HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs de PfA-M17, potentielle cible antipaludéenne

Bérénice Chaillou

▶ **To cite this version:**

Bérénice Chaillou. Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs de PfA-M17, potentielle cible antipaludéenne. Autre. Université de Haute Alsace - Mulhouse, 2015. Français. NNT : 2015MULH8176 . tel-01530740

HAL Id: tel-01530740

https://theses.hal.science/tel-01530740v1

Submitted on 31 May 2017

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 Haute-Alsace
Ecole Doctorale des Sciences Chimiques (ED 222)

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Haute-Alsace

Discipline : Chimie Organique

Par

Bérénice CHAILLOU

Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs de *Pf*A-M17, potentielle cible antipaludéenne

Laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique (EA 4566)
Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse

Soutenue publiquement le **30 octobre 2015** devant la commission d'examen :

Pr. Christine GERARDIN	Rapporteur
Dr. Frédéric TARAN	Rapporteur
Pr. Marcel HIBERT	Président
Pr. Jean-Marc WEIBEL	Examinateur
Dr. Julien POTHIER	Examinateur
Pr. Céline TARNUS	Directeur de thèse
Dr. Sébastien ALBRECHT	Co-directeur de thèse

Ne jugez pas le grain de poivre d'après sa petite taille,

goûtez-le et vous sentirez comme il pique.

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée au sein du laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique (COB) sous la direction du Pr Céline Tarnus et du Dr Sébastien Albrecht.

Le laboratoire COB, l'Université de Haute-Alsace (allocation ministérielle) et l'Agence Nationale de la Recherche (ANR MAMMAMIA 12-BS07-0020-01) ont assuré le soutien financier de mes travaux de thèse.

Le projet ANR MAMMAMIA a été mené en collaboration avec le Pr Isabelle Florent et le Dr Lotfi Bounaadja de l'équipe 'Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes' du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (UMR 7245, CNRS).

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, le Pr Céline Tarnus et le Dr Sébastien Albrecht. Mme Tarnus, je vous remercie pour l'accueil au sein de votre équipe, pour vos conseils avisés et votre aide précieuse tout au long de cette thèse. Sébastien, je vous suis très reconnaissante et vous remercie pour votre patience, votre disponibilité et toutes les connaissances que vous m'avez apportées. En espérant que votre première doctorante ait été à la hauteur.

Je souhaite remercier les membres du jury, le Pr Christine Gérardin, le Pr Marcel Hibert, le Dr Julien Pothier, le Dr Frédéric Taran et le Pr Jean-Marc Weibel, pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail.

Je remercie le Pr Isabelle Florent et le Dr Lotfi Bounaadja pour les connaissances qu'ils m'ont apportées à propos du paludisme et du parasite *Plasmodium*.

Je tiens à remercier Marjorie pour ses explications claires et précises en biologie et son soutien tout au long de ma thèse.

J'adresse mes remerciements au Dr Nicolas Blanchard, au Pr Jean-Philippe Goddard et au Dr Philippe Bisseret pour leurs conseils judicieux et leurs critiques constructives.

Je remercie vivement Didier pour sa disponibilité, son aide précieuse en RMN et son caractère taquin.

Je souhaite remercier Philippe pour son attention, ses conseils avisés en chimie et en botanique, les nombreux articles ASAP dont il m'a fait part et le chocolat noir, petit remontant quotidien !

Je tiens à remercier le Dr Cécile Joyeux et le Dr Mary-Lorène Goddard pour les analyses de masse et leur aide.

Je remercie Aline pour sa gentillesse, son indulgence vis-à-vis de mes retards de commandes et sa disponibilité.

J'adresse mes remerciements à tous les membres permanents, doctorants et post-doctorants du laboratoire COB avec lesquels j'ai travaillé, de près ou de loin, pendant ces trois années.

Je tiens à remercier Delphine et Samuel pour m'avoir accueillie à l'Ecole de Chimie pour les travaux pratiques de première année, pour leurs conseils et leur gentillesse.

Je remercie vivement Laura, stagiaire M1, pour son travail et son implication dans le projet. Je remercie également Alex, stagiaire micro-projet, pour sa participation au projet.

Je souhaite remercier mes collègues : Sarah, la liste est bien trop longue avec tout ce que tu as fait pour moi depuis ton accueil chaleureux au laboratoire et dans ta belle ville de Mulhouse ! Tu as beaucoup participé au fait que je m'y sente bien, que j'y sois bien entourée et que je ne m'y ennuie pas ! Au labo, tu as été très patiente et tu m'as aidée à trouver mes marques. Nous avons partagé de très bons moments et j'espère qu'il y en aura moult autres, comme tu dis ! Je n'oublierai pas ton « allez, c'est drôle ! », ton sourire et ta gourmandise ! Germain, cher collègue MAMMAMIA, cher collègue aminobenzosubérone, je tiens à te remercier pour ta patience, tes conseils avisés et ton aide en chimie. Bien sûr, je n'oublie pas les nombreux

fous rires, nos périples en congrès aux quatre coins de la France et toi déguisé en canette Oasis ! Je remercie aussi Mamadou pour la bonne humeur qu'il a apportée au labo lors de son stage ! Brice, tu m'auras parfois mené la vie dure dans le bureau entre les missiles, les chansons qui restent en tête et Calzedonia, mais il faut reconnaître qu'on ne s'est pas ennuyé! Mounir ou l'homme qui fera du bureau un jardin de cactus, merci pour ta gentillesse et ton sourire quotidien ! Je voudrais aussi remercier mes anciens collègues, Aurélie, Tchoupi, Stéphane, Emilie pour la bonne ambiance au labo. Je remercie la petite équipe du jeudi midi pour les séances intenses de CAF ! Caro, entre quelques courbatures et parts de brioche, je te remercie pour ton aide pendant ces trois années et pour la longue liste de moments agréables partagés.

Je tiens à remercier mes parents, mon frère, ma famille et mes amis pour leur présence et leur soutien. Enfin, mon Guigui, je ne pourrai jamais assez te remercier pour ton écoute, ton soutien et ta faculté à me faire voir les choses du bon côté, sans oublier tous les bons moments partagés.

Liste des abréviations

ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination
ADN	acide désoxyribonucléique
ANR	Agence Nationale de la Recherche
APN	aminopeptidase neutre
Bn	benzyle
BnBr	bromure de benzyle
Boc	*tert*-butoxycarbonyle
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane
DHFR	dihydrofolate reductase
DHPS	dihydropteroate synthase
DIAD	diisopropylazodicarboxylate
DIPEA	diisopropyléthylamine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMEAD	di-2-méthoxyéthylazodicarboxylate
DMF	*N*, *N*-diméthylformamide
DMP	periodinane de Dess-Martin
DMSO	diméthylsulfoxyde
EC	numéro de la commission des enzymes
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
ERAP	Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase
GOESY	Gradient-enhanced nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
IBX	acide 2-iodoxybenzoïque
IMAC	Immobilized-Metal Affinity Chromatography
IP	Intra-Péritonéale
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IRAP	insulin-regulated aminopeptidase
LAP	leucyl aminopeptidase
LAPc	leucyl aminopeptidase cytosolique
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
LTA_4H	Leukotriene A_4 hydrolase
MDR	Multi-Drug Resistant
mlge	mélange
MNHN	Museum National d'Histoire Naturelle de Paris
mpk	mg/kg
NBS	*N*-bromosuccinimide
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NPP	New Permeability Pathway
OMS	Organisation Mondiale pour la Santé
P.	*Plasmodium*
pABA	acide *para*-aminobenzoïque
*Pf*EMP1	*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1

PMB	*para*-méthoxybenzyle
PPTS	pyridinium *para*-toluènesulfonate
RCM	Ring Closing Metathesis
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAR	Structure-Activity Relationship
SEAr	Substitution Electrophile Aromatique
SERCA	Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}/ATPase
TBAF	fluorure de tétrabutylammonium
TBAI	iodure de tétrabutylammonium
TBDMS	*tert*-butyldiméthylsilyle
TEA	triéthylamine
TEMPO	(2,2,6,6-tétraméthyl-pipéridin-1-yl)oxyl
THF	tétrahydrofurane
TIFF3	Tricorn Interacting Factor 3
TMEDA	*N*,*N*,*N'*,*N'*-tétraméthyléthylènediamine
TMSI	iodure de triméthylsilyle

Sommaire

Introduction **1**

Chapitre 1 : le paludisme et le parasite *Plasmodium* **3**

I- Généralités sur le paludisme 4

1) Epidémiologie 4

2) Transmission 4

3) Symptômes 5

II- Les parasites du genre *Plasmodium* 6

1) Espèces impliquées en pathologie humaine 6

2) Cycle de vie du parasite 7

3) Catabolisme de l'hémoglobine 10

4) Pathogenèse 13

III- Moyens de lutte actuels 14

1) Lutte anti-vectorielle 14

2) Recherche d'un vaccin 16

3) Arsenal thérapeutique actuel 19

4) Problèmes de chimiorésistance 26

Chapitre 2 : les métallo-aminopeptidases *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 ..... **32**

I- Les enzymes protéolytiques 33

1) Définition et classification 33

2) Les aminopeptidases 35

3) Les métalloprotéases 35

II- Famille M1 : métalloprotéases à un ion métallique 36

1) Homologie de repliement 36

2) Homologie de séquence 38

3) Mécanisme catalytique..... 38

4) Structure et spécificité de substrat de *Pf*A-M1 39

III- Famille M17 : métalloprotéases à deux ions métalliques 41

1) Homologie de repliement..... 41

2) Homologie de séquence 43

3) Mécanisme catalytique..... 44

4) Structure et spécificité de substrat de *Pf*A-M17 44

5) L'aminopeptidase d'*Aeromonas proteolytica*..... 46

IV- Rôles de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 chez *Plasmodium* 47

1) Expression, rôle et localisation de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17..... 47

2) *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17, protéines essentielles au développement du parasite 50

Chapitre 3 : inhibiteurs de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 et travaux antérieurs menés au laboratoire 52

I- Les inhibiteurs de *Pf*A-M1 et de *Pf*A-M17 53

1) Mimes partiels de l'intermédiaire tétraédrique..... 54

2) Chélatant des métaux..... 59

II- Recherche antérieure aux travaux de thèse..... 62

1) Aminopeptidases monométalliques : des inhibiteurs de l'APN de mammifères à l'inhibition de *Pf*A-M1. 62

2) Inhibiteurs de métallo-aminopeptidases bimétalliques..... 63

III- Conception d'inhibiteurs de *Pf*A-M17 65

Chapitre 4 : synthèse et évaluation biologique d'analogues de la 8-amino-7-hydroxy-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptèn-6-one. 70

I- Synthèse de la [cis]-8-amino-7-hydroxy-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptèn-6-one..... 71

1) Voie A : approche précédemment publiée..... 71

2) Voie B..... 81

a) Stratégie de synthèse 81

b) Synthèse 82

II- Voie C 92

1) Rétrosynthèse 92

2) Synthèse des *N-tert*-butanesulfinimines R_S-45 et S_S-45 93

a) Synthèse de l'ester 37 à partir de l'acide D-isoascorbique 93

b) Protection de l'alcool du composé 37 94

c) Obtention de l'aldéhyde 43 99

d) Condensation de l'aldéhyde 43 avec les *tert*-butanesulfinamides 101

3) Additions diastéréosélectives sur les *N-tert*-butanesulfinimines 45 102

a) Addition d'un nucléophile allylique 105

b) Addition d'un nucléophile vinylique 109

c) Addition d'un nucléophile éthynylique 110

d) Addition d'un nucléophile propargylique 111

e) Addition d'un nucléophile benzylique 114

f) Détermination de la stéréochimie des produits d'addition 117

4) Synthèse des époxydes 90-97 119

5) Synthèse de cycloheptanes et cyclohexanes trisusbtitués 122

6) Synthèse de benzocycloheptanes trisubstitués 129

a) Voie C1 129

b) Voie C2 132

c) Voie C3 138

7) Synthèse d'un analogue 1,2,3-triazole 141

III- Evaluation biologique des composés finaux 146

1) Essais enzymatiques *in vitro* et *in cellulo* sur parasites en cultures 146

a) Production de *rPf*A-M17 146

b) Potentiel inhibiteur des composés 146

2) Discussion 147

Conclusion et perspectives 150

Partie expérimentale 154

I- Solvants..... 154

II- Matériels et méthodes 154

III- Synthèse..... 157

Annexes..... 222

Résumé 227

Introduction

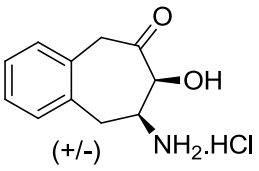
Le paludisme est encore aujourd'hui une maladie infectieuse préoccupante et mortelle dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique, d'Asie et d'Amérique. Il est dû à des parasites du genre *Plasmodium* et est transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques femelles du genre *Anopheles*. Depuis une dizaine d'années, la morbidité et la mortalité liées au paludisme ont nettement reculé, notamment grâce à un meilleur diagnostic, à l'utilisation croissante de moustiquaires et à des traitements efficaces à base d'Artémisinine. Cependant, les phénomènes de résistance des parasites aux différentes générations de traitements et d'insecticides restent un problème majeur, auxquels s'ajoutent le coût des traitements et donc l'accès aux soins pour les populations les plus défavorisées. Il est ainsi urgent de trouver de nouvelles cibles et de développer de nouveaux agents antipaludiques agissant via des mécanismes originaux.

L'alanyl aminopeptidase monométallique ([EC 3.4.11.2]) et la leucyl aminopeptidase bimétallique ([EC 3.4.11.1]) de *Plasmodium falciparum*, notées respectivement *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17, ont récemment émergé comme potentielles cibles antipaludéennes. Plusieurs études montrent que ces deux aminopeptidases joueraient un rôle essentiel à la croissance et à la survie du parasite, en étant principalement impliquées dans la dernière étape du catabolisme de l'hémoglobine. Compte tenu du caractère prometteur de *Pf*A-M1 et de *Pf*A-M17 comme cibles antipaludéennes, la conception rationnelle d'inhibiteurs puissants et sélectifs de ces deux métallo-aminopeptidases est d'un intérêt considérable.

Les inhibiteurs de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 développés jusqu'à présent ont une activité inhibitrice de l'ordre du nanomolaire sur les enzymes, mais de l'ordre du micromolaire sur la croissance du parasite. Cela peut être dû, en partie, à une faible biodisponibilité, à une faible perméabilité cellulaire ou à des liaisons non spécifiques avec d'autres métallo-enzymes.

Fort de son expérience avec les métalloprotéases, notre laboratoire s'est intéressé à la synthèse d'inhibiteurs sélectifs de *Pf*A-M1 et/ou *Pf*A-M17 présentant de meilleures propriétés pharmacologiques. Ces inhibiteurs pourraient être utilisés comme outils moléculaires pour une meilleure compréhension du rôle biologique de ces protéines chez le parasite et comme potentiels traitements antipaludéens. Lors de mes travaux de thèse, je me suis particulièrement intéressée à l'inhibition sélective de l'aminopeptidase bimétallique *Pf*A-M17.

Des travaux précédemment menés au laboratoire ont permis de mettre en évidence le composé **1** comme puissant inhibiteur sélectif d'une aminopeptidase bimétallique de référence, l'aminopeptidase d'*Aeromonas proteolytica* ([EC 3.4.11.10]), notée *AP*aero (K_i = 10 nM *AP*aero ; K_i > 1000 µM aminopeptidase monométallique APN CD13).



1

Etant donné que *Pf*A-M17 et *AP*aero présentent des éléments structuraux communs au niveau de l'organisation de leur site actif et du mécanisme catalytique, le châssis moléculaire de type benzocycloheptane trisubstitué a constitué un point de départ à la conception d'inhibiteurs de *Pf*A-M17. Mes travaux de thèse ont consisté en la conception, la synthèse et l'évaluation biologique d'analogues du composé **1** pour l'inhibition sélective de *Pf*A-M17.

Quatre chapitres constituent le manuscrit de thèse :

- Le paludisme et le parasite *Plasmodium*.
- Les métallo-aminopeptidases *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17.
- Les inhibiteurs de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 et les travaux antérieurs menés au laboratoire.
- La synthèse et l'évaluation biologique d'analogues de la 8-amino-7-hydroxy-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptèn-6-one.

Chapitre 1

Le paludisme et le parasite *Plasmodium*

I- Généralités sur le paludisme

1) Epidémiologie
2) Transmission
3) Symptômes

II- Les parasites du genre *Plasmodium*

1) Espèces impliquées en pathologie humaine
2) Cycle de vie du parasite
3) Catabolisme de l'hémoglobine
4) Pathogenèse

III- Moyens de lutte actuels

1) Lutte antivectorielle
2) Recherche d'un vaccin
3) Arsenal thérapeutique actuel
4) Problèmes de chimiorésistance

I- Généralités sur le paludisme

1) Epidémiologie

Le paludisme (du latin paludis, « marais »), aussi appelé malaria (de l'italien mal'aria, « mauvais air ») est la plus importante maladie parasitaire chez l'Homme. L'Organisation Mondiale de la Santé a estimé en 2013, 198 millions de cas, qui ont causé 584 000 décès. [1,2] Le paludisme est endémique dans 97 pays, essentiellement situés dans les zones intertropicales d'Amérique, d'Asie et d'Afrique (fig. 1). L'Afrique est, de loin, le continent le plus touché avec 90% des décès enregistrés dans cette zone en 2013. La grande majorité des victimes sont les enfants âgés de moins de cinq ans et les femmes enceintes.

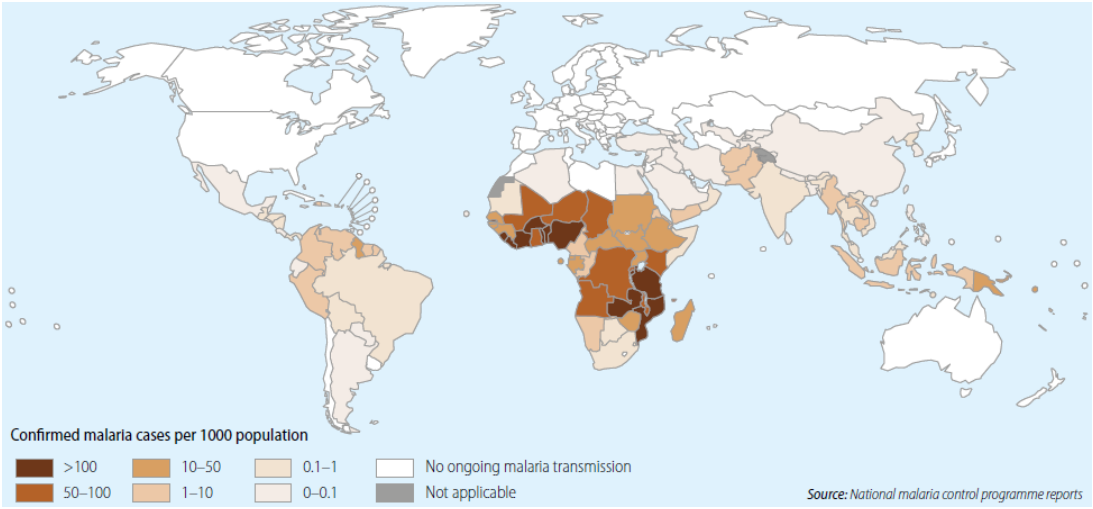


Figure 1 : cas de paludisme confirmé pour une population de 1000 individus[1]

2) Transmission

Le paludisme est une maladie infectieuse due à des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques femelles du genre *Anopheles*, appelés **vecteurs**. Il existe plus de 400 espèces d'*Anopheles* et seulement 30 à 40 espèces sont considérées comme des vecteurs potentiels du paludisme humain, dont notamment *A. arabiensis, A. gambiae* et *A. funestus* (fig. 2 et 3).

Figure 2 : *Anopheles gambiae*

L'intensité de la transmission dépend de la densité, de la longévité, des habitudes de piqûres et de l'efficacité des moustiques vecteurs, mais également de facteurs liés au parasite, à l'hôte humain et à l'environnement. Pour se développer et se reproduire, les anophèles ont besoin de chaleur et de surfaces d'eau peu profondes (les flaques, les rizières et les empreintes laissées par les sabots d'animaux). C'est pourquoi le paludisme est essentiellement concentré vers les tropiques et la transmission est souvent saisonnière avec un pic pendant ou juste après la saison des pluies.

[1] World Malaria Report **2014**, World Health Organization, 1-242.
[2] N. J. White *et al.*, *Lancet* **2014**, *383*, 723-735.

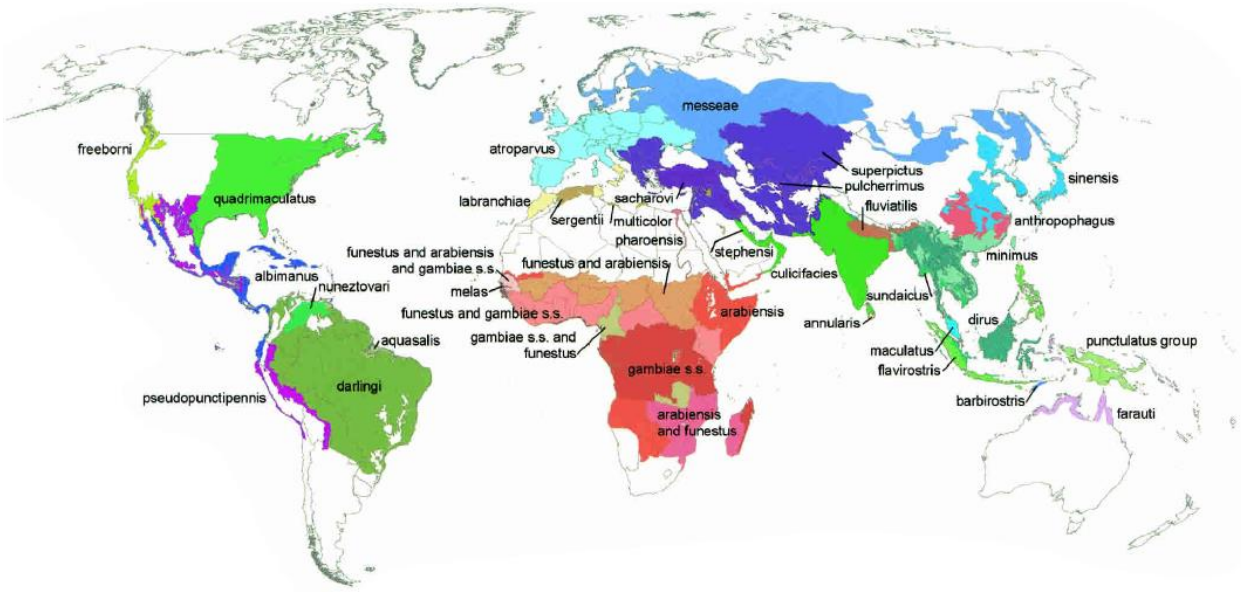


Figure 3 : répartition globale des espèces d'Anophèles dominantes[3]

Il existe un seul cas de contamination inter-humaine directe, lorsqu'une femme enceinte infectée contamine son enfant par voie transplacentaire.

3) Symptômes

Les manifestations cliniques du paludisme sont très diverses. Le paludisme débute par une fièvre 8 à 30 jours après l'infection, qui peut s'accompagner de maux de tête, de douleurs musculaires, d'un affaiblissement, de vomissements, de diarrhées, de toux. Des cycles typiques alternant fièvre, tremblements avec sueurs froides et transpiration intense, peuvent alors survenir : c'est **l'accès palustre simple**. Comme nous le verrons dans la partie suivante, la périodicité des symptômes dépend de l'espèce de parasite en cause et coïncide avec son cycle de développement. La multiplication intense des parasites et l'éclatement des globules rouges conduit à l'**anémie** (cf figure 9, page 10).

S'il n'est pas traité rapidement, le paludisme à *P. falciparum* peut évoluer vers une affection sévère, qui se manifeste différemment selon l'âge. [2,4] Une anémie sévère et une hypoglycémie sont fréquentes chez les enfants fortement atteints, alors que les œdèmes pulmonaires et les lésions rénales sont plus communs chez les adultes. A tout âge, on peut observer une acidose métabolique et un **paludisme cérébral** (ou **neuropaludisme**), souvent mortel. Ce dernier correspond à l'obstruction des vaisseaux sanguins irriguant le cerveau par les globules rouges infectés.

Dans les régions où le paludisme est hautement endémique, une partie de la population est porteuse asymptomatique. Suite à de nombreuses années d'infection chronique par le parasite, certains individus tolèrent sa présence et développent une immunité naturelle.

[3] A. Kiszewski *et al.*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *70*, 486-498.
[4] A. M. Dondorp *et al.*, *CID* **2008**, *47*, 151-57.

I- Les parasites du genre *Plasmodium*

1) Espèces impliquées en pathologie humaine

Si le paludisme est connu depuis la Haute Antiquité, les agents responsables n'ont été découverts qu'en 1880 par un médecin militaire français, A. Laveran, et le rôle des anophèles dans le cycle évolutif a été mis en évidence par R. Ross (1895) et G. B. Grassi (1899).[5,6,7]

Domaine	Eucaryote
Règne	Protiste
Embranchement	Apicomplexa
Classe	Hematozoa
Ordre	Haemosporida
Famille	Plasmodiidae
Genre	*Plasmodium*

Tableau 1 : taxonomie du parasite Plasmodium[8]

Le genre *Plasmodium* se situe dans l'embranchement des **Apicomplexa**, caractérisés par la présence d'un **complexe apical** (tabl. 1). Ce dernier est typique chez les stades infectieux et décrit comme un ensemble de cytosquelette et de structures sécrétrices permettant au parasite de pénétrer son hôte (fig. 4).

Plasmodium appartient à l'ordre **Haemosporida**, endoparasites obligatoires se trouvant dans le sang de vertébrés (Reptiles, Oiseaux, Mammifères). Les Hémosporidies ont deux hôtes : un hôte vertébré chez lequel a lieu la reproduction asexuée (**hôte intermédiaire**) et un insecte piqueur chez lequel a lieu la reproduction sexuée (**hôte définitif**). [9]

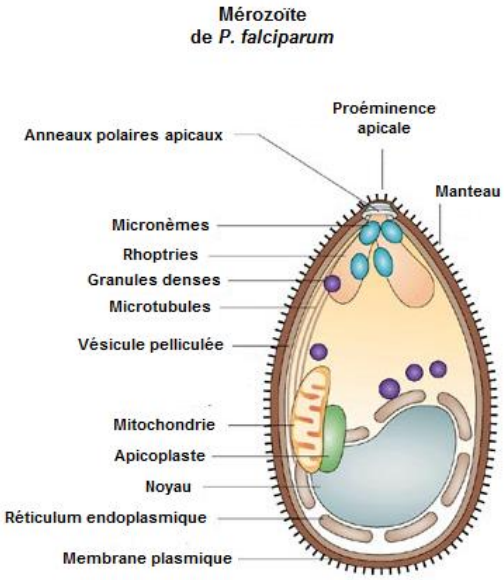


Figure 4 : Mérozoïte de *P. falciparum*

Le genre *Plasmodium* compte près de 150 espèces et est divisé en 10 sous-genres, les parasites des humains et des primates font partie du sous-genre *Plasmodium* ou *Laverania.*

[5] Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme : description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre, A. Laveran, *J.-B. Baillière*, **1881**.
[6] Report on the cultivation of proteosoma, Labbé, in grey mosquitoes, R. Ross, *Calcutta: Superintendent of Govt. Printing*, **1898**.
[7] Rapporti tra la malaria e peculiari insetti (zanzaroni e zanzare palustri), G. B. Grassi, *R. C. Accad. Lincei* **1899**, *7*, 163-177.
[8] http://tolweb.org/tree/phylogeny.html, consulté le 02/04/2015.
[9] J. Baum *et al.*, *Nature Reviews Microbiology* **2006**, *4*, 621-628.

Cinq espèces sont responsables du paludisme chez l'Homme[10] :

- ***Plasmodium falciparum*** est l'espèce la plus répandue, présente dans les zones tropicales d'Amérique Latine, d'Asie et dominante en Afrique. C'est l'espèce la plus virulente car elle se multiplie rapidement dans le sang et peut entraîner la mort par obstruction des vaisseaux sanguins dans le cerveau.
- ***Plasmodium vivax*** que l'on retrouve principalement en Asie, en Amérique latine et dans quelques régions d'Afrique, a la particularité de créer des formes hépatiques «dormantes» (**hypnozoïtes**), pouvant s'activer et envahir le sang des semaines ou des mois après la première infection (rechutes cliniques).
- ***Plasmodium ovale*** est plutôt observé en Afrique de l'ouest et dans les îles de l'ouest du Pacifique. Cette espèce a une biologie et une morphologie proche de *P. vivax* et existe également sous forme d'hypnozoïtes.
- ***Plasmodium malariae*** a une distribution mondiale. S'il n'est pas traité, il entraîne une infection chronique, durable, pouvant dans certains cas persister toute la vie. Chez certains patients, *P. malariae* peut entraîner de sévères complications.
- ***Plasmodium knowlesi*** est principalement rencontré en Asie du Sud-Est. Il était d'abord connu chez deux espèces de macaque et a été récemment découvert chez l'Homme (1965). *P. knowlesi* peut rapidement progresser vers une infection sévère, pouvant s'avérée mortelle.

2) Cycle de vie du parasite

Le cycle de *Plasmodium* se révèle complexe et comporte deux étapes essentielles : une phase asexuée chez l'homme (**schizogonie**) et une phase sexuée chez le moustique (**gamagonie** et **sporogonie**) (fig. 5).

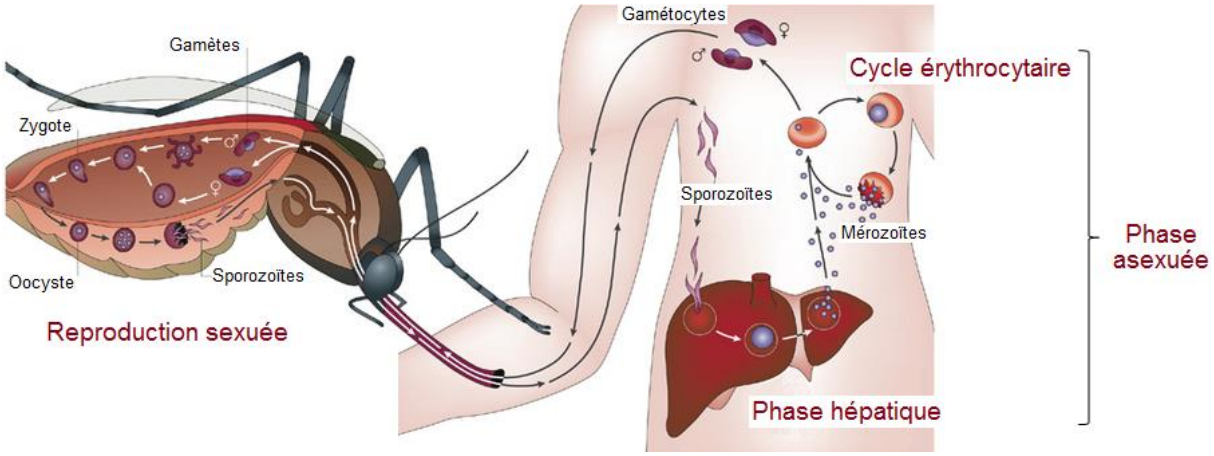


Figure 5 : cycle de vie et de reproduction du parasite

Un repas sanguin sur un hôte humain infecté est nécessaire à l'anophèle femelle pour ingérer le parasite sous forme de gamétocytes mâles (**microgamétocytes**) et femelles (**macrogamétocytes**) (fig. 6). Le moustique se révèle alors infecté et le cycle sexué de reproduction du parasite peut commencer. Dans l'intestin du moustique, les microgamètes pénètrent les macrogamètes, générant des **zygotes**. Ces derniers deviennent mobiles et s'allongent (**oocinètes**) puis envahissent la paroi du tube digestif où ils se développent en **oocystes** (moins de 24 h après le repas sanguin).

[10] http://www.cdc.gov/malaria/, consulté le 02/04/2015.

Chaque **oocyste** formé se divise et se multiplie afin de libérer, 4 à 15 jours après le repas sanguin, plusieurs milliers de **sporozoïtes** qui iront coloniser les glandes salivaires du moustique (cf fig. 9, page 10). C'est à partir de ce moment-là que le moustique est infectieux pour l'homme. En effet, tout nouveau repas sanguin chez l'hôte humain sera accompagné d'une libération de sécrétions salivaires contenant les **sporozoïtes**.

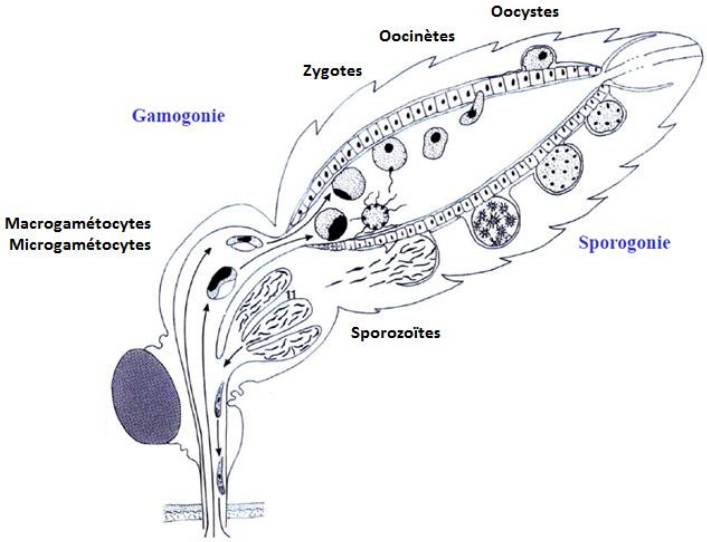


Figure 6 : phase sexuée chez le moustique vecteur

Après une piqûre infectante chez l'Homme, les **sporozoïtes** migrent rapidement, via la circulation sanguine, vers le **foie**. Ils pénètrent dans les hépatocytes, où ils se divisent très activement pour donner naissance à des dizaines de milliers de nouveaux parasites, les **mérozoïtes**. Cette phase d'amplification intra-hépatique dure environ dix jours et est asymptomatique. Elle s'achève par l'éclatement des hépatocytes infectés permettant la libération des parasites dans le sang (fig. 7).

