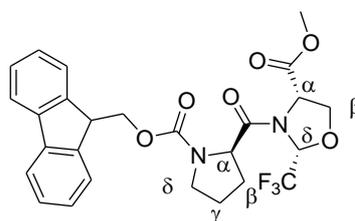
Hz, 1 H, $H_{\beta' \Psi_{\text{Pro}}}$), 5.06 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, $H_{\alpha \Psi_{\text{Pro}}}$), 6.23 (q, $^3J = 4.8$ Hz, 1 H, $H_{\delta \Psi_{\text{Pro}}}$), 7.31 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.40 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.56 (t, $^3J = 8.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.77 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K) : (*trans* rotamer) δ 24.8 ($C_{\gamma \text{ Pro}}$), 30.9 ($C_{\beta \text{ Pro}}$), 47.1 ($C_{\delta \text{ Pro}}$), 47.2 (CHFmoc), 52.8 (C_{Me}), 56.9 ($C_{\alpha \text{ Val}}$), 58.3 ($C_{\alpha \Psi_{\text{Pro}}}$), 67.7 (CH_2Fmoc), 68.9 (CH_2 , $C_{\beta \Psi_{\text{Pro}}}$), 85.1 (q, $^2J = 30.7$ Hz, $C_{\delta \Psi_{\text{Pro}}}$), 120.1 (C_{Fmoc}), 122.9 (q, $^1J = 286.6$ Hz, CF_3), 125.2, 127.1, 127.8, 141.4, 143.9 (C_{Fmoc}), 155.4, 168.8, 173.0 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3 , 298 K) : (*trans* rotamer) δ -82.0 (d, $^3J = 4.8$ Hz)

Anal Calc. : % C = 60.23 % H = 4.86 % N = 5.40 **Found.**: % C = 60.22 % H = 4.84 % N = 5.51

Fmoc-D-Pro-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (36)



To a solution of **13** (300 mg, 1.51 mmol, 1 equiv) in DCM (5 mL) was added Fmoc-D-Pro-Cl (591 mg, 1.66 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 722 mg (92 %) of peptide **36**.

$\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$

MW: 518.48 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect : White solid

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -78.0 (c 1.02, CHCl_3)

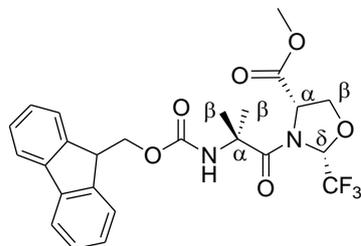
^1H NMR (400 MHz) : δ 1.97 (m, 1H, $H_{\gamma \text{ Pro}}$), 2.17-2.24 (m, 2H, $H_{\beta \text{ Pro}}$), 2.28-2.35 (m, 1H, $H_{\gamma' \text{ Pro}}$), 3.53-3.59 (m, 1H, $H_{\delta \text{ Pro}}$), 3.67-3.73 (m, 1H, $H_{\delta' \text{ Pro}}$), 3.80 (s, 3H, H_{Me}), 4.20-4.30 (m, $^3J = 8.7$ Hz, 2H, CHFmoc and CH_2Fmoc), 4.34-4.38 (m, 2H, CH_2Fmoc and $H_{\alpha \text{ Pro}}$), 4.50-4.53 (m, 2H, $H_{\beta \Psi_{\text{Pro}}}$), 5.47-5.50 (m, 1H, $H_{\alpha \Psi_{\text{Pro}}}$), 5.99 (q, $^3J = 5.0$ Hz, 1H, $H_{\delta \Psi_{\text{Pro}}}$), 7.30 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{ArFmoc}), 7.40 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{ArFmoc}), 7.56 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{ArFmoc}), 7.76 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{ArFmoc})

^{13}C NMR (100.5 MHz) : δ 24.8 ($C_{\gamma \text{ Pro}}$), 30.7 ($C_{\beta \text{ Pro}}$), 47.0 ($C_{\delta \text{ Pro}}$), 47.1 (CHFmoc), 53.0 (C_{Me}), 58.0 ($C_{\alpha \Psi_{\text{Pro}}}$), 58.2 ($C_{\alpha \text{ Pro}}$), 67.7 (CH_2Fmoc), 70.4 ($C_{\beta \Psi_{\text{Pro}}}$), 84.1 (q, $^2J = 35.5$ Hz,

$\delta_{\Psi\text{Pro}}$, 120.0, 125.0, 125.1, 127.1, 127.7 (C_{Fmoc}), 122.7 (q, $^1J = 285.6$ Hz, CF_3), 141.3, 143.6, 143.8 (C_{Fmoc}), 152.3, 169.6, 173.8 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz) : δ -82.8 (d, $^3J = 4.8$ Hz, 3F, CF_3)

Fmoc-Aib-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (37)



To a solution of **13** (500 mg, 2.51 mmol, 1 equiv) in DCM (8 mL) was added Fmoc-Aib-Cl (2.59 g, 7.53 mmol, 3 equiv). The mixture was refluxed for 48 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 709 mg (55 %) of peptide **37**.

$\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$

MW: 506.47 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect : White solid

m.p. : 112°C

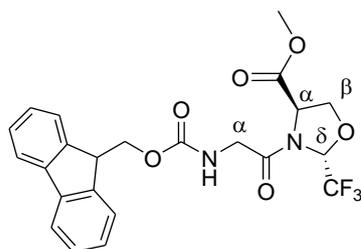
$[\alpha]_{\text{D}} = -28.4$ (c 1.02, CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 273 K) : δ 1.54 (br s, 6 H, $\text{H}_{\beta \text{ Aib}}$), 3.69 (s, 3 H, H_{Me}), 4.16 (m, 1 H, $\text{H}_{\beta \Psi\text{pro}}$), 4.18 (m, 1 H, CHFmoc), 4.39 (m, 1 H, $\text{H}_{\beta \Psi\text{pro}}$), 4.50-4.52 (m, 2 H, CH_2Fmoc), 5.10 (s, 1 H, NH_{Aib}), 5.14 (m, 1 H, $\text{H}_{\alpha \Psi\text{pro}}$), 6.04 (m, 1 H, $\text{H}_{\delta \Psi\text{pro}}$), 7.34 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.43 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.57 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.76 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3 , 273 K) : δ 25.7 ($C_{\beta \text{ Aib}}$), 46.5 (CHFmoc), 52.4 (C_{Me}), 57.6 ($C_{\alpha \Psi\text{pro}}$), 57.9 ($C_{\alpha \text{ Aib}}$), 65.9 (CH_2Fmoc), 69.5 ($C_{\beta \Psi\text{pro}}$), 84.9 (q, $^2J = 35.5$ Hz, $C_{\delta \Psi\text{pro}}$), 119.4 (C_{Fmoc}), 121.9 (q, $^1J = 285.6$ Hz, CF_3), 124.1, 126.5, 127.3, 140.7, 142.7 (C_{Fmoc}), 154.7, 169.0, 172.6 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3 , 298 K) : δ -80.9 (d, $J = 5.2$ Hz);

IR ($\nu\cdot\text{cm}^{-1}$) : 3321, 2952, 1709, 1677, 1513, 1144, 739

Fmoc-Gly-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (38)

To a solution of **17** (307 mg, 1.54 mmol, 1 equiv) in DCM (6 mL) was added Fmoc-Gly-Cl (535 mg, 1.70 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 462 g (63 %) of peptide **38**.

$\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$

MW: 478.42 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: White solid

m.p.: 88-92 $^\circ\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}$ = +44.2 (c 1.05, CHCl_3)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 274 K): (*trans* rotamer) δ 3.79 (s, 3 H, H_{Me}), 4.00 (m, 1 H, $\text{H}_{\alpha \text{ Gly}}$), 4.20 (m, 1 H, $\text{H}_{\alpha' \text{ Gly}}$), 4.23 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.39 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2 H, CH_2Fmoc), 4.48-4.54 (m, 2 H, $\text{H}_{\beta \Psi\text{pro}}$), 5.05 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, $\text{H}_{\alpha \Psi\text{pro}}$), 5.67 (q, $^3J = 4.7$ Hz, 1 H, $\text{H}_{\delta \Psi\text{pro}}$), 5.70-5.75 (m, 1 H, NH_{Gly}), 7.32 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.42 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.60 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.78 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

(*cis* rotamer) δ 3.82 (s, 3 H, H_{Me}), 4.05 (m, 1 H, $\text{H}_{\alpha \text{ Gly}}$), 4.22 (m, 1 H, $\text{H}_{\alpha' \text{ Gly}}$), 4.23 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.39 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2 H, CH_2Fmoc), 4.54 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 2 H, $\text{H}_{\beta \Psi\text{pro}}$), 4.80 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 1 H, $\text{H}_{\alpha \Psi\text{pro}}$), 5.70-5.75 (m, 1 H, NH_{Gly}), 5.97 (q, $^3J = 5.0$ Hz, 1 H, $\text{H}_{\delta \Psi\text{pro}}$), 7.32 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.42 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.60 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.78 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 274 K): (*trans* rotamer) δ 42.8 ($\text{C}_{\alpha \text{ Gly}}$), 46.2 (CHFmoc), 52.4 (C_{Me}), 56.3 ($\text{C}_{\alpha \Psi\text{pro}}$), 66.8 (CH_2Fmoc), 68.2 ($\text{C}_{\beta \Psi\text{pro}}$), 83.6 (q, $^2J = 36.4$ Hz, $\text{C}_{\delta \Psi\text{pro}}$), 119.4 (C_{Fmoc}), 121.8 (q, $^1J = 286.6$ Hz, CF_3), 124.9, 126.9, 127.6, 140.6, 143.0 (C_{Fmoc}), 155.7, 167.2, 167.9 (CO)

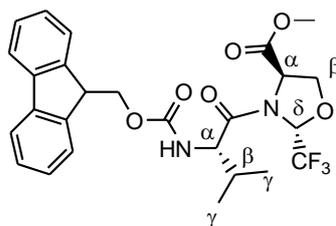
(*cis* rotamer) δ 42.5 ($\text{C}_{\alpha \text{ Gly}}$), 46.3 (CHFmo), 53.0 (C_{Me}), 56.1 ($\text{C}_{\alpha \Psi\text{pro}}$), 66.7 (CH_2Fmoc), 69.9 ($\text{C}_{\beta \Psi\text{pro}}$), 83.7 (q, $J = 36.4$ Hz, $\text{C}_{\delta \Psi\text{pro}}$), 119.4 (C_{Fmoc}), 121.8 (q, $J = 286.6$ Hz, CF_3), 124.5, 126.4, 127.1, 140.6, 143.0 (C_{Fmoc}), 155.6, 167.8, 167.9 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3 , 298 K) : (*trans* rotamer) δ -81.8 (s, CF_3)
 (*cis* rotamer) δ -82.8 (s, CF_3)

IR ($\nu\cdot\text{cm}^{-1}$) : 3338, 2955, 1686, 1518, 1150, 727

HRMS : Calc. 478.1352 Found 478.1408

Fmoc-L-Ala-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (39)



To a solution of **17** (294 mg, 1.48 mmol, 1 equiv) in DCM (5 mL) was added Fmoc-Ala-Cl (536 mg, 1.63 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 406 mg (56 %) of peptide **39**.

$\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$

MW: 492.44 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect: White solid

m.p. : 64°C

$[\alpha]_{\text{D}} = +43.2$ (c 1.00, CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 1.02 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 6H, H_γ val), 2.12 (m, 1H, H_β val), 3.81 (s, 3H, H_{Me}), 4.05 (t, $^3J = 8.7$ Hz, 1H, H_α val), 4.19 (dd, $^3J = 7.3, 6.9$ Hz, 1H, CHFmoc), 4.25-4.36 (m, 2H, CH_2Fmoc), 4.44 (m, 1H, H_β Ψ_{pro}), 4.61 (m, 1H, $\text{H}_{\beta'}$ Ψ_{pro}), 5.26 (m, 1H, H_α Ψ_{pro}), 5.57 (m, 1H, NH), 5.99 (q, $^3J = 4.6$ Hz, 1H, H_δ Ψ_{pro}), 7.30 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{FmocAr}), 7.40 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{FmocAr}), 7.55 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{FmocAr}), 7.76 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{FmocAr})

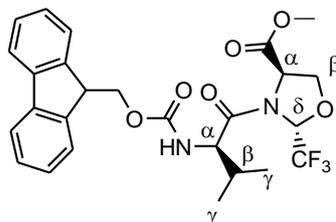
^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3) : δ 18.4 (C_γ val), 19.0 (C_γ val), 31.4 (C_β val), 47.1 (CHFmoc), 52.9 (C_{Me}), 58.0 (C_α Ψ_{pro}), 58.4 (C_α val), 67.2 (CH_2Fmoc), 70.4 (C_β Ψ_{pro}), 83.9 (q, $^2J = 41.2$ Hz, C_δ Ψ_{pro}), 120.0 (C_{Fmoc}), 125.0 (q, $^1J = 284.2$ Hz, CF_3), 124.9, 125.0, 127.1, 127.8, 141.3, 143.5, 143.6 (C_{Fmoc}), 156.6, 169.1, 173.2 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3) : δ -82.6 (bs, 3F, CF_3)

IR (v.cm^{-1}) : 3326, 2956, 1752, 1686, 1524, 1153, 758, 742.