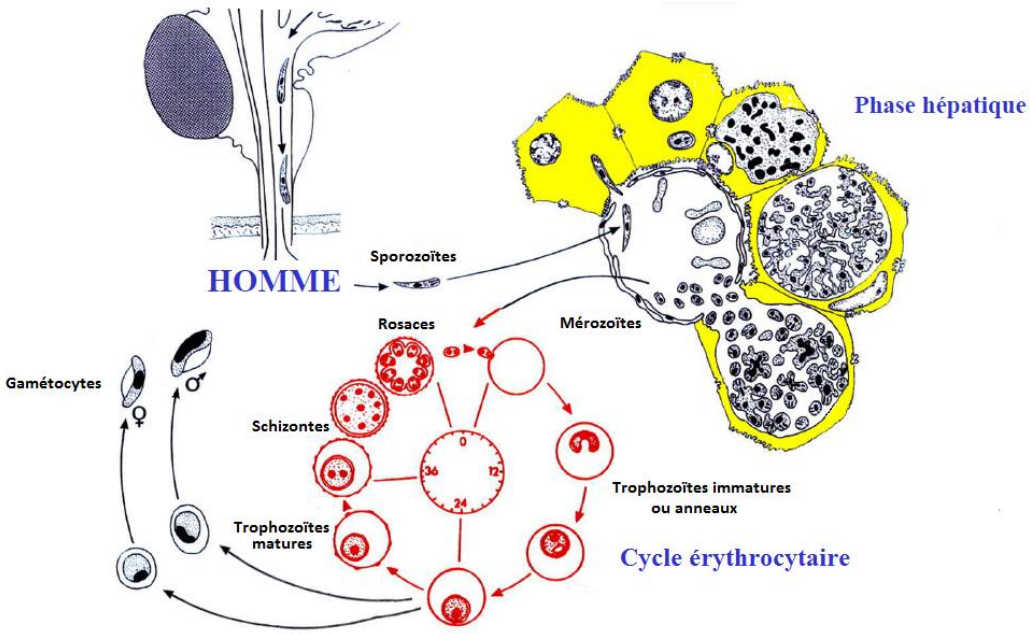


Figure 7 : phase asexuée chez l'Homme

Chez *P. vivax* et *P. ovale*, une partie des sporozoïtes n'évoluent pas en mérozoïtes mais en **hypnozoïtes**. Ces formes peuvent rester dormantes dans le foie pendant des mois, voire des années. Les mécanismes derrière le développement de la dormance et de l'activation sont toujours à l'étude. [11,12,13]

Libérés dans le sang, les **mérozoïtes** envahissent des globules rouges (ou érythrocytes) et le cycle érythrocytaire commence. C'est un processus cyclique de 48 heures pour *P. falciparum*, allant de l'invasion d'un globule rouge à son éclatement, permettant ainsi la libération d'une trentaine de nouveaux mérozoïtes qui pourront coloniser d'autres globules rouges (cf fig. 9, page 10). Au cours du cycle, le parasite passe par différentes phases : **anneaux ou trophozoïtes immatures**, **trophozoïtes matures**, **schizontes** et **rosaces** (fig. 8).[10] La rosace est le stade de maturation ultime qui correspond à un schizonte sur le point d'éclater pour libérer de nouveaux mérozoïtes. L'éclatement des globules rouges, provoquant l'anémie, est à l'origine des nombreux symptômes cliniques du paludisme. Les formes asexuées du cycle érythrocytaire sont donc responsables de la morbidité et de la mortalité.

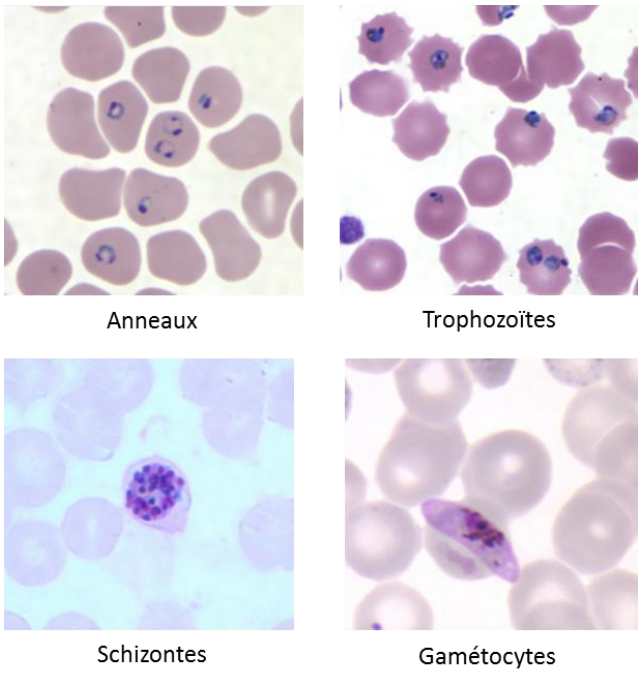


Figure 8 : différents stades sanguins de *P. falciparum* (clichés microscope de frottis sanguins)

Pour alimenter le cycle hôte-vecteur, certains anneaux vont se différencier en **gamétocytes** mâles et femelles. Ces formes non pathogènes pour l'Homme circuleront dans le sang jusqu'à plusieurs semaines après la fin de l'infection. Ces gamètes pourront être ingérés par un vecteur compétent lors d'un repas sanguin, infectant alors l'anophèle et permettant ainsi la propagation de la maladie.

[11] G. D. Shanks, N. J. White, *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *10*, 900-906.
[12] V. Andrianaranjaka *et al.*, *Malar. J.* **2013**, 12:177.
[13] L. Dembélé *et al.*, *Nature Med.* **2014**, *20*, 307-312.

L'évolution de la charge parasitaire au cours du cycle de vie de *Plasmodium* au sein de ses deux hôtes est représentée figure 9.[14]

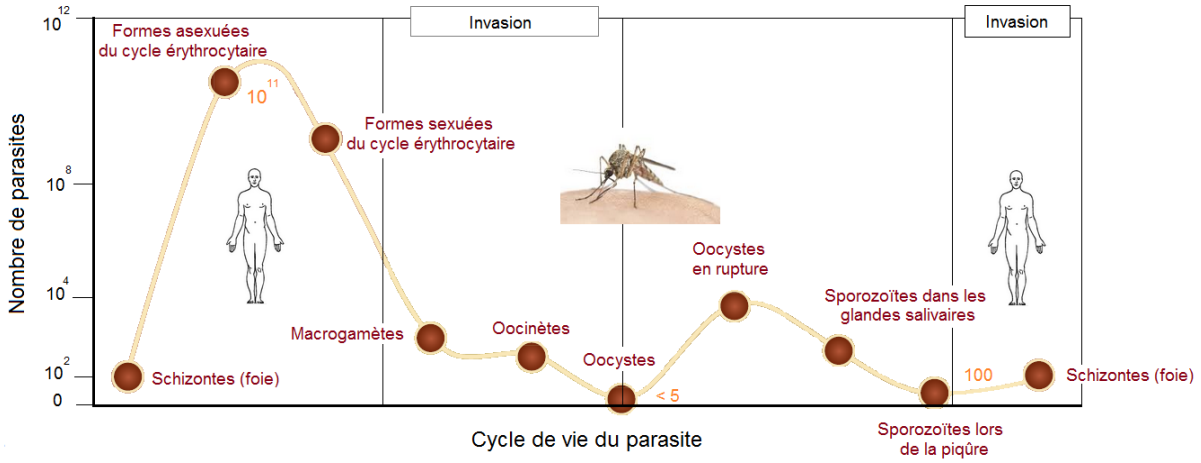


Figure 9 : évolution de la charge parasitaire au cours du cycle biologique

3) Catabolisme de l'hémoglobine

Intéressons-nous plus particulièrement au cycle érythrocytaire. Pour des raisons pratiques et parce qu'il est directement lié aux symptômes, c'est le cycle le plus étudié et la majorité des antipaludéens actuels ciblent des protéines ou des mécanismes impliqués dans ce cycle.

Les mérozoïtes relargués par le foie infecté ou par les érythrocytes infectés (réinvasion) envahissent les globules rouges. A l'intérieur du globule rouge, le parasite croît et se multiplie jusqu'à occuper 16 à 20 fois le volume du mérozoïte initial. Pour cela, il va ingérer et digérer jusqu'à 75% des protéines de l'érythrocyte, majoritairement l'**hémoglobine**.

Pour bien comprendre le cycle érythrocytaire, il faut nous intéresser à la structure de l'hémoglobine, au processus et aux conséquences de sa dégradation. L'hémoglobine est constituée de quatre chaînes de globine identiques deux à deux (chaînes α avec 141 acides aminés et chaînes β avec 146 acides aminés). Chacune de ces chaînes est associée à un groupement prosthétique, l'**hème**, constitué d'un atome de fer au centre d'un dérivé tétrapyrrolique cyclique, la porphyrine (fig. 10).

[14] G. Vogel, *Science* **2010**, *328*, 847-848.

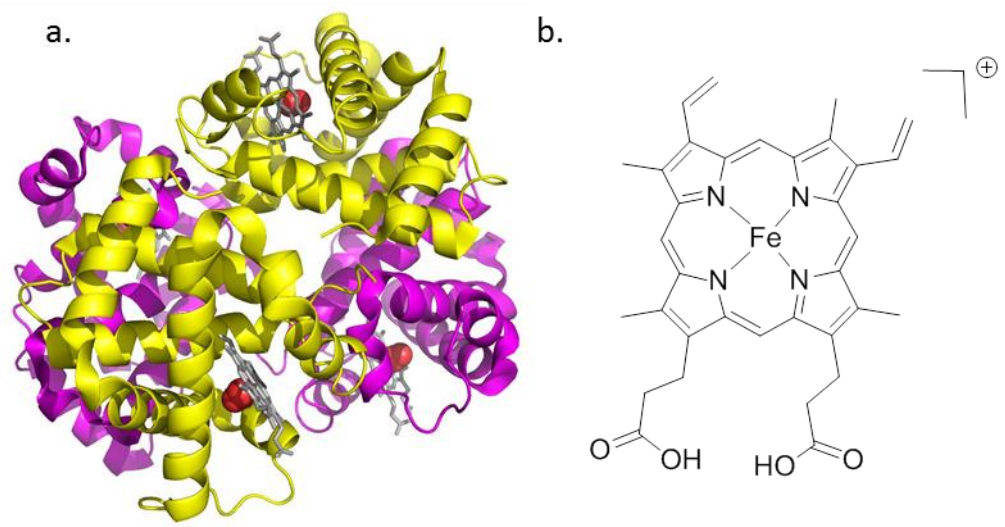


Figure 10 : a. structure RX de l'hémoglobine (molécule de dioxygène *sphère rouge*) (PDB 1BBB) ; b. structure de l'hème

Au stade anneau jeune, le parasite subit une transformation morphologique profonde qui lui permet d'« engloutir » une part importante du cytoplasme du globule rouge. [15,16] C'est la première étape de formation du compartiment de digestion du parasite, appelé **vacuole digestive.** Au stade trophozoïte, l'assimilation de l'hémoglobine se fait également par formation de **cytostomes** au niveau de la surface du parasite (similaire au phénomène d'endocytose) (fig. 11). [17,18] La membrane plasmique et la membrane de la vacuole parasitophore forment des invaginations qui vont bourgeonner et piéger le cytoplasme du globule rouge dans des petites vacuoles. Ces dernières pourront fusionner avec la vacuole digestive et y déverser l'hémoglobine.

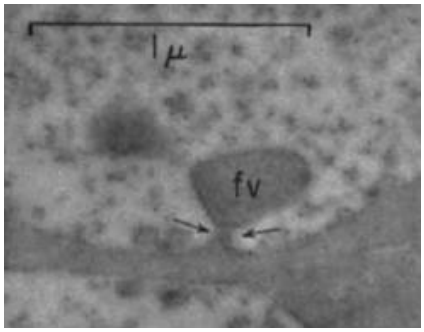


Figure 11 : cytostome chez *P. berghei* ; fv vacuole digestive

La vacuole digestive est une organelle centrale dans le métabolisme du parasite. En effet, il s'agit du site de **digestion des chaînes de globine** et de **détoxification de l'hème**. Elle est caractérisée par un pH acide de 4,5−5,5 et par la présence de diverses enzymes protéolytiques.

Détoxification de l'hème

Lors du catabolisme de l'hémoglobine, l'hème ou ferriprotoporphyrine IX (FePPIX) est libéré avec de l'oxygène dans la vacuole digestive. Le fer est un métal qui peut être sous forme oxydée, ion ferrique Fe^{3+} ou sous forme réduite, ion ferreux Fe^{2+}. Seul l'hème ferreux transporte l'oxygène. Ainsi, lorsque l'hémoglobine est dégradée, l'hème ferreux est libéré et oxydé en hème ferrique. A cause de la quantité importante en oxygène et du pH acide dans la vacuole digestive, la production de radicaux oxygénés, via les réactions de Fenton et Haber-Weiss, est idéale (cf annexes, page 223). Afin d'éliminer les espèces ferriprotoporphyrine IX réactives en solution, le parasite dimérise l'hème (via des liaisons covalentes fer-oxygène du carboxylate) en

[15] D. A. Elliott *et al.*, *PNAS* **2008**, *105*, 2463-2468.
[16] N. Abu Bakar e*t al.*, *J. Cell Sci.* **2009**, *123*, 441-450.
[17] M. D. Lazarus *et al.*, *J. Cell Sci.* **2008***, 121,* 1937-1949.
[18] M. A. Rudzinska et al., *J. Protozool.* **1965**, *12*, 563-576.

une forme cristalline insoluble, l'**hémozoïne** (fig. 12a). [19] Celle-ci est aussi appelée **pigment paludéen** car sa couleur brune-noire caractérise le sang des patients infecté par *Plasmodium* (fig. 12b). La présence de ce pigment dans la vacuole digestive marque la transition entre les stades anneau et trophozoïte. Le pigment persiste jusqu'à la rupture des schizontes, qui relarguent les mérozoïtes fils, l'hémozoïne accumulée et d'autres produits de dégradation.

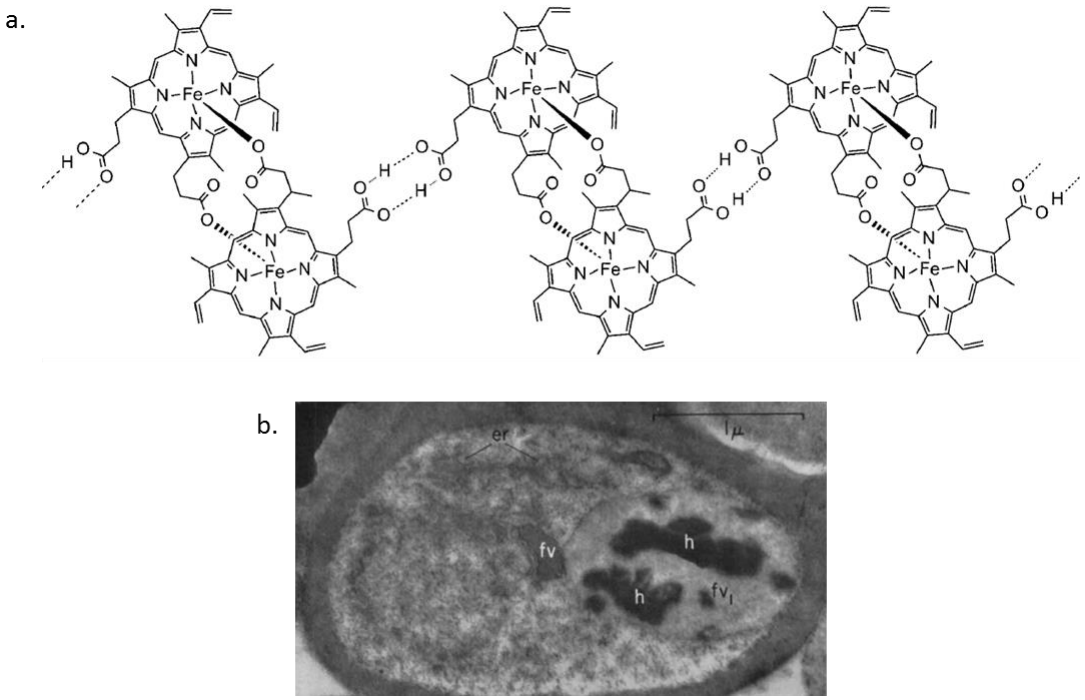


Figure 12 : a. structure du polymère hémozoïne. La structure est stabilisée par des liaisons hydrogène; b. trophozoïte mature de *P. falciparum* avec présence d'hémozoïne dans la vacuole digestive (fv vacuole digestive, h hémozoïne, er réticulum endoplasmique)[18]

Digestion des chaînes de globine

Les acides aminés nécessaires au parasite sont obtenus de trois manières : (1) par biosynthèse, (2) par ingestion de l'hémoglobine et digestion en acides aminés libres, (3) par import depuis le milieu extracellulaire (plasma) et/ou depuis la cellule hôte.

Les parasites et les érythrocytes infectés sont capables de fixer le dioxyde de carbone et donc de synthétiser des acides aminés. Cependant, l'obtention d'acides aminés par cette voie est plutôt restreinte et limitée aux acides aspartique (Asp) et glutamique (Glu), ainsi qu'à l'alanine (Ala). [20]

La digestion des chaînes de globine par diverses enzymes protéolytiques (décrites dans la partie II) permet quant à elle de fournir de grandes quantités d'acides aminés libres, utilisées par le parasite pour :

- la biosynthèse de ses propres protéines et son métabolisme général

[19] D. J. Jr. Sullivan, *Biopolymers* **2003**, *9*, 129-163.
[20] I. W. Sherman, *Bull. World Health Organ.* **1977,** *55*, 265-276.

- l'import d'isoleucine (Ile)

L'isoleucine est un acide aminé essentiel à la croissance du parasite. En effet, le retrait d'isoleucine d'un milieu de culture de *P. falciparum* conduit à un arrêt de la croissance du parasite. [21] Cependant, l'isoleucine est le seul acide aminé absent de l'hémoglobine humaine adulte et doit donc être importé depuis le milieu extracellulaire. Le transport d'isoleucine à travers la membrane des érythrocytes infectés est augmenté de cinq fois par rapport aux érythrocytes non infectés. [22] Le parasite modifie les propriétés de la membrane de la cellule hôte, induisant de nouvelles voies de perméabilité (**New Permeability Pathways**, NPPs). [23] L'isoleucine est ensuite rapidement transportée à l'intérieur du parasite via un transporteur membranaire en échange de la leucine (Leu) intracellulaire, issue de la dégradation de l'hémoglobine dont il est l'acide aminé le plus abondant (avec l'alanine).

- la modulation de l'environnement osmotique de la cellule hôte afin d'empêcher son hémolyse prématurée.

Pendant les 48 heures du cycle érythrocytaire, le parasite augmente l'activité métabolique de l'érythrocyte, et perméabilise la membrane plasmique de la cellule hôte pour le passage d'une variété d'ions, de nutriments et de déchets. Il dissipe également les gradients Na/K à travers la membrane de la cellule hôte, ingère et digère près de 75% de l'hémoglobine de l'hôte. Toutes ces modifications spectaculaires n'entraînent pourtant pas de lyse prématurée de l'érythrocyte (pas avant 48 heures) et ce grâce à la dégradation excessive de l'hémoglobine. En effet, il est largement reconnu que l'hémoglobine est dégradée en large excès par rapport aux besoins du parasite pour la synthèse de ses protéines. [24,25,26]

4) Pathogenèse

Pour les paludismes à *P. falciparum,* la surface des érythrocytes infectés se déforme et des protubérances apparaissent 12 à 15 heures après l'invasion. Ces protubérances expriment des protéines d'adhésion, comme *Pf*EMP1 (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1), qui permettent la **cytoadhésion**, à savoir l'interaction avec des récepteurs présents à la surface endothéliale des veines et capillaires. [27] Les érythrocytes infectés adhèrent à la paroi des vaisseaux sanguins, parfois entre eux ou à des érythrocytes non-infectés. La cytoadhésion favorise la **séquestration** des globules rouges infectés par les parasites matures dans les organes vitaux (le foie, la rate et en particulier le cerveau). [28,29] Les globules rouges séquestrés interagissent avec la microcirculation sanguine, le métabolisme et le fonctionnement de l'endothélium vasculaire dans les organes vitaux et sont clairement corrélés à la sévérité du paludisme à *P. falciparum* (coma, mort). Ils ne circulent pas et évitent alors la **rétention et la filtration par la rate**. Seuls les stades jeunes (anneaux) sont dans la circulation périphérique, ce qui implique une sous-estimation de la parasitémie lors des prélèvements.

---

[21] A. A. Divo *et al.*, *J. Protozool.* **1985**, *32*, 59-64.
[22] R. E. Martin, K. Kirk, *Blood* **2007**, *109*, 2217-2224.
[23] K. Kirk*, Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 495-537.
[24] M. Krugliak *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *119*, 249-256.
[25] V. L. Lew *et al.*, *Blood Cells Mol. Dis.* **2004**, *32*, 353-359.
[26] V. L. Lew *et al.*, *Blood* **2003**, *101*, 4189-4194.
[27] X. Su *et al.*, *Cell* **1995**, *82*, 89-100.
[28] K. Silamut *et al.*, *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 395-410.
[29] S. Looareesuwan *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **1987**, *317*, 675-679.

La rupture des globules rouges lors du relargage des mérozoïtes n'est pas l'unique cause de la perte de globules rouges chez les personnes impaludées. La destruction de globules rouges non infectés et de globules rouges infectés par des parasites au stade anneau y contribue également. [30] Ces deux types de globules rouges subissent des modifications en surface (« décoration » par des molécules de *P. falciparum* relarguées lors de l'invasion d'autres érythrocytes ou déformation de la membrane induite par le parasite) qui vont les rendre susceptibles à la rétention par la rate, à la phagocytose et à la dégradation via le complément. Cela exacerbe l'anémie mais réduit les risques de sévères complications liées à une forte charge parasitaire (comme le paludisme cérébral).

L'hémozoïne et d'autres déchets parasitaires sont continuellement libérés par la rupture des schizontes dans la circulation sanguine, ce qui active le système immunitaire de l'hôte (capture par les cellules présentatrices d'antigènes) et provoque des **réponses pro- et anti-inflammatoires**, causant fièvre et autres effets pathologiques. [31,32]

II- Moyens de lutte actuels

1) Lutte anti-vectorielle

La lutte contre les anophèles vecteurs est un élément central de toutes les stratégies de lutte. Elle repose principalement sur deux interventions : les **moustiquaires à imprégnation durable** et les **pulvérisations intradomiciliaires à effet rémanent** (fig. 13). Dans le cadre des efforts pour atteindre la couverture universelle de toutes les populations exposées au risque, la lutte antivectorielle s'est sensiblement accrue au cours des dix dernières années ; en 2013, 49% de la population à risque avait accès à une moustiquaire imprégnée dans leur foyer, contre 3% en 2004. Les enfants et les femmes enceintes doivent en priorité dormir sous ces moustiquaires. Cependant il est estimé qu'encore 278 millions des 840 millions de personnes à risque vivant en Afrique sub-saharienne ne possèdent pas de moustiquaire dans leur foyer. [1]

Figure 13 : principaux moyens de lutte antivectorielle

Différentes classes d'insecticides sont actuellement utilisés : les **pyréthrinoïdes**, les organochlorés (le dichlorodiphényltrichloroéthane, DDT, est le plus commun), les organophosphorés et les carbamates (fig. 14). Les moustiquaires actuellement recommandées par l'OMS sont traitées avec un insecticide de la famille des pyréthrinoïdes, qui présentent une faible toxicité pour les mammifères et une longue activité résiduelle.

[30] P. A. Buffet *et al.*, *Blood* **2011**, *117*, 381-392.
[31] M. Jaramillo *et al.*, *J. Immunol.* **2004**, *172,* 3101-3110.
[32] E. Ayimba *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* **2011**, *166*, 218-226.

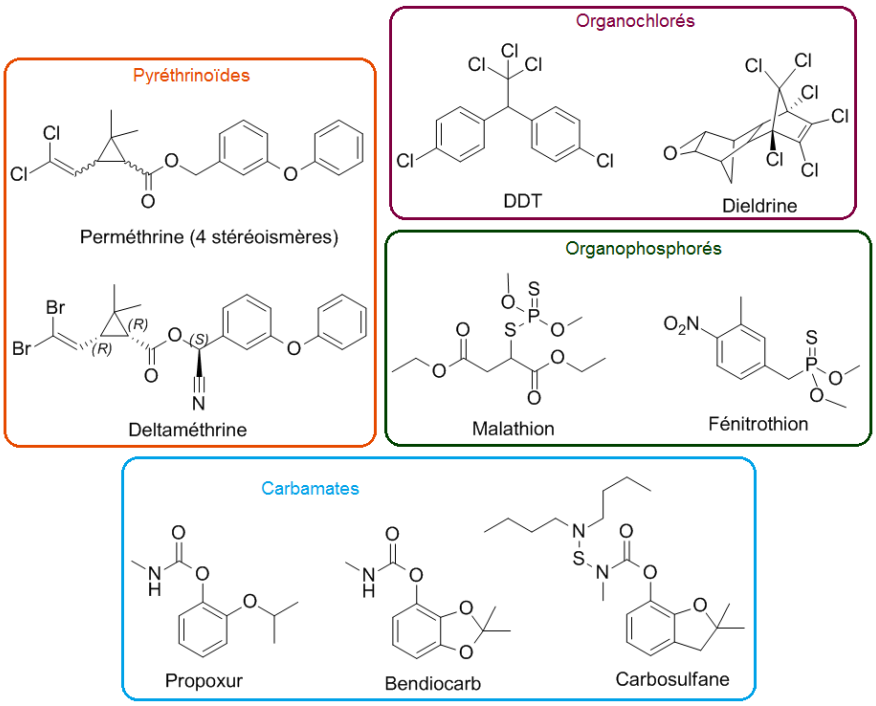


Figure 141 : structure de quelques insecticides

La pulvérisation intradomiciliaire consiste à appliquer une petite quantité d'insecticide sur les murs intérieurs et les plafonds des foyers afin que le moustique entre en contact avec cet insecticide lorsqu'il se pose. L'anophèle meurt dans la journée qui suit et ne peut pas propager la maladie. Cette technique atteint pleinement son potentiel lorsque 80% au moins des lieux fréquentés par les vecteurs du paludisme sont pulvérisés. La pulvérisation intradomiciliaire a contribué à éliminer le paludisme de vastes zones en Asie, en Russie, en Europe et en Amérique latine, et des programmes ont été réalisés avec succès dans certaines parties de l'Afrique. En 2013, 123 millions de personnes, soit 3,5% de la population à risque était protégée par cette méthode.

L'efficacité de ces méthodes est menacée par le développement de **résistance** des anophèles vecteurs aux insecticides utilisés pour traiter les moustiquaires et l'intérieur des foyers. La résistance aux insecticides concerne toutes les principales espèces de vecteurs et toutes les classes d'insecticides, notamment les pyréthrinoïdes. En 2013, 49 des 63 pays engagés dans un programme de contrôle des résistances, ont enregistré une résistance à au moins un insecticide chez un vecteur et 42 pays une résistance à la classe des pyréthrinoïdes (fig. 15). En 2012, l'OMS a lancé le plan mondial pour la gestion de la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme dont l'objectif à long terme est de maintenir l'efficacité de la lutte antivectorielle. [33]

[33] Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM), World Health Organization, **2012**, 1-132.

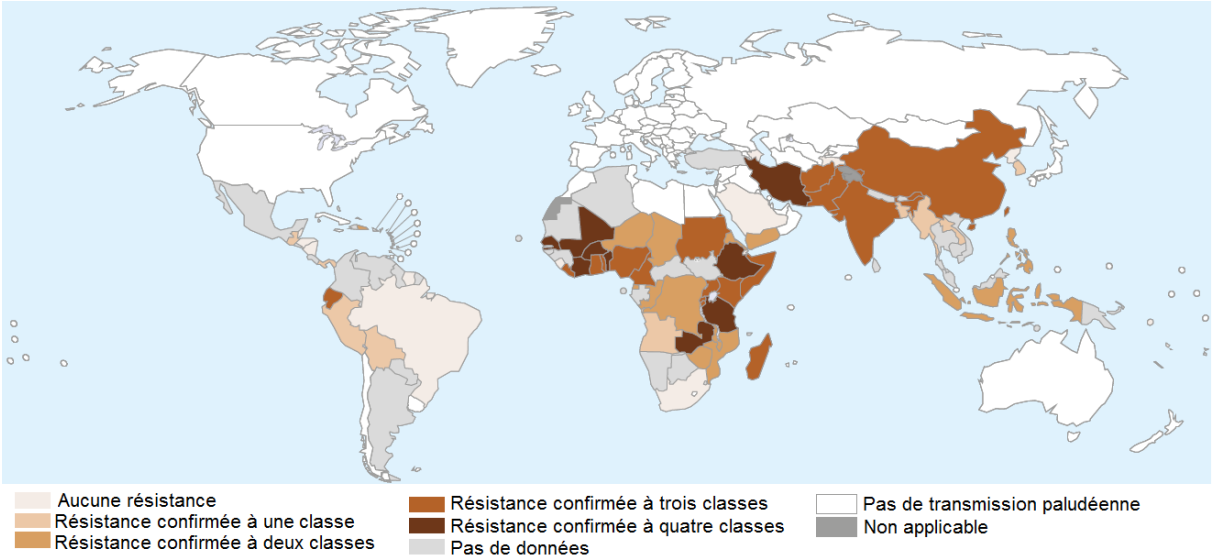


Figure 15 : pays enregistrant des cas de résistance aux insecticides depuis 2010 (résistance confirmée, ie <90% de mortalité)

2) Recherche d'un vaccin

Aujourd'hui, aucun vaccin n'est disponible pour lutter contre le paludisme. Le défi auquel doivent faire face les chercheurs est la compréhension des réponses immunitaires spécifiques, associées à la protection contre la maladie. Le parasite est très complexe et chaque stade est porteur d'antigènes différents qui induisent des réponses immunitaires variées. Les premiers efforts de développement d'un vaccin se sont portés sur la phase pré-érythrocytaire (foie). Aujourd'hui, trois types de vaccins sont à l'étude : des **vaccins pré-érythrocytaires**, des **vaccins érythrocytaires** et des **vaccins bloquant la transmission** (fig. 16). [14,34,35,36,37]

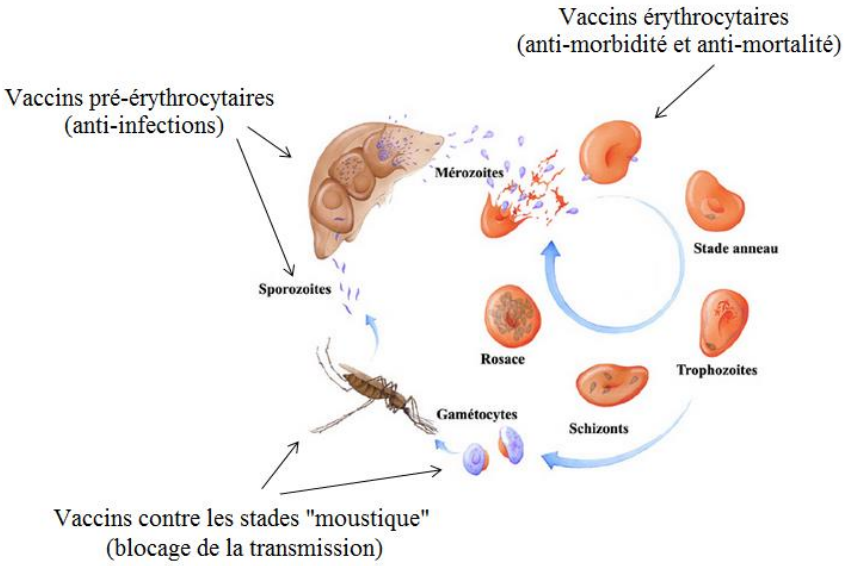


Figure 16 : différents types de vaccins

[34] D. I. Stanisic *et al.*, *Trends Parasitol.* **2013**, *29*, 612-622.
[35] http://www.malariavaccine.org/, consulté le 14/04/2015.
[36] http://www.who.int/vaccine_research/links/Rainbow/en/index.html, consulté le 14/04/2015.
[37] D. G. Heppner, *Trav. Med. Infect. Dis.* **2013**, *11*, 2-7.

- Vaccins pré-érythrocytaires

Ces vaccins ont pour but de protéger contre la première étape de l'infection paludéenne, étape à laquelle le sporozoïte pénètre les hépatocytes et se développe. Ces vaccins vont provoquer une réponse immunitaire qui empêchera soit l'infection, soit la maturation et la multiplication du parasite si l'infection des hépatocytes a débuté. [38]

Parmi ces vaccins candidats, on retrouve (1) des protéines ou antigènes recombinants de la surface du parasite ou des hépatocytes infectés, (2) des vaccins à ADN qui contiennent l'information génétique permettant la production des antigènes correspondant chez la personne vaccinée, (3) une forme atténuée du sporozoïte comme principal composé du vaccin.

Le candidat vaccin pré-érythrocytaire **RTS,S/AS01**, actuellement en phase clinique III, est le plus avancé de tous les vaccins candidats. [39,40,41] En juillet 2015, il a reçu un avis scientifique favorable du Comité des produits de santé à usage humain de l'Agence Européenne des Médicaments (EMA). Ce candidat vaccin est basé sur une protéine membranaire largement présente à la surface des sporozoïtes de *P. falciparum* qui infectent le foie, la protéine circumsporozoïte (CSP). Les essais cliniques ont été réalisés sur des enfants âgés de 6 à 12 semaines et de 5 à 17 mois, répartis sur onze sites africains avec des intensités de transmission différentes. Après 18 mois de suivi et 3 doses de vaccin, l'efficacité du vaccin a été évaluée à 27% chez les enfants âgés de 6 à 12 semaines et sur 1000 enfants vaccinés, 444 cas de paludisme clinique ont été évités. Chez les enfants âgés de 5 à 17 mois, l'efficacité du vaccin a été évaluée à 46% et 941 cas de paludisme clinique ont été évités chez 1000 enfants vaccinés. Les effets indésirables observés pendant cette étude sont comparables chez les enfants ayant reçu le vaccin candidat RTS,S et chez ceux ayant reçu le vaccin contrôle, sauf quelques cas de méningite, qui pourraient ne pas être dus au vaccin mais dont l'occurrence est à surveiller lors des essais cliniques.

- Vaccins érythrocytaires

Ce type de vaccins cible le parasite à son stade le plus destructeur, à savoir sa grande amplification dans les globules rouges. Ces vaccins ne bloquent pas l'infection, mais doivent diminuer la quantité de parasites dans le sang et donc réduire la sévérité de la maladie. Il est prouvé que les personnes qui ont survécu à une exposition régulière au paludisme développent une immunité naturelle avec le temps. Le but d'un vaccin contenant des antigènes ou protéines présents à la surface du mérozoïte serait de permettre au corps de développer une immunité naturelle avec beaucoup moins de risque de tomber malade.

Plusieurs candidats vaccins érythrocytaires ciblant des protéines à la surface des mérozoïtes sont prometteurs : MSP3 en phase clinique IIb (Merozoite Surface Protein 3) et AMA1 en phase clinique IIa (Apical Membrane Antigen 1). [42,43,44]

---

[38] P. E. Duffy *et al.*, *Expert Rev. Vacc.* **2012**, *11*, 1261-1280.
[39] The RTS,S Clinical Trials Partnership, *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 2284-2295.
[40] The RTS,S Clinical Trials Partnership, *PLoS Med.* **2014**, 11(7): e1001685.
[41] https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=RTS%2CS%2FAS01+&Search=Search, consulté le 14/04/2015.
[42] S. B. Sirima *et al.*, *PLoS* ONE **2009**, 4(10):e7549.
[43] C. Roussilhon *et al.*, *PLoS Med.* **2007**, 4(11): e320.
[44] M. A. Thera *et al.*, *PLoS* ONE **2010**, 5(2): e9041.

- Vaccins bloquant la transmission

Ces vaccins cherchent à interrompre le cycle de vie du parasite en déclenchant la production d'anticorps qui vont empêcher le parasite de mûrir dans le moustique après la prise d'un repas sanguin chez la personne vaccinée. [14,45] Ils visent les stades sexués chez l'Homme (gamétocytes) et chez le moustique (gamètes, zygotes, oocinètes) (fig. 17). Ce type de vaccins n'empêchera pas une personne d'être infectée par le parasite et il n'atténuera pas non plus les symptômes de la maladie. Néanmoins il limitera la propagation de l'infection en empêchant les moustiques qui se nourrissent sur une personne infectée de transmettre le parasite à de nouveaux hôtes. Il n'aura donc pas un effet immédiat sur la personne vaccinée mais un effet à plus long terme sur la communauté. Ce type de vaccins est d'une grande importance pour réduire la mortalité et atteindre le but ultime d'**éradication** du paludisme.

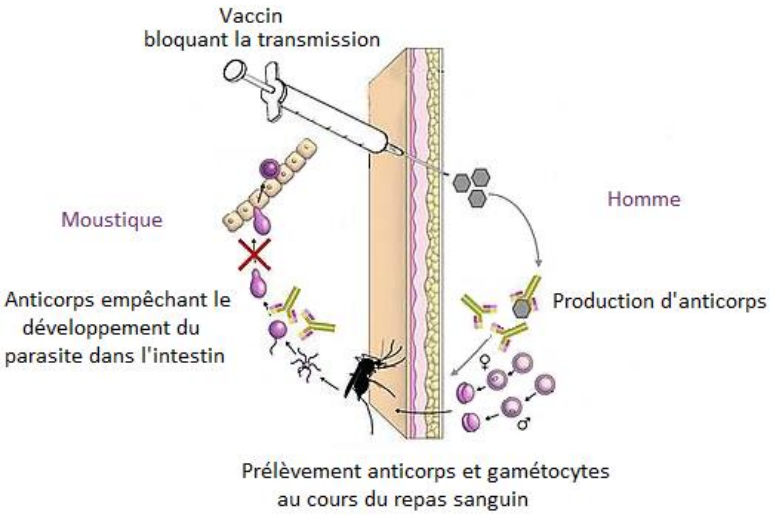


Figure 17 : principe des vaccins bloquant la transmission

Les cibles des vaccins candidats bloquant la transmission sont des protéines exprimées à la surface des gamétocytes, gamètes, zygotes et oocinètes. *Pfs*25, *Pfs*28, *Pfs*48/45 et *Pfs*230 sont des cibles particulièrement intéressantes car elles induisent des anticorps avec une importante activité de blocage de la transmission lorsqu'ils sont ingérés par le moustique avec les gamètes de *P. falciparum*. [46] Deux vaccins candidats sont en phase clinique Ia (*Pfs*25-EPA (*P. falciparum* surface protein of 25 kDa conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* exoprotein A) et *Pfs*25-VLP (*P. falciparum* surface protein of 25 kDa fused to virus-like particles). [36]

Au lieu de cibler une protéine du parasite, le vaccin candidat AnAPN1 (*Anopheles* Aminopeptidase neutre) cible une protéine du moustique qui est le point d'ancrage du parasite lorsqu'il envahit l'intestin du moustique. [47] Les anticorps se lient à la protéine AnAPN1 de l'intestin, bloquant l'interaction avec le parasite dont le développement sera empêché. Un des avantages de cibler une protéine du moustique est de produire des anticorps qui seront efficaces contre plusieurs espèces du parasite *Plasmodium*.

[45] J. K. Nunes *et al.*, *Vaccine* **2014**, *32*, 5531-5539.
[46] G. Pradel, *Parasitology* **2007**, *134*, 1911-1929.
[47] J. S. Armistead *et al.*, *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 818-829.

Il peut être envisagé de combiner dans un même vaccin des antigènes bloquant la transmission et d'autres ciblant un autre stade (comme RTS,S) afin d'avoir une protection contre les symptômes de la maladie et de limiter la propagation. Leurs effets pourraient même être synergiques.

3) Arsenal thérapeutique actuel

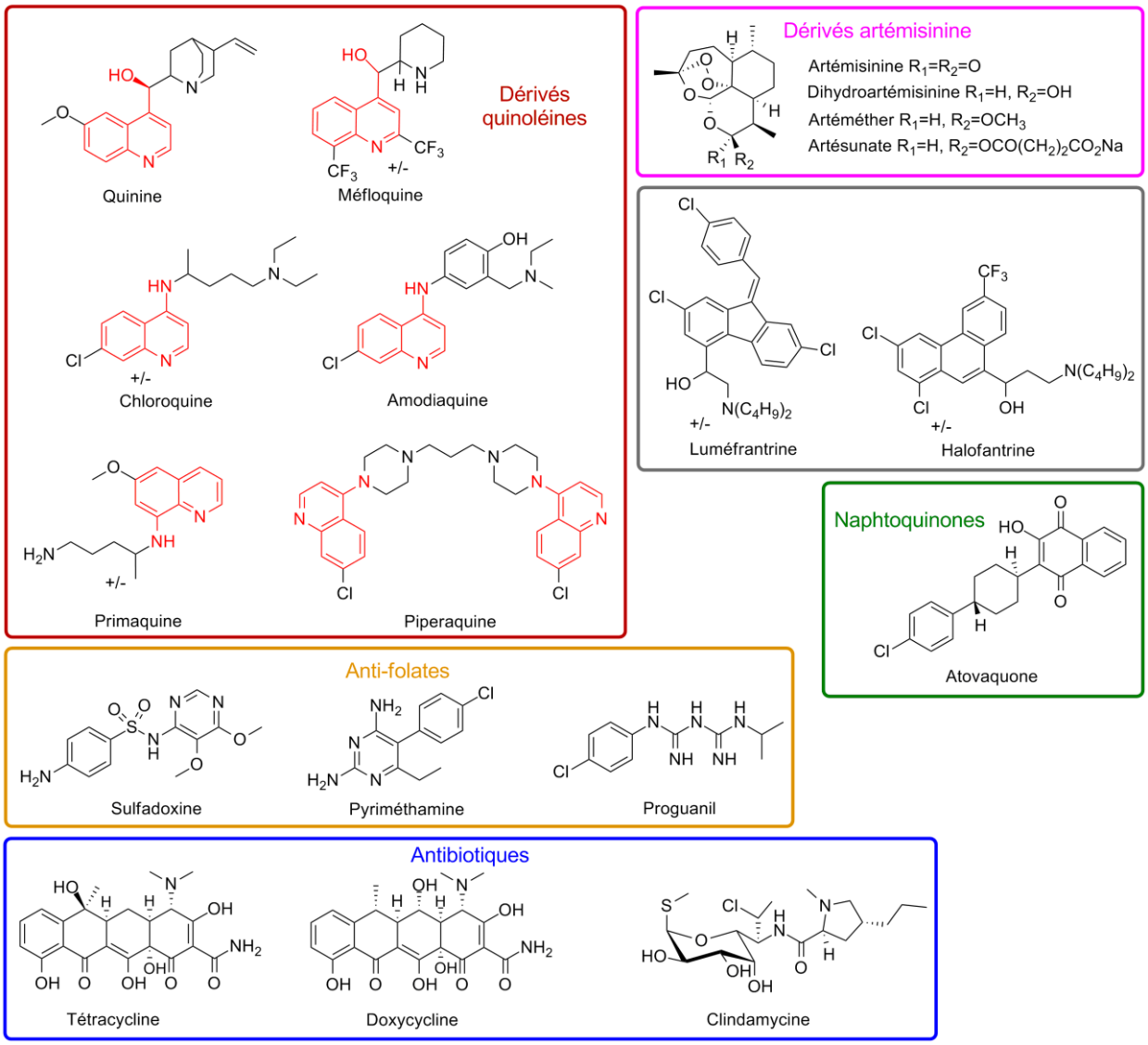


Figure 18 : principales molécules antipaludéennes

L'arsenal thérapeutique de lutte contre le paludisme est composé de quatre classes principales de molécules : les dérivés **quinoléines** (aminoquinolines : chloroquine, amodiaquine, primaquine et 4-méthanolquinoléines : quinine, méfloquine), les **anti-folates** (sulfadoxine, pyriméthamine, proguanil), les **naphtoquinones** (atovaquone) et plus récemment les dérivés d'**artémisinine** (artémisinine, dihydroartémisinine, artéméther, artésunate) (fig. 18). Certains **antibiotiques** ont également des propriétés antipaludéennes (tétracycline, doxycycline, clindamycine).

Les dérivés quinoléines

La **quinine** est une substance naturelle extraite de l'écorce d'un arbre originaire d'Amérique du Sud, le quinquina (fig. 19), déjà utilisé au XVIe siècle par les Quechuas pour traiter les fièvres engendrées par le paludisme. Importée en Europe par les Jésuites au XVIIe siècle, la quinine a été l'antipaludéen de choix jusque dans les années 1940 où des produits de synthèse avec le même noyau quinoléine ont commencé à remplacer la quinine d'extraction, plus chère.

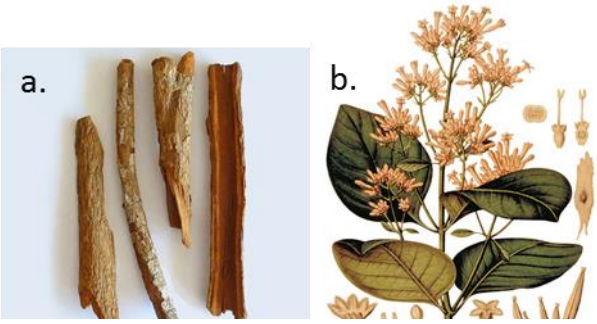


Figure 19 : a. écorce de quinquina rouge ; b. gravure du quinquina rouge

La **chloroquine** est le premier antipaludéen de synthèse à avoir été produit à grande échelle pour le traitement et la prévention du paludisme. Elle a été largement utilisée jusqu'à l'apparition de souches résistantes chez *P. falciparum* dans les années 60, qui se sont finalement étendues à l'ensemble des zones endémiques. L'**amodiaquine** a été utilisée comme alternative à la chloroquine car elle est active sur les souches résistantes à la chloroquine. La **méfloquine** sera développée peu de temps après la guerre du Vietnam.

Les dérivés quinoléines comme la quinine, la chloroquine, la méfloquine et l'amodiaquine sont actifs sur les stades sanguins du parasite, ils sont **schizonticides sanguins**. [48,49] Ils sont actifs sur toutes les espèces de *Plasmodium*, sauf la chloroquine qui est inefficace contre certaines souches de *P. falciparum* résistantes. Ces molécules sont principalement utilisées pour le traitement des accès palustres simples à *P. falciparum* et la prophylaxie (tabl. 2). [50]

Le mode d'action des dérivés quinoléines est principalement basé sur la perturbation du processus de détoxification du parasite. La molécule pénètre la vacuole digestive, probablement par diffusion, s'y accumule du fait de sa protonation (pH de la vacuole digestive 4,5–5,5) et forme un complexe avec la ferriprotoporphyrine IX via des interactions π-π, avec transitoirement une forme disponible d'hème libre. Il a été prouvé que la chloroquine et les dérivés 4-aminoquinoléines se lient fortement à la ferriprotoporphyrine IX (K_d = 10^{-8} M). [51] La formation d'hémozoïne est inhibée, conduisant à l'accumulation du complexe quinoléine/hème et de l'hème toxiques, connus pour leurs effets délétères sur le parasite.

La **Primaquine**, une 8-aminoquinoléine, est la seule molécule capable d'éliminer les schizontes intra-hépatiques et les hypnozoïtes de *P. vivax* et *P. ovale* ; elle est **schizonticide tissulaire** et **hypnozoïticide**. [52] Elle est recommandée dans la cure radicale et la prévention de rechutes des paludismes à *P. vivax* et *P. ovale*. Elle a en outre un effet **gamétocytocide** contre toutes les espèces de *Plasmodium*. La Primaquine est cependant trop toxique pour être utilisée en routine comme agent prophylactique.

---

[48] S. Vangapandu *et al.*, *Med. Res. Rev.* **2007**, *27*, 65-107.
[49] A. F. G. Slater, *Pharmacol. Ther.* **1993**, *57*, 203-235.
[50] Guidelines for the treatment of malaria. Second Edition, **2010**, World Health Organization, 1-194.
[51] C. D. Fitch, *Parasitol. Today* **1986**, *2*, 330-331.
[52] D. Fernando *et al.*, *Malar. J.* **2011**, 10:351.

Le mode d'action de la Primaquine est très peu connu. Un premier mécanisme suggère que la primaquine perturbe le transport d'électrons dans la mitochondrie et interrompt la chaîne respiratoire du parasite. Un autre mécanisme d'action serait la production de métabolites hydroxylés très réactifs qui génèreraient des espèces réactives de l'oxygène toxiques pour le parasite. [53,54]

		Traitement accès palustre simple			
	Prophylaxie	*P. falciparum*	*P. vivax* ou *P. ovale*	*P. malariae* ou *P. knowlesi*	Prévention rechute *P. vivax* ou *P. ovale*
Quinine		x			
Chloroquine	x	x *		x	
Méfloquine	x	x			
Amodiaquine associée à l'Artésunate		x			
Primaquine			x		x

Tableau 2 : utilisation des quinoléines pour la prévention et le traitement du paludisme (*sauf contre les souches résistantes à la chloroquine)

Les anti-folates

Les dérivés folates sont d'importants cofacteurs des réactions de transfert d'un carbone dans la biosynthèse des purines, des pyrimidines et des acides aminés. Ils sont ainsi essentiels pour la réplication de l'ADN, la synthèse de protéines et donc la survie de la cellule. Les parasites *Plasmodium* sont capables de synthétiser les dérivés folates *de novo* mais aussi de les récupérer depuis leur environnement (fig. 20). [55,56]

L'enzyme **dihydropteroate synthase** (DHPS) catalyse la combinaison de la ptéridine avec l'acide *para*-amino benzoïque (*p*ABA) pour former le dihydropteroate. Les anti-folates de type I comme les sulfones et sulfonamides (**sulfadoxine**) sont des analogues structuraux du *p*ABA et sont donc capables d'inhiber la dihydropteroate synthase.

L'enzyme **dihydrofolate reductase** (DHFR) catalyse la réduction du dihydrofolate (H_2folate) en tetrahydrofolate (H_4folate). Elle traite à la fois le dihydrofolate provenant de la voie *de novo* et celui provenant de la récupération depuis le milieu extracellulaire. Les anti-folates de type II comme la **Pyrimethamine** et le **Proguanil** inhibent la dihydrofolate reductase.

La Pyriméthamine, le Proguanil et la sulfadoxine sont des schizonticides sanguins et **sporonticides**, *ie* ils agissent sur le développement des oocystes et bloquent la formation des sporozoïtes dans le moustique (tabl. 3). Ces médicaments sont sélectivement toxiques pour *Plasmodium* car ils ont une affinité 1000 fois plus grande pour l'enzyme parasitaire que pour l'enzyme humaine.

[53] K. A. Fletcher *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 2683-2690.
[54] J. Vasquez-Vivar, O. Augusto, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 6848-6854.
[55] I. B. Müller, J. E. Hyde, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2013**, *188*, 63-77.
[56] Malaria Parasite Metabolic Pathways website http://mpmp.huji.ac.il, consulté le 20/04/2015.

	Prophylaxie	Traitement accès palustre simple à *P. falciparum*
Proguanil + chloroquine	x	
Proguanil associée à Atovaquone	x	x
Pyriméthamine associée à Sulfadoxine		x

Tableau 3 : utilisation des antifolates pour la prévention et le traitement du paludisme

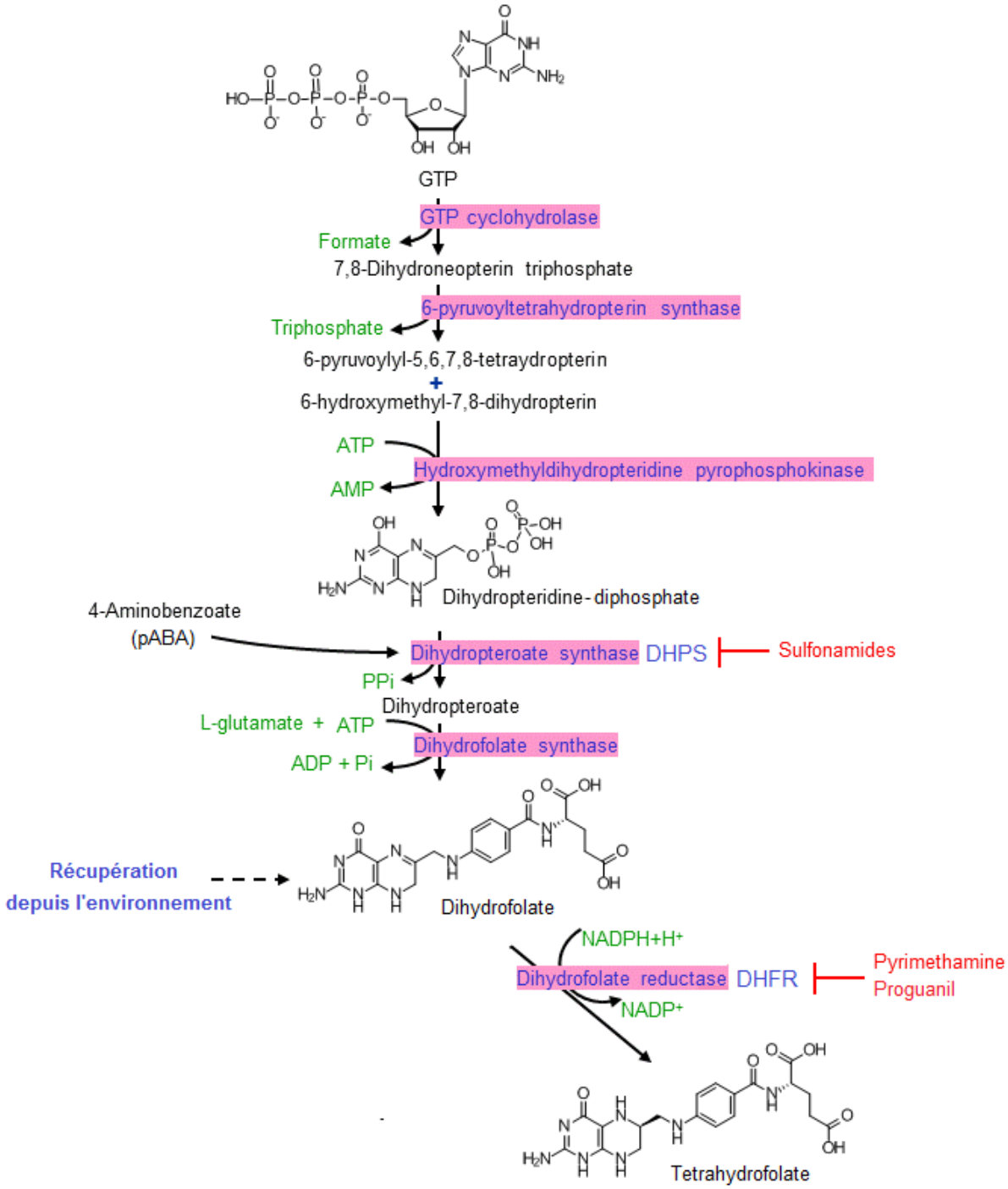


Figure 20 : synthèse des folates chez *P. falciparum* ; ADP : adénosine diphosphate ; AMP ; adénosine monophosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; GTP : guanosine-5'-triphosphate ; NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; Pi : phosphate inorganique ; PPi : pyrophosphate inorganique

Les dérivés naphtoquinones

L'**Atovaquone** (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) est un analogue structural de l'ubiquinone (ou coenzyme Q), acteur essentiel du transport d'électrons dans la chaîne respiratoire. L'Atovaquone inhibe le passage d'électrons de l'ubiquinone au cytochrome *bc1* (complexe III). [57,58] La sélectivité toxique de l'Atovaquone pour la chaîne respiratoire du parasite est basée sur les différences de structure entre le coenzyme Q humain et parasitaire. La conséquence de cette inhibition est l'effondrement du potentiel de membrane de la mitochondrie, qui provoque le blocage de la chaîne respiratoire du parasite ainsi que l'inhibition d'enzymes liées au transport d'électrons dans la mitochondrie, comme des enzymes impliquées dans la biosynthèse de pyrimidine.

L'Atovaquone est schizonticide tissulaire et sanguin. Elle est utilisée en association avec le Proguanil (Malarone©) pour le traitement et la prévention des paludismes à *P. falciparum*.

Les dérivés artémisinine

L'**Artémisinine**, également connue sous le nom « qinghaosu », est une lactone sesquiterpénique extraite de la plante *Artemisia annua* et utilisée en médecine traditionnelle chinoise depuis plus de 2 000 ans pour le traitement des états fébriles (fig. 21).

L'Artémisinine a maintenant largement cédé sa place à la **Dihydroartémisinine**, son principal métabolite actif, plus puissant, et à d'autres dérivés, l'**Artéméther** (dérivé éthéré) et l'**Artésunate** (dérivé estérifié).

Figure 21 : ***Artemisia annua***

L'Artémisinine et ses dérivés sont de puissants schizonticides sanguins à action rapide, actifs contre toutes les espèces de *Plasmodium*. Ils sont dotés d'un spectre d'activité d'une étendue inhabituelle, puisqu'ils tuent tous les stades sanguins, depuis les stades anneaux jusqu'aux schizontes. Les dérivés de l'Artémisinine ont une action gamétocytocide, qui réduit la transmission et limite les risques de voir émerger des résistances.

Le mécanisme d'action de l'Artémisinine et de ses dérivés fait toujours débat mais il est majoritairement reconnu que leur activité antipaludéenne est initiée par la **rupture homolytique du pont endoperoxyde** caractérisant la structure de ces molécules (noyau 1,2,4-trioxane). [59,60] Un mécanisme non-spécifique serait la génération de radicaux oxygénés par activation de l'Artémisinine, qui se réarrangent ensuite en **radicaux carbonés.** Ces derniers vont alors provoquer un stress oxydatif et d'importants dommages au sein du parasite par alkylation de l'hème et des protéines du parasite. [61]

---

[57] M. Fry, M. Pudney, *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1545-1553.
[58] A. L. Baggish, D. R. Hill, *Antimicrob. Agents Ch.* **2002**, *64*, 1163-1173.
[59] J. Li, B. Zhou, *Molecules* **2010**, *15*, 1378-1397.
[60] P. M. O'Neill *et al.*, *Molecules* **2010**, *15*, 1705-1721.
[61] G. H. Posner *et al.*, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1256-1258.

L'Artémisinine est activée par réduction de la liaison O1-O2 par les ions ferreux, donnant un oxygène lié au Fe(III) (O1-Fe(III) ou O2-Fe(III)) et un électron célibataire sur l'autre oxygène ($O2^{\cdot}$ ou $O1^{\cdot}$) (fig. 22). Ensuite, il peut y avoir scission de la liaison C3-C4 ou abstraction 1,5 d'hydrogène, formant respectivement un radical carboné primaire et secondaire.

Il existe plusieurs hypothèses quant à l'agent activateur de l'Artémisinine.[62] Une première hypothèse propose que ce soit le fer de l'hème. En effet, il a été montré que l'Artémisinine forme des adduits avec l'hème et que des membranes d'érythrocytes incubées avec un mélange hème-Artémisinine sont considérablement oxydées, ce qui indique que la réaction entre l'hème et l'Artémisinine génère des oxydants.[63] Par ailleurs, l'activité de l'Artémisinine est presque totalement bloquée par la présence d'inhibiteurs d'hémoglobinase, ce qui prouve que la dégradation de l'hémoglobine a un rôle critique dans l'action de l'Artémisinine.[64] Une étude récente montre que la sensibilité à l'Artémisinine dépend du stade auquel est le parasite. Cette dépendance est majoritairement en corrélation avec le niveau de digestion de l'hémoglobine, avec une activité réduite de l'Artémisinine lorsque le niveau de digestion de l'hémoglobine est faible.[65]

Une seconde hypothèse propose que l'Artémisinine soit activée par les ions ferreux libres du cytosol du parasite. Les études qui soutiennent cette hypothèse montrent que des chélatants sélectifs du fer libre non lié à l'hème ont un effet antagoniste sur l'activité de l'Artémisinine.[66,67]

Très certainement, le fer libre et le fer de l'hème agissent tous les deux dans l'activation de l'Artémisinine.

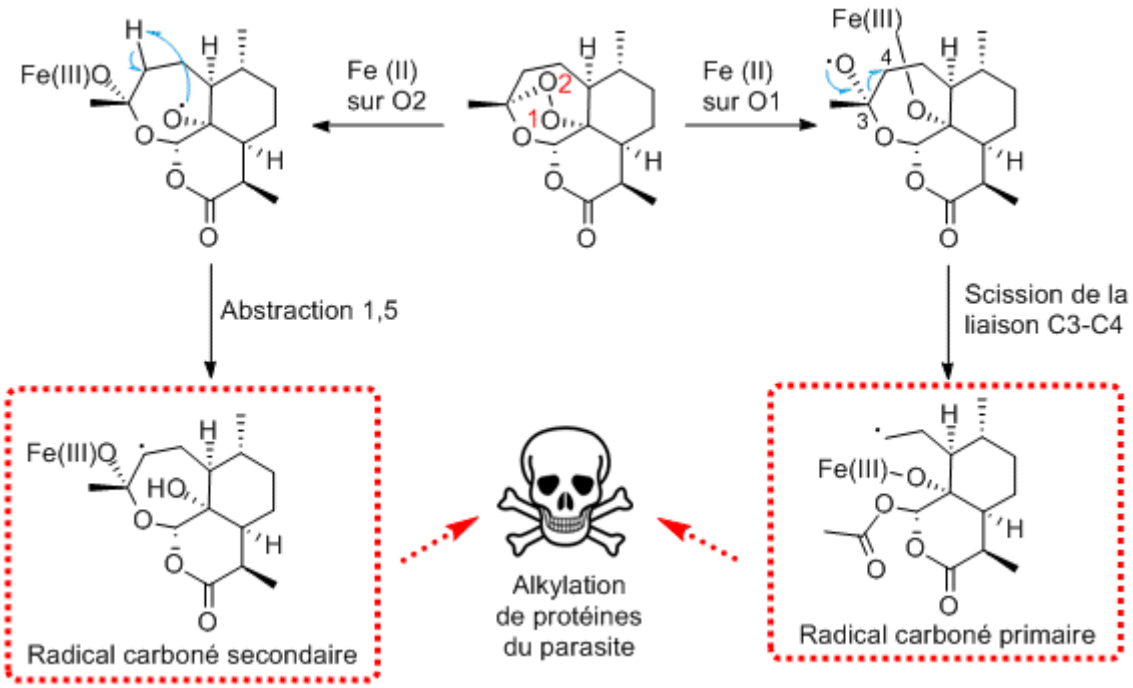


Figure 22 : génération de radicaux carbonés par activation de l'Artémisinine

[62] N. Klonis *et al.*, *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 722-727.
[63] S. R. Meshnick *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1991**, *49*, 181-189.
[64] N. Klonis *et al.*, *PNAS* **2011**, *108*, 11405-11410.
[65] N. Klonis *et al.*, *PNAS* **2013**, *110*, 5157-5162.
[66] S. R. Meshnick *et al.*, *Antimicrob. Agents Ch.* **1993**, *37*, 1108-1114.
[67] P. A. Stocks *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *119*, 6394-6399.

Des mécanismes spécifiques ont été proposés :

- L'Artémisinine et ses dérivés inhiberaient ***Pf*ATP6**, l'unique pompe ATPase/Ca^{2+} située sur le réticulum sarco-endoplasmique du parasite, appelée SERCA. [68] Cette pompe permet de réguler la concentration en ions calcium, importante pour la génération de signaux calcium-dépendants et pour le bon repliement et les correctes modifications post-traductionnelles des protéines. *Pf*ATP6, exprimée dans des oocystes de *Xenopus laevis,* est inhibée par l'Artémisinine avec une puissance similaire à la Thapsigargine, autre lactone sesquiterpénique inhibant très sélectivement les pompes SERCA. L'addition de Thapsigargine et d'Artémisinine dans des cultures de *P. falciparum* ont montré que ces deux molécules entrent en compétition pour la même cible.

- L'Artémisinine et ses dérivés seraient en fait activés par et interféreraient avec les composants de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie parasitaire. [69] L'Artémisinine, activée par le fer contenu dans la mitochondrie, cause la production locale d'espèces réactives de l'oxygène, entraînant la dépolarisation de la membrane mitochondriale et le dysfonctionnement de la mitochondrie.

L'Artémisinine et ses dérivés sont particulièrement efficaces car ils entraînent une clairance parasitaire rapide (temps de demi-vie de clairance parasitaire ≤ 5h) et la prompte disparition des symptômes. De plus, ils sont rapidement éliminés de la circulation sanguine avec un temps de demi-vie d'élimination compris entre 2h et 5h. Pour cela, ils sont utilisés le plus souvent en association avec des schizonticides à action lente (cf problème de chimiorésistances).

Les antibiotiques

Les tétracyclines (**Tétracycline**, **Doxycycline**), découvertes au début des années 1940, sont des antibiotiques à large spectre, actifs sur un certain nombre de bactéries gram positif et négatif, de bactéries intracellulaires, et sur des protozoaires dont *Plasmodium.* La **Clindamycine** est un antibiotique de la famille des lincosamides utilisé à partir des années 60 d'abord pour le traitement d'infections à bactéries anaérobies puis pour des maladies dues à des protozoaires.

La Tétracycline, la Doxycycline et la Clindamycine sont des schizonticides sanguins à action lente sur toutes les espèces de *Plasmodium*, utilisés en thérapeutique en association avec la quinine et en prophylaxie en zone de multi-résistances. [70]

Le mécanisme d'action des antibiotiques sur *Plasmodium* n'est pas clairement identifié. Les tétracyclines sont connues depuis longtemps pour inhiber la synthèse protéique des bactéries. Il est alors suggéré que le mode d'action antipaludique des tétracyclines serait similaire à son mode d'action bactériostatique. Elles se fixeraient à des sous-unités ribosomales et inhiberaient la synthèse de protéines, mais cela n'a été observé chez *Plasmodium* qu'à des concentrations beaucoup plus importantes que celles requises pour bloquer la croissance du parasite, ce qui laisse penser à un mécanisme différent. [71]

---

[68] U. Eckstein-Ludwig *et al.*, *Nature* **2003**, *424*, 957-961.
[69] W. Li *et al.*, *PLoS Gen.* **2005**, 1(3): e36.
[70] K. R. Tan *et al.*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *84*, 517-531.
[71] A. S. Budimulja *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *84*, 137-141.

Une action des antibiotiques sur la mitochondrie plasmodiale est suggérée par une étude mettant en évidence une synergie d'action *in vitro* entre la durée d'exposition du parasite à la tétracycline et l'augmentation de la teneur en oxygène de l'environnement de *Plasmodium*. [72] Les tétracyclines inhiberaient aussi directement la synthèse protéique mitochondriale. [73]

Plus récemment, une autre étude indique une action spécifique sur l'apicoplaste du parasite. Les tétracyclines bloquent la réplication du génome de l'apicoplaste, le rendant non fonctionnel, ce qui empêche le développement de parasites viables. [74]

La figure 23 permet de résumer les stades parasitaires ciblés par les antipaludéens actuels. Il est important de noter que la majorité de l'arsenal thérapeutique cible des protéines ou des processus physiologiques du globule rouge parasité (fig. 23).

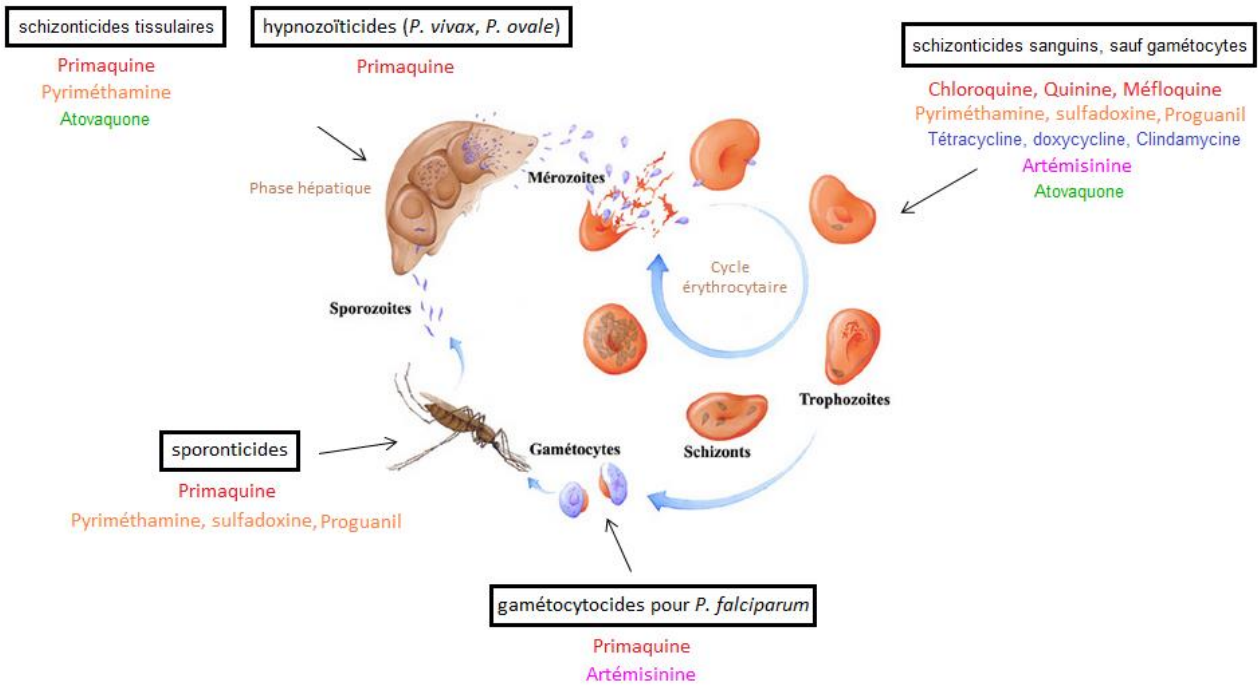


Figure 23 : stades du parasite ciblés par les antipaludéens actuels

4) Problèmes de chimiorésistance

Emergence, transmission et propagation de résistances

Avec les antipyrétiques, les antipaludéens sont les médicaments les plus consommés dans les régions tropicales du globe. Plus particulièrement la Chloroquine et la combinaison Sulfadoxine-Pyriméthamine ont été massivement utilisées puisqu'elles sont bon marché, disponibles à grande échelle et bien tolérées. Leur

[72] A. A. Divo *et al.*, *Antimicrob. Agents Ch.* **1985**, *27*, 21-27.
[73] R. Kiatfuengfoo *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, *34*, 109-116.
[74] E. L. Dahl *et al.*, *Antimicrob. Agents Ch.* **2006**, *50*, 3124-3131.

utilisation très répandue et parfois inadaptée a entraîné l'émergence de parasites résistants, principalement chez *P. falciparum*, et a contribué à la résurgence du paludisme dans les quatre dernières décennies. [75,76,77,78]

La résistance à un médicament se définit par un décalage vers la droite de la courbe concentration-effet (fig. 24). Il existe différents schémas de résistance avec décalage parallèle de la courbe (B), ou une modification de l'effet maximum atteignable (C), et une modification de la pente (D).

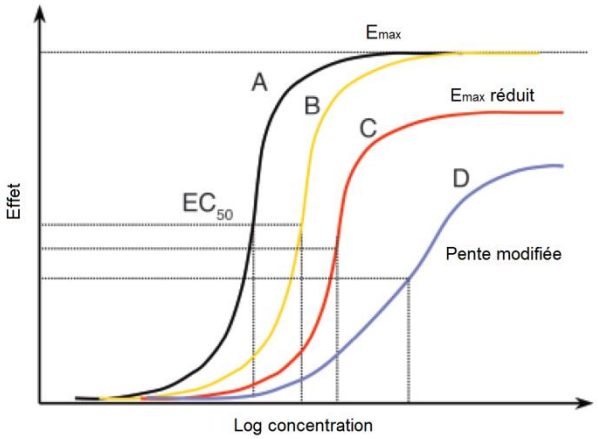


Figure 24 : courbe concentration-effet pour différentes populations de parasite (A parasites sensibles au médicament ; B, C, D parasites résistants)

L'émergence de résistance peut être considérée en deux temps : d'abord l'évènement génétique qui produit le parasite mutant résistant, et ensuite le processus de sélection dans lequel l'avantage de survie en présence du médicament conduit à la transmission et à la propagation de la résistance.