MS m/z 493.55

Fmoc-D-Ala-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (40)



To a solution of **17** (300 mg, 1.51 mmol, 1 equiv) in DCM (5 mL) was added Fmoc-D-Ala-Cl (547 mg, 1.66 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 541 mg (73 %) of peptide **40**.

$\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$

MW: 492.44 g.mol^{-1}

Aspect: White solid

m.p. : 56-60 $^\circ\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}} = +80.3$ (c 1.00, CHCl_3)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 274 K) : (*trans* rotamer) δ 1.46 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, H_β Ala), 3.78 (s, 3 H, H_{Me}), 4.20 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.30 (dd, $^3J = 10.5, 7.3$ Hz, 1 H, CH_2Fmoc), 4.31-4.35 (m, 1 H, H_β Ψ_{pro}), 4.31-4.37 (m, 1 H, H_α Ala), 4.42 (dd, $^3J = 10.5, 7.1$ Hz, 1 H, CH_2 Fmoc), 4.49 (t, $^3J = 8.9$ Hz, 1 H, $\text{H}_{\beta'}$ Ψ_{pro}), 5.06 (t, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, H_α Ψ_{pro}), 5.39 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1 H, NH_{Ala}), 6.28 (q, $^3J = 4.8$ Hz, 1 H, H_δ Ψ_{pro}), 7.33 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.43 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.58 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.79 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

(*cis* rotamer) δ 1.39 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 3 H, H_β Ala), 3.78 (s, 3 H, H_{Me}), 4.20 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.30-4.36 (m, 1 H, CH_2Fmoc), 4.38-4.44 (m, 1 H, CH_2Fmoc), 4.52-4.56 (m, 1 H, H_β Ψ_{pro}), 4.58-4.61 (m, 1 H, $\text{H}_{\beta'}$ Ψ_{pro}), 4.58-4.66 (m, 1 H, H_α Ala), 4.71-4.78 (m, 1 H, H_α Ψ_{pro}), 5.69 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, NH_{Ala}), 5.88 (q, $^3J = 4.3$ Hz, 1 H, H_δ Ψ_{pro}), 7.33 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.43 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.58 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.79 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 274 K) : (*trans* rotamer) δ 17.8 ($\text{C}_{\beta \text{ Ala}}$), 46.8 (CHFmoc), 48.7 ($\text{C}_{\alpha \text{ Ala}}$), 53.1 (C_{Me}), 56.6 ($\text{C}_{\alpha \Psi\text{pro}}$), 67.2 (CH_2Fmoc), 69.0 ($\text{C}_{\beta \Psi\text{pro}}$), 84.9 (q, $^2J = 36.0$ Hz, $\text{C}_{\delta \Psi\text{pro}}$), 120.0 (C_{Fmoc}), 121.8 (q, $^1J = 286.6$ Hz, CF_3), 125.0, 127.6, 127.7, 140.6, 143.0 (C_{Fmoc}), 155.6, 167.8, 167.9 (CO)

(*cis* rotamer) δ 19.1 ($\text{C}_{\beta \text{ Ala}}$), 46.8 (CHFmoc), 48.5 ($\text{C}_{\alpha \text{ Ala}}$), 53.7 (C_{Me}), 56.8 ($\text{C}_{\alpha \Psi\text{pro}}$), 67.2 (CH_2Fmoc), 70.4 ($\text{C}_{\beta \Psi\text{pro}}$), 84.5 (q, $^2J = 34.0$ Hz, $\text{C}_{\delta \Psi\text{pro}}$), 120.0 (CH_{Fmoc}), 121.8 (q, $^1J = 286.6$ Hz, CF_3), 125.0, 127.6, 127.7, 140.6, 143.0 (C_{Fmoc}), 155.7, 167.2, 167.9 (CO)

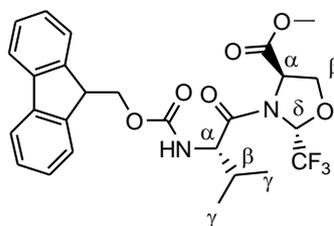
^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3 , 298 K) : (*trans* rotamer) δ -82.0 (s, CF_3)

(*cis* rotamer) δ -81.8 (s, CF_3)

IR ($\nu.\text{cm}^{-1}$) : 3324, 3015, 2955, 1743, 1684, 1523, 1154, 757, 743

HRMS : Calc. 492.1508 Found 492.1590

Fmoc-L-Val-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (**41**)



To a solution of **17** (108 mg, 0.54 mmol, 1 equiv) in DCM (5 mL) was added Fmoc-Val-Cl (213 mg, 0.60 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 188 mg (67 %) of peptide **41**.

$\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$

MW: 520.50 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect : White solid

m.p. : 112°C

$[\alpha]_{\text{D}}$ = +30.2 (*c* 1.0, CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 1.02 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 6H, $\text{H}_{\gamma \text{ Val}}$), 2.12 (m, 1H, $\text{H}_{\beta \text{ Val}}$), 3.81 (s, 3H, H_{Me}), 4.05 (t, $^3J = 8.7$ Hz, 1H, $\text{H}_{\alpha \text{ Val}}$), 4.19 (dd, $^3J = 7.3, 6.9$ Hz, 1H, CHFmoc), 4.25-4.36 (m, 2H, CH_2Fmoc), 4.44 (m, 1H, $\text{H}_{\beta \Psi\text{pro}}$), 4.61 (m, 1H, $\text{H}_{\beta' \Psi\text{pro}}$), 5.26 (m, 1H, $\text{H}_{\alpha \Psi\text{pro}}$), 5.57 (m, 1H, NH), 5.99 (q, $^3J = 4.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{\delta \Psi\text{pro}}$), 7.30 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{FmocAr}),

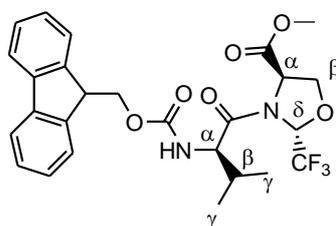
7.40 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{FmocAr}), 7.55 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{FmocAr}), 7.76 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{FmocAr})

^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3): δ 18.4 ($C_{\gamma \text{ Val}}$), 19.0 ($C_{\gamma \text{ Val}}$), 31.4 ($C_{\beta \text{ Val}}$), 47.1 (CHFmoc), 52.9 (C_{Me}), 58.0 ($C_{\alpha \Psi_{\text{pro}}}$), 58.4 ($C_{\alpha \text{ Val}}$), 67.2 (CH_2Fmoc), 70.4 ($C_{\beta \Psi_{\text{pro}}}$), 83.9 (q, $^2J = 41.2$ Hz, $C_{\delta \Psi_{\text{pro}}}$), 120.0 (C_{Fmoc}), 125.0 (q, $^1J = 284.2$ Hz, CF_3), 124.9, 125.0, 127.1, 127.8, 141.3, 143.5, 143.6 (C_{Fmoc}), 156.6, 169.1, 173.2 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3): δ -82.6 (bs, 3F, CF_3)

IR (v.cm^{-1}) 3312, 2928, 2159, 1977, 1764, 1716

Fmoc-D-Val-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (42)



To a solution of **17** (300 mg, 1.51 mmol, 1 equiv) in DCM (5 mL) was added Fmoc-D-Val-Cl (594 mg, 1.66 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 414 mg (53 %) of peptide **42**.

$\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$

MW: 520.4976 g.mol^{-1}

Aspect : White solid

m.p. : 112°C

$[\alpha]_{\text{D}} = +83.4$ (c 1.00, CHCl_3)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): (*trans* rotamer) δ 1.03 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 3 H, $H_{\gamma \text{ Val}}$), 1.05 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 3 H, $H_{\gamma \text{ Val}}$), 2.06-2.15 (m, 1 H, $H_{\beta \text{ Val}}$), 3.75 (s, 3 H, H_{Me}), 3.97 (t, $^3J = 9.0$ Hz, 1 H, $H_{\alpha \text{ Val}}$), 4.19 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.31 (dd, $^3J = 9.8, 6.9$ Hz, 1 H, $H_{\beta \Psi_{\text{pro}}}$), 4.33 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, CH_2Fmoc), 4.46 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, CH_2Fmoc), 4.47 (dd, $^3J = 9.8, 6.4$ Hz, 1 H, $H_{\beta' \Psi_{\text{pro}}}$), 5.10 (t, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, $H_{\alpha \Psi_{\text{pro}}}$), 5.26 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1 H, NH_{Val}), 6.40 (q, $^3J = 4.6$ Hz, 1 H, $H_{\delta \Psi_{\text{pro}}}$), 7.31 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.40 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.56 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.76 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

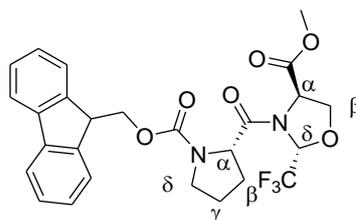
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K) : (*trans* rotamer) δ 18.5 (C_γ val), 18.6 (C_γ val), 31.6 (C_β val), 47.0 (CHFmoc), 52.7 (C_{Me}), 56.5 (C_α val), 58.6 (C_α Ψ_{pro}), 67.3 (CH_2Fmoc), 68.7 (C_β Ψ_{pro}), 85.0 (q, $^2J = 37.4$ Hz, C_δ Ψ_{pro}), 120.0 (C_{Fmoc}), 122.7 (q, $^1J = 286.6$ Hz, CF_3), 124.9, 127.0, 127.8, 141.3, 143.6 (C_{Fmoc}), 156.5, 168.6, 172.5 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3 , 298 K) : (*trans* rotamer) δ -80.9 (d, $J = 4.6$ Hz)

IR (v.cm^{-1}) 3312, 2928, 2159, 1977, 1764, 1716

HRMS calc. 520.1821 Found 520.1906

Fmoc-L-Pro-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (43)



To a solution of **17** (123 mg, 0.62 mmol, 1 equiv) in DCM (5 mL) was added Fmoc-Pro-Cl (242 mg, 0.68 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 250 mg (78 %) of peptide **43**.

$\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$

MW: 518.48 g.mol^{-1}

Aspect : White solid

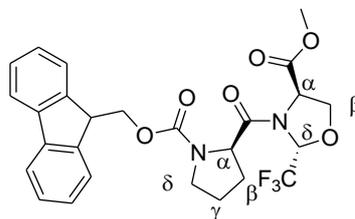
$[\alpha]_{\text{D}}$ = +79.2 (c 1.02, CHCl_3)

^1H NMR (400 MHz) : δ 1.97 (m, 1H, H_γ Pro), 2.17-2.24 (m, 2H, H_β Pro), 2.28-2.35 (m, 1H, $\text{H}_{\gamma'}$ Pro), 3.53-3.59 (m, 1H, H_δ Pro), 3.67-3.73 (m, 1H, $\text{H}_{\delta'}$ Pro), 3.80 (s, 3H, H_{Me}), 4.20-43.0 (m, $^3J = 8.7$ Hz, 2H, CHFmoc and CH_2Fmoc), 4.34-4.38 (m, 2H, CH_2Fmoc and H_α Pro), 4.50-4.53 (m, 2H, H_β Ψ_{Pro}), 5.47-5.50 (m, 1H, H_α Ψ_{Pro}), 5.99 (q, $^3J = 5.0$ Hz, 1H, H_δ Ψ_{Pro}), 7.30 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{ArFmoc}), 7.40 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{ArFmoc}), 7.56 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{ArFmoc}), 7.76 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, H_{ArFmoc})

^{13}C NMR (100.5 MHz) : δ 24.8 (C_γ Pro), 30.7 (C_β Pro), 47.0 (C_δ Pro), 47.1 (CHFmoc), 53.0 (C_{Me}), 58.0 (C_α Ψ_{Pro}), 58.2 (C_α Pro), 67.7 (CH_2Fmoc), 70.4 (C_β Ψ_{Pro}), 84.1 (q, $^2J = 35.5$ Hz, δ Ψ_{Pro}), 120.0, 125.0, 125.1, 127.1, 127.7 (C_{Fmoc}), 122.7 (q, $^1J = 285.6$ Hz, CF_3), 141.3, 143.6, 143.8 (C_{Fmoc}), 152.3, 169.6, 173.8 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz) : δ -82.8 (d, $^3J = 4.8$ Hz, 3F, CF_3)

Fmoc-D-Pro-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (44)



To a solution of **17** (300 mg, 1.51 mmol, 1 equiv) in DCM (5 mL) was added Fmoc-D-Pro-Cl (591 mg, 1.66 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 422 mg (54 %) of peptide **44**.