Les évènements génétiques qui confèrent la résistance à un médicament (tout en maintenant la viabilité du parasite) sont spontanés et rares. Ils sont indépendants du médicament. Ce sont des mutations et/ou une modification du nombre de copies des gènes qui codent pour la protéine cible du médicament ou pour les pompes d'efflux qui affectent la concentration intra-parasitaire en médicament. Un seul évènement génétique peut être suffisant pour conférer la résistance, ou plusieurs évènements indépendants peuvent être nécessaires. En supposant une distribution égale des probabilités au cours du cycle de vie du parasite, l'évènement génétique a probablement lieu dans un seul parasite au moment du pic de l'infection. Ces évènements génétiques peuvent résulter en un changement modéré de la sensibilité du parasite au médicament, tel que celui-ci soit toujours efficace. Ils peuvent aussi résulter, bien que moins souvent, en une grande réduction de la sensibilité du parasite au médicament, telle que toute concentration physiologique atteignable soit complètement inefficace.

La probabilité de sélection du parasite résistant dépend de plusieurs facteurs :

- du nombre de parasites exposés au médicament
- de la concentration en médicament à laquelle les parasites sont exposés
- des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du médicament
- du degré de résistance qui résulte des modifications génétiques
- du niveau de défense de l'hôte (immunité spécifique ou non-spécifique)
- de la présence simultanée d'un autre médicament antipaludéen auquel le parasite n'est pas résistant.

[75] A. L. Pickard *et al.*, *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2*, 209-218.
[76] N. J. White, *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1084-1092.
[77] J. E. Hyde, *FEBS J.* **2007**, *274*, 4688-4698.
[78] N. J. White, W. Pongtavornpinyo, *Proc. R. Soc. Lond. B* **2003**, *270*, 545-554.

Dans les zones de transmission intense, une personne peut se faire piquer par un moustique infecté jusqu'à trois fois par jour. Dans ce contexte, une personne prenant un traitement contre des symptômes palustres expose les parasites causant cette infection, mais aussi les parasites provenant de nouvelles infections et sortant du foie lors de la phase d'élimination du médicament. Le **temps de demi-vie d'élimination du médicament** détermine la probabilité que des parasites acquis lors de nouvelles infections soient en contact avec une concentration partiellement efficace en médicament (*ie* concentration sélective) (fig. 25). Les médicaments rapidement éliminés, comme les dérivés Artémisinine, ne présentent jamais une concentration sous-thérapeutique aux parasites puisqu'ils sont éliminés complètement en 48h. D'autres médicaments, comme la Chloroquine et la Méfloquine, ont des temps de demi-vie d'élimination de quelques semaines, voire un mois et présentent une longue opportunité de sélection.

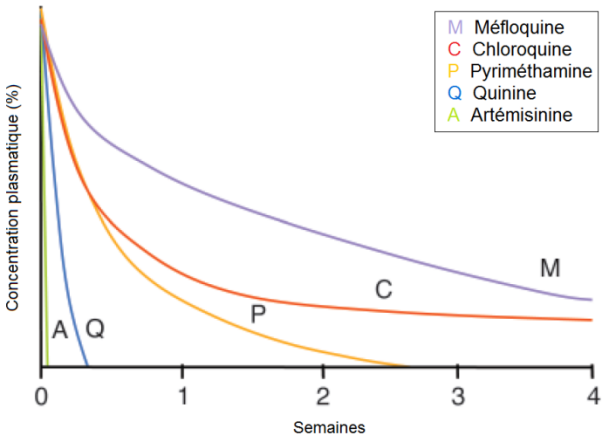


Figure 25 : concentration plasmatique en fonction du temps pour différents antipaludéens (l'origine des courbes représente la concentration maximale (100%) atteinte après une dose thérapeutique)

Des concentrations sous-thérapeutiques en médicament dans le sang peuvent aussi exister à cause d'automédication inadaptée, d'un manque d'observance du traitement, de médicaments de mauvaise qualité ou achetés à des doses incorrectes.

La recrudescence et la transmission ultérieure de l'infection ayant généré des parasites résistants sont nécessaires à la propagation de la résistance. Eliminer les stades sexuels transmissibles (gamétocytes) durant la première infection n'affecte pas l'émergence de résistance puisque ces gamétocytes dérivent de parasites sensibles au médicament. Les gamétocytes portant le gène de résistance n'atteindront des densités assez importantes pour être transmis que lorsque la population de parasites résistants sera proche de celle produisant des symptômes (plus de 10^7 parasites). La probabilité de survie et de transmission peut être réduite par l'immunité non spécifique, mais surtout par l'immunité spécifique de l'hôte, acquise au cours des infections répétées dans les zones de forte transmission. La probabilité de transmission peut aussi dépendre de la présence de parasites avec d'autres génotypes, entrant en compétition pour l'invasion des globules rouges et pour la multiplication.

Gènes et protéines impliqués dans la résistance aux antipaludéens actuels

La résistance à la Chloroquine a d'abord été observée en Thaïlande en 1957 et à la frontière Colombie/Venezuela en 1959, puis s'est propagée dans la plupart des pays de l'Afrique Sub-Saharienne dans les années 80, jusqu'à perdre son efficacité dans presque toutes les régions du monde aujourd'hui. Elle est multigénique et est initialement conférée par des mutations touchant le gène ***pfcrt*** (chloroquine resistance transporter) codant pour une protéine transmembranaire de la vacuole digestive *Pf*CRT, permettant le transport de la Chloroquine (et autres solutés) dans la vacuole digestive. [79] Le remplacement de la Lysine 76

[79] D. A. Fidock *et al.*, *Mol. Cell* **2000**, *6*, 861-871.

par une Thréonine, causé par une mutation génétique, est toujours observé chez les parasites résistants à la Chloroquine et souvent accompagné d'autres mutations. En présence de mutations du gène *pfcrt*, des mutations au niveau du **gène *pfmdr1*** modulent l'effet de la résistance à la chloroquine. [80] Le gène *pfmdr1* code pour une P-glycoprotéine, *Pf*Pgh1 ou *Pf*MDR1, pompe ATP-dépendante transmembranaire assurant le transport de solutés à travers la membrane de la vacuole digestive, incluant les médicaments Chloroquine, Méfloquine, Artémisinine. La résistance à la Méfloquine serait liée à une amplification du nombre de copies du gène *pfmdr1*. Les mutations des protéines *Pf*CRT et *Pf*MDR1 empêchent l'accumulation de la Chloroquine/Méfloquine dans la vacuole digestive par un phénomène d'efflux.

La résistance aux antifolates est apparue rapidement après leur introduction en monothérapie, ce qui explique qu'ils ont ensuite été utilisés en association synergique, comme la Pyriméthamine-Sulfadoxine, largement répandue à partir des années 60. La résistance aux antifolates est due à des mutations des gènes ***dhfr*** et ***dhps*** codant pour les protéines cibles de ces médicaments (cf fig. 20, page 22). [81] Le génotype le plus commun des parasites résistants à la Pyriméthamine-Sulfadoxine en Afrique combine trois mutations de *dhfr* et deux mutations de *dhps*. En Asie du Sud-Est, une quatrième altération de DHFR est observée (Isoleucine164 remplacée par une Leucine) et rend le parasite complètement résistant aux concentrations physiologiques atteignables de Pyriméthamine-Sulfadoxine.

Dans les régions où l'Atovaquone a été utilisée en monothérapie, une résistance a très rapidement émergé, avec des mutations du **gène du cytochrome *b***, affectant principalement le codon 268 (la tyrosine est remplacée par une sérine, une asparagine ou une cystéine). [82] En association avec le Proguanil, la manifestation de résistance est nettement retardée et cette association est utilisée avec succès en prophylaxie, notamment pour les voyageurs à destination de l'Asie du Sud-Est où les parasites multi-résistants sont communs. Le mécanisme expliquant la synergie entre ces deux composés est mal compris, mais il semble que le Proguanil ait la capacité de sensibiliser la mitochondrie en bloquant un mécanisme secondaire de maintien de son potentiel membranaire.

Le phénomène de résistance à l'Artémisinine a été tout d'abord observé dans l'ouest du Cambodge dans les années 2000 et a ensuite émergé indépendamment et/ou s'est propagé dans plusieurs régions d'Asie du Sud-Est (Birmanie, Thaïlande, Laos et Vietnam) (fig. 26). [83,84,85] La résistance à l'Artémisinine et ses dérivés se caractérise par une clairance parasitaire ralentie, qui reflète une réduction de susceptibilité des parasites au stade anneau. Dans l'Ouest du Cambodge par exemple, le temps de demi-vie de clairance parasitaire est passé de 2.6 heures en 2001 à 5.5 heures en 2010.

---

[80] M. B. Reed *et al.*, *Nature* **2000**, *403,* 906-909.
[81] A. Gregson, C. V. Plowe, *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 117-145.
[82] M. Korsinczky *et al.*, *Antimicrob. Agents Ch.* **2000**, *44*, 2100-2108.
[83] Global Report on Antimalarial drug efficacy and drug resistance 2000-2010, World Health Organization, **2010**.
[84] A. M. Dondorp *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 455-467.
[85] Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC), *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 411-423.

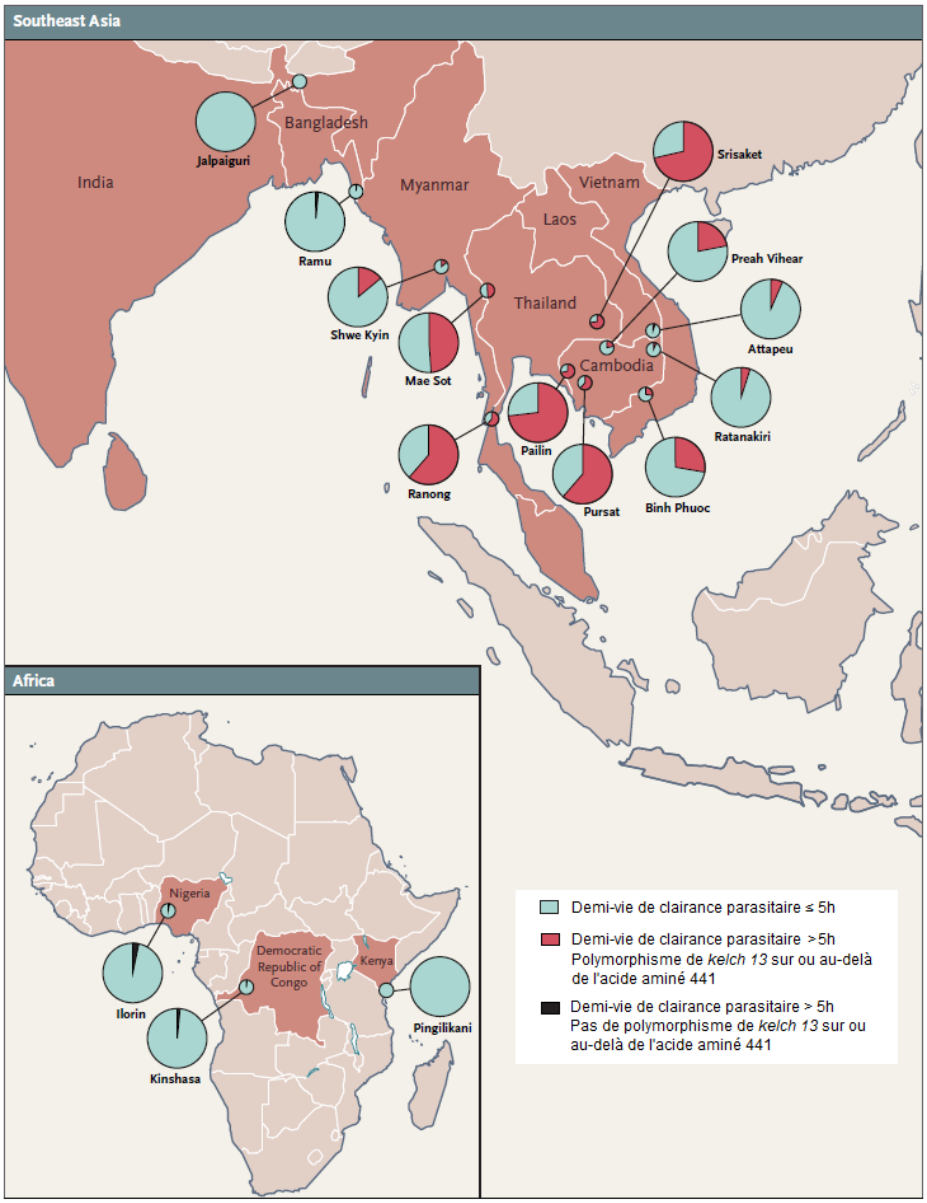


Figure 26 : localisation des sites d'une étude conduite de mai 2011 à mai 2013 et proportions de patients présentant une résistance à l'Artémisinine, définie par une clairance parasitaire > 5h

Le mécanisme de résistance à l'Artémisinine est très mal connu. Des études récentes montrent qu'il serait associé à des mutations de gènes impliqués dans le repliement des protéines, ainsi que dans la réponse au stress oxydatif. [86,87,88,89] Plusieurs mutations ont été observées au niveau du gène ***kelch13*** codant pour une protéine hélice K13 dont la fonction dans le repliement des protéines reste à clarifier.

Le ralentissement du développement du parasite au stade anneau est associé à des niveaux plus faibles d'endocytose et de digestion de l'hémoglobine, ce qui diminue l'activation de l'Artémisinine par l'hème et augmente la tolérance du parasite au médicament. Ce phénotype peut aussi être lié au mécanisme de dormance de *Plasmodium*, décrit comme lui permettant de résister à la pression du médicament et de reprendre sa croissance lorsque les conditions sont favorables.

[86] R. M. Fairhurst *et al.*, *Nature* **2014**, *505*, 50-55.
[87] J. Straimer *et al.*, *Science* **2015**, *347*, 428-431.
[88] S. Mok *et al.*, *Science* **2015**, *347*, 431-435.
[89] A. Mbengue *et al.*, *Nature* **2015**, *520*, 683-687.

Combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA)

L'association de médicaments ayant des mécanismes d'action différents repose sur deux principes : (1) l'association a souvent une meilleure efficacité qu'un seul médicament grâce à une synergie d'action (exemple Proguanil-Atovaquone), (2) la probabilité d'apparition simultanée d'une résistance à deux médicaments est plus faible. En effet, dans le cas peu probable où un parasite mutant résistant à l'un des médicaments apparaîtrait spontanément au cours de l'infection, il serait éliminé par l'autre médicament. On estime que cette protection mutuelle permet de retarder l'émergence de résistances.

Depuis 2005, l'OMS recommande l'utilisation de **Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine** (CTA) comme traitement de première ligne contre le paludisme simple à *P. falciparum*. Elle recommande également le retrait du marché des monothérapies à base d'Artémisinine, afin de limiter l'émergence de résistance à l'Artémisinine. [50]

Les dérivés Artémisinine sont particulièrement efficaces en combinaison car ils entraînent une rapide clairance parasitaire et la prompte disparition des symptômes ; aussi ils présentent peu d'effets secondaires et l'émergence de résistance a été tardive et principalement concentrée en Asie du Sud-Est. Comme ils sont rapidement éliminés, un traitement de sept jours est nécessaire lorsqu'ils sont administrés en association avec des médicaments dont l'élimination est également rapide (Tétracycline, Doxycycline, Clindamycine). La durée de ce traitement peut être ramenée à trois jours en associant l'Artémisinine à des antipaludéens à élimination lente (Méfloquine, Amodiaquine). Avec un tel traitement sur trois jours, l'obtention d'une clairance parasitaire de 100 % est tributaire de l'efficacité du médicament associé qui doit persister à une concentration parasiticide jusqu'à ce que tous les parasites aient été éliminés. Différentes CTA sont actuellement recommandées : Artéméther/Luméfantrine, Dihydroartémisinine/Piperaquine, Artésunate/Amodiaquine, Artésunate/Méfloquine et Artésunate/Sulfadoxine-Pyrimethamine.

Le prix des CTA est plus élevé que le prix des monothérapies classiques ou autres combinaisons thérapeutiques, ce qui en limite l'accès pour certaines familles durement touchées par la pauvreté (par exemple, au Sierra Leone en 2012, dans le secteur public l'Artésunate-Amodiaquine est à 1,56 $US contre 0,31 $US pour la Quinine ou 0,63 $US pour la Chloroquine). [90]

Dans la dernière décennie, l'utilisation des CTA a permis une réduction importante du taux de mortalité dû au paludisme. [1] Cependant, leur efficacité est désormais menacée par l'émergence de résistance à l'Artémisinine. Cela est d'autant plus préoccupant qu'aucune alternative pleinement efficace comme traitement de première ligne n'est aujourd'hui disponible pour remplacer les CTA.

Ces problèmes de résistance et de coût élevé pour les populations les plus défavorisées encouragent fortement la communauté scientifique à la découverte d'alternatives viables aux options thérapeutiques existantes. Il y a nécessité de découvrir de nouvelles cibles et de développer de nouvelles molécules, bon marché et non toxiques, pour continuer à faire reculer le paludisme.

Récemment, deux nouvelles enzymes protéolytiques, les aminopeptidases *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17, impliquées dans le catabolisme de l'hémoglobine par *Plasmodium*, ont émergé comme candidates potentielles pour la conception d'une nouvelle classe de médicaments antipaludéens. L'identification de ces cibles nouvelles a déterminé les travaux décrits dans ce manuscrit.

---

[90] J. H. Amuasi *et al.*, *PLoS ONE* **2012**, 7(10): e47733.

Chapitre 2

Les métallo-aminopeptidases

*Pf*A-M1 et *Pf*A-M17

I- Les enzymes protéolytiques

1) Définition et classification
2) Les aminopeptidases
3) Les métalloprotéases

II- Famille M1 : métalloprotéases à un ion métallique

1) Homologie de repliement
2) Homologie de séquence
3) Mécanisme catalytique
4) Structure et spécificité de substrat de *Pf*A-M1

III- Famille M17 : métalloprotéases à deux ions métalliques

1) Homologie de repliement
2) Homologie de séquence
3) Mécanisme catalytique
4) Structure et spécificité de substrat de *Pf*A-M17
5) L'aminopeptidase d'*Aeromonas proteolytica*

IV- Rôles de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 chez *Plasmodium*

1) Expression, rôle et localisation de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17
2) *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17, protéines essentielles au développement du parasite

I- Les enzymes protéolytiques

1) Définition et classification

Les enzymes protéolytiques (protéases ou peptidases) catalysent les réactions d'hydrolyse de liaisons amides de peptides ou de protéines. [91] Il s'agit de la réaction irréversible la plus importante dans le monde du vivant. Les protéases sont naturellement très abondantes et interviennent dans la régulation de nombreux processus biologiques : digestion et recyclage des protéines [92], coagulation[93], défense immunitaire [94], mort cellulaire [95]… Elles sont également impliquées dans de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires et inflammatoires, le cancer, les troubles neurologiques et sont, par conséquent, des cibles pharmacologiques de choix pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques, ainsi que des biomarqueurs diagnostiques (détectent la présence de la maladie) et biomarqueurs pronostiques (renseignent sur le devenir des patients). [96]

Les interactions d'un substrat avec une protéase sont formalisées par la nomenclature de Schechter et Berger introduite en 1967 (fig. 27). [97] Par convention, les résidus du peptide substrat du côté N-terminal de la liaison scissile sont désignés par la lettre P et ceux du côté C-terminal par P'. Les résidus P et P' interagissent avec les sous-sites complémentaires S et S' de la protéase pour une reconnaissance spécifique.

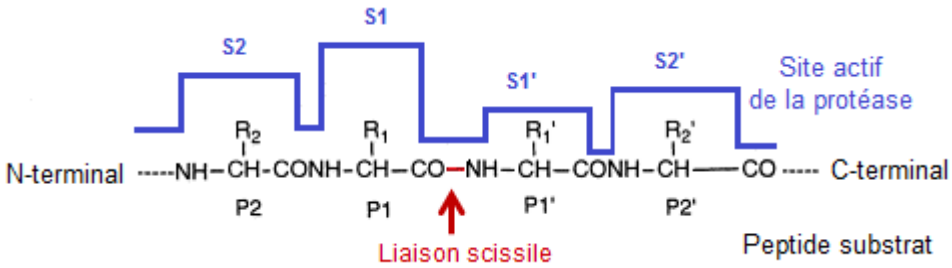


Figure 27 : nomenclature de Schechter et Berger [97]

Le mécanisme général d'hydrolyse d'une liaison amide catalysée par les protéases est une addition nucléophile présentée schéma 1. Le carbonyle de l'amide du substrat est activé par un environnement électrophile au sein du site actif. Le nucléophile (molécule d'eau activée ou acide aminé nucléophile du site actif) attaque ce carbonyle, formant ainsi un intermédiaire tétraédrique sp^3, stabilisé au sein du site catalytique. La protonation de l'amine conduit à la rupture de la liaison peptidique pour libérer les produits de la réaction.

[91] Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rd Edn, vol. 2, N. D. Rawlings, G. Salvesen, *Elsevier Academic Press* **2004**, 1-2448.
[92] M. H. Glickman, A. Ciechanover, *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 373-428.
[93] E. W. Davie *et al.*, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10363-10370.
[94] S. Donnelly *et al.*, *Adv. Exp. Med.Biol.* **2011**, *712*, 192-207.
[95] D. W. Nicholson, *Cell Death Differ.* **1999**, *6*, 1028-1042.
[96] B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 785-799.
[97] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1967**, *27*, 157-162.

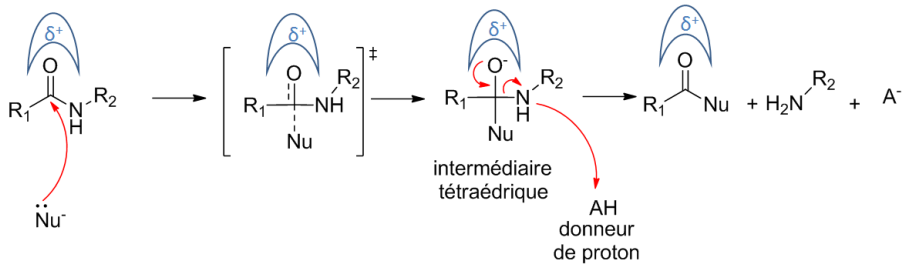


Schéma 1 : mécanisme général d'hydrolyse d'une liaison amide catalysée par une protéase

Deux familles de protéases se distinguent : les **endopeptidases** et les **exopeptidases** (fig. 28).

- Les endopeptidases catalysent le clivage d'une liaison amide située à l'intérieur de la chaîne peptidique.

- Les exopeptidases catalysent le clivage d'une liaison amide située à l'extrémité d'une chaîne peptidique. Elles sont classées en fonction de leur spécificité de substrat, par exemple, les **aminopeptidases** libèrent l'acide aminé en position N-terminale, alors que les **carboxypeptidases** libèrent l'acide aminé en position C-terminale.

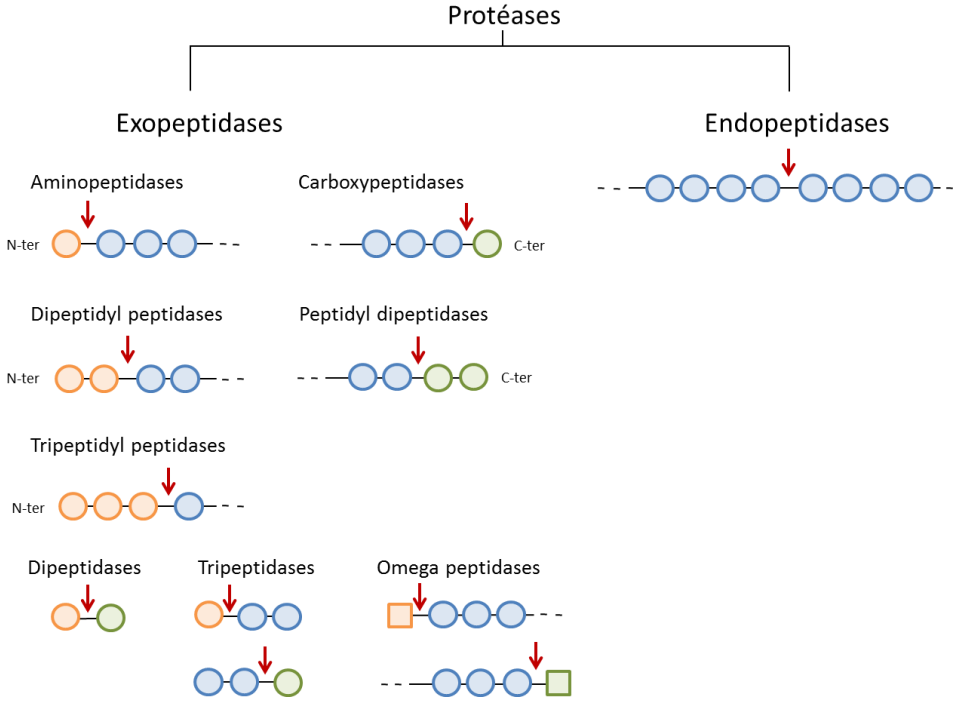


Figure 28 : classification des protéases [91]

Par ailleurs, les données structurales obtenues par cristallographie aux rayons X (RX) ont permis de classer les protéases en fonction de leur mécanisme catalytique et plus précisément en fonction de la nature de l'acide aminé impliqué dans la catalyse : protéases à cystéine, à sérine, à thréonine, à acide aspartique et métalloprotéases.

Parmi ces protéases, nous nous intéressons plus particulièrement aux aminopeptidases.

2) Les aminopeptidases

Les aminopeptidases (AP) [EC.3.4.11.-] catalysent l'hydrolyse de la liaison amide de l'acide aminé en position N-terminale d'un peptide ou d'une protéine. Il existe une grande variété d'aminopeptidases chez les mammifères. [91] Elles sont spécifiques de la nature de l'acide aminé en position P1. Il existe des aminopeptidases spécifiques des acides aminés N-terminaux neutres (APN), acides (APA), basiques (APB). Certaines sont spécifiques d'un acide aminé particulier : proline (APP), tryptophane (APW), leucine (LAP) ou méthionine (MetAP).

Nous allons nous intéresser dans le cadre de nos travaux aux métallo-aminopeptidases.

3) Les métalloprotéases

Les métalloprotéases contiennent un ou plusieurs ions métalliques essentiel(s) à la catalyse. Ce sont généralement des ions zinc, mais certaines enzymes peuvent montrer une activité catalytique en présence de cobalt, manganèse, nickel ou cuivre. [91]

Les métalloprotéases peuvent être divisées en deux groupes selon le nombre d'ions métalliques impliqués dans la catalyse : un ion métallique ou deux organisés en unité co-catalytique.

Les métalloprotéases sont regroupées en clans ; le tableau 4 illustre la grande diversité structurelle de ces clans.

Clan	Family	Type example
MA(E)	M1	Aminopeptidase N (*Homo sapiens*)
	M2	Peptidyl-dipeptidase A peptidase unit 2 (*Homo sapiens*)
	M3	Thimet oligopeptidase (*Rattus norvegicus*)
	M4	Thermolysin (*Bacillus thermoproteolyticus*)
	M5	Mycolysin (*Streptomyces cacaoi*)
	M9	Microbial collagenase (*Vibrio alginolyticus*)
	M13	Neprilysin (*Homo sapiens*)
	M26	IgA1-specific metalloendopeptidase (*Streptococcus sanguis*)
	M27	Tentoxilysin (*Clostridium tetani*)
	M30	Hyicolysin (*Staphylococcus hyicus*)
	M32	Carboxypeptidase Taq (*Thermus aquaticus*)
	M34	Anthrax lethal factor (*Bacillus anthracis*)
	M36	Fungalysin (*Aspergillus fumigatus*)
	M41	FtsH endopeptidase (*Escherichia coli*)
	M47	PRSM1 putative metallopeptidase (*Homo sapiens*)
	M60	Enhancin (*Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus)
	M61	Glycyl aminopeptidase (*Sphingomonas capsulata*)
MA(M)	M6	Immune inhibitor A (*Bacillus thuringiensis*)
	M7	Snapalysin (*Streptomyces lividans*)
	M8	Leishmanolysin (*Leishmania major*)
	M10	Collagenase 1 (*Homo sapiens*)
	M11	Gametolysin (*Chlamydomonas reinhardtii*)
	M12	Astacin (*Astacus astacus*)
	M35	Deuterolysin (*Aspergillus flavus*)
	M43	Cytophagalysin (*Cytophaga* sp.)
	M46	Pappalysin-1 (*Homo sapiens*)
	M57	prtB gene product (*Myxococcus xanthus*)
	M64	IgA protease (*Clostridium ramosum*)
	M72	peptidyl-Asp metalloendopeptidase (*Pseudomonas aeruginosa*)

MC	M14	Carboxypeptidase A1 (*Homo sapiens*)
MD	M15	Zinc D-Ala-D-Ala carboxypeptidase (*Streptomyces albus*)
ME	M16	Pitrilysin (*Escherichia coli*)
	M44	Vaccinia virus-type metalloendopeptidase (vaccinia virus)
MF	M17	Leucyl aminopeptidase (*Bos taurus*)
MG	M24	Methionyl aminopeptidase type 1 (*Escherichia coli*)
MH	M18	Aminopeptidase I (*Saccharomyces cerevisiae*)
	M20	Glutamate carboxypeptidase (*Pseudomonas* sp.)
	M28	aminopeptidase (*Streptomyces griseus*)
	M42	Glutamyl aminopeptidase (*Lactococcus lactis*)
MJ	M38	β-Aspartyl dipeptidase (*Escherichia coli*)
MK	M22	*O*-sialoglycoprotein endopeptidase (*Pasteurella haemolytica*)
ML	M52	HybD endopeptidase (*Escherichia coli*)
	M63	GPR protease (*Bacillus megaterium*)
MM	M50	S2P protease (*Homo sapiens*)
MN	M55	D-Aminopeptidase DppA (*Bacillus subtilis*)
M-	M19	Membrane dipeptidase (*Homo sapiens*)
	M23	β-Lytic metalloendopeptidase (*Achromobacter lyticus*)
	M29	Aminopeptidase T (*Thermus aquaticus*)
	M48	Ste24 endopeptidase (*Saccharomyces cerevisiae*)
	M49	Dipeptidyl-peptidase III (*Rattus norvegicus*)
	M56	BlaR1 peptidase (*Bacillus licheniformis*)

Tableau 4 : métalloprotéases à un ion métallique : clans MA, MC, MD, ME, MJ, MK, MM, MO, MP, MT ; métalloprotéases à plusieurs ions métalliques : clans MF, MG, MH, MN. Chaque clan est divisé en familles, organisées selon leur homologie au niveau du repliement, les résidus ligands des ions métalliques dans le site actif et leur spécificité de substrat. [91]

Notre travail s'est porté sur deux aminopeptidases neutres parasitaires appartenant aux familles de métalloprotéases M1 et M17 : l'alanyl aminopeptidase *Pf*A-M1 et la leucyl aminopeptidase *Pf*A-M17.

I- Famille M1 : métalloprotéases à un ion métallique

1) Homologie de repliement

Les métalloprotéases de la famille M1 ont un repliement très similaire, comme le montre l'alignement HHpred figure 29, qui tient compte de la séquence primaire et de la structure secondaire des protéines. [98]

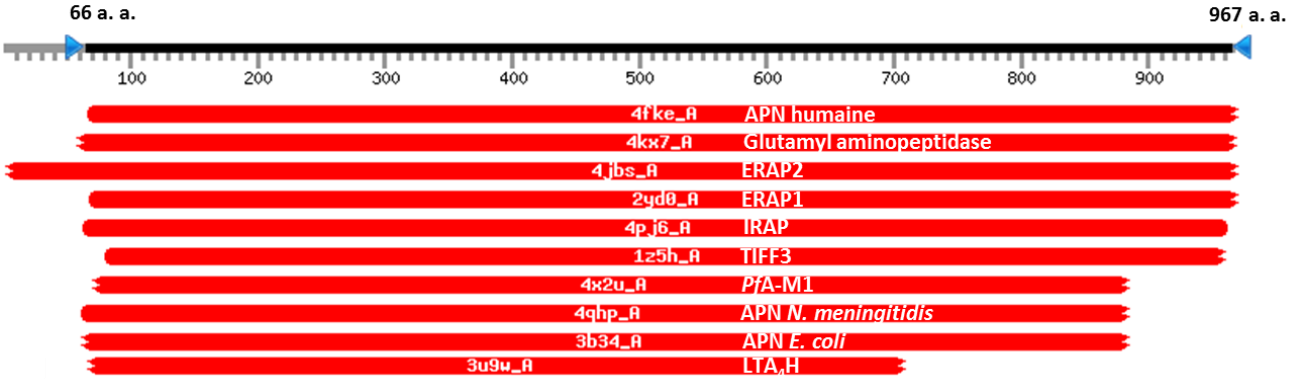


Figure 29 : alignement HHpred de quelques membres de la famille M1 par rapport à la structure de l'APN humaine (967 acides aminés) ; le code de la Protein Data Bank (PDB) et le nom de chaque protéine sont indiqués [98]

[98] J. Soding et al., *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 244-248.
http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred, consulté le 30/05/2015.

Toutes ces enzymes s'organisent en trois ou quatre domaines structuraux distincts (fig. 30 et 31). [91] Le domaine I correspond au domaine N-terminal. Le domaine II est le domaine catalytique contenant l'atome de zinc. Le repliement de ce domaine dérive de celui de la Thermolysine ([EC.3.4.24.27]) (fig. 31). Il est très conservé au sein de la famille M1 (80% homologie de repliement). Le site actif forme une cavité au cœur d'un réseau d'hélices α et est enfoui dans la protéine. Le domaine III est absent chez certaines métalloprotéases de cette famille. Le domaine IV correspondant au domaine C-terminal, est le moins conservé au sein des différentes espèces.