$\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$

MW: 518.48 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect : White solid

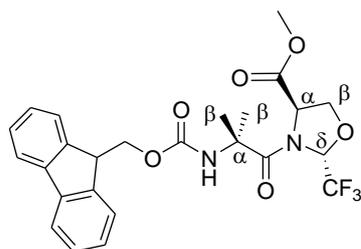
$[\alpha]_{\text{D}} = +53.0$ (c 1.02, CHCl_3)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K) : (*trans* rotamer) δ 1.94-2.05 (m, 1 H, H_{γ} Pro), 2.10-2.26 (m, 2 H, H_{β} Pro), 2.27-2.39 (m, 1 H, $\text{H}_{\gamma'}$ Pro), 3.52-3.60 (m, 1 H, H_{δ} Pro), 3.67-3.74 (m, 1 H, $\text{H}_{\delta'}$ Pro), 3.77 (s, 3 H, H_{Me}), 4.23 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.32 (dd, $^3J = 8.5, 6.9$ Hz, 1 H, H_{β} Ψ_{pro}), 4.34 (d, $^3J = 7.1$ Hz, 2 H, CH_2Fmoc), 4.36-4.40 (m, 1 H, 1 H, H_{α} Pro), 4.50 (t, $^3J = 8.5$ Hz, 1 H, $\text{H}_{\beta'}$ Ψ_{pro}), 5.06 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, H_{α} Ψ_{pro}), 6.23 (q, $^3J = 4.8$ Hz, 1 H, H_{δ} Ψ_{pro}), 7.31 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.40 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.56 (t, $^3J = 8.5$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.77 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K) : (*trans* rotamer) δ 24.8 (C_{γ} Pro), 30.9 (C_{β} Pro), 47.1 (C_{δ} Pro), 47.2 (CHFmoc), 52.8 (C_{Me}), 56.9 (C_{α} Val), 58.3 (C_{α} Ψ_{pro}), 67.7 (CH_2Fmoc), 68.9 (CH_2 , C_{β} Ψ_{pro}), 85.1 (q, $^2J = 30.7$ Hz, C_{δ} Ψ_{pro}), 120.1 (C_{Fmoc}), 122.9 (q, $^1J = 286.6$ Hz, CF_3), 125.2, 127.1, 127.8, 141.4, 143.9 (C_{Fmoc}), 155.4, 168.8, 173.0 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3 , 298 K) : (*trans* rotamer) δ -82.0 (d, $^3J = 4.8$ Hz)

Anal Calc. : % C = 60.23 % H = 4.86 % N = 5.40 Found.: % C = 60.22 % H = 4.84 % N = 5.51

Fmoc-Aib-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe (45)

To a solution of **17** (500 mg, 2.51 mmol, 1 equiv) in DCM (8 mL) was added Fmoc-Aib-Cl (2.59 g, 7.53 mmol, 3 equiv). The mixture was refluxed for 48 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (10 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3×10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 709 mg (55 %) of peptide **45**.



MW: 506.47 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect : White solid

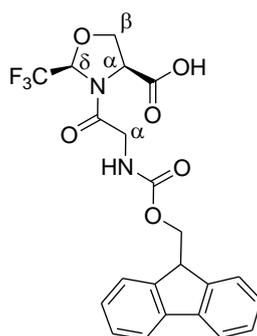
m.p. : 112°C

$[\alpha]_{\text{D}} = +28.4$ (c 1.02, CHCl_3)

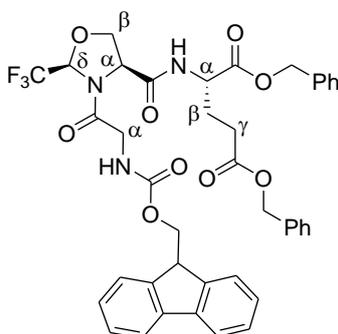
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 273 K) : δ 1.54 (br s, 6 H, H_{β} Aib), 3.69 (s, 3 H, H_{Me}), 4.16 (m, 1 H, H_{β} Ψ_{pro}), 4.18 (m, 1 H, CHFmoc), 4.39 (m, 1 H, H_{β} Ψ_{pro}), 4.50-4.52 (m, 2 H, CH_2Fmoc), 5.10 (s, 1 H, NH_{Aib}), 5.14 (m, 1 H, H_{α} Ψ_{pro}), 6.04 (m, 1 H, H_{δ} Ψ_{pro}), 7.34 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.43 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.57 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.76 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3 , 273 K) : δ 25.7 (C_{β} Aib), 46.5 (CHFmoc), 52.4 (C_{Me}), 57.6 (C_{α} Ψ_{pro}), 57.9 (C_{α} Aib), 65.9 (CH_2Fmoc), 69.5 (C_{β} Ψ_{pro}), 84.9 (q, $^2J = 35.5$ Hz, C_{δ} Ψ_{pro}), 119.4 (C_{Fmoc}), 121.9 (q, $^1J = 285.6$ Hz, CF_3), 124.1, 126.5, 127.3, 140.7, 142.7 (C_{Fmoc}), 154.7, 169.0, 172.6 (CO)

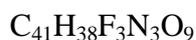
^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3 , 298 K) : δ -80.9 (d, $J = 5.2$ Hz)

Fmoc-Gly-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OH (46)

To a solution of calcium chloride (0.84 M) in isopropanol/water (7:3) (715 mL) was added peptide **31** (15.000 g, 31.4 mmol, 1 equiv) and NaOH (1.506 g, 37.6 mmol, 1.2 equiv). The mixture is stirred at room temperature for 24 h then quenched by HCl 1 M. The aqueous solution was extracted with ethyl acetate (3 × 400 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (200 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give acid **46**. *The product was used directly in the next step without further purification.*

Fmoc-Gly-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-Glu(OBzl)-OBzl (47)

To a solution of **46** (6.000 g, 12.9 mmol, 1 equiv) in DCM (687 mL) were added L-Glu(OBzl)-OBzl (8.388 g, 16.1 mmol, 1.25 equiv) and Et₃N (4.179 g, 41.4 mmol, 3.2 equiv). After 20 min at room temperature BOP-Cl (4.270 g, 16.8 mmol, 1.3 equiv) was added and the mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with water. The aqueous solution was extracted with DCM (3 × 200 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (100 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture is purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 6.820 g (68 %) of peptide **47**.



MW: 773.75 g.mol⁻¹

Aspect : Yellow oil

$[\alpha]_D = -29.5$ (c 1.3, CHCl₃)

¹H NMR (400 MHz, acetone) : δ 1.95-2.13 (m, 1 H, H _{β} Glu), 2.16-2.29 (m, 1 H, H _{β'} Glu), 2.46-2.54 (m, 2 H, H _{γ} Glu), 3.86 (m, 2 H, H _{α} Gly), 4.24 (t, ³J = 6.9 Hz, 1 H, CHFmoc), 4.32 (d, ³J = 6.9 Hz, 2 H, CH₂Fmoc), 4.60-4.68 (m, 3 H, H _{β} Pro H _{α} Glu), 4.84 (m, 1 H, H _{α} Pro), 5.05 (s, 2 H, H_{Bzl}), 5.15 (s, 2 H, H_{Bzl}), 5.70-5.86 (m, 2 H, NH and H _{δ} Pro), 7.30-7.33 (m, 13 H, H_{ArFmoc} H_{ar} and NH), 7.60 (t, ³J = 7.2 Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.67 (d, ³J = 7.4 Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.85 (d, ³J = 7.4 Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

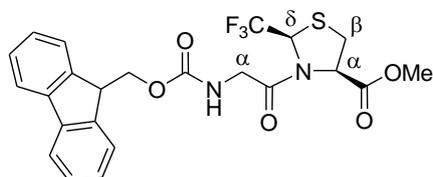
¹³C NMR (100.5 MHz, acetone) : δ 26.8 (C _{β} Glu), 34.5 (C _{γ} Glu), 40.0 (C _{α} Gly), 47.2 (CHFmoc), 51.5 (C _{α} Glu), 58.6 (C _{α} Glu), 65.7 (C _{β} Pro), 66.4, 66.5, 66.6 (CH₂Fmoc and C_{Bzl}), 84.4 (q, ²J = 35.4 Hz, C _{δ} Pro), 122.3 (q, ¹J = 297.1 Hz, CF₃), 120.0, 125.1, 127.1, 127.8 (C_{Fmoc}), 128.2, 128.3, 128.6, 128.7 (C_{ar}), 135.2, 135.7 (C_{ar}), 141.3, 144.2 (C_{Fmoc}), 156.6, 167.8, 171.3, 172.1, 174.3 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, acetone) : δ -79.9 (s, CF₃)

IR (ν.cm⁻¹) 3315, 2925, 1736, 1664, 1532, 1152, 734

MS m/z 773.73

Fmoc-Gly-L-Cys(Ψ^{CF₃,H}pro)-OMe (49)



To a solution of **19-min** (3.000 g, 13.9 mmol, 1 equiv) in DCM (150 mL) was added Fmoc-Gly-Cl (4.820 g, 15.3 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO₃ solution (150 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3 × 100 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (150 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture is purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 6.080 g (89 %) of peptide **49**.

C₂₃H₂₀F₃N₂O₅S

MW : 493.48 g.mol⁻¹

Aspect : Yellow solid

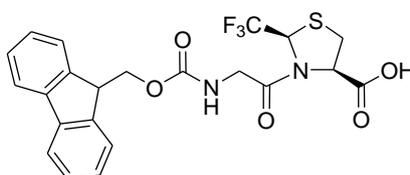
m.p.: 72 °C

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 323 K) : δ 3.33-3.60 (m, 2 H, $\text{H}_{\beta \Psi\text{Pro}}$), 3.78 (s, 3 H, H_{Me}), 4.00-4.20 (m, 2 H, $\text{H}_{\alpha \text{Gly}}$), 4.21 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 1 H, CHFmoc), 4.40 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 2 H, CH_2Fmoc), 5.02 (m, 1 H, $\text{H}_{\alpha \Psi\text{Pro}}$), 5.50 (m, 1 H, NH), 5.68 (m, 1 H, $\text{H}_{\delta \Psi\text{Pro}}$), 7.30 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.38 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.58 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.74 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

^{13}C NMR (100.5 MHz, CDCl_3 , 323 K) : δ 31.4 ($\text{C}_{\beta \Psi\text{Pro}}$), 43.2 ($\text{C}_{\alpha \text{Gly}}$), 47.2 (CHFmoc), 53.0 (C_{Me}), 62.2 (q, $^2J = 30.1$ Hz, $\text{C}_{\delta \Psi\text{Pro}}$), 67.4 (CHFmoc), 120.0 (C_{Fmoc}), 124.3 (q, $^1J = 281.8$ Hz, C, CF_3), 125.0, 127.1, 127.7, 141.3, 143.8 (C_{Fmoc}), 156.3, 168.4, 168.9 (CO)

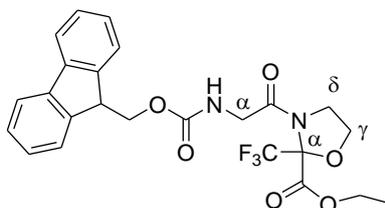
^{19}F NMR (376.2 MHz, CDCl_3 , 298 K) : (*trans* rotamer) δ -77.1 (s, CF_3), (*cis* rotamer) δ -77.3 (s, CF_3).

Fmoc-Gly-L-Cys($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ pro)-OH (**50**)

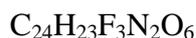


To a solution of calcium chloride (0.84 M) in isopropanol/water (7:3) (300 mL) was added peptide **49** (8.000 g, 16.0 mmol, 1 equiv) and NaOH (0.770 g, 19 mmol, 1.2 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched by HCl 1 M. The aqueous solution was extracted with ethyl acetate (3 \times 200 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (100 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude acid **50** was *used* directly in the *next step without further purification*.

Fmoc-Gly-2-trifluoromethyl-2carboxyethyl-1,3-oxazolidine (**51**)



To a solution of **21** (220 mg, 1.03 mmol, 1 equiv) in DCM (3 mL) was added Fmoc-Gly-Cl (490 mg, 1.55 mmol, 1.5 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with saturated NaHCO_3 solution (5 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3 \times 10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (80:20 cyclohexane/ethyl acetate) to give 378 mg (75 %) of peptide **51**.