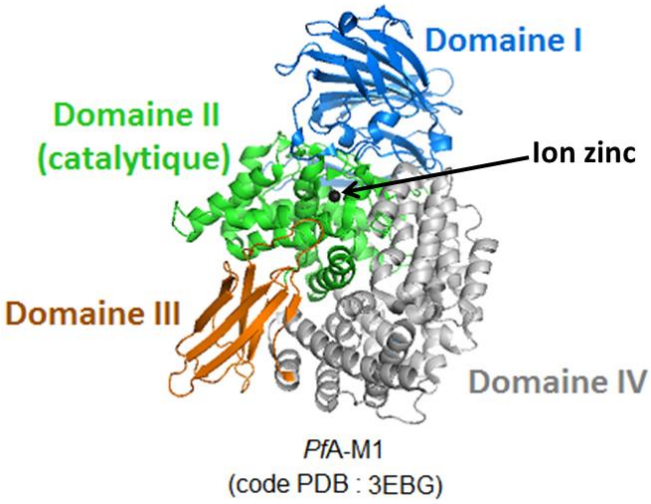


Figure 30 : différents domaines des aminopeptidases de la famille M1 (ici *Pf*A-M1) ; visualisation de la protéine via PyMOL Molecular Graphics System (2009-2010 Schrodinger, LLC)

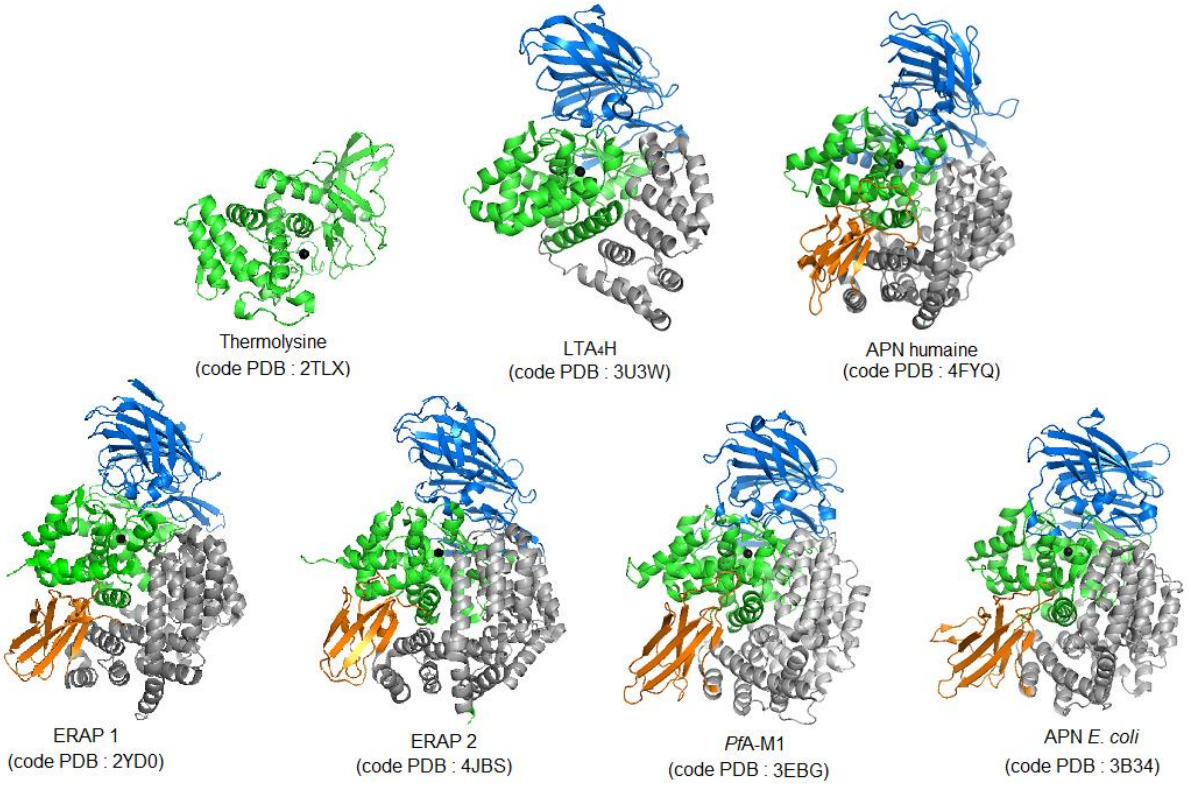


Figure 31 : structure tridimensionnelle de quelques aminopeptidases de la famille M1 et de la Thermolysine ; logiciel PyMOL

2) Homologie de séquence

L'alignement des séquences primaires des aminopeptidases de la famille M1 révèle la présence de motifs particulièrement conservés (fig. 32) [91,99] :

- Motif consensus liant l'ion zinc **His**-**Glu**-Xaa-Xaa-**His**-Xaa$_{18}$-**Glu** (**H**EXX**H**X$_{18}$**E**). L'ion zinc est tétra-coordiné par deux histidines (**H**EXX**H**X$_{18}$E), un acide glutamique (HEXXHX$_{18}$**E**) et une molécule d'eau (agent nucléophile).
- Domaine Gly-Ala-Met-Glu-Asn ou GAMEN liant l'amine primaire de l'acide aminé N-terminal du substrat.
- Deux résidus essentiels à la catalyse : l'acide glutamique catalytique (partie du motif H**E**XXHX$_{18}$E) et un résidu tyrosine, essentiel à l'activation du substrat et à la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique.

```
AMPN_HUMAN      349  FNAGAMENWGLVTYRENSLLFDPLSSSSSNKERVVTVIAHELAHQWFGNLVTIEWWNDLW   408
ERAP1_HUMAN     314  FQSGAMENWGLTTYRESALLFDAEKSSASSKLGITMTVAHELAHQWFGNLVTMEWWNDLW   373
ERAP2_HUMAN     331  FAPGAMENWGLITYRETSLLFDPKTSSASDKLWVTRVIAHELAHQWFGNLVTMEWWNDIW   390
AMP1_PLAFQ      457  FNVGAMENKGLNIFNANSLLASKKNSIDFSYARILTVVGHEYFHNYTGNRVTLRDWFQLT   516
AMPN_ECOLI      258  FNMGAMENKGLNIFNSKYVLARTDTATDKDYLDIERVIGHEYFHNWTGNRVTCRDWFQLS   317
LKHA4_HUMAN     266  FPYGGMENPCLTFVTPTLLAGD---------KSLSNVIAHEISHSWTGNLVTNKTWDHFW   316
                     *  *.***  *     . :             :  .:.**  *.: ** ** . * .:

AMPN_HUMAN      409  LNEGFASYVEYLGADYAEPTWNLKDLMVLNDVYR----VMAVDALASSHPLSTPASEINT   464
ERAP1_HUMAN     374  LNEGFAKFMEFVSVSVTHPELKVGDY-FFGKCFD----AMEVDALNSSHPVSTPV---EN   425
ERAP2_HUMAN     391  LKEGFAKYMELIAVNATYPELQFDDY-FLNVCFE----VITKDSLNSSRPISKPA---ET   442
AMP1_PLAFQ      517  LKEGLTVHRENLFSEEMTKTV----TTRLSHVDLLR----SVQFLEDSSPLSHPIRP-ES   567
AMPN_ECOLI      318  LKEGLTVFRDQEFSSDLGSRA----VNRINNVRTMR----GLQFAEDASPMAHPIRP-DM   368
LKHA4_HUMAN     317  LNEGHTVYLERHICGRLFGEK----FRHFNALGGWGELQNSVKTFGETHPFTKLVVD-LT   371
                     *:** : . :                  :             .   .: *.:

AMPN_HUMAN      465  PAQISELFDAISYSKGASVLRMLSSFLSEDVFKQG-LASYLHTFAYQNTIYLNLWDHLQE   523
ERAP1_HUMAN     426  PAQIREMFDDVSYDKGACILNMLREYLSADAFKSG-IVQYLQKHSYKNTKNEDLWDSMAS   484
ERAP2_HUMAN     443  PTQIQEMFDEVSYNKGACILNMLKDFLGEEKFQKG-IIQYLKKFSYRNAKNDDLWSSLSN   501
AMP1_PLAFQ      568  YVSMENFYTTTVYDKGSEVMRMYLTILGEEYYKKG-FDIYIKKNDGNTATCEDFNYAMEQ   626
AMPN_ECOLI      369  VIEMNNFYTLTVYEKGAEVIRMIHTLLGEENFQKG-MQLYFERHDGSAATCDDFVQAMED   427
LKHA4_HUMAN     372  DIDPDVAYSSVFYEKGFALLFYLEQLLGGPEIFLGFLKAYVEKFSYKSITTDDWKDFLYS   431
                       .    :    *.**  ::      *.      * :  *..          :    : .
```

Figure 32 : alignement des séquences primaires de la région catalytique d'une sélection d'aminopeptidases de la famille M1 : APN humaine (AMPN_human, UniProtKB/Swiss-Prot P15144), ERAP1 (ERAP1_HUMAN, Q9NZ08), ERAP2 (ERAP2_HUMAN, Q6P179), *Pf*A-M1 (AMP1_PLAFQ, O96935), APN *E. coli* (AMPN_ECOLI, P04825), LTA$_4$H (LKHA4_HUMAN, P09960) ; outil d'alignement de séquences du serveur UniProt, programme Clustalo [99]

3) Mécanisme catalytique

Un mécanisme catalytique a été proposé pour les membres de la famille M1 (schéma 2). [91] Nous y retrouvons les principes de catalyse communs aux enzymes protéolytiques. Le mécanisme implique une catalyse générale acide/base dans laquelle le premier acide glutamique du motif H**E**XXHX$_{18}$E joue le rôle de « navette à proton » (acide aminé catalytique). Le substrat est correctement positionné dans le site actif grâce à l'acide glutamique du motif GAM**E**N et à la tyrosine. Le substrat déplace la molécule d'eau liée au zinc vers l'acide glutamique catalytique. L'atome de zinc devient penta-coordiné (a). La molécule d'eau est activée à la fois par l'atome de zinc et par l'acide glutamique catalytique. Le pKa de la molécule d'eau est abaissé aux environs de 6, permettant ainsi la formation *in situ* d'un groupement hydroxyle HO^-. [100] Le

[99] http://www.uniprot.org/, consulté le 30/05/2015.
[100] Metal Sites in Proteins and models. Phosphatases, Lewis Acids and Vanadium, H. A. O. Hill, P. J. Sadler, A. J. Thomson, *Springer Desktop Editions in Chemistry* **1999**, 1-198.

carbonyle de la liaison amide du substrat est activé par le zinc et par liaison hydrogène avec la tyrosine. L'addition nucléophile de l'ion hydroxyle sur cette fonction carbonyle conduit à l'**intermédiaire tétraédrique** (b). Cet intermédiaire est stabilisé par un réseau de liaisons hydrogène. L'acide glutamique catalytique joue alors le rôle d'acide et protone l'atome d'azote de l'intermédiaire tétraédrique, conduisant à l'hydrolyse de la liaison amide (c).

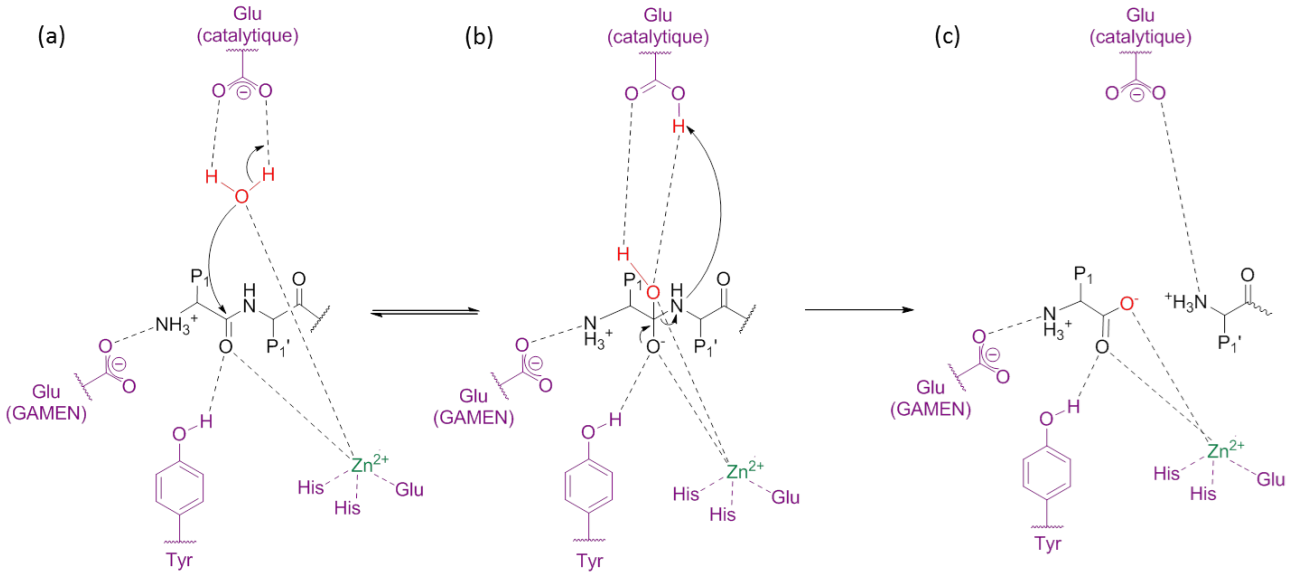


Schéma 2 : mécanisme catalytique proposé pour les métallo-aminopeptidases de la famille M1

4) Structure et spécificité de substrat de *Pf*A-M1

*Pf*A-M1 ([EC 3.4.11.2]) est la première aminopeptidase de *Plasmodium* à avoir été clonée et séquencée. [101,102,103] Le gène codant pour cette protéine est présent en une seule copie, située sur le chromosome 13 de *P. falciparum*. [104] Il code pour une protéine de 1085 acides aminés avec une masse estimée à 126 kDa. *Pf*A-M1 est un monomère constitué des quatre domaines conservés de la famille M1 (fig. 33), précédés d'une séquence de 194 acides aminés, appelée extension N-terminale et contenant un segment transmembranaire. Une extension N-terminale est observée chez tous les orthologues plasmodiaux de *Pf*A-M1, mais sa séquence n'est pas conservée.

*Pf*A-M1 présente une très forte homologie avec APN *E. coli* : 35% d'identité de séquence primaire et 81% d'homologie au niveau du site actif. [101] De plus, *Pf*A-M1 présente une identité de séquence primaire de 60 à 66% avec plusieurs orthologues plasmodiaux, notamment des espèces présentes chez les rongeurs (*P. berghei*, *P. chabaudi chabaudi* et *P. yoelii*) (outil d'alignement de séquences du serveur UniProt, programme Clustalo). [99] Par contre, *Pf*A-M1 ne présente que 17% d'identité de séquence primaire avec l'APN humaine et 44% d'homologie au niveau du site actif (outil d'alignement de séquences du serveur UniProt, programme Clustalo). Cette différence pourra être exploitée pour développer des inhibiteurs sélectifs de *Pf*A-M1, avec une faible activité sur les métallo-aminopeptidases humaines de cette famille.

[101] I. Florent *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1998**, *97*, 149-160.
[102] M. Allary *et al.*, *Parasitology* **2002**, *125*, 1-10.
[103] O. Azimzadeh *et al.*, *Malar. J.* **2010**, *9*, 189-204.
[104] M. J. Gardner *et al.*, *Nature* **2002**, *419*, 498-511.

La figure 33 présente la structure du site actif de *Pf*A-M1 : nous retrouvons le motif $H^{496}EXXHX_{18}E^{519}$ conservé au sein de la famille M1, contenant les résidus ligands du zinc, His496, His500, Glu519, et le résidu catalytique Glu497, ainsi que le motif de liaison du substrat G^{460}AMEN. [105] L'ion zinc est lié à deux molécules d'eau : la molécule d'eau agent nucléophile dans la réaction d'hydrolyse, qui est elle-même liée par liaisons hydrogène aux résidus Glu497 et Glu463 et une autre molécule d'eau liée par liaison hydrogène au résidu Tyr580 (non représenté ici par souci de clarté). L'ion zinc est alors penta-coordiné.

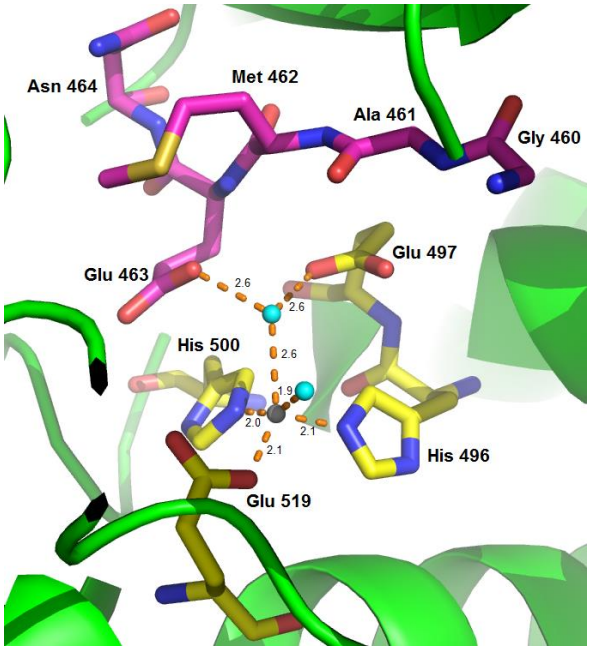


Figure 33 : *Pf*A-M1 (code PDB 3EBG) ; ion métallique et molécule d'eau représentés par une sphère grise et bleue, respectivement ; distances en Angström (Å) ; logiciel Pymol

Deux ouvertures à la surface de la protéine semblent permettre l'accès à la cavité enfouie du site actif de *Pf*A-M1 (fig. 34). [105] Un premier accès se fait via un sillon peu profond long de 8 Å au niveau du domaine N-terminal, à la jonction entre les domaines I et IV. La seconde ouverture est un canal long de 30 Å situé à l'intérieur du domaine IV, au niveau du domaine C-terminal. Il a été proposé que les substrats peptidiques entrent par le long canal C-terminal, alors que les acides aminés issus de la réaction d'hydrolyse peuvent sortir par le canal N-terminal plus petit.

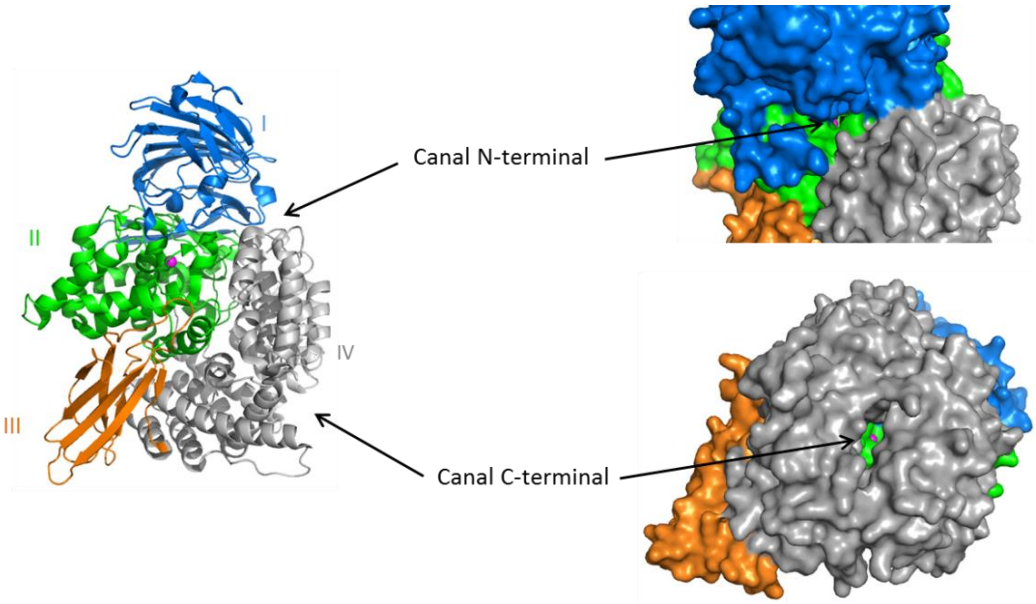


Figure 34 : structure de *Pf*A-M1 (PDB 3EBH, représentation en cartoon) et des deux canaux permettant d'accéder au site actif (représentation en surface moléculaire) ; ion zinc en magenta ; logiciel Pymol

[105] S. McGowan *et al.*, *PNAS* **2009**, *106*, 2537-2542.

Le sous-site S1, qui lie l'acide aminé P1 du substrat, est constitué des résidus Gln317, Glu319, Ala320, Val459, Met462, Glu572, Tyr575 et Met1034, formant un cylindre hydrophobe qui définit la spécificité de substrat (fig. 35). Le sommet de ce cylindre est polaire (Glu572) et forme une boucle pouvant subir d'importants changements conformationnels en fonction de l'acide aminé P1 du substrat. Cette boucle extrêmement flexible (facteur b : 22-54) est essentielle au site actif. [106,107] La présence de Glu572 permet à *Pf*A-M1 la reconnaissance d'acides aminés basiques en position P1. [108] Ces éléments structuraux expliquent la spécificité de substrat de *PfA*-M1.

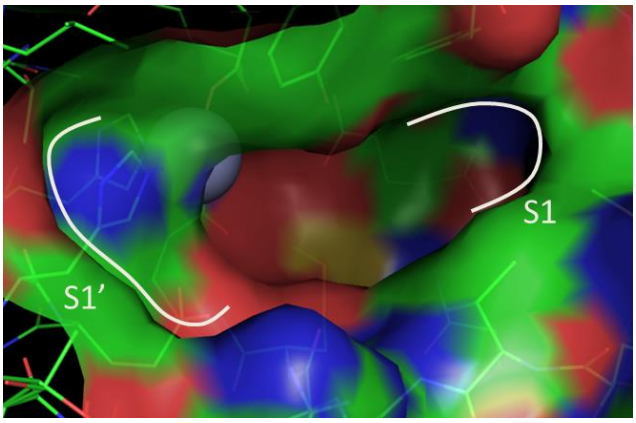


Figure 35 : sous-sites S1 et S1' de *Pf*A-M1 (PDB 3EBH) ; ion zinc en gris ; logiciel Pymol

Le sous-site S1', qui interagit avec la chaîne latérale P1' du substrat est une poche ouverte constituée des résidus Thr492, Val493 et Val523 (fig. 35). Ces résidus hydrophobes peuvent stabiliser le substrat par des interactions de Van der Waals avec des chaînes latérales non polaires en P1'. Le sous-site S1' est incapable de former des liaisons hydrogène avec des résidus polaires ou chargés de courte ou moyenne taille. Cependant, il peut accommoder de longues chaînes latérales avec une extrémité polaire, comme celle de la lysine, de la méthionine, ou la tyrosine.

L'aminopeptidase *Pf*A-M1 présente un **pH optimal d'activité** de **7,4** et conserve au moins 40% de son activité maximale aux pH extrêmes de 5,8 et 8,6. [102,105]

II- Famille M17 : métalloprotéases à deux ions métalliques

La famille M17 est l'unique famille du clan MF, rassemblant des métalloprotéases dont l'activité catalytique implique deux ions métalliques organisés en **unité co-catalytique**. [91] Elle regroupe **des leucyl aminopeptidases**, qui comme leur nom l'indique, hydrolysent préférentiellement le résidu leucine en position N-terminale d'un peptide ou d'une protéine ; cependant elles reconnaissent également d'autres acides aminés hydrophobes comme la phénylalanine, l'alanine, et la méthionine.

1) Homologie de repliement

Les leucyl aminopeptidases de la famille M17 sont présentes chez les eucaryotes et les bactéries. [109] Elles ont un repliement similaire comme le montre l'alignement HHpred figure 36, qui tient compte de la séquence primaire et de la structure secondaire des protéines. [98] La leucyl aminopeptidase cytosolique bovine, la leucyl aminopeptidase d'*E. coli* et la leucyl aminopeptidase de *P. falciparum* sont des homo-hexamères, chaque

[106] G. Velmourougane *et al.*, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1655-1666.
[107] M. B. Harbut *et al.*, *PNAS* **2011**, *108*, 526-534.
[108] S. Dalal *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 26004-26012.
[109] M. Matsui *et al.*, *Biol. Chem.* **2006**, *387*, 1535-1544.

monomère contenant un domaine N-terminal et un domaine C-terminal catalytique (fig. 37). Ce dernier est le domaine le mieux conservé au sein de la famille M17.

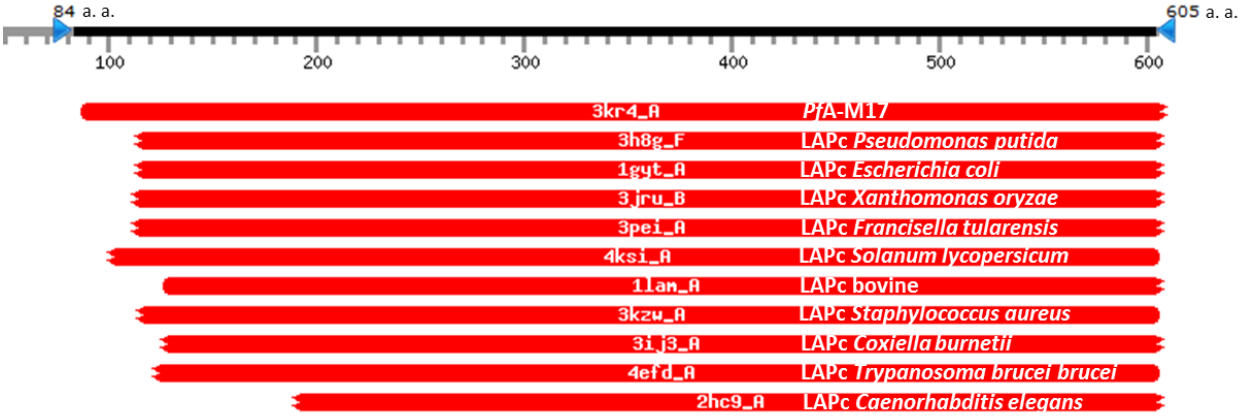


Figure 36 : alignement HHpred des monomères de quelques membres de la famille M17 par rapport au monomère de *PfA*-M17 (605 acides aminés) ; le code PDB ainsi que le nom de chaque protéine sont indiqués ; logiciel HHpred [98]

Les six sites actifs sont situés à l'intérieur de l'hexamère et forment une cavité largement accessible au solvant.

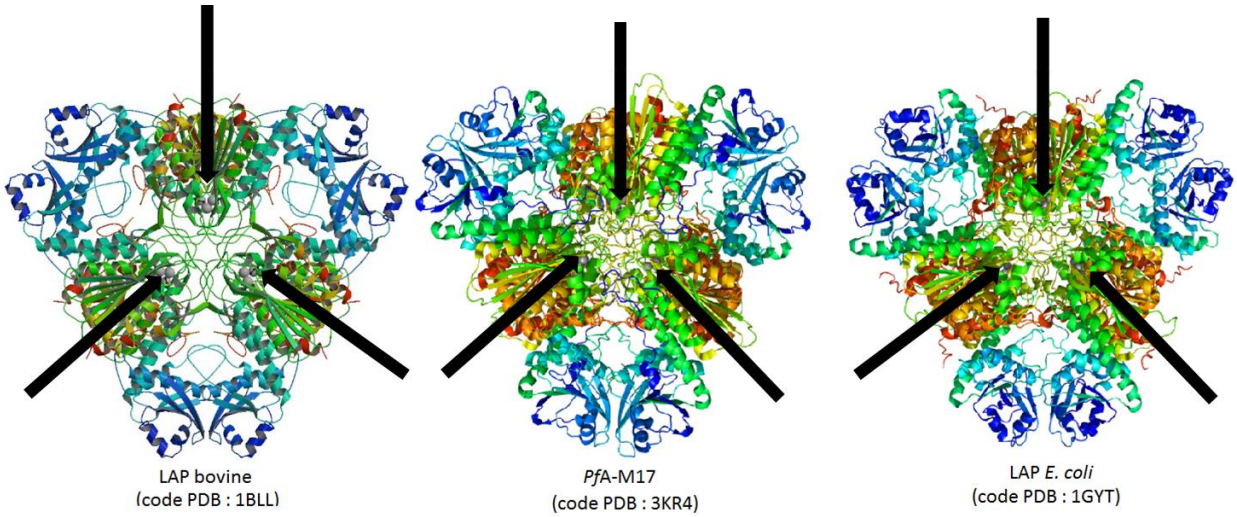


Figure 37 : structure tridimensionnelle d'une sélection de leucyl aminopeptidases de la famille M17 ; ions zinc indiqués par flèches ; logiciel Pymol

2) Homologie de séquence

La figure 38 présente l'alignement des séquences primaires de quelques membres de la famille M17. [99] Les résidus ligands des ions métalliques (en magenta) et les résidus participant à la catalyse (en bleu) sont bien conservés au sein de la famille M17.

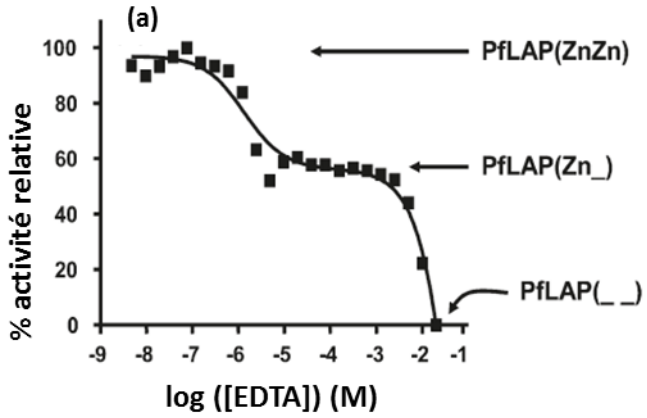
```
AMPL_BOVIN          239  WIEEQEMGSFLSVAKGSEEPPVFLEIHYKGSPNASEPPLVFVGKGITFDSGGISIKAAA-     297
Q8IL11_PLAF7        332  ELEELKMGAYLSVGKGSMYPNKFIHLTYKSKGD-VKKKIALVGKGITFDSGGYNLKAAPG     390
AMPA_ECOLI          227  QMKELGMHSYLAVGQGSQNESLMSVIEYKGNASEDARPIVLVGKGLTFDSGGISIKPSE-     285
                          ::*  * ::*:*.:**     :  : **.. .     :.:****:****** .:* :

AMPL_BOVIN          298  -NMDLMRADMGGAATICSAIVSAAKLDL-PINIVGLAPLCENMPSGKANKPGDVVRARNG     355
Q8IL11_PLAF7        391  SMIDLMKFDMSGCAAVLGCAYCVGTLKPENVEIHFLSAVCENMVSKNSYRPGDIITASNG     450
AMPA_ECOLI          286  -GMDEMKYDMCGAAAVYGVMRMVAELQL-PINVIGVLAGCENMPGGRAYRPGDVLTTMSG     343
                           :* *: ** *.*:: .    .. *.   :::  :   **** . .: :***:: : .*

AMPL_BOVIN          356  KTIQVDNTDAEGRLILADALCYAHTFNPKVIINAATLTGAMDIALGSGATGVFTNSSWLW     415
Q8IL11_PLAF7        451  KTIEVGNTDAEGRLTLADALVYAEKLGVDYIVDIATLTGAMLYSLGTSYAGVFGNNEELI     510
AMPA_ECOLI          344  QTVEVLNTDAEGRLVLCDVLTYVERFEPEAVIDVATLTGACVIALGHHITGLMANHNPLA     403
                         :*::* ******** *.*.* *.. :  . ::: ******   :**   :*:: * . *
```

Figure 38 : alignement des séquences primaires de la région catalytique d'une sélection d'aminopeptidases de la famille M17 ; LAP bovine (AMPL_BOVIN, UniProtKB/Swiss-Prot P00727), *Pf*A-M17 (Q8IL11_PLAF7, Q8IL11), LAP *E. coli* (AMPA_ECOLI, P68767) ; outil d'alignement de séquences du serveur Uniprot, programme Clustalo [99]

Des études réalisées avec la LAP bovine et avec une enzyme recombinante *Pf*A-M17 révèlent que les deux ions zinc du site actif, notés Zn1 et Zn2, se distinguent par leur force de liaison au site actif (fig. 39 (a)), soit leur capacité à être échangé contre un autre cation divalent. [110,111,112] Zn1 est un site de faible liaison et il peut être échangé rapidement contre Mn^{2+}, Mg^{2+} ou Co^{2+}. Les constantes de dissociation K_d sont reportées dans le tableau figure 39 (b). [112] Zn2 est un site fortement lié et les échanges contre un autre cation au niveau de ce site sont difficiles. Zn2 peut être uniquement remplacé par un ion Co^{2+} lorsque les deux sites métalliques sont simultanément inoccupés. [111] Les deux ions zinc sont penta-coordinés. Les ligands de Zn1 sont deux acides aspartiques (dont un est bidentate) et un acide glutamique. Les ligands de Zn2 sont deux acides aspartiques, un acide glutamique et une lysine. Zn1 et Zn2 sont tous deux liés à une molécule d'eau (agent nucléophile).



(b)

Ion métallique	K_d (µM)
Zn^{2+}	2.3
Mn^{2+}	47
Co^{2+}	130
Mg^{2+}	1600

Figure 39 : (a) inhibition de *rPf*A-M17(ZnZn) par l'EDTA. L'enzyme (30 nM) est incubée avec EDTA (5 nM – 20 mM) dans un tampon pH 8.0 contenant 10 µM de Zn^{2+} libre pendant 5 min, avant l'addition du substrat (20 µM) ; (b) constantes de dissociation K_d pour la liaison de Zn^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+} et Co^{2+} à *rPf*A-M17 (Zn_) [112]

[110] H. Kim, W. N. Lipscomb, *PNAS* **1993**, *90*, 5006-5010.
[111] M. P. Allen *et al.*, *Biochemistry* **1983**, *22*, 3778-3783.
[112] S. Maric *et al.*, *Biochemistry* **2009**, *48*, 5435-5439.

3) Mécanisme catalytique

Un mécanisme a été proposé pour les membres de la famille M17 à partir de l'étude du mécanisme de la LAP bovine (schéma 3). [113,114] Il implique, comme la famille M1, une catalyse générale acide-base dans laquelle un ion bicarbonate HCO_3^- joue le rôle de « navette à proton ». Ce dernier forme des liaisons hydrogène et électrostatiques avec le groupement guanidinium d'une arginine, le maintenant ainsi en place. Le substrat est stabilisé au sein du site actif via plusieurs interactions : entre l'amine primaire N-terminale du substrat et Zn2, entre le carbonyle de la liaison scissile du substrat et Zn1, entre le carbonyle de la liaison scissile et une lysine. Les deux ions métalliques sont alors hexa-coordinés. La molécule d'eau est activée par les atomes de zinc et par l'ion bicarbonate jouant le rôle de catalyseur basique (a). L'addition nucléophile de l'ion hydroxyle ainsi formé sur la fonction carbonyle de la liaison amide du substrat conduit à un intermédiaire tétraédrique, stabilisé par un réseau de liaisons hydrogène (b). L'acide carbonique joue alors le rôle de catalyseur acide et protone l'atome d'azote de l'intermédiaire tétraédrique, facilitant ainsi la rupture de la liaison amide (c).

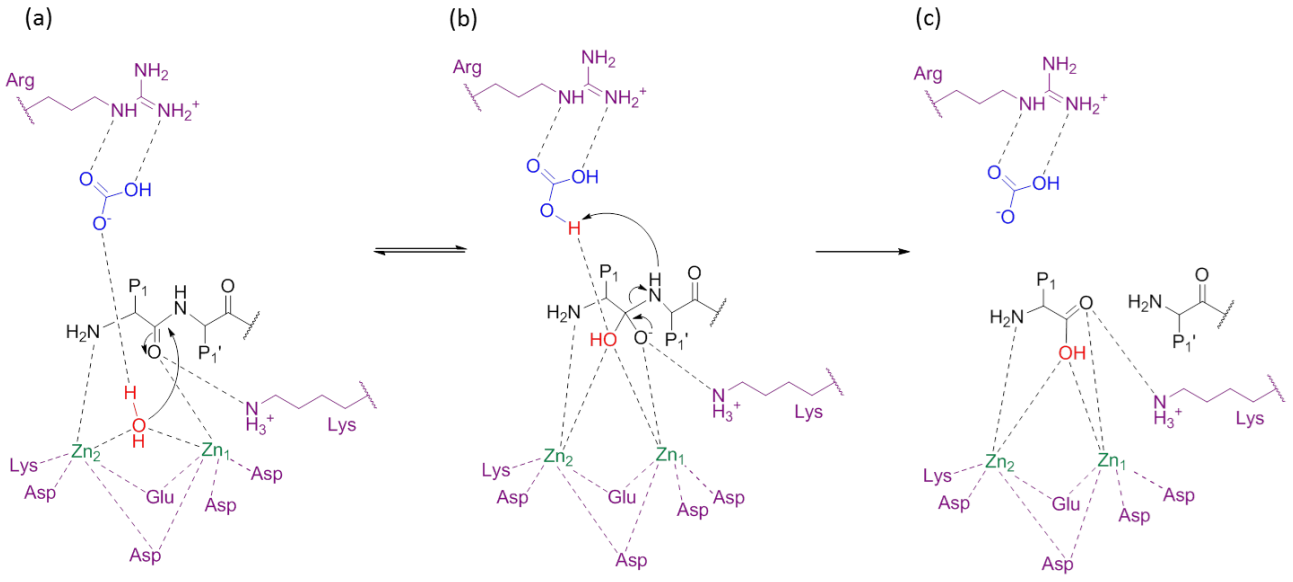


Schéma 3 : mécanisme catalytique proposé pour les membres de la famille M17 [113,114]

4) Structure et spécificité de substrat de *Pf*A-M17

*Pf*A-M17 ([EC 3.4.11.1]) est codée par un gène présent en une seule copie, située sur le chromosome 14 de *P. falciparum*. [104] Elle est constituée de 605 acides aminés pour une masse totale estimée de 67,8 kDa.[115] Comme plusieurs aminopeptidases de la famille M17, *Pf*A-M17 est une protéine homo-hexamérique, chaque monomère contenant un domaine N-terminal relié au domaine C-terminal catalytique par un lien hélicoïdal (fig. 37 et 40). [116] *Pf*A-M17 est plus longue que les leucyl aminopeptidases des autres espèces (mammifères,

[113] H. Kim, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1993**, *32*, 8465-8478.
[114] H. Kim, W. N. Lipscomb, *Adv. Enzymol. RAMB* **1994**, *68*, 153-213.
[115] C. M. Stack *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2069-2080.
[116] S. McGowan *et al.*, *PNAS* **2010**, *107*, 2449-2454.

bactéries) de par une extension N-terminale riche en asparagine. [115] Cette extension N-terminale est présente chez les autres espèces de *Plasmodium*, mais sa séquence et sa longueur sont très variables.