MW: 492.44 g.mol⁻¹

Aspect: White solid

m.p : 54°C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.30 (t, ³J = 7.3 Hz, 3H, H_{Et}), 3.7 (dd, ³J = 8.2, 7.8 Hz, 1H, H_δ Ψ_{Pro}), 3.92 (m, 1H, H_{δ'} Ψ_{Pro}), 4.02 (dd, ³J = 17.4, 4.6 Hz, 1H, H_α Gly), 4.11 (dd, ³J = 17.4, 6.9 Hz, 1H, H_{α'} Gly), 4.18 (dd, ³J = 7.3, 7.3 Hz, 1H, CHFmoc), 4.29 (q, ³J = 7.3 Hz, 2H, H_{Et}), 4.35-4.39 (m, ³J = 7.3 Hz, 4H, H_γ Ψ_{Pro} and CH₂Fmoc), 5.72 (bs, 1H, NH), 7.28 (t, ³J = 7.3, 2H, H_{ArFmoc}), 7.38 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, H_{ArFmoc}), 7.57 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H, H_{ArFmoc}), 7.74 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H, H_{ArFmoc})

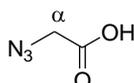
¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : □δ 13.9 (C_{Et}), 44.1 (C_α Gly), 45.2 (C_δ Ψ_{Pro}), 47.1 (CHFmoc), 63.1 (C_{Et}), 67.4 (C_γ Ψ_{Pro}), 69.0 (CH₂Fmoc), 89.5 (q, ²J = 32.6 Hz, C_α Ψ_{Pro}), 120.1 (C_{Fmoc}), 122.4 (q, ¹J = 288.5 Hz, CF₃), 125.2, 127.2, 127.9, 141.4, 143.8 (C_{Fmoc}), 156.3, 163.5, 167.1 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : □-79.7 (s, 3F, CF₃)

IR: (ν.cm⁻¹) 3330, 2922, 1758, 1715, 1682, 1203, 1170, 1033, 759, 738

HRMS Calc. 492.1508, Found 492.1491

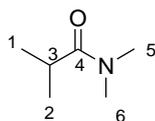
N₃-Gly-OH (52)



Sodium azide (5 g, 76.9 mmol, 2.1 equiv) in DMSO (214 mL) was stirred at r.t. for 3 h. Then bromoacetic acid (5.09 g, 36.6 mmol, 1 equiv) was added and the mixture was stirred at r.t. overnight. The reaction mixture was diluted with water (250 mL), the pH adjusted to 2.5 with conc. HCl and the aqueous phase extracted with ethyl acetate (2 x 450 mL). The combined organic extracts were washed with brine (3 x 100 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give N₃-Gly-OH **52** (1.96 g, 53%). NMR data are in accordance with literature data.¹²⁵

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 323 K) : δ 3.98 (s, 2H, H_α)

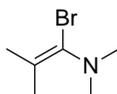
¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃, 323 K) : δ 50.0 (C_α), 174.5 (CO)

N,N,2-trimethylpropionamide (53)

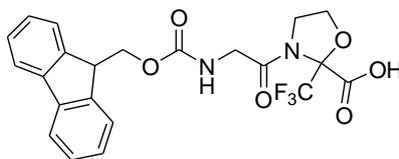
To a solution of dimethylamine 40% in water (226.000 mL, 2 mol, 2 equiv) in DCM (50 mL) was added at 0°C *via* a pressure equalizing dropping funnel 2-methylpropanoyl chloride (105.000 mL, 1 mol, 1 equiv). The resulting mixture was stirred at room temperature for 24 h. The precipitate formed was filtered and washed with DCM. The filtrate was successively washed with 3% sodium bicarbonate solution and water, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified either by distillation under reduced pressure to afford 68.970 g (60 %) of amide **53**. NMR data are in accordance with literature data.⁸⁷

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 1.12 (d, ³J = 6.8, 6H, H₁ H₂), 2.81 (*sept*, ³J = 6.8, 1H, H₃), 2.94 (s, 3H, H₅), 3.04 (s, 3H, H₆)

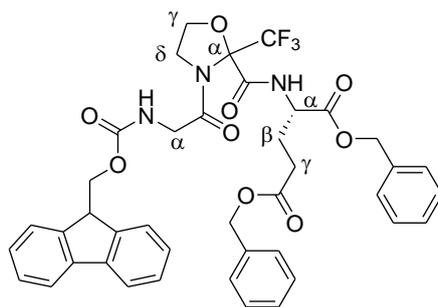
¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : δ 18.7 (C₁ C₂), 29.7 (C₃), 35.1 (C₅), 36.6 (C₆), 176.6 (C₄)

N-(1-bromo-2-methylprop-1-enyl)-N,N-dimethylamine (54)

To a solution of POBr₃ (10.000 g, 34.96 mmol, 1.2 equiv) and DMF (45 μL, 0.58 mmol, 0.02 équiv.) in dry DCM (5 mL) under argon was added at 0°C *via* a pressure equalizing dropping funnel N,N,2-trimethylpropionamide in dry DCM (5 mL). The mixture is stirred at room temperature for 24 h then after cooling to 0°C Et₃N (4.85 mL, 34.96 mmol, 1.2 equiv) was slowly added. The mixture was then stirred at room temperature for 3 h. Low boiling point petroleum ether was then added and the mixture was allowed to stand overnight at 4°C. The precipitate of triethylamine hydrobromide was removed by filtration under argon. The precipitate was washed with petroleum ether. The solvents were removed under reduced pressure and the residue was purified by distillation under reduced pressure to give 2.050 g (40 %) of bromoamine **54**.

Fmoc-Gly-2-trifluoromethyl-2carboxylic acid-1,3-oxazolidine (55)

To a solution of calcium chloride (0.84 M) in isopropanol/water (7:3) (11 mL) was added peptide **51** (237 mg, 0.48 mmol, 1 equiv) and NaOH (23 mg, 0.58 mmol, 1.2 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched by HCl 1 M. The aqueous solution was extracted with ethyl acetate (3 × 10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give acid **55**. *The product was used directly in the next step without further purification.*

Fmoc-Gly-2-trifluoromethyl-1,3-oxazolidine-2-Glu(OBzl)-OBzl (56)

To a solution of **55** (173 mg, 0.37 mmol, 1 equiv) in DCM (20 mL) were added L-Glu(OBzl)-OBzl (240 mg, 0.48 mmol, 1.30 equiv) and Et₃N (120 mg, 1.19 mmol, 3.2 equiv). After 20 min at room temperature BOP-Cl (122 mg, 254.57 mmol, 1.3 equiv) was added and the mixture was stirred at room temperature for 24 h then quenched with water. The aqueous solution was extracted with DCM (3 × 10 mL). The organic layer was washed with a saturated NaCl solution (10 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash chromatography (50:50 cyclohexane/ethyl acetate) to give 85 mg (30 %) of peptide **major-56** and give 64 mg (22 %) of peptide **minor-56**

major-56

MW: 773.75 g.mol⁻¹

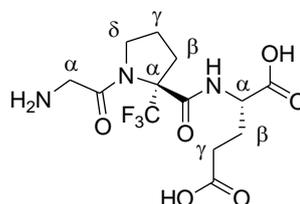
Aspect: colorless oil

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 2.01-2.10 (m, 1H, H_β Glu), 2.19-2.29 (m, 1H, H_{β'} Glu), 2.36-2.43 (m, 2H, H_γ Glu), 3.71 (dd, ³J = 8.2, 7.3 Hz, 1H, H_δ ΨPro), 3.86 (dd, ³J = 8.0, 6.2 Hz, 1H, H_{δ'} ΨPro), 4.02-4.07 (m, 2H, H_α Gly), 4.18 (dd, ³J = 7.3, 6.9 Hz, 1H, CHFmoc), 4.29-4.40 (m, 4H, CH₂Fmoc and H_γ ΨPro), 4.63-4.70 (m, 1H, H_α Glu), 5.03 (d, ³J = 14.6 Hz, 1H, H_{Bzl}), 5.06 (d, ³J = 14.6 Hz, 1H, H_{Bzl}), 5.12 (d, ³J = 12.4 Hz, 1H, H_{Bzl}), 5.14 (s, 1H, NH), 5.19 (d, ³J = 12.4 Hz, 1H, H_{Bzl}), 5.65 (s, 1H, NH), 7.28-7.33 (m, 12 H, H_{ArFmoc} and H_{Ar}), 7.40 (t, ³J = 7.3 Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.51 (d, ³J = 7.3 Hz, 1H, NH), 7.59 (d, ³J = 7.8 Hz, 2 H, H_{ArFmoc}), 7.75 (d, ³J = 7.8 Hz, 2 H, H_{ArFmoc})

¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) : □ δ 26.6 (C_β Glu), 30.0 (C_γ Glu), 44.3 (C_α Gly), 45.5 (C_δ ΨPro), 47.1 (CHFmoc), 52.4 (C_α Glu), 66.8, 67.4, 67.7, 67.9 (C_{Bzl} CH₂Fmoc and C_γ ΨPro), 90.9 (q, ²J = 30.7 Hz, C_α ΨPro), 120.1 (C_{Fmoc}), 122.6 (q, ¹J = 289.5 Hz, CF₃), 125.2, 127.2, 127.8, 128.2, 128.4, 128.7, 128.7 (C_{Fmoc}), 135.5, 141.2, 143.7 (C_{Fmoc}), 156.2, 162.6, 167.0, 170.7, 173.2 (CO)

¹⁹F NMR (376.2 MHz, CDCl₃) : □ -77.5 (s, 3F, CF₃)

H-Gly-(S)-α-Tfm-Pro-Glu(OH)-OH (57)



The peptide **26** (0.440 g) in MeOH (2.5 mL) was hydrogenated over 20% Pd/C (0.440 g) at room temperature for 24 h under 1 bars pressure of hydrogen. The reaction mixture was filtered, pentane was added and the precipitate was filtered to afford 0.116 g (55 %) of deprotected peptide **57**.

C₁₃H₁₈F₃N₃O₆

MW: 369.29 g.mol⁻¹

Aspect : White solid

[α]_D = - 55.5 (c 1.3, H₂O)

^1H NMR (400 MHz, D_2O) : δ 1.79 (m, 1H, H_{β} Glu), 1.88-2.03 (m, 3H, H_{γ} Pro and $\text{H}_{\beta'}$ Glu), 2.18-2.26 (m, 3H, H_{β} Pro and H_{γ} Glu), 2.44 (m, 1H, $\text{H}_{\beta'}$ Pro), 3.53 (q, $^3J = 8.1$ Hz, 1H, H_{δ} Pro), 3.72 (m, 1H, H_{δ} Pro), 3.87 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 1H, H_{α} Gly), 3.97 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 1H, $\text{H}_{\alpha'}$ Gly), 4.10 (m, 1H, H_{α} Glu)

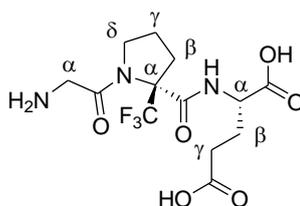
^{13}C NMR (100.5 MHz, D_2O) : δ 22.7 (C_{γ} Pro), 27.0 (C_{β} Glu), 30.9 (C_{γ} Glu), 34.5 (C_{β} Pro), 41.3 (C_{α} Gly), 48.7 (C_{δ} Pro), 54.4 (C_{α} Glu), 71.8 (q, $^2J = 28.8$ Hz, C_{α} Pro), 124.5 (q, $^1J = 285.6$ Hz, CF_3), 166.0, 167.8, 176.8, 178.6 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz, D_2O) : δ -71.7 (s, 3F, CF_3)

IR (ν . cm^{-1}) : 3600-2750, 1667, 1538

HRMS calc. 369.1148 Found 369.1215

H-Gly-(R)- α -Tfm-Pro-Glu(OH)-OH (58)



The peptide (0.159 g) **28** in MeOH (1 mL) was hydrogenated over 20% Pd/C (0.159 g) at room temperature for 24 h under 1 bars pressure of hydrogen. The reaction mixture was filtered, pentane was added and the precipitate was filtered to afford 0.041 g (51 %) of deprotected peptide **58**.

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_6$

MW: 369.29 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Aspect : White solid

$[\alpha]_D$ = - 49.3 (c 0.85, H_2O)

^1H NMR (400 MHz, D_2O) : δ 1.79 (m, 1H, H_{β} Glu), 1.90-2.10 (m, 3H, H_{γ} Pro and $\text{H}_{\beta'}$ Glu), 2.16-2.32 (m, 3H, H_{β} Pro and H_{γ} Glu), 2.46 (m, 1H, $\text{H}_{\beta'}$ Pro), 3.55 (m, 1H, H_{δ} Pro), 3.75 (m, 1H, $\text{H}_{\delta'}$ Pro), 3.87 (d, $^3J = 16.5$ Hz, 1H, H_{α} Gly), 3.91 (d, $^3J = 16.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{\alpha'}$ Gly), 4.10 (m, 1H, H_{α} Glu)

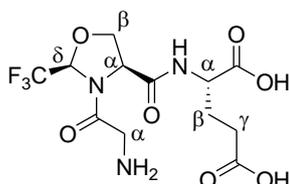
^{13}C NMR (100.5 MHz, D_2O) : δ 22.7 (C_4), 26.1 (C_9), 31.7 (C_{10}), 34.5 (C_5), 41.5 (C_1), 48.9 (C_3), 54.9 (C_4), 71.8 (C_6 , q, $^2J_{\text{CF}} = 27.8$ Hz), 124.5 (C_6' , q, $^1J_{\text{CF}} = 285.6$ Hz), 166.3, 168.0, 177.0, 179.6 (C=O)

^{19}F NMR (376.2 MHz, D_2O) : δ -71.3 (s, 3F, CF_3)

IR ($\nu\cdot\text{cm}^{-1}$) : 3600-2750, 1667, 1538

HRMS : Calc. 369.1148 Found 369.1219

H-Gly-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3,\text{H}}$ Pro)-Glu(OH)-OH (59)



The peptide (4.000 g) **47** in MeOH (40 mL) was hydrogenated over 20% Pd/C (4.000 g) at room temperature for 24 h under 1 bars pressure of hydrogen. The reaction mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. Water and Et_2O was added, aqueous phase was washed with Et_2O (3 x 50 mL). The aqueous phase was concentrated under reduced pressure to give 1.747 g (72 %) of deprotected peptide **59**.

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_7$

MW: 371.27 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

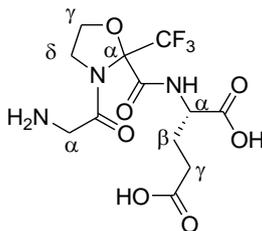
Aspect : Yellow solid

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -31.1 (c 1.2, H_2O)

^1H NMR (400 MHz, D_2O , 353K) : δ 2.36 (m, 1H, H_{β} Glu), 2.53 (m, 1H, $\text{H}_{\beta'}$ Glu), 2.78 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 2H, H_{γ} Glu), 4.25 (bs, 1H, H_{α} Gly), 4.50 (bs, 1H, $\text{H}_{\alpha'}$ Gly), 4.61-4.78 (m, 1H, H_{α} Glu), 4.82 (dd, $^3J = 7.8$, 7.3 Hz, 1H, H_{β} ΨPro), 5.05 (dd, $^3J = 7.8$, 6.9 Hz, 1H, $\text{H}_{\beta'}$ ΨPro), 5.35 (dd, $^3J = 7.3$, 6.9 Hz, 2H, H_{α} ΨPro), 6.39 (q, $^3J = 5.0$ Hz, 1H, H_{δ} ΨPro)

^{13}C NMR (100.5 MHz, D_2O , 353 K) : δ 27.7 (CH_2, C_9), 31.7 ($\text{CH}_2, \text{C}_{10}$), 41.6 (CH_2, C_8), 55.3 (CH, C_1), 59.4 (CH, C_3), 77.1 (CH_2, C_4), 85.5 (C_5 , q, $^2J = 34.5$ Hz), 123.0 (C_6 , q, $^1J = 285.6$ Hz), 168.3, 169.1, 177.3, 178.8 (CO)

^{19}F NMR (376.2 MHz, D_2O , 353 K) : δ -80.4 (bs, 3F, CF_3)

H-Gly-2-trifluoromethyl-1,3-oxazolidine-2-Glu(OH)-OH (60)

The peptide **major-56** (86 mg) in MeOH (2 mL) was hydrogenated over 10% Pd/C (86 mg) at room temperature for 24 h under 1 bars pressure of hydrogen. The reaction mixture was filtered and concentrated under reduced pressure to give 20 mg (49 %) of deprotected peptide **60**.

Références bibliographiques

- ¹ Yin, Q. W. ; Johnson, J. ; Prevette, D. ; Oppenheim, R. W. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 7629-7640.
- ² Parrizas, M.; Saltiel, A. R.; LeRoith, D. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 154-161.
- ³ Mason, J. L.; Ye, P.; Suzuki, K.; D'ercole, A. J.; Matsushima, G. K. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 5703-5708.
- ⁴ Johnston, B. M.; Mallard, E. C.; Williams, C. E.; Gluckman, P. D. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 300-308.
- ⁵ Tropea, D.; Giacometti, E.; Wilson, N. R.; Beard, C.; McCurry, C.; Fu, D. D.; Flannery, R.; Jaenisch, R.; Sur, M. *PNAS* **2009**, *6*, 2029-2034.
- ⁶ Sara, V. R.; Carlsson-Sdwirut, C.; Bergman, T.; Jornvall, H.; Roberts, P. J.; Crawford, M.; Hakansson, L. N.; Civalero, I.; Nordberg, A. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1989**, *165*, 766-771.
- ⁷ Brimble, M. A.; Harris, P. W. R. *Chem. N. Z.* **2001**, 133-136.
- ⁸ Brott, T.; Bogousslavsky, J. *N. Engl. J. Med.* **2000**, 710-722.
- ⁹ Baron, J.C. *Cerebrovasc. Dis.* **1999**, 193-201.
- ¹⁰ Dirnagle, U.; Iadecola, C.; Moskowitz, M.A. *Trends Neurosci.* **1999**, 391-397.
- ¹¹ Asma LAMINE, Document présenté dans le cadre du cours BIO9000 du programme de Doctorat en Biologie de l'INRS Institut Armand Frappier.
- ¹² Los, M.; Wesselborg, S.; Schulze-Osthoff, K. *Immunity* **1999**, *10*, 629-639.
- ¹³ Beilharz, E. J.; Klemp, N. D.; Kelmpt, M.; Sirimanne, E.; Dragunow, M.; Gluckman, P. D. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1993**, *18*, 209-215.
- ¹⁴ Yamamoto, H.; Murphy, L. J. *Endocrinology* **1994**, *135*, 2432-2439.
- ¹⁵ Guan, J.; Krishnamurthi, R.; Waldvogel, H. J.; Faull, R. L. M.; Clark, R.; Gluckman, P. *Brain Res.* **2000**, *859*, 286-292.
- ¹⁶ Sizonenko, S. V.; Sirimanne, E. S.; Williams, C. E.; Gluckman, P. D. *Brain Res.* **2001**, *922*, 42-50.
- ¹⁷ Lai, M. Y. H.; Brimble, M. A.; Callis, D. J.; Harris, P. W. R.; Levi, M. S.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 533-548.
- ¹⁸ Alonso De Diego, S. A.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Perez de Vega, M. J.; Casabona, D.; Cativiela, C.; Gonzalez-Muniz, R.; Herranz, R.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Rio, J.; Jimeno, M. L.; Garcia-Lopez, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1392-1396.

- ¹⁹ Trotter, N. S.; Brimble, M. A.; Callis, D. J.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 501-517.
- ²⁰ Brimble, M. A.; Trotter, N. S.; Harris, P. W. R.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 519-532.
- ²¹ Alonso De Diego, S. A.; Munoz, P.; Gonzalez-Muniz, R.; Herranz, R.; Martin-Martinez M.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Rio, J.; Jimeno, M. L; Garcia-Lopez, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2279-2283.
- ²² Schimid, F. X.; Mayr, L. M.; Mücke, M.; Schönbrunner, E. R. *Adv. Prot. Chem.* **1993**, *44*, 25.
- ²³ Yaron, A.; Naider, F. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *28*, 31.
- ²⁴ Harris, P. W. R.; Brimble, M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2696-2709.
- ²⁵ Alonso De Diego, S. A.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Perez de Vega, M. J.; Gonzalez-Muniz, R.; Herranz, R.; Martin-Martinez M.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Rio, J.; Jimeno, M. L; Garcia-Lopez, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3396-3400.
- ²⁶ Harris, P. W. R.; Brimble, M. A.; Muir, V. J.; Lai, M. Y. H.; Trotter, N. S.; Callis, D. J. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10018-10035.
- ²⁷ Edwards, C. M. B.; Cohen, M. A.; Bloom, S. R. *Q. J. Med.* **1999**, *92*, 1-4.
- ²⁸ Kaitin, K. I. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *87*, 3, 356-361.
- ²⁹ Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatisky, M. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 40-56.
- ³⁰ Hummel, G.; Reineke, U.; Reimer, U. *Mol. Biosyst.* **2006**, *2*, 499-508.
- ³¹ Loffet, A. *J. Peptide Sci.* **2002**, *8*, 1-7.
- ³² Maggio, E. T. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2006**, *3*, 529-539.
- ³³ Quattrin, T.; Bélanger, A.; Bohannon, N. J. V. Schwartz, S. L. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 2622-2627.
- ³⁴ O'Hagan, D.; Harper D. B. *J. Fluorine Chem.* **1999**, *100*, 127-133.
- ³⁵ Schmedt, J.; Mangsti, M.; Kraus, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1-4.
- ³⁶ Tressaud, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6792-6796.
- ³⁷ Moissan, H. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1886**, *102*, 1543-1544.
- ³⁸ Jaccaud, M.; Nicolas, F. *Techniques de l'Ingénieur* **1990**, J6020-J1453.
- ³⁹ Uneyama, K. *Organofluorine Chemistry*, Blackwell, Malden, USA, **2006**.
- ⁴⁰ Nakajima, T.; Zemva, B.; Tressaud, A. *Advanced Inorganic Fluorides : Synthesis, Characterization and Applications*, Elsevier, Dordrecht, **2000**.
- ⁴¹ Ameduri, B.; Boutevin, B. *Well-Architected Fluoropolymers*, Elsevier, Dordrecht, **2004**.

- ⁴² Bégué, J. P.; Bonnet-Delpon, D. *Chimie Bioorganique et Médicinale du Fluor*, EDP-Sciences, Paris, **2005**.
- ⁴³ Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 320-330.
- ⁴⁴ O'Hagan, D. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 308-319.
- ⁴⁵ Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 320-330.
- ⁴⁶ Schlosser, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *110*, 1496-1513.
- ⁴⁷ Furuya, T.; Kamlet, A. S.; Ritter, T. *Nature* **2011**, *473*, 470-477.
- ⁴⁸ Qiu, X.-L.; Qing, F.-L. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3261-3278.
- ⁴⁹ Acena, J. L.; Sorochinsky, A. E.; Soloshonok, V. A. *Synthesis*, **2012**, *44*, 1974-1976.
- ⁵⁰ Qiu, X. -L.; Qing, F. -L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2002**, *1*, 2052.
- ⁵¹ Qiu, X. -L.; Meng, W. -D.; Qing, F. -L. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6711-6745.
- ⁵² Qiu, X. -L.; Qing, F. -L. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7162-7164.
- ⁵³ Qiu, X. -L.; Qing, F. -L. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3614-3617.
- ⁵⁴ Del Valle, J. R.; Goodman, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1600.
- ⁵⁵ Smiths, R.; Cadicamo, C. D.; Burger, K.; Kokschi, B. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1727-1739.
- ⁵⁶ Brigaud, T.; Chaume, G.; Huguenot, F.; Pytkowicz, J. *Chemistry Today* **2007**, *25*, 8-10.
- ⁵⁷ Burger, K.; Mutze, K.; Osipov, S. N.; Tsouker, P.; Schier, A. *Monatsh. Chem.* **2003**, *134*, 69-80.
- ⁵⁸ Osipov, S. N.; Artyushin, O. I.; Kolomiets, A. F.; Bruneau, C.; Picquet, M.; Dixneuf, P. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3891-3897.
- ⁵⁹ Eckert, M.; Monnier, F.; Shchetnikov, G. T.; Titanyuk, I. D.; Osipov, S. N.; Toupet, L.; Derien, S.; Dixneuf, P. H. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3741-3743.
- ⁶⁰ Osipov, S. N.; Bruneau, C.; Picquet, M.; Kolomiets, A. F.; Dixneuf, P. H. *Chem. Commun.* **1998**, 2053-2054.
- ⁶¹ Chaume, G.; Van Severen, M. C.; Marinkovic, S.; Brigaud, T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 6123-6126.
- ⁶² Caupène, C.; Chaume, G.; Ricard, L.; Brigaud, T. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 209-212.
- ⁶³ Chaume, G.; Van Severen, M. C.; Ricard, L.; Brigaud, T. *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 1104-1109.
- ⁶⁴ Huguenot, F.; Brigaud, T. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7075-7078.
- ⁶⁵ Wang, H.; Zhao, X.; Li, Y.; Lu, L. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1379.
- ⁶⁶ Simon, J.; Nguyen, T. T.; Chelain, E.; Lensen, N.; Pytkowicz, J.; Chaume, G.; Brigaud, T. *Tetrahedron : Asymm.* **2011**, *22*, 309-314.
- ⁶⁷ Watanabe, H.; Hashizume, Y.; Uneyama, K. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4333.