Les six sites actifs sont situés à l'intérieur de l'hexamère et forment une cavité (fig. 37), accessible via des canaux formés à l'intérieur du domaine N-terminal de chaque monomère. Une boucle d'environ 20 Å, partiellement désordonnée dans la plupart des monomères, est positionnée à l'entrée de la cavité catalytique (fig. 40). [116] Il est suggéré que la flexibilité de cette boucle régule l'entrée et la sortie des produits d'hydrolyse depuis la cavité catalytique.

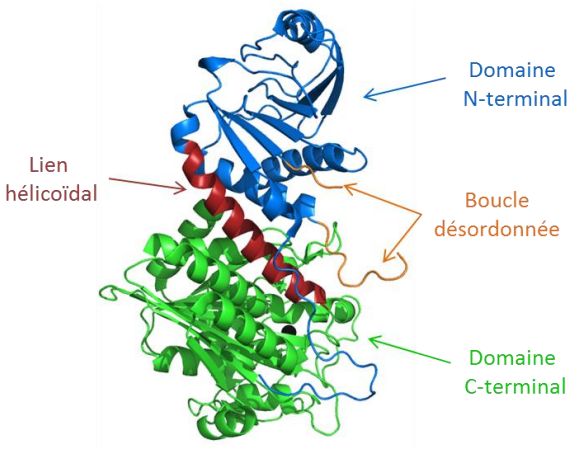


Figure 40 : structure du monomère de PfA-M17 (code PDB 3KQX) ; site Zn1 inoccupé et site Zn2 occupé par un ion zinc représenté par une sphère noire

Chaque site actif contient deux ions métalliques, Zn1 est un site de faible liaison tandis que Zn2 est un site fortement lié, comme observé pour la LAP bovine. [112,115] *Pf*A-M17 conserve son activité avec un seul ion zinc (Zn2). La nature de l'ion métallique dans le site Zn1 a une influence sur l'activité catalytique de l'enzyme. [112]

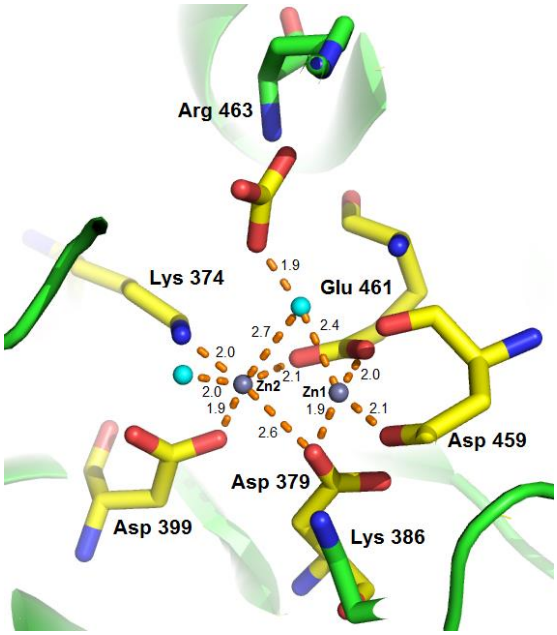


Figure 41 : *Pf*A-M17 (code PDB 3KQZ) ; ions métalliques et molécule d'eau représentés par des sphères grises et bleue, respectivement ; distances en Angström (Å) ; logiciel Pymol

Les deux ions métalliques sont distants de 2.9 Å (fig. 41). Les ligands de Zn1 sont Asp379, Glu461, Asp459 et la molécule d'eau nucléophile. Le site Zn2 est hexa-coordiné par Asp379, Glu461, Lys374, Asp399 et deux molécules d'eau, dont la molécule d'eau nucléophile.

La Lys386 intervient dans la stabilisation du substrat et de l'intermédiaire tétraédrique et le résidu Arg463 intervient dans la stabilisation de l'ion bicarbonate, « navette à proton ».

Le mécanisme catalytique de *Pf*A-M17 est analogue à celui décrit pour la LAP bovine (schéma 3).

Le sous-site S1 est étroit et constitué de résidus hydrophobes (fig. 42) : Met392, Met396, Phe398, Gly489, Leu492, Ala577 et Phe583, ce qui explique que la **spécificité de substrat de *Pf*A-M17** soit **restreinte au résidu leucine**.

*Pf*A-M17 présente une **activité optimale à pH neutre** et conserve une activité jusqu'à pH 11. Elle est inactive à un pH inférieur à 6. [115]

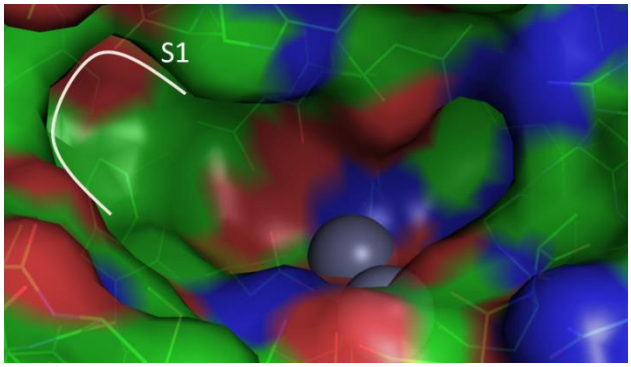


Figure 42 : sous-site S1 de *Pf*A-M17 (code PDB 3KR5) ; ions zinc en gris ; logiciel Pymol

*Pf*A-M17 présente 65-69% d'identité de séquence primaire et 80-85% d'identité au niveau du domaine C-terminal avec ses orthologues plasmodiaux (*P. berghei*, *P. chabaudi chabaudi* et *P. yoelii*). [115] *Pf*A-M17 ne présente que 24% d'identité de séquence primaire avec la LAP humaine (outil d'alignement de séquences du serveur UniProt, programme Clustalo). [99]

5) L'aminopeptidase d'*Aeromonas proteolytica*

L'aminopeptidase d'*Aeromonas proteolytica* (*AP*aero) ([EC 3.4.11.10]), aussi appelée aminopeptidase de *Vibrio proteolyticus*, est une métalloprotéase bimétallique pouvant être classée dans les familles de métalloprotéases M17 et M28. [91] La famille M28 est une autre famille de métalloprotéases à deux ions métalliques, rassemblant des aminopeptidases et carboxypeptidases. L'aminopeptidase d'*Aeromonas proteolytica* est une enzyme particulièrement étudiée et caractérisée, elle sert d'enzyme de référence pour les métalloprotéases à deux ions métalliques. Elle hydrolyse les résidus hydrophobes situés en position N-terminale d'un peptide ou d'une protéine avec une préférence pour la leucine.

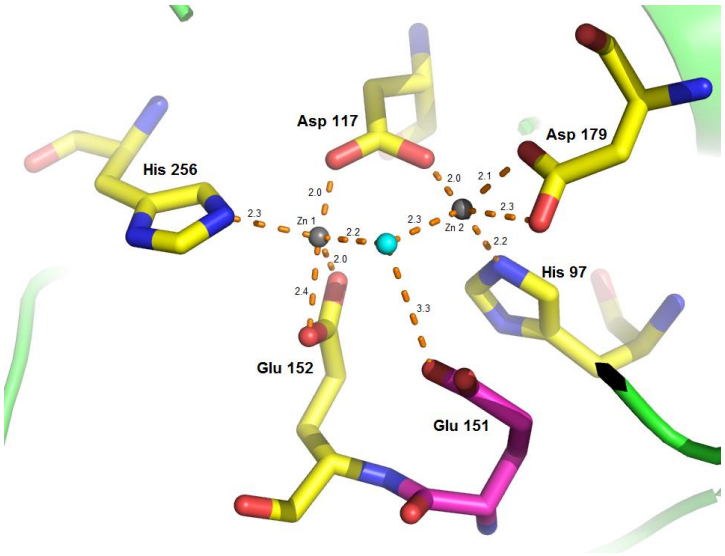


Figure 43 : site actif d'*AP*aero (code PDB 1AMP) ; ions métalliques et molécule d'eau représentés par des sphères grises et bleue, respectivement ; distances en Angström (Å) ; logiciel Pymol

*AP*aero est une protéine monomérique possédant un site actif très en surface de sa structure et accessible au solvant. [117] Il contient deux ions métalliques penta-coordinés distants de 3.5 Å (fig. 43). Les ligands de Zn1 sont Asp117, His256, Glu152 (ligand bidentate) et la molécule d'eau nucléophile. Les ligands de Zn2 sont

[117] B. Chevrier *et al.*, *Structure* **1994**, *2*, 283-291.

Asp117, His97, Asp179 (ligand bidentate) et la molécule d'eau nucléophile. Le résidu Glu151 est lié à la molécule d'eau nucléophile et joue le rôle de catalyseur acide/base dans le mécanisme catalytique.

Le mécanisme catalytique d'*Aeromonas proteolytica* est similaire à celui décrit précédemment pour la famille M17 (schéma 4). [91,117] L'ion Zn2 et Asp179 participent à la liaison du substrat au niveau de son amine N-terminale, tandis que l'ion Zn1 lie la fonction carbonyle de la liaison amide à hydrolyser et est impliqué dans la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique. La « navette à proton » Glu151 favorise la déprotonation de la molécule d'eau liée aux ions métalliques, ainsi que la protonation de l'azote de la liaison scissile. Le résidu Glu151 remplace l'ion bicarbonate rencontré dans le mécanisme de la famille M17.

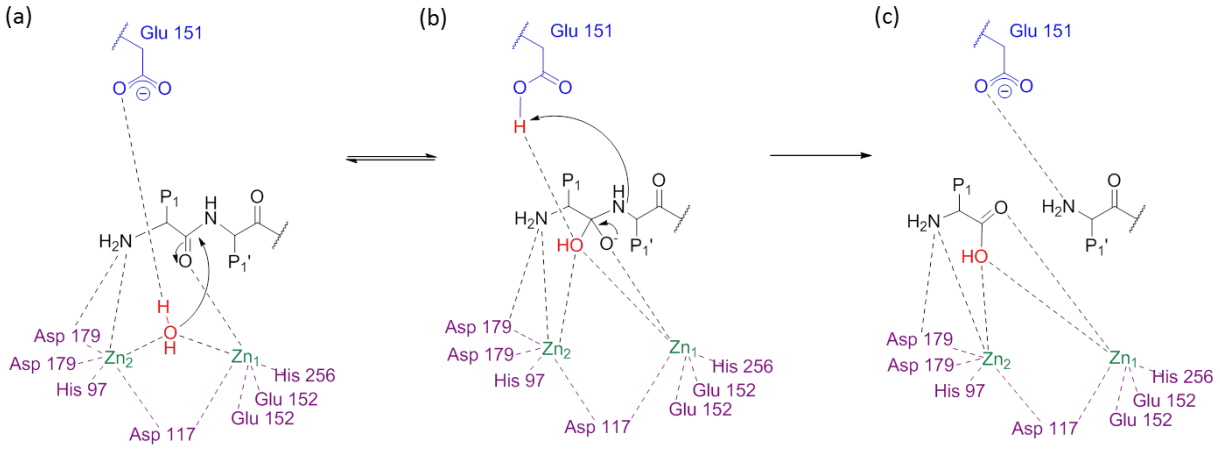


Schéma 4 : mécanisme catalytique proposé pour *AP*aero [91,117]

III- Rôles de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 chez *Plasmodium*

*Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 sont deux cibles intéressantes pour lutter contre le paludisme.

1) Expression, rôle et localisation de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17

D'après des données de protéomique, *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 sont exprimées à divers stades du cycle de développement de *P. falciparum* : au stade sporozoïte, aux stades sanguins mérozoïte, anneau, trophozoïte et schizonte, et au stade gamétocyte pour *Pf*A-M1. [118,119,120] L'expression de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 aux stades sanguins est confirmée par des analyses d'immunofluorescence, de fluorescence sur culture de parasites et par Northern Blot. [102,103,105,115,121]

*Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 jouent un rôle critique dans le cycle de vie parasitaire étant donné que des inhibiteurs comme la bestatine (cf fig. 47, page 55) inhibent *in vitro* la croissance et le développement des espèces de

[118] L. Florens *et al.*, *Nature* **2002**, *419*, 520-526.
[119] E. Lasonder *et al.*, *Nature* **2002**, *419*, 537-542.
[120] E. Lasonder *et al.*, *PLoS Pathogen* **2008**, 4(10), e1000195.
[121] S. Dalal, M. Klemba, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35978-35987.

Plasmodium. [107,115,116,121,122,123] Parmi les rôles les plus étudiés, ces deux aminopeptidases participeraient à la dégradation de l'hémoglobine lors de la phase intra-érythrocytaire. L'hémoglobine est hydrolysée par le parasite en acides aminés libres, indispensables à sa croissance, à la modulation de son environnement osmotique ainsi qu'à l'import d'isoleucine depuis le milieu extracellulaire (cf page 10). Au sein de la vacuole digestive, des endoprotéases de différentes classes vont successivement dégrader les chaînes de globine en oligopeptides (fig. 44) : des protéases à acide aspartique (plasmepsines I, II, IV), des protéases à cystéine (falcipaïnes 2, 2', 3), une protéase histo-aspartique et une métalloprotéase (falcilysine). [124,125,126] Ces oligopeptides sont ensuite hydrolysés en dipeptides par la dipeptidyl aminopeptidase I. [127] Finalement, les dipeptides sont dégradés en acides aminés par les exopeptidases *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17.

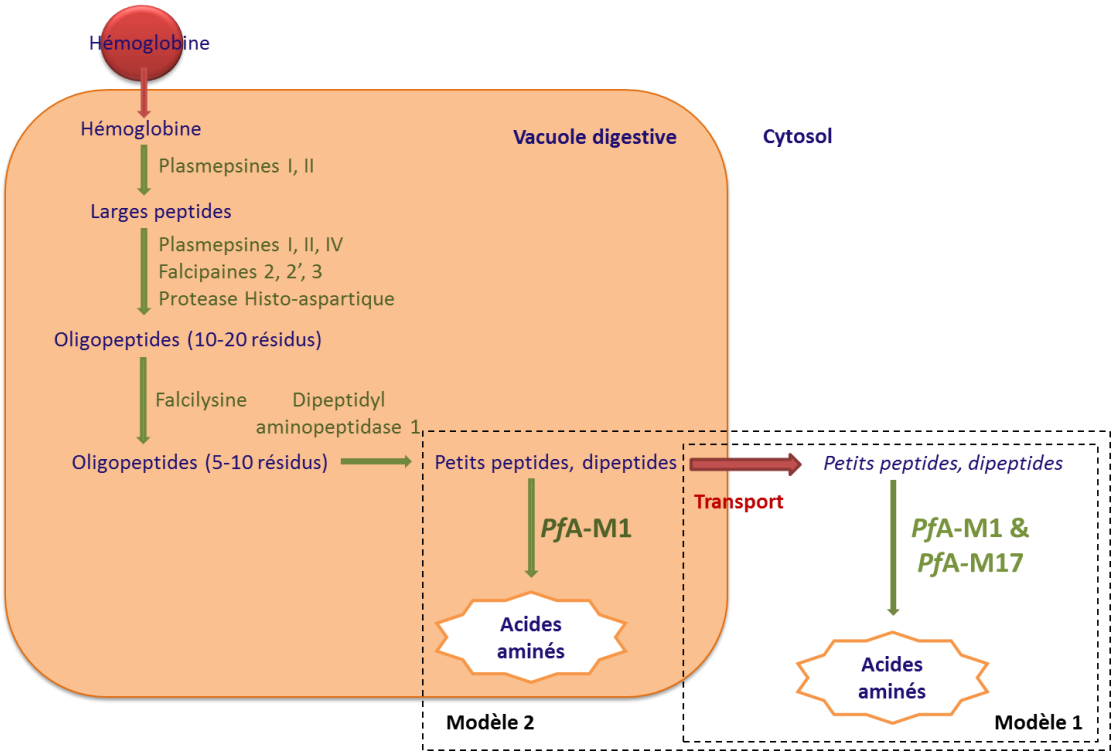


Figure 44 : représentation schématique de la dégradation des chaînes protéiques de l'hémoglobine en acides aminés au sein du parasite

Gavigan *et al.* ont révélé l'existence d'une relation synergique antipaludéenne entre la bestatine (inhibiteur des aminopeptidases le plus connu) et des inhibiteurs d'endoprotéases, ce qui indique que les endoprotéases et les aminopeptidases semblent agir ensemble dans la dégradation de l'hémoglobine. [128] Dans une autre étude, ils ont montré que la dégradation de l'hémoglobine débute au stade anneau de développement du parasite et atteint son maximum au stade trophozoïte, coïncidant avec l'augmentation du niveau d'expression et le pic d'activité de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17. [115,122] De plus, des cultures synchronisées de parasites exposées aux inhibiteurs bestatine et nitrobestatine sont plus susceptibles au stade anneau avancé/trophozoïte qu'aux autres stades intra-érythrocytaires. Des extraits cytosoliques de trophozoïtes ou

[122] C. S. Gavigan *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *117*, 37-48.
[123] M.F. Nankya-Kitaka *et al.*, *Parasitol. Res.* **1998**, *84*, 552-558.
[124] D. E. Goldberg, *Curr. Top. Microbiol.* **2005**, *295*, 275-291.
[125] P. J. Rosenthal, *Int. J. Parasitol.* **2004**, *34*, 1489-1499.
[126] C. E. Murata, D. E. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 38022-38028.
[127] M. Klemba *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 43000-43007.
[128] C. S. Gavigan *et al.*, *Antimicrob. Agents Chem.* **2001**, *45*, 3175-3181.

des aminopeptidases partiellement purifiées dégradent des petits peptides dont la séquence correspond à des produits connus de dégradation de l'hémoglobine. La libération d'acides aminés depuis ces peptides est inhibée par ajout de nitrobestatine. [122]

*Pf*A-M17 a été localisée dans le cytosol du parasite par des méthodes d'immunofluorescence et de fluorescence sur culture de parasites [115], tandis que la localisation de *Pf*A-M1 reste confuse. Des expériences d'immunofluorescence ont suggéré qu'elle est présente dans le cytoplasme et autour de la vacuole digestive. [101,102,105,122] Au contraire, des études d'imagerie sur parasites vivants révèlent que *Pf*A-M1 est présente en abondance dans la lumière de la vacuole digestive et dans le noyau. [121,129] D'autres études proposent que la forme membranaire de *Pf*A-M1 est ancrée dans la membrane de la vacuole digestive avec son domaine catalytique orienté vers le cytosol. [130,131] Enfin, certains proposent qu'elle soit située dans des vésicules proches de la vacuole digestive. [103]

Par conséquent, deux modèles sont proposés pour expliquer la participation des aminopeptidases *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 à la dégradation de l'hémoglobine (fig. 44). [121,122,129,132]

- Le premier modèle suppose que l'hémoglobine soit dégradée dans la vacuole digestive en oligopeptides et dipeptides, transportés vers le cytosol du parasite où ils sont hydrolysés en acides aminés par des exopeptidases, incluant *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17. Plusieurs études supportent cette hypothèse : Kolakovitch *et al.* ont montré que les premières étapes de dégradation de l'hémoglobine qui ont lieu dans la vacuole digestive génèrent des petits peptides mais pas d'acides aminés libres. [132] De plus, aucune activité exopeptidase n'a pu être détectée dans la vacuole digestive. Au contraire, l'activité aminopeptidase d'extraits cytosoliques génère des acides aminés libres à partir de peptides dérivés de l'hémoglobine. [122,132] Ce premier modèle est également soutenu par le fait que le pH optimum d'activité de *Pf*A-M1 est neutre et qu'au pH de la vacuole digestive (pH 4.5-5.5), l'activité catalytique de *Pf*A-M1 est largement diminuée. [105] Pour être en accord avec ce modèle, *Pf*A-M1 serait localisée dans le cytosol et/ou ancrée dans la membrane de la vacuole digestive avec le domaine catalytique orienté vers le cytosol. L'export des dipeptides et petits peptides vers le cytosol n'a pas encore été mis en évidence expérimentalement.

- Le second modèle propose que la dégradation de l'hémoglobine en acides aminés libres ait lieu à la fois dans la vacuole digestive et dans le cytosol (fig. 44). *Pf*A-M1 participerait aux étapes finales d'hydrolyse de l'hémoglobine dans la vacuole digestive et *Pf*A-M17, clairement exclue de cette organelle, agirait dans le cytosol. [107,121,129] Les arguments en faveur de ce modèle sont : (i) la localisation de *Pf*A-M1 au niveau de la lumière de la vacuole digestive [121,129], ii) enrichissement de l'activité de *Pf*A-M1 dans les extraits de vacuole digestive par rapport aux extraits de trophozoïtes [121], iii) gonflement de la vacuole digestive par traitement avec un inhibiteur spécifique de *Pf*A-M1 [107].

Par ailleurs, *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 sont présents à d'autres stades parasitaires que celui de dégradation de l'hémoglobine (mérozoïte et schizonte pour *Pf*A-M17 ; mérozoïte, schizonte et gamétocyte pour *Pf*A-M1), ce

[129] D. Ragheb *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 27255-27265.
[130] T. S. Skinner-Adams *et al.*, *Trends in Biochemical Sciences* **2010**, *35*, 53-61.
[131] J. C. Whisstock *et al.*, *PNAS* **2009**, *106*, e56.
[132] K. A. Kolakovich *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *87*, 123-135.

qui laisse penser que ces deux aminopeptidases ont des fonctions supplémentaires distinctes de leur fonction d'hémoglobinase.

2) *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17, protéines essentielles au développement du parasite

Les parasites ne survivent pas aux tentatives de *knock-out* sur le gène de *Pf*A-M1 ou sur le gène de *Pf*A-M17, ce qui suggère qu'une perte de l'une ou l'autre de ces protéines est un inconvénient majeur pour le parasite lors de son développement. [121] Nous ne pouvons pas en conclure que ces gènes sont essentiels pour la croissance et la survie du parasite. Cependant des gènes codant pour des protéines non-essentielles peuvent être totalement invalidés par cette approche et donnent des parasites viables. Des exemples incluent deux des falcipaïnes et les quatre plasmepsines. [133,134]

Bien que les inhibiteurs décrits dans la littérature ne soient pas sélectifs de *Pf*A-M1 et de *Pf*A-M17, les résultats suivants suggèrent que la fonction de ces aminopeptidases est essentielle pour le cycle de développement du parasite.

Des inhibiteurs de *Pf*A-M1 et de *Pf*A-M17 (bestatine et dérivés, analogue de dipeptide phosphinate) ont un effet antipaludéen *in vitro* sur des cultures de *P. falciparum*, sensibles ou résistantes à la chloroquine. [105,106,107,122,123,135] L'inhibition de *Pf*A-M1 par l'inhibiteur BTA (K_i (*rPf*A-M1) = 260 nM ; K_i (*rPf*A-M17) = 4000 nM) entraîne le gonflement de la vacuole digestive et la mort des parasites à la transition trophozoïte/schizonte (fig. 45). [107] L'inhibition de *Pf*A-M17 par l'inhibiteur PNAP (K_i (*rPf*A-M17) = 29 nM ; K_i (*rPf*A-M1) = 330 nM) provoque la mort prématurée des parasites à la transition anneau/trophozoïte (fig. 45).

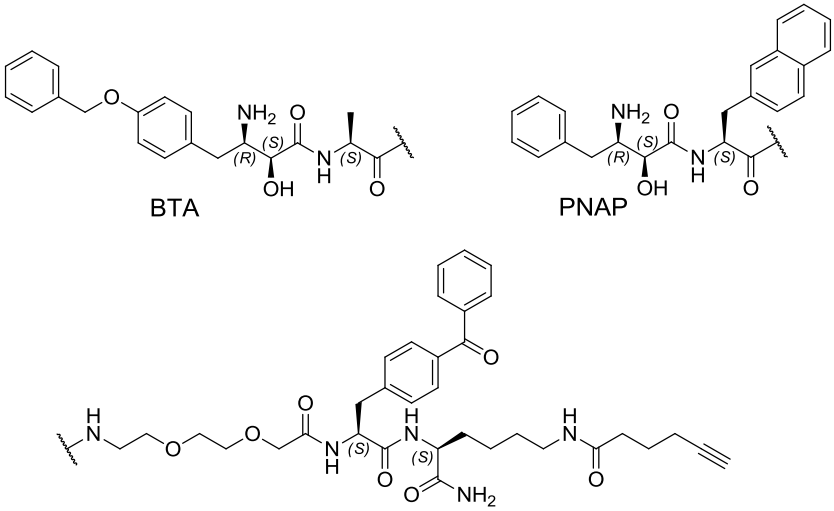


Figure 45 : structure des inhibiteurs BTA et PNAP

L'inhibition de *Pf*A-M1 et de *Pf*A-M17 a également un effet antipaludéen *in vivo* : le blocage de leur activité par un analogue synthétique de dipeptide phosphinate (homophénylalanine-P[CH_2]Phénylalanine, fig. 49, page 58) réduit de 92% la parasitémie dans un modèle murin infecté par *P. chabaudi chabaudi.* [105,135,136]

[133] P. S. Sijwali *et al.*, *PNAS* **2004**, *101*, 8721-8276.
[134] A. L. Omara-Opyene *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 54088-54096.
[135] T. S. Skinner-Adams *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6024-6031.
[136] J. Grembecka *et al.*, *J. Med. Chem.* **2003**, *46,* 2641-2655.

Il est aussi important de noter que la toxicité de la bestatine est réduite dans des parasites transgéniques surexprimant *Pf*A-M17. [137]

La spécificité de substrat restreinte de *Pf*A-M17 pour la leucine laisse penser que *Pf*A-M17 a un rôle spécialisé au sein du parasite et que la leucine est importante pour la croissance du parasite. En effet, la digestion de l'hémoglobine produit de grandes quantités de leucine, qui serait échangée contre l'isoleucine extracellulaire, le parasite étant incapable de la synthétiser. [22] Bien que l'isoleucine soit l'un des acides aminés les plus abondants des protéines du parasite [138], c'est le seul acide aminé absent de l'hémoglobine humaine. Ainsi, il est supposé que *Pf*A-M17 a une fonction critique dans la génération d'un réservoir intracellulaire de leucine, nécessaire au parasite pour obtenir l'isoleucine du milieu extracellulaire. [130] Cette fonction serait différente de celle de *Pf*A-M1. [107]

De plus, étant donné que *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 sont codées par des gènes existant en une seule copie et qu'aucune autre aminopeptidase neutre n'a été détectée chez *P. falciparum*, ces deux enzymes ne présentent pas de redondance fonctionnelle, à l'inverse des endoprotéases de la vacuole digestive. [134,139] Tous ces résultats indiquent que *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 sont deux cibles prometteuses pour le développement d'une nouvelle classe d'agents antipaludéens. [130,140]

[137] D. L. Gardiner *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2006,** 281, 1741-1745.
[138] N. Nirmalan *et al.*, *Mol. Microbiol.* **2004**, *52*, 1187-1199.
[139] J. Liu *et al.*, *PNAS* **2006**, *103*, 8840-8845.
[140] J. González-Bacerio *et al.*, *Curr. Drug Targets* **2014***, 15,* 1144-1165.

Chapitre 3

Inhibiteurs de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 et travaux antérieurs menés au laboratoire

I- Les inhibiteurs de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17

1) Mimes partiels de l'intermédiaire tétraédrique

2) Chélatant des métaux

II- Recherche antérieure aux travaux de thèse

1) Aminopeptidases monométalliques : des inhibiteurs de l'APN de mammifères à l'inhibition de *Pf*A-M1

2) Inhibiteurs de métallo-aminopeptidases bimétalliques

III- Conception d'inhibiteurs de *Pf*A-M17

I- Les inhibiteurs de *Pf*A-M1 et de *Pf*A-M17

Compte tenu du caractère prometteur de *Pf*A-M1 et de *Pf*A-M17 comme cibles antipaludéennes, la conception rationnelle d'inhibiteurs puissants et sélectifs de ces deux aminopeptidases est d'un intérêt considérable. Il faut distinguer deux objectifs : (i) synthétiser des inhibiteurs sélectifs de chaque aminopeptidase en tant qu'outil pour une meilleure compréhension du rôle biologique de chaque aminopeptidase ; (ii) synthétiser des inhibiteurs ciblant l'une ou l'autre, ou les deux aminopeptidases parasitaires sélectivement vis-à-vis des aminopeptidases humaines pour un potentiel traitement antipaludéen.

Deux grandes approches sont généralement utilisées pour concevoir des inhibiteurs d'enzymes protéolytiques. La première consiste en l'incorporation d'un isostère non-hydrolysable de la liaison amide ou de l'intermédiaire tétraédrique formé lors de l'hydrolyse de cette liaison (fig. 46). [141] La partie 1) développée ci-dessous présente les principaux exemples pour l'inhibition de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17.

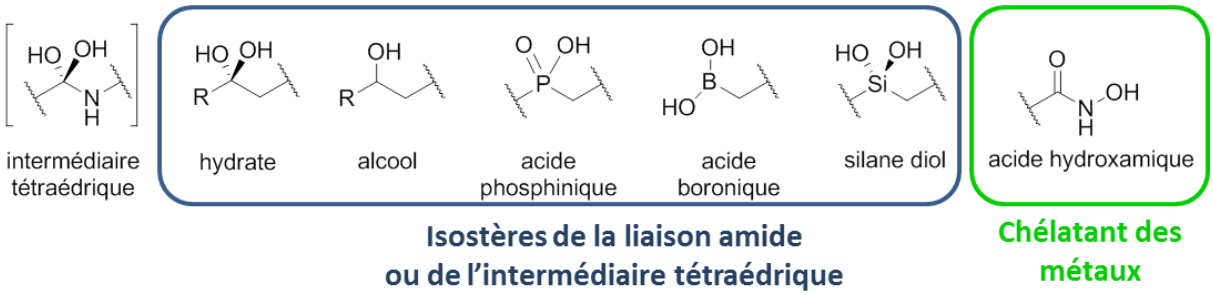


Figure 46 : isostères de la liaison amide ou de l'intermédiaire tétraédrique ; chélatant des métaux

La seconde approche consiste en l'incorporation d'un motif chélatant les ions métalliques dans un châssis moléculaire plus ou moins peptidique (fig. 46). La partie 2) développée ci-dessous montre les principaux exemples de ce type d'inhibiteurs.

L'existence de différentes familles de métallo-aminopeptidases, ayant des spécificités de substrats proches ainsi que des mécanismes catalytiques semblables, représente une difficulté pour la conception d'inhibiteurs sélectifs d'une aminopeptidase donnée. Parmi les composés décrits à ce jour, peu présentent une sélectivité intéressante.

[141] A. Mucha *et al.*, *Biochimie* **2010**, *92*, 1509-1529.

1) Mimes partiels de l'intermédiaire tétraédrique

Bestatine et dérivés

La bestatine, l'amastatine et la probestine sont des substances naturelles isolées de bactéries du genre *Streptomyces*, qui se sont avérées être des inhibiteurs compétitifs de métallo-aminopeptidases de plusieurs familles (tabl. 5). [142,143,144,145,146,147,148] Ce sont des analogues partiels de l'intermédiaire tétraédrique formé au cours de la réaction catalytique.

La bestatine est un analogue du dipeptide Phe-Leu avec un groupement hydroxyle entre le carbonyle et le carbone α de la phénylalanine. La bestatine se lie aux aminopeptidases de manière compétitive et réversible. Elle est plus active sur les enzymes à deux ions métalliques car la fonction hydroxyle de la bestatine se positionne entre les deux ions métalliques (tabl. 5).

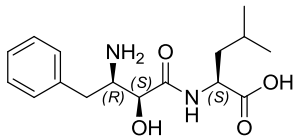
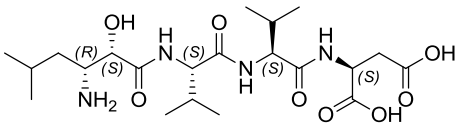
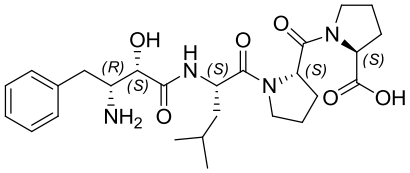
Composés	K_i (µM)					IC_{50} (µM)
	1 ion zinc		2 ions zinc			
	APN porcine	*rPf*A-M1	*rPf*A-M17	LAP porcine	*AP*aero	Culture parasites
Bestatine 	3.5	0.478 (ref. 105)	0.025 (ref. 135)	0.009 (ref. 141)	0.0015 (ref. 145)	8-14 *P. falciparum* 3D7 (ref. 135)
Amastatine 	0.05	nd	nd	0.03 (ref. 145)	0.0003 (ref. 145)	>64 *P. chabaudi chabaudi* (ref. 123)
Probestine 	0.02	nd	nd	0.06	>100	nd

Tableau 5 : inhibition des métallo-aminopeptidases par la bestatine, l'amastatine et la probestine (constante d'inhibition K_i et concentration du composé inhibant 50% de l'effet observé IC_{50}) ; 3D7 : souche sensible à la chloroquine ; nd : non déterminé

[142] H. Umezawa *et al.*, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 97-99.
[143] H. Suda *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *177*, 196-200.
[144] T. Aoyagi *et al.*, *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 636-638.
[145] S. H. Wilkes, J. M. Prescott, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 13154-13162.
[146] T. Aoyagi *et al.*, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 143-148.
[147] Small Molecular Immunomodifiers of Microbial Origin: Fundamental and Clinical Studies of Bestatin, H. Umezawa, *Japan Scientific Press*, **1981**, 1-254.
[148] S. K. Burley *et al.*, *PNAS* **1991**, *88*, 6916-6920.

Le mode de liaison de la bestatine à *Pf*A-M1 et à *Pf*A-M17 est présenté figure 47. Sa fixation aux sites actifs est similaire à celle d'un substrat peptidique : l'amine primaire de la bestatine interagit avec le résidu Glu463 du motif GAMEN chez *Pf*A-M1 et avec l'ion Zn2 chez *Pf*A-M17. Le carbonyle se lie à l'ion métallique (Zn1 dans le cas de *Pf*A-M17). Le groupement hydroxyle occupe quant à lui la place de la molécule d'eau (agent nucléophile) : il se lie au(x) zinc(s) et forme une liaison hydrogène avec le résidu acide glutamique catalytique. Par ailleurs, le phényle en position N-terminale de la bestatine se dirige dans le sous-site S1 et forme des interactions π avec des résidus aromatiques (tyrosine pour *Pf*A-M1, phénylalanines pour *Pf*A-M17).