- ⁶⁸ Amii, H.; Kishikawa, Y.; Kageyama, K.; Uneyama, K. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3404.
- ⁶⁹ Kokschi, B.; Sewald, N.; Jakubke, H. –D. Synthesis and Incorporation of α -Trifluoromethyl-Substituted Amino Acids into Peptides. In *Biomedical Frontiers of Fluorine Chemistry*. ACS Symp. Series 639. Ojima, I.; McCarthy, J. R.; Welch, J. T. (Eds.); Am. Chem. Soc.: Washington DC, **1996**, 42-58.
- ⁷⁰ Mikhailiuk, P. K.; Afonin, S.; Chernega, A. N.; Rusanov, E. B.; Platonov, M. O.; Dubinina, G. G.; Berditsch, M.; Ulrich, A. S.; Komarov, I. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1-4.
- ⁷¹ Maisch, D.; Wadhvani, P.; Afonin, S.; Böttcher, C.; Kokschi, B.; Ulrich, A. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15596-15597.
- ⁷² Mykhailiuk, P. K.; Afonin, S.; Palamarchuchuk, G. V.; Shishkin, O. V.; Ulrich, A. S.; Komarov, I. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1-4.
- ⁷³ Terreno, E.; Delli Castelli, D.; Viale, A.; Aime, S. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3019-3042..
- ⁷⁴ Jiang, Z.-X.; Feng, Y.; Yu, Y. B. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7233-7235.
- ⁷⁵ Lubin, H. Synthèse d'oxazolidines et de pyrrolidines trifluorométhylées chirales – Applications en synthèse asymétrique, Université de Cergy Pontoise, 2010.
- ⁷⁶ Alladoun, J.; Roland, S.; Vrancken, E.; Mangeney, P.; Kadouri-Puchot, C. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9771-9774.
- ⁷⁷ Mutter, M.; Nafzi, A.; Sato, T.; Sun, X.; Wahl, E.; Wöhr, T. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 145.
- ⁷⁸ Chaume, G.; Barbeau, O.; Lesot, P.; Brigaud, T. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4135-4145.
- ⁷⁹ El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602
- ⁸⁰ Prasad, K.V.S.R.G.; Barathi, K.; Haseena B. B. *IJPSRR*, **2011**
- ⁸¹ Joullié, M.; Lassen, K. *ARKIVOC*, **2010**, 189-250
- ⁸² Subiros-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9394- 9403.
- ⁸³ El-Faham, A.; Albericio, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 1499-1501.
- ⁸⁴ Gawne, G.; Kenner, G. W.; Sheppard, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 5670.
- ⁸⁵ Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Evin, G.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205.
- ⁸⁶ Fischer, E.; Otto, E. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 2106.
- ⁸⁷ Ghosez, L.; George-Koch, I.; Patiny, L.; Houtekie, M.; Bovy, P.; Nshimyumukiza, P.; Phan, T. *Tetrahedron*, **1998**, 9207-9222.
- ⁸⁸ Bilgicer, B.; Xing, X.; Kumar, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11815-11816.
- ⁸⁹ Bilgicer, B.; Fichera, A.; Kumar, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4393-4399.
- ⁹⁰ Tang, Y.; Ghirlanda, G.; Vaidehi, N.; Kua, J.; Mainz, D. T.; Goddard III, W. A.; DeGrado, W. F.; Tirell, D. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2790-2796.

- ⁹¹ Jackel, C.; Seufert, W.; Thust, S.; Kokschi, B. *Chem. Bio. Chem.* **2004**, *5*, 717-720.
- ⁹² Binkert, C.; Frigerio, M.; Jones, A.; Meyer, S.; Pesenti, C.; Prade, L.; Viani, F.; Zanda, M. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, *7*, 181-186.
- ⁹³ Jackel, C.; Salwiczek, M.; Kokschi, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4198-4203.
- ⁹⁴ Son, S.; Tanrikulu, C.; Tirell, D. A. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, *7*, 1251-1257.
- ⁹⁵ Smiths, R.; Kokschi, B. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1483.
- ⁹⁶ Kitamoto, T.; Marubayashi, S.; Yamazaki, T. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1888-1894.
- ⁹⁷ Kokschi, B.; Sewald, N.; Hofmann, H. -J.; Burger, K. *J. Pept. Sci.* **1997**, *3*, 157-167.
- ⁹⁸ Burger, K.; Mutze, K.; Hollweck, W.; Kokschi, B. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5915-5928.
- ⁹⁹ Kokschi, B.; Dahl, C.; Radics, G.; Vocks, A.; Arnold, K.; Arnhold, J.; Sieler, J.; Burger, K. *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 67-81.
- ¹⁰⁰ Chaume, G.; Lensen, N.; Caupène, C.; Brigaud, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5717-5724.
- ¹⁰¹ Dal Pozzo, A.; Dikovskaya, K.; Moroni, M.; Fagnoni, M.; Vanini, L.; Bergonzi, R.; de Castiglione, R.; Bravo, P.; Zanda, M. *J. Chem. Res.* **1999**, 468-469.
- ¹⁰² DalPozzo, A.; Bergonzi, R.; Ni, M. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3925-3927.
- ¹⁰³ DalPozzo, A.; Ni, M.; Muzi, L.; Caporale, A.; de Castiglione, R.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Formaggio, F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6372-6375.
- ¹⁰⁴ Dal Pozzo, A.; Ni, M.; Muzi, L.; de Castiglione, R.; Mondelli, R.; Mazzini, S.; Penco, S.; Pisano, C.; Castorina, M.; Giannini, G. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1808-1817.
- ¹⁰⁵ Kokschi, B.; Sewald, N.; Burger, K.; Jakubke, H. -D. *Amino Acids* **1996**, *11*, 425-434.
- ¹⁰⁶ Jakubke, H. -D. *J. Chin. Chem. Soc.* **1994**, *41*, 355.
- ¹⁰⁷ Bordusa, F.; Dahl, C.; Jakubke, H. -D.; Burger, K.; Kokschi, B. *Tetrahedron: Asymm.* **1999**, *10*, 307-313.
- ¹⁰⁸ Thust, S.; Kokschi, B. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2290-2296.
- ¹⁰⁹ Thust, S.; Kokschi, B. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1163-1165.
- ¹¹⁰ Sewald, N.; Hollweck, W.; Mutze, K.; Schierlinger, C.; Seymour, L. C.; Gaa, K.; Burger, K.; Kokschi, B.; Jakubke, H. -D. *Amino Acids* **1995**, *8*, 187-194.
- ¹¹¹ Dal Pozzo, A.; Muzi, L.; Moroni, M.; Rondanin, R.; de Castiglione, R.; Bravo, P.; Zanda, M. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 6019-6028.
- ¹¹² Kokschi, B.; Mutze, K.; Osipov, S. N.; Gobulev, A. S.; Burger, K. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3825-3828.
- ¹¹³ Kokschi, B.; Quaedflieg, P. J. L. M.; Michel, T.; Burger, K.; Broxterman, Q. B.; Schoemakerb, H. E. *Tetrahedron: Asymm.* **2004**, *15*, 1401-1407.
- ¹¹⁴ Schierlinger, C.; Burger, K. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2, 193-194.

- ¹¹⁵ Sewald, N.; Seymour, L.; Burger, K.; Osipov, S. N.; Kolomiets, A. F.; Fokin, A. V. *Tetrahedron : Asym.* **1994**, *5*, 1051-1060.
- ¹¹⁶ Gulevich, A. V.; Schevchenko, N. E.; Balenkova, E. S.; Röshenthaler, G.-V.; Nenajdenko, V.G. *Synlett* **2009**, *3*, 403-406.
- ¹¹⁷ Kocsch, B.; Dahl, C.; Radics, G.; Vocks, A.; Arnold, K.; Arnhold, J.; Sieler, J.; Burger, K. *J. Peptide Sci.* **2004**, *10*, 67-81.
- ¹¹⁸ Olah, G.; Nokima, M.; Kerekes, I. *Synthesis* **1973**, 487.
- ¹¹⁹ Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Winter, R.; Bienert, M.; Ionescu, D.; Carpino, L.A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *31*, 5483-5486.
- ¹²⁰ Kantharaju; Patil, B. S.; Babu, V.V. S. *Letters in Peptide Science*, **2002**, 227-229.
- ¹²¹ Santagada, V.; Fiorino, F.; Perissutti, E.; Severino, B.; De Filippis, V.; Vivencio, B.; Caliendo, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 5171-5173.
- ¹²² Wöhr, T.; Wahl, F.; Nefzi, A.; Rohwedder, B.; Sato, T.; Sun, X.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218-9227.
- ¹²³ Gopi, H. N.; Babu, V. V. S. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9769-9772.
- ¹²⁴ DalPozzo, A.; Bergonzi, R.; Ni, M. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 3925-3927.
- ¹²⁵ Lundquist, J. T.; Pelletier, J. C. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 781-783.
- ¹²⁶ Karplus, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11-15.
- ¹²⁷ Maegawa, T.; Fujiwara, Y.; Ikawa, T. *Amino Acids* **2009**, *36*, 493-499.
- ¹²⁸ Tiecco, M.; Testaferri, L.; Marini, F.; Sternativo, S.; Santi, C.; Bagnoli, L.; Temperini, A. *Tetrahedron : Asymm.* **2003**, *14*, 2651-2657.
- ¹²⁹ Saito, Y.; Ouchi, H.; Takahata, H. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11599-11607.
- ¹³⁰ Ollivier, A.; Goubert, M.; Tursun, A.; Canet, I.; Sinibaldi, M.-E. *ARKIVOC* **2010**, 108-126.
- ¹³¹ Varala, R.; Nuvula, S.; Adapa, S. R. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8283-8286.

Table des schémas

Schéma 1 : Equilibre cis/trans de la liaison amide d'un peptide AA-Pro par rapport à un peptide ne contenant pas de proline	32
Schéma 2 : Composés organofluorés naturels.....	40
Schéma 3 : Synthèse de l' α -Tfm-phénylglycine.....	45
Schéma 4 : Synthèse de l'acide α -Tfm-aspartique.....	46
Schéma 5 : Synthèse de l' α -Tfm-sérine.....	46
Schéma 6 : Alkylation d'imines dérivées du trifluoropyruvate	47
Schéma 7 : Préparation des α -Tfm-prolines	51
Schéma 8 : Préparation de la 5-CF ₃ -proline.....	52
Schéma 9 : Formation des pseudoprolines et nomenclature	53
Schéma 10 : Préparation des CF ₃ -pseudoprolines Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$).....	54
Schéma 11 : Synthèse de l'allylmorpholinone	54
Schéma 12 : <i>N</i> -protection du phénylglycinol par un groupement Boc	55
Schéma 13 : Réaction d'iodocyclisation	55
Schéma 14 : Essais de cyclisation avec NBS et NIS.....	56
Schéma 15 : Réduction de la liaison carbone-iode des bicycles iodés.....	57
Schéma 16 : Synthèses des deux énantiomères de la 2-CF ₃ -proline.....	57
Schéma 17 : Estérification et <i>N</i> -protection de la L-sérine par un groupement Boc.....	58
Schéma 18 : Synthèse des L-Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$).....	58
Schéma 19 : Estérification et <i>N</i> -protection de la D-sérine par un groupement Boc	59
Schéma 20 : Synthèse des D-Ser($\Psi^{CF_3,H}Pro$)	59
Schéma 21 : <i>N</i> -protection de la L-cystéine par un groupement Boc.....	59
Schéma 22 : Synthèse des Cys($\Psi^{CF_3,H}Pro$).....	60
Schéma 23 : Synthèse de l'oxazolidine dérivée du (<i>R</i>)-phénylglycinol.....	60
Schéma 24 : <i>N</i> -protection de l'éthanolamine par un groupement Boc	60
Schéma 25 : Synthèse de l'oxazolidine dérivée de l'éthanolamine	61
Schéma 26 : La réaction de couplage peptidique	62
Schéma 27 : Formation et épimérisation de l'oxazolone	62
Schéma 28 : Exemples de groupements carbamates.....	62
Schéma 29 : Réaction entre un acide aminé et un carbodiimide.....	63

Schéma 30 : Réactions possibles après formation de la <i>O</i> -acylisourée	64
Schéma 31 : Formation d'anhydride symétrique	65
Schéma 32 : Réaction de couplage avec un anhydride mixte	66
Schéma 33 : Formation de l'anhydride de Leuch	67
Schéma 34 : Préparation d'un chlorure d'acyle	69
Schéma 35 : Préparation d'un fluorure d'acyle.....	70
Schéma 36 : Anhydride de Leuch	70
Schéma 37 : Formation d'un bromure d'acyle.....	70
Schéma 38 : Formation d'un ester activé sous forme de pentafluorophényle.....	71
Schéma 39 : Couplage de l' α -Tfm-Arg	72
Schéma 40 : Couplage de l' α -Tfm-Ala et l' α -Tfm-Phe	73
Schéma 41 : Couplage C-terminal d'acides aminés trifluorométhylés <i>via</i> la formation d'anhydride de Leuch.....	73
Schéma 42 : Formation d'une dicétopipérazine trifluorométhylée	74
Schéma 43 : Addition d'organométalliques sur des dicétopipérazines trifluorométhylées	74
Schéma 44 : Formation du dipeptide par acidolyse de la dicétopipérazine trifluorométhylée	74
Schéma 45 : Synthèse de dipeptides α -Tfm-Pro-AA sous forme racémique <i>via</i> la réaction de Ugi.....	75
Schéma 46 : Optimisation du couplage C-terminal de l' α -Tfm-Pro	76
Schéma 47 : Synthèse de dipeptides avec l' α -Tfm-Pro	76
Schéma 48 : Synthèse de dipeptides avec l' α -Tfm-Ala.....	77
Schéma 49 : Couplage sur l'azote de l' α -Tfm-Leu et l' α -Tfm-Phe	77
Schéma 50 : Couplage de la Z-Leu avec l' α -Tfm-Ala-NH ₂	78
Schéma 51 : Couplage de Couplage de la Z-Phe avec le dipeptide α -Tfm-Ala-Ala-NH ₂	78
Schéma 52 : Couplage de la Boc-Met avec le dipeptide α -Tfm-Ala-Phe-NH ₂	79
Schéma 53 : Couplage de la Phe-Br sur l'azote de l' α -Tfm-Phe.....	79
Schéma 54 : Couplage sur l'azote du dipeptide α -Tfm-Ala-Leu-OBzl.....	80
Schéma 55 : Couplage de l' α -Tfm-Pro avec l'acide glutamique.....	81
Schéma 56 : Couplage du dipeptide α -Tfm-Pro-Glu(OBzl)-OBzl avec la Z-Gly <i>via</i> la formation d'un anhydride mixte.....	82
Schéma 57 : Préparation du fluorure d'acyle de la Fmoc-Gly	83
Schéma 58 : Couplage du dipeptide α -Tfm-Pro-Glu(OBzl)-OBzl avec Fmoc-Gly-F.....	83
Schéma 59 : Couplage de la Fmoc-Gly avec le dipeptide α -Tfm-Pro-Glu(OBzl)-OBzl.....	84

Schéma 60 : Synthèse du GPE en série 2-CF ₃ -proline.....	86
Schéma 61 : Synthèse de dipeptides <i>N</i> -terminaux en série pseudoproline	87
Schéma 62 : Réaction de couplage de la Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro) avec la Fmoc-Ala en présence de diisopropyléthylamine	88
Schéma 63 : Equilibre entre les oxazolidines (<i>S, S</i>) et (<i>R, S</i>).....	88
Schéma 64 : Réaction de couplage de la Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro) avec la Fmoc-Gly sans base	89
Schéma 65 : Couplage de chlorures d'acyle sur la Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro).....	90
Schéma 66 : Couplage de chlorures d'acycles sur la D-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)	91
Schéma 67 : Epimérisation de la Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)	92
Schéma 68 : Saponification du dipeptide Fmoc-Gly-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe.....	93
Schéma 69 : Couplage du dipeptide Fmoc-Gly-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OH	93
Schéma 70 : Couplage du dipeptide Fmoc-Gly-Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OH avec l'acide glutamique en utilisant BOP-Cl	94
Schéma 71 : Couplage de la Fmoc-Gly-Cl sur la Cys($\Psi^{CF_3,H}$ Pro).....	94
Schéma 72 : Comparaison de l'épimérisation entre la Ser($\Psi^{CF_3,H}$ Pro) et la Cys($\Psi^{CF_3,H}$ Pro) ..	95
Schéma 73 : Saponification du dipeptide Fmoc-Gly-Cys($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OMe.....	96
Schéma 74 : Couplage du dipeptide Fmoc-Gly-Cys($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OH avec l'acide glutamique en utilisant HOBt/EDCI	96
Schéma 75 : Couplage du dipeptide Fmoc-Gly-Cys($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OH avec l'acide glutamique en utilisant le BOP-Cl	97
Schéma 76 : Couplage du dipeptide Fmoc-Gly-Cys($\Psi^{CF_3,H}$ Pro)-OH avec l'acide glutamique en utilisant l'isobutylchloroformiate	97
Schéma 77 : Couplage de la Fmoc-Gly-Cl sur l'oxazolidine dérivée de l'éthanolamine	98
Schéma 78 : Couplage de la Fmoc-Gly-Cl sur l'oxazolidine dérivée du (<i>R</i>)-phénylglycinol .	98
Schéma 79 : Synthèse de la 1-bromo- <i>N,N</i> -2-triméthyl-1-propenylamine.....	99
Schéma 80 : Couplage de N ₃ -Gly-Br sur l'oxazolidine dérivée du (<i>R</i>)-phénylglycinol	99
Schéma 81 : Couplage de l'acide glutamique avec le dipeptide Fmoc-Gly-1,3-oxazolidine	100
Schéma 82 : Couplage de l' α -Tfm-Ala avec le décapeptide FLAPYGWMVL	101
Schéma 83 : Couplage de la Fmoc-Gly sur le peptide α -Tfm-Ala-FLAPYGWMVL.....	102
Schéma 84 : Couplage de l' α -Tfm-Ala avec l'acide glutamique greffé	103
Schéma 85 : Couplage de la Fmoc-Gly avec le dipeptide α -Tfm-Ala-Glu	104
Schéma 86 : Couplage de l' α -Tfm-Pro avec l'acide glutamique greffé	104

Schéma 87 : Couplage de la Fmoc-Gly avec le dipeptide α -Tfm-Pro-Glu.....	105
Schéma 88 : Analogues trifluorométhylés du GPE.....	115
Schéma 89 : Synthèses des analogues de type G-2-alkyl-PE.....	117
Schéma 90 : Synthèses des analogues G-dmPE et G-D-PE.....	118
Schéma 91 : Synthèse des Cys($\Psi^{\text{H,H}}$ Pro) et Cys ($\Psi^{\text{Me, Me}}$ Pro).....	120
Schéma 92 : Synthèse des analogues G-Cys($\Psi^{\text{H,H}}$ Pro)E et G-Cys($\Psi^{\text{Me, Me}}$ Pro)E	120
Schéma 93 : Déprotection du Fmoc en série (S)-2-CF ₃ -proline avec de la pipéridine	121
Schéma 94 : Déprotection du Fmoc en série (S)-2-CF ₃ -proline avec le DBU	121
Schéma 95 : Hydrogénolyse sous 3 ou 5 bars d'hydrogène pour obtenir le tripeptide G-(S)-2-CF ₃ -PE.....	122
Schéma 96 : Hydrogénolyse sous 1 bar d'hydrogène en présence d'acétonitrile pour obtenir le tripeptide G-(S)-2-CF ₃ -PE.....	122
Schéma 97 : Hydrogénolyse sous 1 bar d'hydrogène sans acétonitrile pour obtenir le tripeptide G-(S)-2-CF ₃ -PE.....	123
Schéma 98 : Hydrogénolyse sous 1 bar d'hydrogène sans acétonitrile pour obtenir le tripeptide G-(R)-2-CF ₃ -PE	124
Schéma 99 : Hydrogénolyse sous 1 bar d'hydrogène pour obtenir le tripeptide G-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)E.....	125
Schéma 100 : Hydrogénolyse sous 1 bar d'hydrogène pour obtenir le tripeptide contenant l'oxazolidine issue de l'éthanolamine	125
Schéma 101 : Clivage des groupements protecteurs des analogues trifluorométhylés du tripeptide GPE.....	126

Table des tableaux

Tableau 1 : Comparaison entre H, F et Cl.....	41
Tableau 2 : Réaction de cyclisation avec NBS et NIS	56
Tableau 3 : Réactions de couplage avec la Fmoc-Gly-Cl	84
Tableau 4 : Dipeptides Fmoc-AA-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe.....	90
Tableau 5 : Dipeptides Fmoc-AA-D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)-OMe	91
Tableau 6 : Couplage de la Fmoc-Gly sur le peptide α -Tfm-Ala- FLAPYGWMVL	102
Tableau 7 : Distances interatomiques dans les différentes configurations et conformations de la Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}$ Pro)	109

Table des figures

Figure 1 : IGF-1.....	19
Figure 2 : Structure chimique du GPE et de NNZ-2566.....	20
Figure 3 : Analogues trifluorométhylés du GPE.....	20
Figure 4 : Représentation schématique de la pénombre ischémique.....	23
Figure 5 : Évolution spatio-temporelle des mécanismes impliqués dans l'ischémie cérébrale.....	24
Figure 6 : Processus excitotoxique suite au choc ischémique.....	25
Figure 7 : Mécanismes lors de l'inflammation ischémique.....	26
Figure 8 : Cascade de Caspase.....	27
Figure 9 : Clivage d'IGF-1 en des(1-3)IGF-1 et GPE.....	28
Figure 10 : Modifications structurales effectuées sur le GPE.....	29
Figure 11 : Analogues du GPE modifiés sur la glycine.....	30
Figure 12 : Analogues du GPE modifiés sur l'acide glutamique.....	31
Figure 13 : Analogues du GPE modifiés sur la proline.....	33
Figure 14 : Affinité d'analogues du GPE sur les récepteurs glutamates ¹⁸	34
Figure 15 : Test de neuroprotection du GPE et d'analogues contre l'excitotoxicité ¹⁸	35
Figure 16 : Affinité du GPE et de ses analogues sur les récepteurs glutamates ²¹	35
Figure 17 : D-AP5 (Acide (2 <i>R</i>)-amino-5-phosphonopentanoïque).....	36
Figure 18 : Test de neuroprotection du GPE et d'analogues contre l'excitotoxicité et la privation d'oxygène-glucose ²¹	37
Figure 19 : Nombre de nouveaux médicaments potentiels versus les investissements R&D aux Etats-Unis entre 1970 et 2008.....	38
Figure 20 : Structure des médicaments Copaxone [®] , Lupron [®] et Zoladex [®]	38
Figure 21 : Polarisation de la liaison C-F.....	41
Figure 22 : Effet du fluor sur un carbocation.....	42
Figure 23 : Exemples de composés organofluorés utilisés comme médicaments.....	42
Figure 24 : Fluorodesoxyglucose (¹⁸ F).....	42
Figure 25 : Variation des pKa des fonctions acide et amine de l'alanine β fluorée en fonction du nombre d'atomes de fluor ⁴⁶	43
Figure 26 : Effet gauche.....	43
Figure 27 : Synthons trifluorométhylés communément utilisés.....	45
Figure 28 : Etude de l'hydrolyse de différents peptides avec l'α-chymotrypsine.....	48