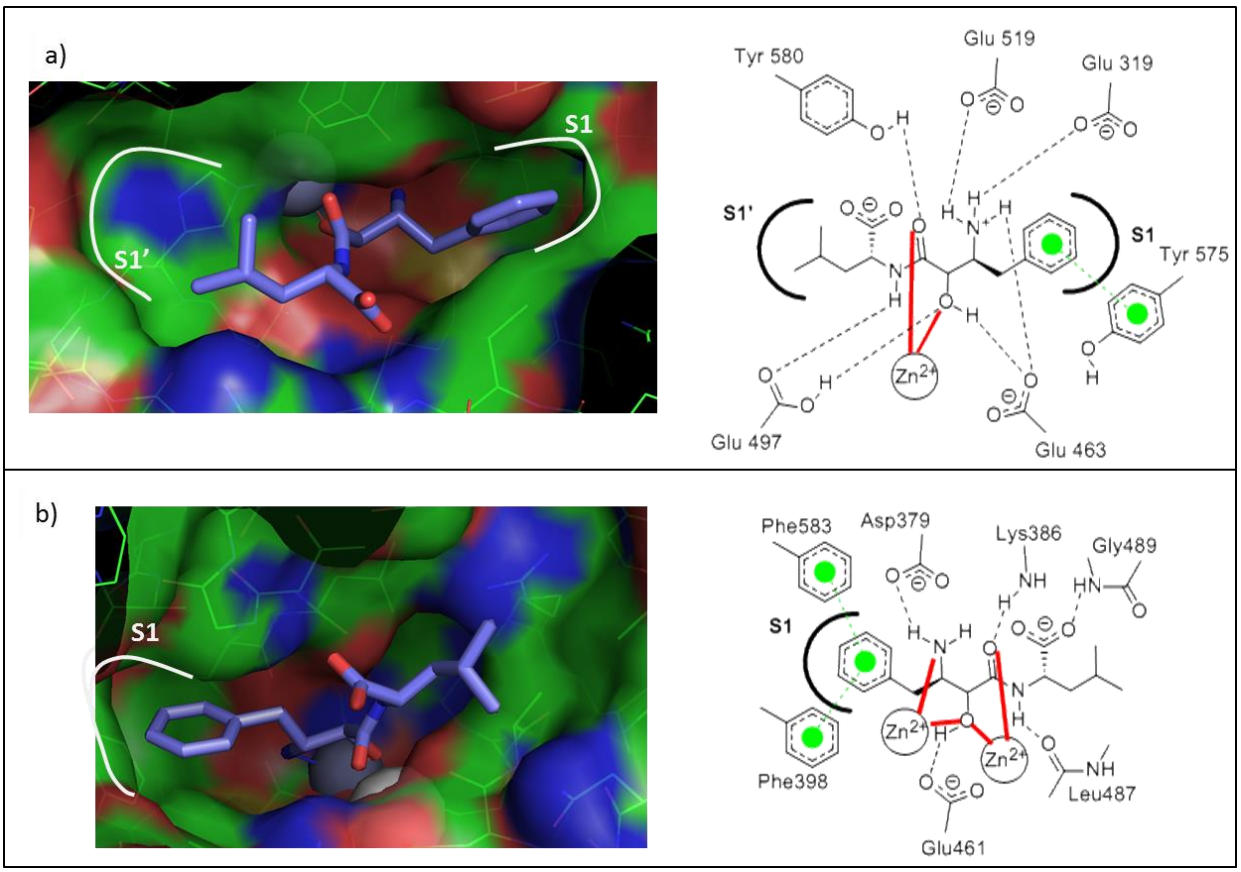


Figure 47 : a) représentation du complexe *Pf*A-M1/bestatine (PDB 3EBH) et mode de liaison schématique ; b) représentation du complexe *Pf*A-M17/bestatine (PDB 3KR4) et mode de liaison schématique ; ions métalliques sphères grises

Dérivés acides boroniques

Les acides boroniques en tant qu'inhibiteurs d'aminopeptidases ont été décrits en premier par Baker *et al.* pour la leucine aminopeptidase d'*Aeromonas proteolytica*. [149,150,151] Des dérivés aliphatiques simples étaient utilisés comme inhibiteurs compétitifs, analogues de l'intermédiaire tétraédrique de la réaction d'hydrolyse se liant efficacement au site actif de l'aminopeptidase (fig. 48 et tabl. 6). Depuis des séries α-amino acides boroniques ont été synthétisées afin d'améliorer l'affinité du ligand pour les leucyl aminopeptidases. [152] Des études cinétiques révèlent une interaction lente et en deux étapes. Il est supposé que l'étape lente corresponde à la formation d'un anion boronate tétraédrique depuis l'acide boronique trigonal.

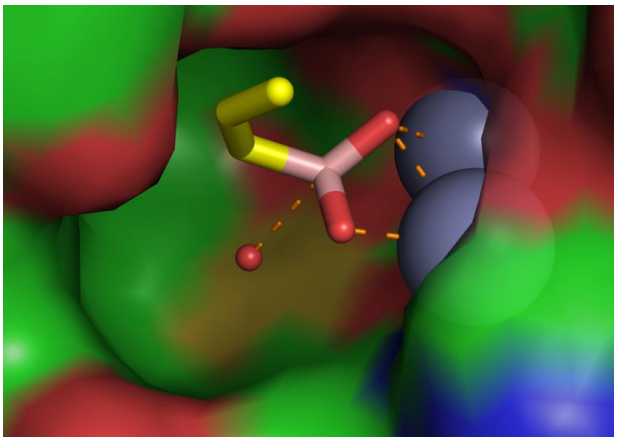


Figure 48 : représentation du complexe *AP*aero/1-butane acide boronique (PDB 1CP6) ; ions métalliques et molécule d'eau sphères grises et rouge respectivement

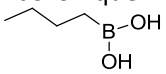
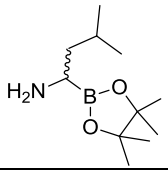
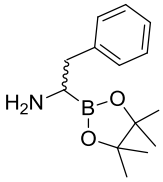
Composés	K_i (µM)		
	1 ion zinc	2 ions zinc	
	APN porcine	LAP humaine	*AP*aero
1-butane acide boronique 	nd	nd	9.6 (ref. 151)
Leu-B(OH)$_2$-pinacol 	0.025 (ref. 141)	0.13 (ref. 141)	nd
Phe-B(OH)$_2$-pinacol 	0.020 (ref. 141)	0.050 (ref. 141)	nd

Tableau 6 : inhibition des métallo-aminopeptidases par des dérivés d'acide boronique (constante d'inhibition K_i) ; nd : non déterminé

[149] J. O. Baker *et al.*, *Biochemistry* **1983**, *22*, 2098-2103.
[150] J. O. Baker *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1985**, *130*, 1154-1160.
[151] C. C. De Paola *et al.*, *Biochemistry* **1999**, *38*, 9048-9053.
[152] A. B. Shenvi, *Biochemistry* **1986**, *25*, 1286-1291.

Dérivés acides phosphiniques

Certains dérivés d'acide phosphinique sont des inhibiteurs compétitifs puissants des aminopeptidases des familles M1 et M17 (tabl. 7). [105,116,135,136,153] Les groupes phosphonates et phosphinates ont un fort pouvoir chélatant sur les métaux et leur forme tétraédrique mime l'intermédiaire géminal diol formé lors de la réaction d'hydrolyse. Les chaînes latérales P1 et P1' des analogues pseudopeptides phosphiniques donnent des possibilités d'optimisation des substituants interagissant avec les sous-sites S1 et S1' des enzymes.

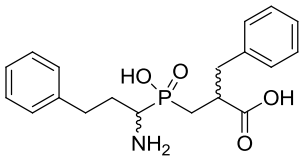
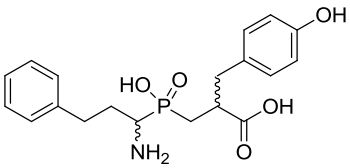
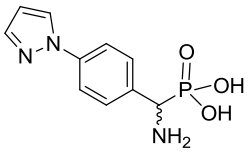
Composés	K_i (µM)				IC_{50} (µM)
	1 ion zinc		2 ions zinc		
	APN porcine	*rPf*A-M1	*rPf*A-M17	LAP porcine	Souche *P. falciparum* 3D7
hPheP[CH_2]Phe (Co-4) 	0.276 (ref. 136)	0.079 (ref. 105)	0.013 (ref. 135)	0.066 (ref. 136)	24-62 (ref. 135)
hPheP[CH_2]Tyr (Co-5) 	0.036 (ref. 136)	nd	0.010 (ref. 135)	0.067 (ref. 136)	19-28 (ref. 135)
	nd	104 (ref. 153)	0.011 (ref. 153)	nd	nd

Tableau 7 : inhibition des métallo-aminopeptidases par des dérivés d'acide phosphinique (constante d'inhibition K_i et concentration du composé inhibant 50% de l'effet observé IC_{50}) ; souche 3D7 : sensible à la chloroquine ; nd : non déterminé

Le composé le plus intéressant est l'analogue du dipeptide phosphinate homoPhe-P[CH_2]Phe, noté Co-4. [105,116,135,136] Il réduit modérément la croissance *in vitro* de cultures de *P. falciparum* sensibles (IC_{50} 24-62 µM) et résistantes à la chloroquine (IC_{50} 20-40 µM). Cependant l'administration de Co-4 à un modèle murin infecté par *P. chabaudi chabaudi* réduit de 92% la parasitémie (100 mpk IP, deux fois par jour pendant sept jours). [135] Son mode de liaison aux sites actifs de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17, présenté figure 49, est analogue à celui de la bestatine.

[153] K. K. Sivaraman *et al.*, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5213-5217.

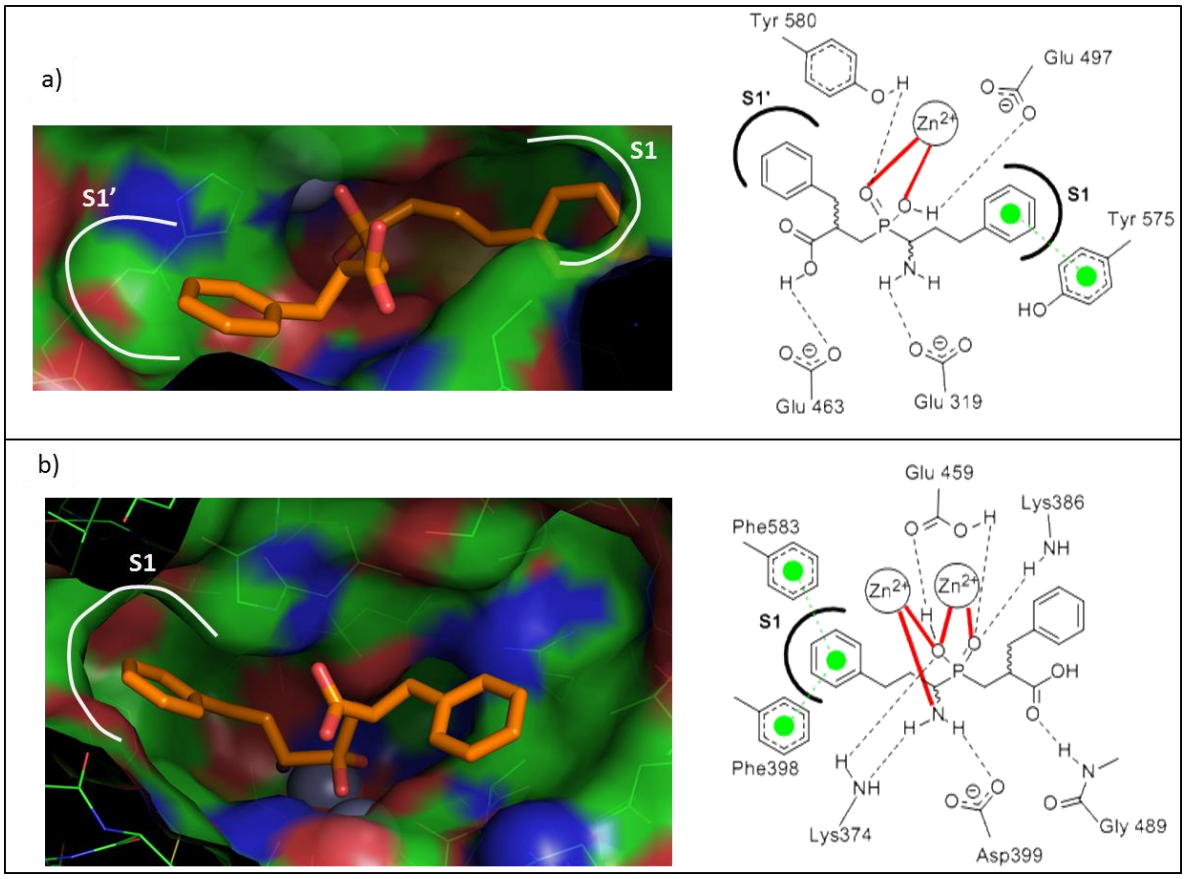


Figure 49 : a) représentation du complexe *Pf*A-M1/Co-4 (PDB 3EBI) et mode de liaison schématique ; b) représentation du complexe *Pf*A-M17/Co-4 (PDB 3KR5) et mode de liaison schématique ; ions métalliques sphères grises

Dérivés silanes diols

Les analogues de dipeptides incorporant une fonction silane diol sont de puissants inhibiteurs de métalloprotéases et de protéases à acide aspartique. Le motif silane diol mime l'intermédiaire géminal diol formé lors de la réaction d'hydrolyse de la liaison peptidique. Il est également capable de chélater les ions métalliques. Par exemple, le composé représenté figure 50 possède une très bonne activité sur la thermolysine (0.041 µM). [154]

Par rapport aux dérivés acides phosphiniques et acides hydroxamiques, ces composés ont l'avantage d'être neutres au pH physiologique et de disposer d'une perméabilité plus élevé, d'où une meilleure biodisponibilité.

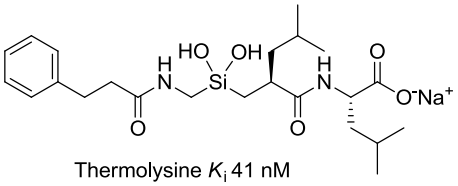


Figure 50 : structure et activité d'un dérivé silane diol

[154] J. Kim *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3625-3627.

2) Chélatant des métaux

Dérivés acides hydroxamiques

Un acide hydroxamique peut être considéré comme un analogue d'acide carboxylique et d'amide, combinant ainsi les caractéristiques des deux groupements. De plus, le groupement hydroxamate est un bon chélatant, plan et bidentate, des ions métalliques. Les analogues acides hydroxamiques maloniques Co-57 et Co-66 sont des inhibiteurs puissants des enzymes de la famille M1 dont *Pf*A-M1 (tabl. 8). [155] Cependant leur activité *in vitro* sur cultures de *P. falciparum* est faible et reste de l'ordre des activités obtenues avec les inhibiteurs décrits dans les parties précédentes. [156]

Le composé CHR-2863 est un analogue du tosedostat, puissant inhibiteur d'aminopeptidases de mammifères actuellement en phase clinique II pour le traitement de leucémie myéloïde aiguë (tabl. 8). [157,158] Le composé CHR-2863 inhibe les deux aminopeptidases *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 et est plus actif *in vitro* sur cultures de *P. falciparum* que les inhibiteurs décrits dans les parties précédentes. Il présente également une bonne activité *in vivo* : son administration par voie orale a permis une réduction significative de la parasitémie dans un modèle murin de *P. chabaudi chabaudi*. [157]

Le tosedostat a des activités inhibitrices comparables au composé CHR-2863 sur *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17, K_i 6.0 µM et K_i 0.079 µM, respectivement (tabl. 8). Le mode de liaison de la forme acide du tosedostat aux sites actifs de *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17 est présenté figure 51 (a et b). La tête hydroxamique chélate directement le/les métaux, ce qui conduit à un mode de liaison original avec *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17. Il y a finalement très peu d'interactions avec les sous-sites S1 ou S1'.

[155] M. Flipo *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, *50,* 1322-1334.
[156] R. Deprez-Poulain *et al.*, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10909-10917.
[157] T. S. Skinner-Adams *et al.*, *Antimicrob. Agents Ch.* **2012**, *56*, 3244-3249.
[158] N. Drinkwater *et al.*, *Proteins* **2015**, *83*, 789-795.

Composés	IC_{50} (µM)				
	1 ion zinc		2 ions zinc	Souche *P. falciparum* sensible à la chloroquine	Souche *P. falciparum* résistante à la chloroquine
	APN porcine	*Pf*A-M1	*rPf*A-M17		
acide malonique hydroxamique (Co-57)	3.6 (ref. 155)	0.027 (ref. 155)	nd	57 Souche F32 (ref. 155)	59 Souche Fcb1 (ref. 155)
acide malonique hydroxamique (Co-66)	1.4 (ref. 155)	0.006 (ref. 155)	nd	13 Souche F32 (ref. 155)	24 Souche Fcb1 (ref. 155)
dérivé du Tosedostat (CHR-2863)	nd	1.4* (K_i µM) (ref. 157)	0.076* (K_i µM) (ref. 157)	0.370 (ref. 157)	nd
acide hydroxamique (7)	nd	0.8* (K_i µM) (ref. 159)	0.03* (K_i µM) (ref. 159)	0.783 Souche 3D7 (ref. 159)	nd

Tableau 8 : inhibition des métallo-aminopeptidases par des dérivés acides hydroxamiques (constante d'inhibition K_i) ; concentration du composé inhibant 50% de l'effet observé IC_{50}) ; * : enzyme recombinante ; nd : non déterminé

L'acide hydroxamique 7 inhibe efficacement *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17. Son mode de liaison avec ces deux aminopeptidases est présenté figure 51 (c et d) et diffère de celui décrit pour la forme acide du tosedostat.[159] L'acide hydroxamique chélate le ou les ions métalliques, le motif 4-(1H-pyrazol-1-yl)phényle occupe la poche S1 des deux aminopeptidases alors que le motif NHBoc occupe la poche S1' et va vers le solvant pour *Pf*A-M1 et *Pf*A-M17, respectivement.

[159] S. N. Mistry *et al.*, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9168-9183.

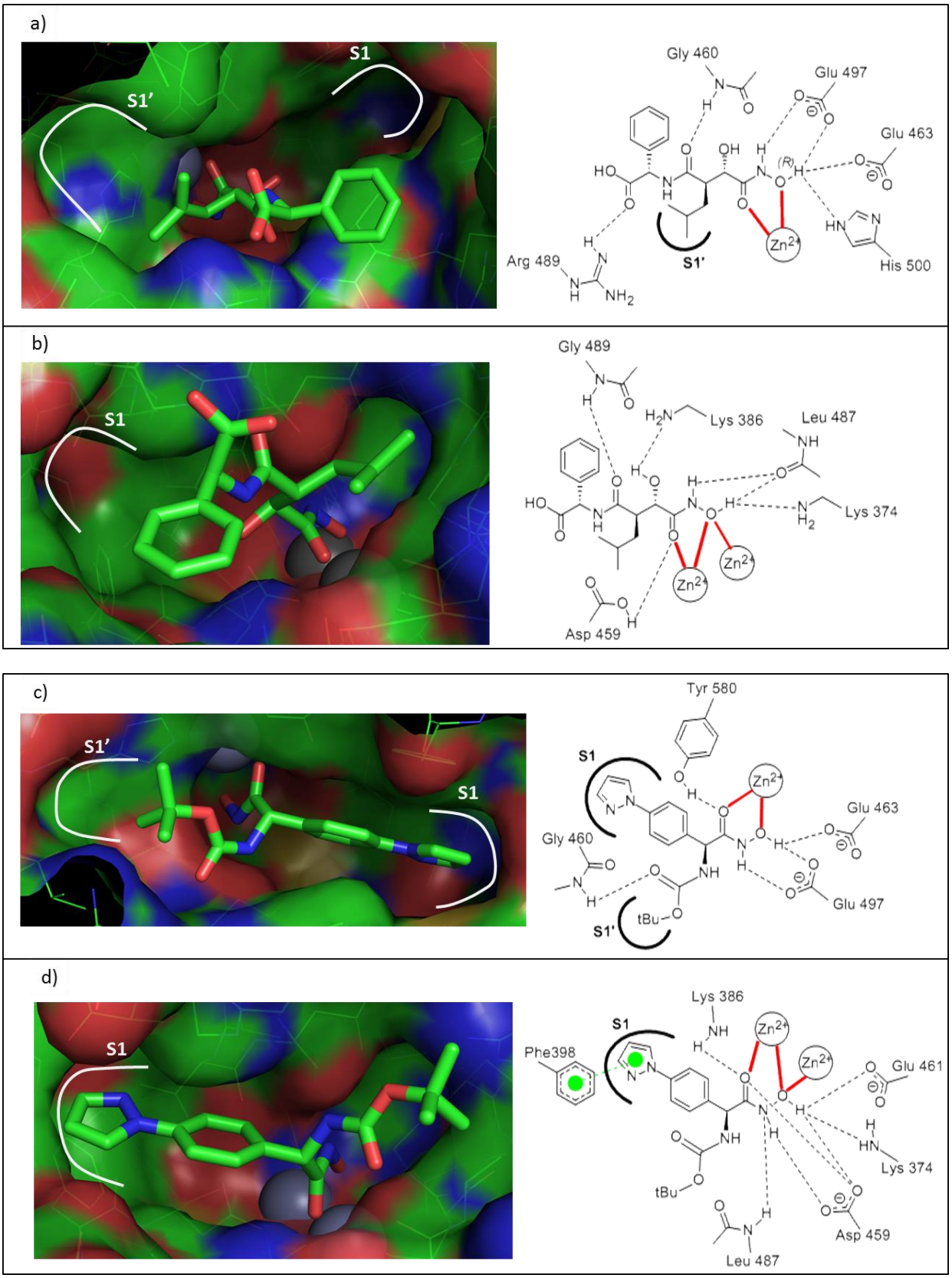


Figure 51 : a) représentation du complexe *Pf*A-M1/forme acide du tosedostat (PDB 4X2U) et mode de liaison schématique ; b) représentation du complexe *Pf*A-M17 /forme acide du tosedostat (PDB 4X2T) et mode de liaison schématique ; c) représentation du complexe *Pf*A-M1/acide hydroxamique 7 (PDB 4R5T) et mode de liaison schématique ; d) représentation du complexe *Pf*A-M17/acide hydroxamique 7 (PDB 4R6T) et mode de liaison schématique ; ions métalliques sphères grises

Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse à la synthèse d'inhibiteurs de métallo-aminopeptidases.

II- Recherche antérieure aux travaux de thèse

1) Aminopeptidases monométalliques : des inhibiteurs de l'APN de mammifères à l'inhibition de *Pf*A-M1

Les travaux du laboratoire se sont concentrés ces dernières années sur la conception, la synthèse et l'évaluation de dérivés amino-tétralones pour l'inhibition sélective de l'APN humaine ([EC.3.4.11.2]). [160] L'APN est une cible thérapeutique en oncologie et est notamment impliqué lors de l'angiogenèse tumorale. La 3-amino-2-tétralone **2** est un inhibiteur puissant et sélectif de l'APN de mammifères (K_i 0.5 µM), cependant elle est instable en solution aqueuse à pH physiologique (aromatisation) (tabl. 9). Plusieurs séries de dérivés amino-tétralone ont alors été synthétisées afin d'améliorer sa stabilité. L'étude de l'influence de la taille du cycle **B** a permis de mettre au jour le composé 7-amino-6-benzosubérone **3** présentant non seulement une meilleure stabilité, mais également une activité et une sélectivité comparable à celle de la 3-amino-2-tétralone (tabl. 9). [161]

Les études suivantes ont consisté à substituer ce composé tête de série afin d'augmenter l'affinité avec l'APN de mammifères. Cette étude SAR a conduit au 1-bromo-4-phényl-tétrahydro-7-amino-benzocycloheptèn-6-one **4**, composé le plus puissant à ce jour sur l'APN de mammifères (tabl. 9). [162] Le laboratoire s'est alors intéressé à moduler les substituants en position 1 et 4 afin d'améliorer les propriétés physicochimiques et les propriétés ADME des composés aminobenzosubérones tout en maintenant une puissante activité et sélectivité sur l'APN de mammifères. [163]

Les travaux de recherche du laboratoire sur l'APN de mammifères ont permis d'acquérir des informations cristallographiques essentielles à la compréhension des relations structure-activité de notre famille de ligands sur les aminopeptidases de la famille M1. Les acides aminés essentiels à l'activité catalytique étant très conservés au sein de la famille M1, nous avons décidé de cibler l'aminopeptidase plasmodiale *Pf*A-M1 avec ces mêmes composés. Le lancement de ce projet a été conforté par les activités intéressantes obtenues pour des molécules non optimisées sur des cultures de parasites résistants à la chloroquine (tabl. 9).

La conception, la synthèse et l'évaluation biologique des composés de type aminobenzosubérone pour l'inhibition sélective de *Pf*A-M1 ont été étudiées par Germain Revelant (post doctorant ; ANR MAMMAMIA). [164]

[160] S. Albrecht *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *147*, 7241-7257.
[161] S. Albrecht *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1434-1449.
[162] C. Maiereanu *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5716-5733.
[163] G. Revelant *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 3192-3207.
[164] B. Chaillou *et al.*, *L'Actualité Chimique* **2014**, *390*, 53-57.

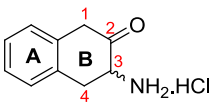
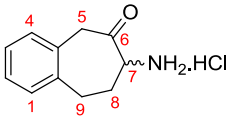
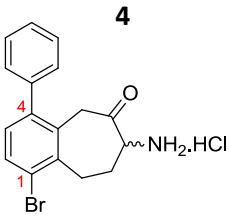
Composés	K_i (µM)				IC_{50} (µM)
	1 ion zinc		2 ions zinc		
	APN porcine	LTA_4H	LAP bovine	*AP*aero	**Souche Fcb1 *P. falciparum***
2 	**0.5**	> 1000	120	130	nd
3 	**1.0**	> 1000	> 1000	900 (IC_{50} µM)	**20**
4 	**0.00006**	nd	71	39	**22**

Tableau 9 : inhibition de métallo-aminopeptidases et des parasites par les composés 2-4 (constante d'inhibition K_i et IC_{50}) ; APN : aminopeptidase neutre, LTA4H : leukotriene A4 hydrolase, LAP : leucyl aminopeptidase, APaero : aminopeptidase d'Aeromonas proteolityca ; souche Fcb1 : souche résistante à la chloroquine ; nd : non déterminé

2) Inhibiteurs de métallo-aminopeptidases bimétalliques

En parallèle des travaux sur l'APN de mammifères, le laboratoire s'est intéressé à la conception d'inhibiteurs sélectifs des métallo-aminopeptidases à deux ions métalliques. En s'inspirant de la bestatine, inhibiteur nanomolaire de ce type d'aminopeptidase, le motif bidentate du châssis moléculaire aminobenzosubérone a été modifié en un motif tridentate, pouvant potentiellement chélater deux ions métalliques formant une unité co-catalytique.

Plusieurs benzocycloheptanes trisubstitués ont été synthétisés et évalués sur l'APN de mammifères et *AP*aero (tabl. 10). [165] Ces essais ont permis de révéler le composé 8-amino-7-hydroxy-5,7,8,9-tétrahydrobenzocycloheptèn-6-one **1** en tant qu'inhibiteur puissant et sélectif de notre enzyme modèle à deux ions métalliques vis-à-vis de l'aminopeptidase à un ion métallique APN.

Comme illustré dans le chapitre précédent, les sites actifs de *Pf*A-M17 et d'*AP*aero ainsi que les mécanismes catalytiques proposés pour ces deux métallo-aminopeptidases à deux ions métalliques présentent de grandes similitudes. Nous avons ainsi envisagé de cibler l'aminopeptidase plasmodiale *Pf*A-M17 avec des analogues du composé **1**.

Mes travaux de thèse se sont alors portés sur la conception, la synthèse et l'évaluation biologique des composés de type benzocycloheptane trisubstitué pour l'inhibition sélective de *Pf*A-M17.

[165] M. Al-Lakkis-Wehbe *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6447-6455.

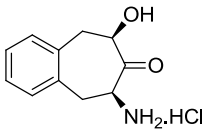
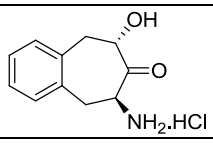
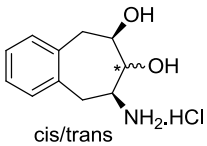
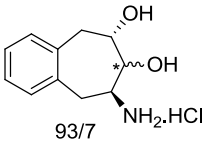
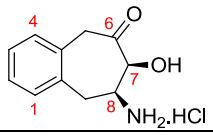
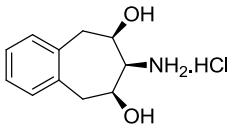
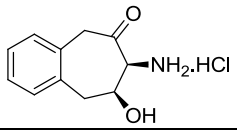
Composés	K_i (µM)	
	1 ion zinc	2 ions zinc
	APN porcine	***AP*aero**
5 	>100 (IC_{50} µM)	**4**
6 	42	**24**
7  cis/trans 60/40	380	**500**
8  93/7	>1000 (IC_{50} µM)	**500**
1 	>1000 (IC_{50} µM)	**0.01**
9 	>1000 (IC_{50} µM)	**78**
10 	>1000 (IC_{50} µM)	**>1000 (IC_{50} µM)**

Tableau 10 : inhibition de métallo-aminopeptidases par les composés 1 et 5-10 (constante d'inhibition K_i et IC_{50}) ; tous les composés ont été évalués en mélanges racémiques ; *APN : aminopeptidase neutre, APaero : aminopeptidase d'Aeromonas proteolityca*

III- Conception d'inhibiteurs de *Pf*A-M17

En s'inspirant du mode de liaison de la bestatine au site actif de *Pf*A-M17 représenté figure 52, nous avons conçu des analogues cyclisés non-peptidiques de la bestatine, de type benzocycloheptane trisubstitué.

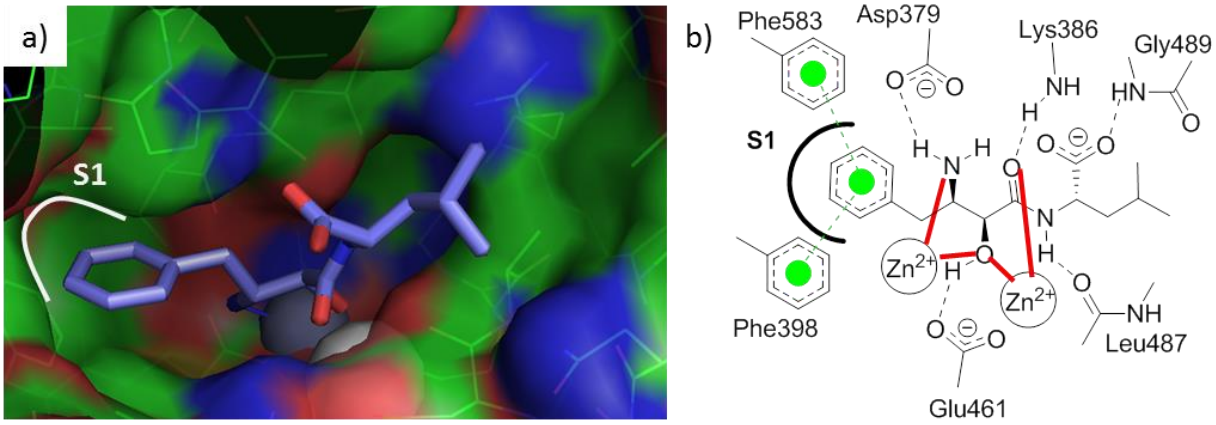


Figure 52 : a) site actif du complexe *Pf*A-M17/bestatine (PDB 3KR4) ; ions métalliques sphères grises ; b) mode de liaison schématique de la bestatine au site actif de *Pf*A-M17

Une étude de modélisation moléculaire a été réalisée pour les composés (7*S*,8*S*)-**1** et (7*S*,8*R*)-**1** (tabl. 11). Nous avons également considéré leurs hydrates respectifs (7*S*,8*S*)-**11** et (7*S*,8*R*)-**11** puisqu'il est probable qu'une molécule d'eau présente dans le site actif à une courte distance de la cétone s'additionne sur celle-ci. La géométrie moléculaire des quatre composés a été minimisée par champ de force MMFF94 (Marvin, ChemAxon). Les structures cristallographiques de *Pf*A-M17 (code PDB 3KR4, 2.00 Å et 4K3N, 2.00Å) et d'*Aeromonas proteolytica* (code PDB 1TXR, 2.00 Å) sont accessibles dans la PDB. Le site actif pour le docking a été déterminé comme tous les résidus à l'intérieur d'une sphère de 9 Å de rayon à partir du ligand co-cristallisé. La modélisation moléculaire a été réalisée par le Dr Sébastien Albrecht à l'aide du module FlexX de LeadIT version 2.1.6 (BiosolveIT, St. Augustin, Germany). Il est important de préciser qu'avec ce module l'évaluation des interactions avec les ions métalliques est sous-estimée. Afin de minimiser le nombre de poses et d'écarter les poses extravagantes, l'oxygène de l'hydroxyle du ligand est placé à l'intérieur d'une sphère de 1 Å de rayon située entre les deux ions zinc. L'approche hybride (considérations enthalpiques et entropiques) a été utilisée au cours de la modélisation moléculaire. Afin d'évaluer l'affinité de liaison des différentes poses, le module HYDE de LeadIT (considèrant à la fois les interactions de type liaison hydrogène, les effets hydrophobes et de désolvatation) a été appliqué pour reporter l'énergie libre de liaison (ΔG) et l'efficacité du ligand. Les différentes poses significatives ont été exportées en tant que Mol2 file et visualisées via PyMOL. Les résultats de cette étude sont présentés tableau 11.

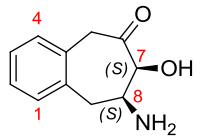
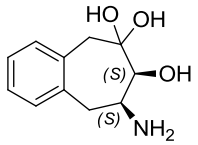
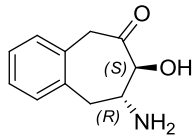
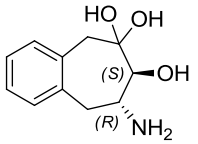
Composés	*AP*aero (1TXR)		*Pf*A-M17 (4K3N)		*Pf*A-M17 (3KR4)	
	Rang	Score Hyde ΔG (kJ/mol)	Rang	Score Hyde ΔG (kJ/mol)	Rang	Score Hyde ΔG (kJ/mol)
(7*S*,8*S*)-**1** 	1	-40	**3**	**-34**	**2**	**-37**
	4	**-41**				
	12	-32			13	-31
	14	-37				
	21	-35				
(7*S*,8*S*)-**11** 	1	-48	**3**	**-31**	2	-28
	2	-46				
	6	-39	10	-31	5	-31
	7	-47				
	8	**-51**	12	-33	9	-30
	17	-50				
	23	-44	14	-27	**13**	**-37**
	53	-44				
	62	-42				
(7*S*,8*R*)-**1** 	2	-30	2	-25	-	-
	6	**-32**				
	12	-25	**11**	**-26**		
	14	-31				
(7*S*,8*R*)-**11** 	1	-37	8	-29	1	-33
	2	**-41**			2	-30
					7	**-46**
	42	-42	**27**	**-30**	12	-31
					21	-31

Tableau 11 : résultats de la modélisation moléculaire de (7*S*,8*S*)-1/(7*S*,8*R*)-1 et (7*S*,8*S*)-11/(7*S*,8*R*)-11 sur les aminopeptidases bimétalliques *AP*aero (1TXR) et *Pf*A-M17 (4K3N, 3KR4)

D'une manière générale, l'étude suggère que le carbone portant l'hydroxyle devrait être de configuration absolue (*S*), comme c'est le cas pour la bestatine. En effet, lorsque nous modélisons le composé avec le carbone portant l'hydroxyle de configuration absolue (*R*) dans le site actif de *Pf*A-M17 ou *AP*aero, aucune pose ne présente un score Hyde intéressant. Nous observons principalement une gêne stérique entre le cycle aromatique du composé et certains résidus du site actif d'*AP*aero et de *Pf*A-M17.