Figure 29 : Structure d'un chélatant fluoré	49
Figure 30 : Produit secondaire bicyclique à 4 chaînons obtenu lors de l'iodocyclisation	56
Figure 31 : Résidu i et $i+1$ d'une chaîne peptidique	61
Figure 32 : Quelques exemples de carbodiimides couramment utilisés	64
Figure 33 : Exemples d'additifs utilisés avec les carbodiimides	65
Figure 34 : Anhydride symétrique et anhydride mixte	65
Figure 35 : Anhydride mixte carboxylique/phosphinique.....	67
Figure 36 : Structure du BOP-Cl.....	67
Figure 37 : Exemples de sels de phosphoniums.....	68
Figure 38 : Exemples de sels d'uronium	68
Figure 39 : Exemples de groupements protecteurs compatibles avec les bromures d'acyle ...	70
Figure 40 : Acide aminé activé sous forme de pentafluorophényle	71
Figure 41 : Liaison amide <i>cis/trans</i>	89
Figure 42 : Liaison amide <i>cis/trans</i> des Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$) et D-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$).....	92
Figure 43 : Décapeptide FLAPYGWMVL	101
Figure 44 : Résine Wang.....	101
Figure 45 : Chromatogramme du couplage de l' α -Tfm-Ala avec l'acide glutamique greffé	103
Figure 46 : Chromatogramme du couplage de l' α -tTm-Pro avec l'acide glutamique greffé	104
Figure 47 : Représentation d'une pseudoproline.....	105
Figure 48 : Puckering des pseudoprolines.....	106
Figure 49 : Représentation de Newman des conformations de cycle up-puckering et down-puckering.....	106
Figure 50 : Courbe de Karplus	107
Figure 51 : Signaux RMN observé selon le puckering	107
Figure 52 : Exemple de détermination du puckering avec le spectre RMN du dipeptide Fmoc-L-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe.....	108
Figure 53 : Exemple de détermination du puckering avec le spectre RMN du dipeptide Fmoc-D-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe	108
Figure 54 : $n\text{Oe}$ entre le H_δ et $\text{H}_\alpha, \text{H}_{\beta 2}, \text{H}_{\beta 3}$ en fonction de la conformation du cycle Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$).....	109
Figure 55 : Exemple de détermination de la configuration absolue avec le spectre RMN du dipeptide Fmoc-L-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe	110
Figure 56 : Distances $\text{H}_\alpha\text{H}_{\beta 2}$ et $\text{H}_\alpha\text{H}_{\beta 3}$ pour un <i>up</i> -puckering.....	110

Figure 57 : Exemple de détermination de la configuration absolue avec le spectre RMN du dipeptide Fmoc-D-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe	111
Figure 58 : Représentation de la proximité spatiale du proton H_α du Fmoc-AA avec le proton H_α ou H_δ de la pseudoproline en fonction de l'isomérisation cis/trans de la liaison amide	112
Figure 59 : Liaison amide <i>cis</i> du dipeptide Fmoc-Ala-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe	112
Figure 60 : Liaison amide <i>trans</i> du dipeptide Fmoc-Ala-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe	113
Figure 61 : Exemple de détermination de conformation de la liaison amide avec le spectre RMN du dipeptide Fmoc-L-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe	113
Figure 62 : Exemple de détermination de conformation de la liaison amide avec le spectre RMN du dipeptide Fmoc-D-Val-L-Ser($\Psi^{\text{CF}_3, \text{H}}\text{Pro}$)-OMe	114
Figure 63 : Synthèse d'analogues du GPE par SPPS	119
Figure 64 : Le tripeptide G-(<i>S</i>)-2-CF ₃ -PE	123
Figure 65 : Structures du NNZ-2566 et du G-(<i>S</i>)-2-CF ₃ -PE	123
Figure 66 : Le tripeptide G-(<i>R</i>)-2-CF ₃ -PE	124
Figure 67 : Acides aminés cycliques trifluorométhylés synthétisés	128
Figure 68 : Dipeptides synthétisés à partir des prolines et pseudoprolines trifluorométhylés	129
Figure 69 : Analogues trifluorométhylés du GPE en série 2-CF ₃ -proline	129
Figure 70 : Analogues trifluorométhylés du GPE en série pseudoproline	130

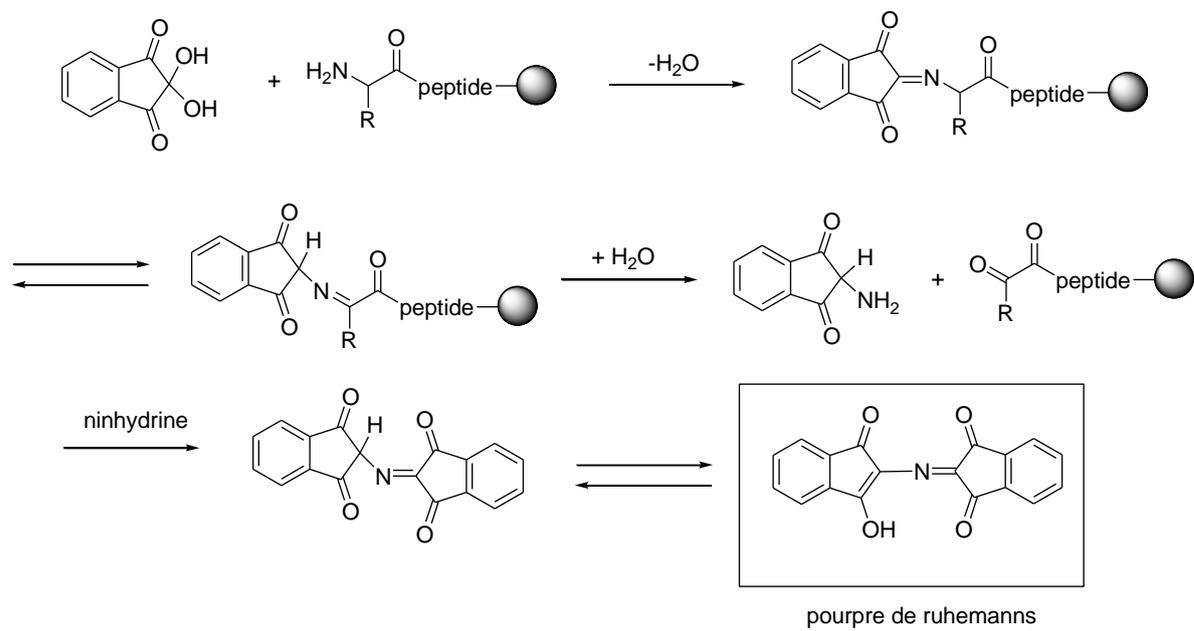
ANNEXES

Annexe 1 : Critères d'exclusion à la thrombolyse IV des IC de moins de 3 heures selon les recommandations de la Société française Neuro-Vasculaire (SFNV)

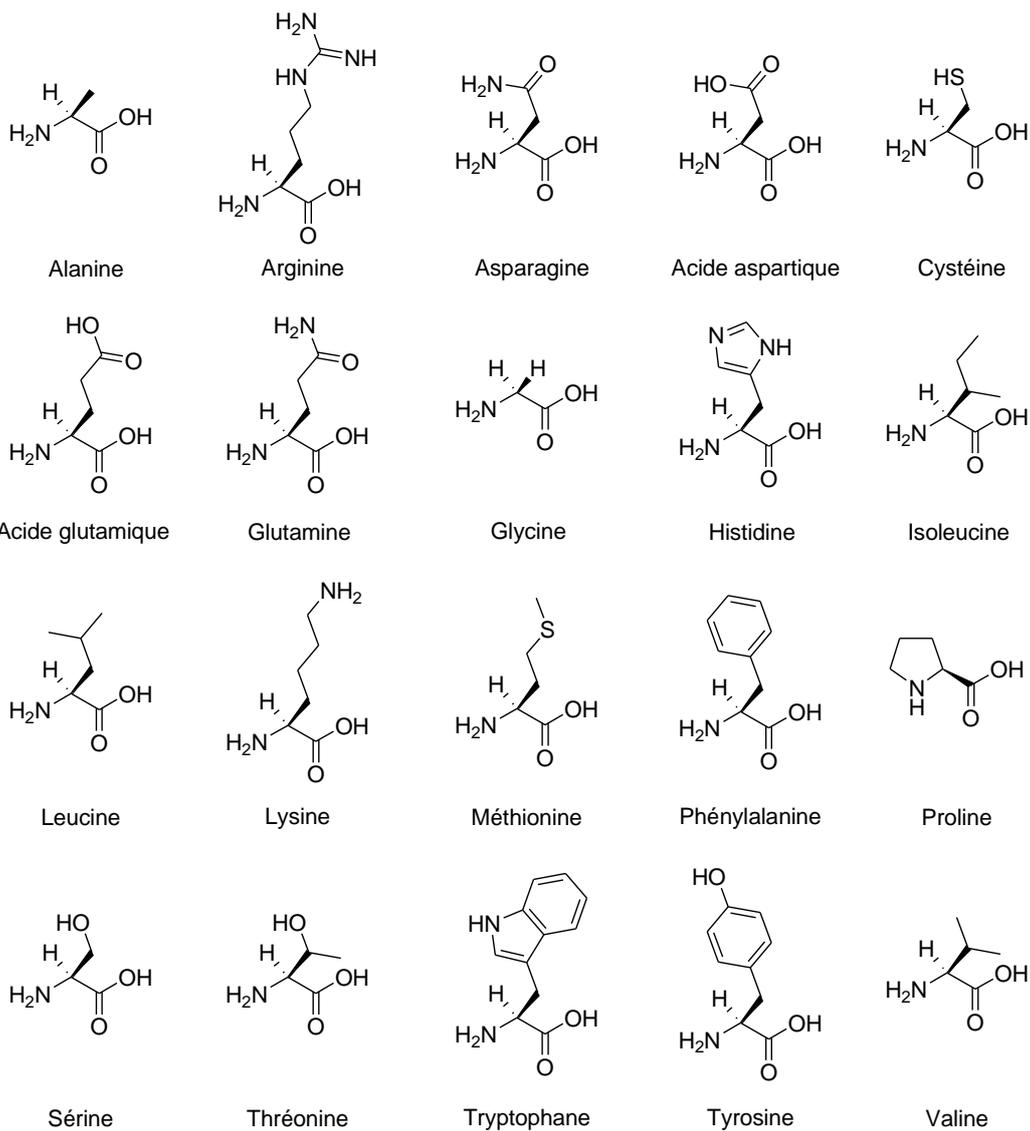
D'après la Société française Neuro-Vasculaire, 2000 (225)

1. traitement anticoagulant oral en cours ou INR (International Normalized Ratio) >1,7,
2. traitement par héparine au cours des 24 heures précédant l'accident ischémique cérébral et allongement du temps de céphaline activée,
3. nombre de plaquettes < 100 000/mm³,
4. un autre AVC ou un traumatisme crânien sévère au cours des 3 mois précédents,
5. pression artérielle systolique > 185 ou pression artérielle diastolique > 110 mmHg au moment d'administrer le traitement,
6. déficit neurologique en voie de régression,
7. déficit neurologique mineur tel que déficit sensitif isolé, ataxie isolée, dysarthrie isolée ou déficit moteur minime,
8. antécédent d'hémorragie intra-crânienne,
9. glycémie < 0,5 g/l ou >4g/l,
10. crise d'épilepsie lors de l'installation de l'accident ischémique cérébral,
11. hémorragie digestive ou urinaire au cours des 21 jours précédents,
12. infarctus du myocarde récent,
13. ponction récente d'un vaisseau incompressible,
14. score NIH (échelle du National Institutes of Health) >22 ou coma profond,
15. atténuation de densité ou effet de masse dans plus du tiers du territoire de l'artère cérébrale moyenne,
16. âge >80 ans,
17. femme enceinte et âge <18 ans,
18. heure de début des symptômes incertaine.

Annexe 2 : Test de Kaiser



Annexe 3 : Structure des acides aminés naturels



Annexe 4 : Propriétés physico-chimiques et abréviations des acides aminés naturels

Code	Abréviation	Acide aminé	Masse molaire	pI	pK _a (α -COOH)	pK _b (α -NH ₃)	pK _c (chaîne latérale)
A	Ala	Alanine	89.0940	6.01	2.35	9.87	-
C	Cys	Cystéine	121.1540	5.05	1.92	10.70	8.18
D	Asp	Acide aspartique	133.1038	2.85	1.99	9.90	3.90
E	Glu	Acide glutamique	147.1307	3.15	2.10	9.47	4.07
F	Phe	Phénylalanine	165.1918	5.49	2.20	9.31	-
G	Gly	Glycine	75.0671	6.06	2.35	9.78	-
H	His	Histidine	155.1563	7.60	1.80	9.33	6.04
I	Ile	Isoleucine	131.1746	6.05	2.32	9.76	-
K	Lys	Lysine	146.1893	9.60	2.16	9.06	10.54
L	Leu	Leucine	131.1746	6.01	2.33	9.74	-
M	Met	Méthionine	149.2078	5.74	2.13	9.28	-
N	Asn	Asparagine	132.1190	5.41	2.14	8.72	-
P	Pro	Proline	115.1319	6.30	1.95	10.64	-
Q	Gln	Glutamine	146.1459	5.65	2.17	9.13	-
R	Arg	Arginine	174.2027	10.76	1.82	8.99	12.48
S	Ser	Sérine	105.0934	5.68	2.19	9.21	-
T	Thr	Thréonine	119.1203	5.60	2.09	9.10	-
V	Val	Valine	117.1478	6.00	2.39	9.74	-
W	Trp	Tryptophane	204.2284	5.89	2.46	9.41	-
Y	Tyr	Tyrosine	181.1912	5.64	2.20	9.21	10.46