L'étude souligne aussi que le carbone portant l'amine peut être soit de configuration absolue (R), soit de configuration absolue (S). En effet, d'après les scores Hyde obtenus (tabl. 11), les deux diastéréoisomères (7*S*,8*S*)-**1** et (7*S*,8*R*)-**1** auraient des activités intéressantes sur *Pf*A-M17 et *AP*aero.

La conformation adoptée par le cycle à sept chaînons de (7*S*,8*S*)-**1**/(7*S*,8*R*)-**1** et (7*S*,8*S*)-**11**/(7*S*,8*R*)-**11** est de type chaise. [166]

[166] G. Favini, A. Nava, *Theor. Chim. Acta (Berlin)* **1973**, *31*, 261-268.

Modélisation moléculaire dans le site actif d'APaero (deux ions zinc)

Les scores Hyde calculés prédisent une bonne activité des quatre composés sur *AP*aero (tabl. 11). Le composé (7*S*,8*S*)-**1** (ΔG = -41 kJ/mol) est plus puissant que son diastéréoisomère (7*S*,8*R*)-**1** (ΔG = -32 kJ/mol). De même, l'hydrate (7*S*,8*S*)-**11** (ΔG = -51 kJ/mol) est plus puissant que son diastéréoisomère (7*S*,8*R*)-**11** (ΔG = -41 kJ/mol). Les composés (7*S*,8*S*)-**1**/(7*S*,8*R*)-**1** sont moins puissants que leurs hydrates respectifs.

Les poses associées au meilleur score Hyde pour chaque composé sont représentées figure 53. Les poses des quatre composés sont remarquablement proches au sein du site actif d'*AP*aero. L'hydroxyle des composés se place entre les deux ions zinc et interagit avec le résidu catalytique Glu151. La cétone ou l'hydrate interagissent avec un ion zinc (Zn1) et pointent vers le solvant. L'aromatique pointe quant à lui en direction du sous-site S1 et interagit avec des résidus hydrophobes et aromatiques situés à l'entrée de ce sous-site. Seule l'amine des composés (7*S*,8*R*)-**1** et (7*S*,8*R*)-**11** interagit avec un ion zinc (Zn2).

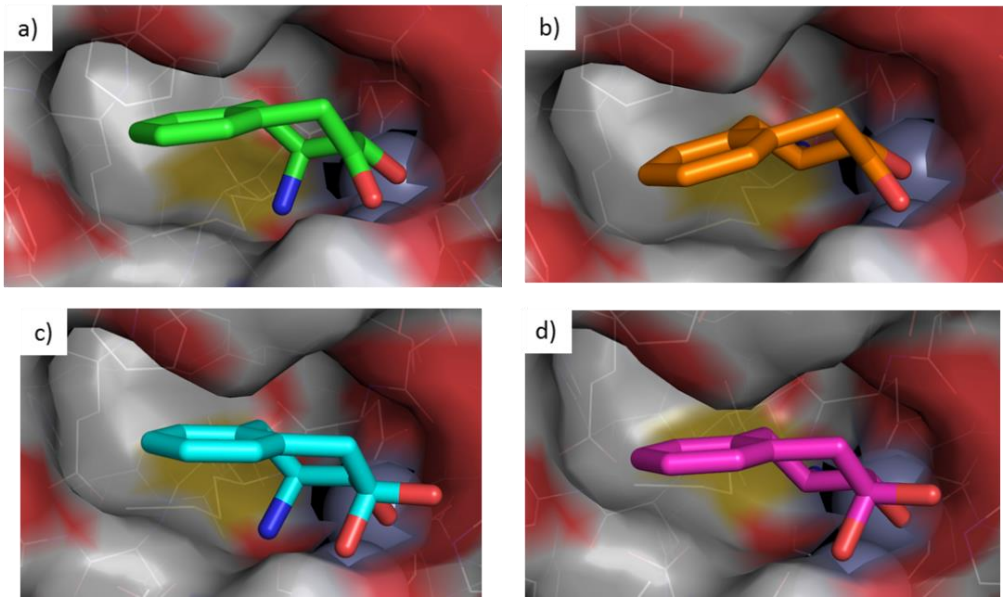


Figure 53 : poses dans le site actif d'*AP*aero (1TXR) des composés a) (7*S*,8*S*)-1 (rang 4) ; b) (7*S*,8*R*)-1 (rang 6) ; c) (7*S*,8*S*)-11 (rang 8) ; d) (7*S*,8*R*)-11 (rang 2)

Modélisation moléculaire dans le site actif de PfA-M17 (deux ions zinc)

Les scores Hyde calculés sont comparables entre les quatre composés (ΔG autour de -30 kJ/mol) et sont moins élevés que sur *AP*aero (ΔG jusqu'à -50 kJ/mol). Les poses associées au meilleur score Hyde pour chaque composé sont représentées figure 54. Les poses sont légèrement différentes entre les composés (7*S*,8*S*)-**1** et (7*S*,8*R*)-**1**, mais aussi entre le composé (7*S*,8*R*)-**1** et son hydrate. La chélation des ions zinc est assurée par l'hydroxyle, par la cétone ou l'hydrate et aussi par l'amine dans le cas des composés (7*S*,8*S*)-**11** et (7*S*,8*R*)-**11**.

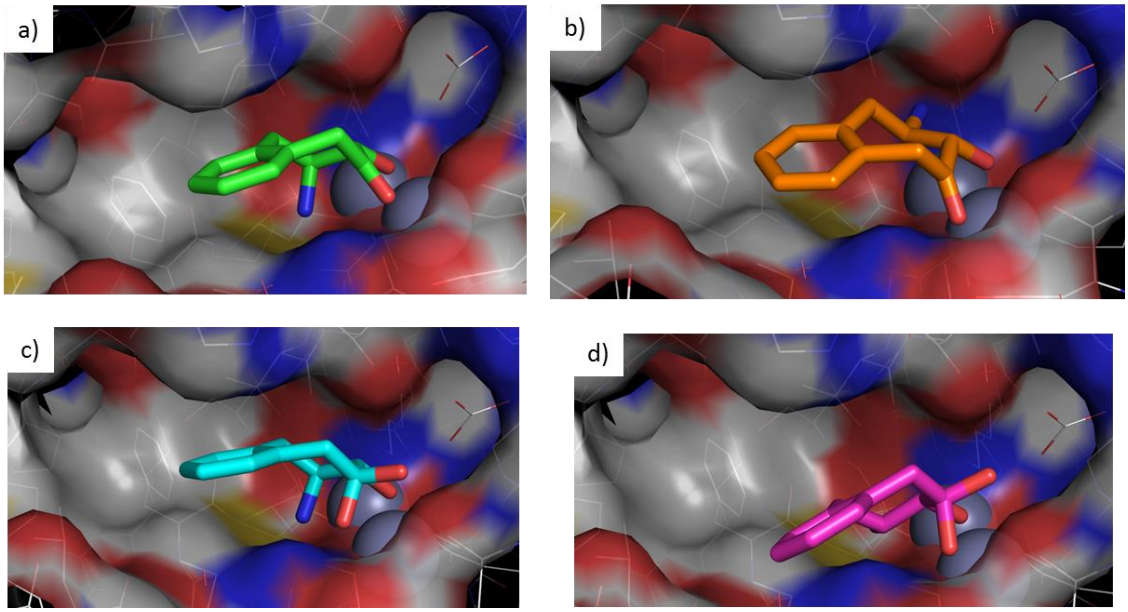


Figure 54 : poses dans le site actif de *Pf*A-M17 (4K3N) des composés a) (7*S*,8*S*)-1 (rang 3) ; b) (7*S*,8*R*)-1 (rang 11) ; c) (7*S*,8*S*)-11 (rang 3) ; d) (7*S*,8*R*)-11 (rang 27)

Modélisation moléculaire dans le site actif de PfA-M17 (un ion zinc et un ion magnésium)

Les scores Hyde calculés pour les composés (7*S*,8*S*)-**1**, (7*S*,8*S*)-**11** et (7*S*,8*R*)-**11** prédisent de bonnes activités sur *Pf*A-M17 (ΔG = -37 kJ/mol pour (7*S*,8*S*)-**1** et (7*S*,8*S*)-**11** ; ΔG = -46 kJ/mol pour (7*S*,8*R*)-**11**) (tabl. 11). Aucune pose proposée n'est acceptable pour le composé (7*S*,8*R*)-**1**. La figure 55 illustre les poses associées aux meilleurs scores Hyde pour le composé (7*S*,8*S*)-**1** et (7*S*,8*R*)-**11**.

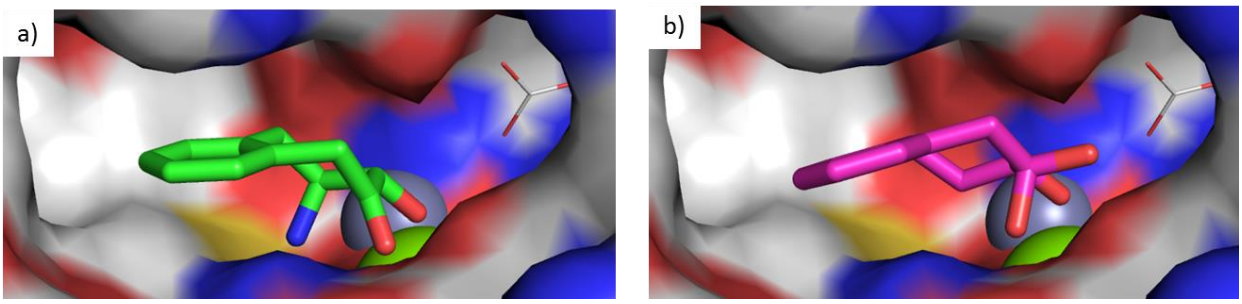


Figure 55 : poses dans le site actif de *Pf*A-M17 (3KR4) des composés a) (7*S*,8*S*)-1 (rang 2) ; b) (7*S*,8*R*)-11 (rang 7)

L'étude des poses dans *Pf*A-M17 (4K3N ou 3KR4) suggère qu'il est possible d'augmenter les interactions avec le sous-site S1 par des substituants en position 1 ou 2 sur le cycle aromatique (fig. 56). Il pourrait être envisagé de substituer l'une ou l'autre de ces positions par des chaînes carbonées composées de deux ou trois atomes de carbones.

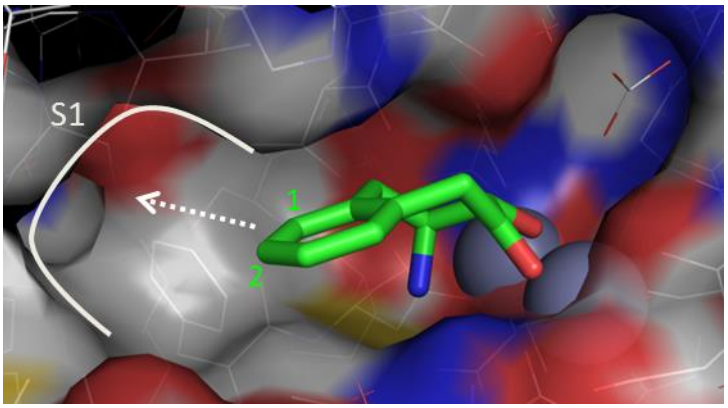


Figure 56 : interaction éventuelle avec le sous-site S1 de *Pf*A-M17 par substitution des positions 1 ou 2 de l'aromatique des composés (7*S*,8*S*)-1/(7*S*,8*R*)-1 et (7*S*,8*S*)-11/(7*S*,8*R*)-11 (pose de (7*S*,8*S*)-1 dans 4K3N en exemple ici)

Cette étude de modélisation moléculaire prédit de bonnes activités sur les aminopeptidases bimétalliques *AP*aero et *Pf*A-M17 pour les composés (7*S*,8*S*)-**1**/(7*S*,8*R*)-**1** et (7*S*,8*S*)-**11**/(7*S*,8*R*)-**11**, nous encourageant à poursuivre la synthèse d'analogues cyclisés non-peptidiques de la bestatine, pour l'inhibition de *Pf*A-M17.

Chapitre 4

Synthèse et évaluation biologique d'analogues de la 8-amino-7-hydroxy-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptèn-6-one.

I- Synthèse de la [cis]-8-amino-7-hydroxy-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptèn-6-one

1) Voie A : approche précédemment publiée
2) Voie B

II- Voie C

1) Rétrosynthèse
2) Synthèse des *N-tert*-butanesulfinimines R_S-45 et S_S-45
3) Additions diastéréosélectives sur les *N-tert*-butanesulfinimines 45
4) Synthèse des époxydes 90-97
5) Synthèse de cycloheptanes et cyclohexanes trisubstitués
6) Synthèse de benzocycloheptanes trisubstitués
7) Synthèse d'un analogue 1,2,3-triazole

III- Evaluation biologique des composés finaux

1) Essais enzymatiques *in vitro* et *in cellulo* sur parasites en culture
2) Discussion

I- Synthèse de la [*cis*]-8-amino-7-hydroxy-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptèn-6-one

1) Voie A : approche précédemment publiée

Mira Al-Lakkis-Wehbe *et al.* ont publié en 2012 une voie de synthèse permettant d'accéder au mélange racémique de la [*cis*]-8-amino-7-hydroxy-5,7,8,9-tétrahydro-benzocycloheptèn-6-one **1**. [165] L'un des intermédiaires clés de sa synthèse, la *cis*-bromosilyloxy cétone **16**, est obtenu en six étapes à partir du dibromo-*ortho*-xylène commercial (schéma 5). Une condensation avec le diméthyl-1,3-acétonedicarboxylate, suivie d'une décarboxylation permet de former la cétone **12**. L'α-silyloxy cétone **14** est obtenue par la méthode de silyloxylation, qui consiste en la silylation de l'énol de **12** par le *tert*-butyldimethylsilyle triflate, suivie de l'oxydation-réarrangement de Rubottom avec *m*-CPBA. La cis-bromosilyloxy cétone **16** est ensuite synthétisée par silylation de l'énol de **14** et bromation avec NBS.

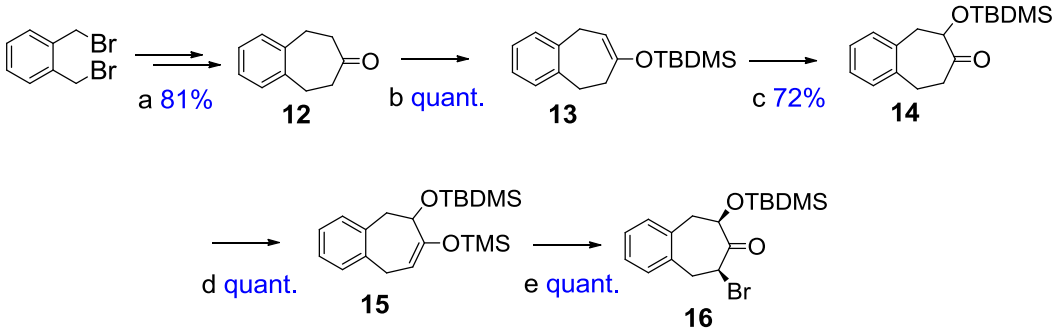


Schéma 5 : (a) (1) diméthyl-1,3-acétonedicarboxylate, NBu_4Br, $CH_2Cl_2/NaHCO_3$, 40 °C, 24 h ; (2) H_2SO_4, CH_3CN, 95 °C, 16 h ; (b) TBDSMOTf, CH_2Cl_2, NEt_3, 0 °C, 30 min ; (c) *m*-CPBA, CH_2Cl_2, 0 °C, 1.5 h ; (d) TMSOTf, toluène, NEt_3, 0 °C, 5 h ; (e) NBS, Et_2O, 0 °C, 40 min

La substitution du brome par l'azoture de sodium conduit au produit azidocétone **18*cis*** en mélange 60:22:18 (analyse RMN du brut) avec le produit d'isomérisation **18*trans*** et le produit d'élimination partielle silyloxyénone **19** (schéma 6). Le produit azidocétone **18*trans*** est isolé avec un rendement de 20% et réduit avec du cyanoborohydrure de sodium en milieu acide ; un mélange 80:20 des diastéréoisomères azidoalcools **20a** et **20b** est obtenu. La déprotection de l'alcool par HCl dans l'éther donne le mélange des diols **21a** et **21b**, directement engagé dans l'oxydation au periodinane de Dess-Martin. L'oxydation est régiosélective sur l'alcool le moins encombré. Après recristallisation, l'hydroxycétone **22*cis*** pure est obtenue avec un rendement de 60% à partir de l'azidocétone **18*trans***. Finalement, **22*cis*** est hydrogénolysée avec le catalyseur d'Adams pour fournir la *cis*-aminohydroxycétone **1*cis***, avec un rendement de 10% après recristallisation.

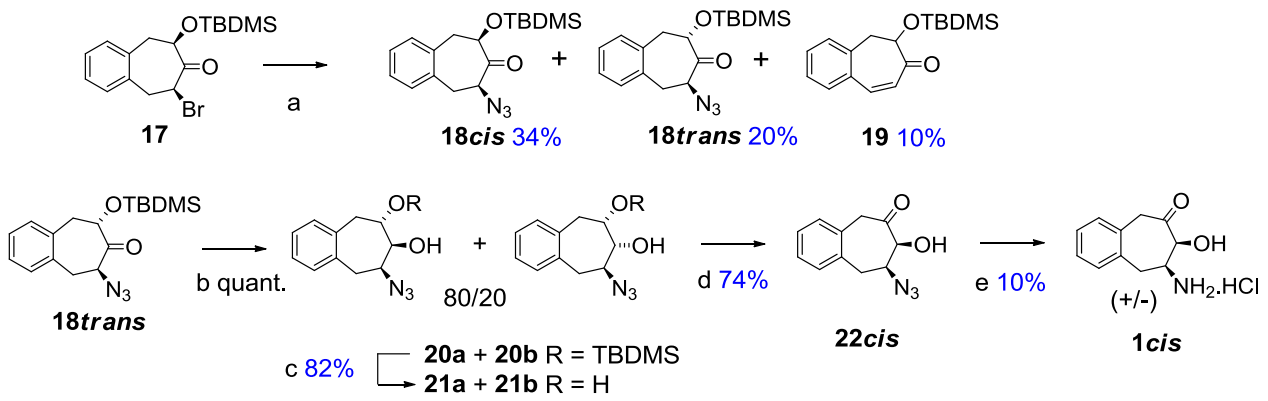


Schéma 6 : (a) NaN_3, DMF, TA, 50 min ; (b) $NaBH_3CN$, AcOH, THF sec, TA, 4.5 h ; (c) HCl 5 M dans Et_2O sec, EtOH, 0.5 h, TA ; (d) DMP, CH_2Cl_2, 1.5 h, TA ; (e) H_2 (1 atm) / PtO_2, MeOH, 1N HCl aqueux, TA, 4.5 h

Cette voie de synthèse a permis d'accéder au mélange racémique du composé **1*cis*** en une quantité suffisante pour être testée sur l'aminopeptidase d'*Aeromonas proteolytica* et l'APN porcine. Cependant l'utilisation de cette voie pour la synthèse d'inhibiteurs de *Pf*A-M17 présente quelques inconvénients. Seul le composé *cis* en mélange racémique est accessible, or l'étude de modélisation moléculaire a montré que le composé *trans* pouvait aussi être intéressant. Par ailleurs, aucune diversité chimique n'est possible, sauf introduction de diversité ou point d'ancrage très tôt dans la synthèse, rendant complexe la synthèse et les purifications par le nombre de régioisomères. De plus, la quantité de produit final obtenue est très faible et des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés, notamment à l'étape d'oxydation-réarrangement de Rubottom.

De ce fait, nous avons étudié d'autres voies de synthèse permettant d'accéder à ce châssis moléculaire de type benzocycloheptane trisubstitué.

Bioorganic & Medicinal Chemistry 21 (2013) 6447–6455

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Synthesis of amino-hydroxy-benzocycloheptenones as potent, selective, non-peptidic dinuclear zinc metalloaminopeptidase inhibitors

Mira Al-Lakkis-Wehbe, Bérénice Chaillou, Albert Defoin, Sébastien Albrecht *, Céline Tarnus *

Université de Haute Alsace, Laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique, EA4466, ENSCMu, 3, rue Alfred Werner, F-68093 Mulhouse Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 May 2013
Revised 20 August 2013
Accepted 23 August 2013
Available online 4 September 2013

Keywords:
Racemic trisubstituted benzocycloheptane derivatives
Synthetic inhibitors
Selective inhibition
M1 aminopeptidases
M28 aminopeptidases

ABSTRACT

Racemic trisubstituted benzocycloheptanes were synthesized and evaluated for their ability to inhibit metalloaminopeptidase activities. A highly selective nanomolar inhibitor of a prototypical '*two zinc*' aminopeptidase from the M28 family was observed with these tridentate species, while bidentate analogs proved to be highly selective for the '*one zinc*' M1 family of enzymes. The selectivity profile of these new, low molecular weight structures may guide the design of specific, non-peptidic inhibitors of binuclear aminopeptidases.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Metalloaminopeptidases (APs) remove amino acids from unblocked N-termini of peptides and proteins. This family of exopeptidases is widely distributed in nature, with representative members present in animal cells, plants, bacteria and fungi.[1,2] Although some APs are secreted, the vast majority are either cytosolic or membrane-bound enzymes.[3–5] They play pivotal roles in many biological processes such as pain, blood pressure regulation, immune cell response and cell migration in mammals and/or amino acid metabolism in parasites for examples.[6–9]

Most metalloaminopeptidases catalyse the same chemical reaction with the active site region related to that of thermolysin. Generally cleavage of the scissile peptide bond at the N-terminus of a peptide or a protein, is dependent upon the chemical structure and composition of amino-acid residues that flank the cleavage site ($P_1 * P'_1$).[10] They can be broadly classified into two sub-families on the basis of the number of their active site zincs. While some of these enzymes contain only one zinc, others possess a binuclear metal centre, usually referred to as a co-catalytic unit.[10] Since all these APs are zinc-dependent enzymes sharing a large substrate specificity, the development of specific inhibitors is undoubtedly a daunting task and is of utmost importance in order to gain a deeper understanding of the respective biological functions of APs and to assess their potential as drug targets. In the present study we focused on aminopeptidases that prefers hydrophobic residues in P1 position. Recent reviews illustrate the various concepts developed up to now and the lack of selectivity, when reported, observed in many cases.[11–15]

We have previously reported aminobenzoheptanone **1a** as a specific lead structure for the design of selective inhibitors of the 'one-zinc' M1 family of aminopeptidases, with an excellent Ligand Efficiency (LE = 0.63).[16] In this series of compounds, well-chosen substitutions with appropriate functional groups led to the most potent inhibitor of mammalian APN (CD13), **1b** (K_i = 60 pM).[17] The present study explored further modifications of chemotype **1a** in order to design specific inhibitors for binuclear aminopeptidases. We have considered trisubstituted benzocycloheptane derivatives as target structures based on bestatin **2** efficacy on 'two zinc' aminopeptidases.[18] Actually, bestatin **2**, usually used as a standard inhibitor of APN with a K_i value in the micromolar range, is a much more potent inhibitor of the binuclear aminopeptidases with nano- to subnanomolar affinities.[18] We have decided first of all to synthesize racemic aminohydroxyketones (*cis* and *trans*) **3a–b**, as well as the corresponding aminodiols **4**, **5** and the *cis*-aminohydroxyketone **6**. We have also investigated the preferred position for these functional groups, with the amino group moved to position 7 in the *cis*-aminodiol **7** and the *cis*-aminoketol **8**. The reported inhibitory activity of these new compounds on APN (EC 3.4.11.2) and *Aeromonas proteolytica* AP (EC 3.4.11.10), two

* Corresponding authors. Tel.: +33 3 89 33 68 59; fax: +33 3 89 33 68 60.
E-mail addresses: sebastien.albrecht@uha.fr (S. Albrecht), celine.tarnus@uha.fr (C. Tarnus).

0968-0896/$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.08.044

prototypes of the one and two-zinc aminopeptidases, respectively, showed that the trisubstituted analogue **6**, proved to be an interesting lead chemotype for selective inhibition of the two zinc families of aminopeptidases. It is proposed to behave as a new tridentate zinc binding motif (Scheme 1).

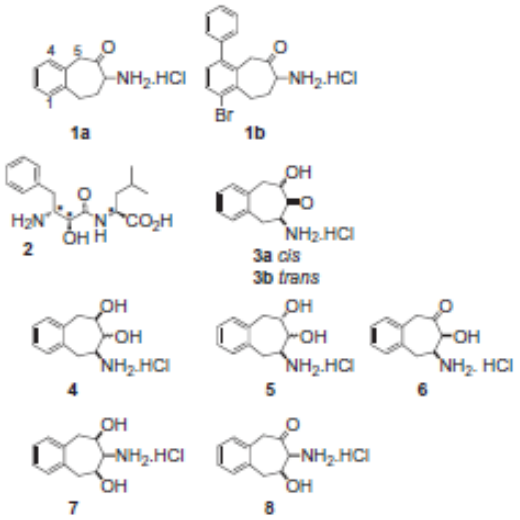
2. Chemistry

The known benzoheptanone **9**[19–21] was the starting material for the synthesis of the target structures and its functionalization was performed according to described procedures.[16] For the first series, the amine function was introduced by substitution of a bromine atom with azide, whereas a reductive amination of ketone allowed the access to the second series.

2.1. First series, amino group in position 6 or 8

The *cis*-bromosilyloxy-ketone **13** was a key intermediate for the synthesis of the first series (Scheme 2, analogues **3a** and **3b**). It was obtained from ketone **9** according to the silyloxylation method[16] which led to α-silyloxy-ketone **11**. This method consisted in silylation of the enol ether with silyl triflate and triethylamine[22] into **10** and then oxidation-rearrangement with *m*-CPBA.[23] In this case, the *tert*-butyldimethylsilyl group was preferred due to its better stability during the following steps. Formation of the trimethylsilylenol ether **12** was achieved by the same procedure. The enol ether **12** was brominated with NBS into the *cis*-bromosilyloxyketone **13** in quantitative yield from ketone **11**.[24] Bromine substitution with sodium azide in DMF[25] occurred with isomerization and partial elimination to give a 60:22:18 mixture of the *cis* and *trans* azidoketones **14a** and **14b**, and the known silyloxyenone **15**[16], respectively.

Isomers **14a** and **14b** were isolated and the catalytic hydrogenation of the azide function over palladium in ethanol in presence of 1 N aqueous hydrochloride acid led to the aminohydroxyketones **3a** and **3b**, as stable crystalline hydrochlorides in ca. 50% yield. For the *cis*-isomer **14a**, the reduction in acidic medium produced a spontaneous desilylation leading to the amine **3a**. By contrast, the *trans*-isomer **14b** gave a partially O-silylated compound which was totally deprotected into **3b** by further action of hydrogen chloride in dry ether. The aminohydroxyketones **3a** and **3b** were in these conditions obtained from the ketone **9** in ca. 16% and 4% yield, respectively. The *cis* and *trans* configuration of the amines **3a** and **3b** was deduced from the NMR data using the theoretical calculation for the benzocycloheptane conformation (see Section 5.9).[16,17,26,27]



Scheme 1. Chemical structures of racemic trisubstituted derivatives 3–8 and enantiopure bestatin 2.

The preparation of the corresponding aminodiols **4a**,**b** and **5a**,**b** is presented in Scheme 3 from the azido-ketones **14a** and **14b**, respectively. The reduction of **14a** and **14b** was carried out in acidic medium, with sodium cyanoborohydride in the presence of acetic acid to avoid any basic isomerization (otherwise observed). The *cis*-isomer **14a** led to a 60:40 diastereoisomeric mixture of **16a** and **16b**, the all-*cis* compound **16a** being preponderant. The *trans*-isomer **14b** gave the silylated alcohols **17a** and **17b** as a 80:20 diastereoisomeric mixture, the major one being the *cis*-azidoalcohol **17a**. O-deprotection by action of dry hydrogen chloride in ether provided the crystallized diol mixture **18a** and **18b**, which was directly oxidized by Dess–Martin periodinane (DMP) to give, after recrystallization, the pure ketone **19a** in 60% yield from the *trans*-azide **14b**. The good regioselectivity of the oxidation might be due to a preferential oxidation on the less hindered C-6 hydroxyl function.

The catalytic hydrogenolysis of the azide function either of the silyloxyl mixtures **16a** and **16b**, or the diol mixture **18a** and **18b** was performed over palladium in ethanol in the presence of hydrochloric acid. In the case of **16a**,**b** a spontaneous O-deprotection occurred to furnish a 60:40 mixture of the corresponding amines hydrochlorides **4a** and **4b** in 65% yield from the azido-ketone **14a**. The diols **18a**,**b** were hydrogenolyzed directly to a 93:7 mixture of the amines hydrochlorides **5a** and **5b** in 49% yield from the azido-ketone **14b**.

Finally, the hydroxyketone **19a** was hydrogenolyzed over Adams's catalyst into the *cis*-hydroxyaminoketone **6** in 10% yield after recrystallization. This poor yield might be due to the low temperature stability of compound **6**. Indeed, thermal degradation occured at 60 °C and may be responsible for the difficulties encountered in obtaining and purifying compound **6**. However, it was only characterized by ^{1}H and ^{13}C NMR. In ^{1}H NMR spectrum in CD_3OD compound **6** appeared only as a hemiketal suggesting a fast hydration of the ketone.[16,27]

The target amino-diols **4a**,**b**, as well as **5a**,**b** and the aminohydroxyketone **6** were thus synthesized in ca. 16%, 7% and 0.9% overall yield from the ketone **9**, respectively.

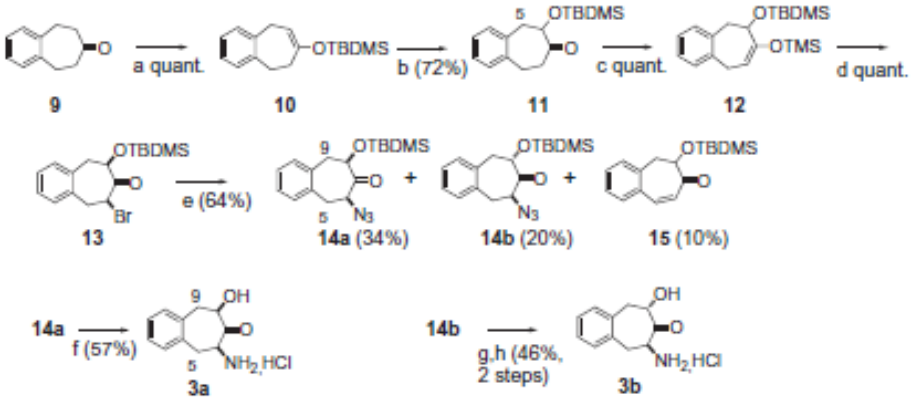
2.2. Second series: amine function in position 7

The starting compound in this second series was the unsaturated aminoalcohol **20** as a 80:20 *cis*–*trans* mixture. The synthesis of this intermediate was already described in a precedent work.[16]

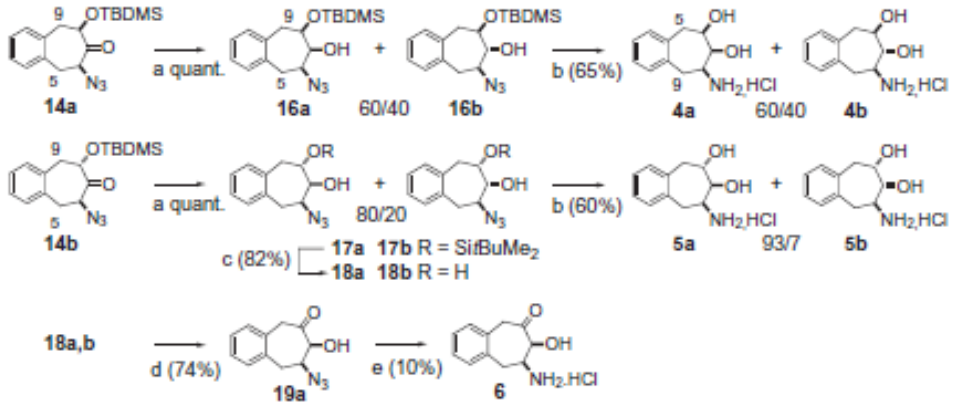
The second hydroxyl group was introduced by regioselective hydride reduction of the major *cis*-epoxide **21** which was obtained from **20** by reaction with *m*-CPBA. Its *cis*-configuration corresponded to the standard regioselectivity observed for the epoxidation of α-hydroxylated double bond. Its reduction by the diisobutylaluminium hydride (DIBAL)[28] at low temperature occurred selectively at the benzylic position into the diol **22** in good yield.

N-deprotection of this diol with dry hydrogen chloride in ether/dioxane gave the all *cis*-amino-diol **7** as hydrochloride salt in 23% overall yield from the ketone **9**.

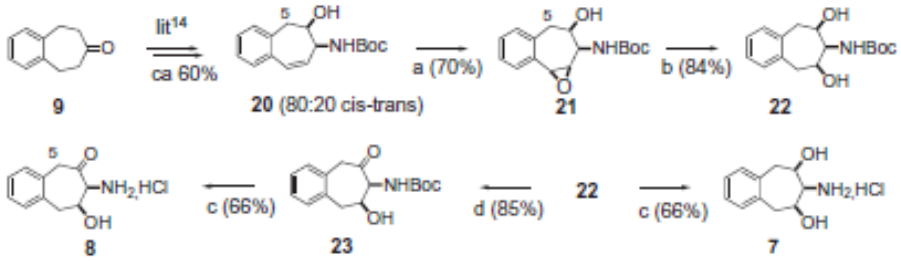
The amido-diol **22** was smoothly oxidized with Dess–Martin periodinane (DMP, 1.3 equiv) in order to react only one hydroxyl function.[29] The corresponding hydroxy-ketone **23** was isolated in good yield and its acidic N-deprotection provided the *cis*-hydroamino-ketone **8** in 56% yield from the diol **22** or 20% overall yield from the ketone **9** (Scheme 4).



Scheme 2. Synthetic scheme for aminohydroxyketone analogues. Reagents and conditions: (a) tBuMe$_2$SiOTf, CH$_2$Cl$_2$, NEt$_3$, 0 °C, 30 min; (b) m-CPBA, CH$_2$Cl$_2$, 0 °C, 1.5 h; (c) Me$_3$SiOTf, toluene, NEt$_3$, 0 °C, 5 h; (d) NBS, Et$_2$O, 0 °C, 40 min; (e) NaN$_3$, DMF, rt, 50 min; (f) H$_2$ (1 atm)/Pd–C, EtOH, 1 N aqueous HCl, rt, 6 h; (g) H$_2$ (1 atm)/Pd–C, EtOH, 1 N aqueous HCl, rt, 18 h; (h) 5 N HCl in dry Et$_2$O.



Scheme 3. Synthetic scheme for aminodiols **4**, **5** and aminohydroxyketone **6** analogues. Reagents and conditions: (a) NaBH$_3$CN, AcOH, dry THF, rt, 4.5 h; (b) H$_2$ (1 atm)/Pd–C 5%, EtOH, 1 N aqueous HCl, rt, 16 h; (c) HCl 5 M in dry Et$_2$O, EtOH, 0.5 h, rt; (d) DMP, CH$_2$Cl$_2$, 1.5 h, rt; (e) H$_2$ (1 atm)/PtO$_2$, MeOH, 1 N aqueous HCl, rt, 4.5 h.



Scheme 4. A synthetic scheme for the aminodiol **7** and hydroxyaminoketone **8**. Reagents and conditions: (a) m-CPBA, CH$_2$Cl$_2$, 0 °C, 1.5 h; (b) DIBAL, THF, −78 °C, 1 h; (c) dry HCl 2.5 M, Et$_2$O, dioxane, 0 °C, 36 h; (d) DMP, CH$_2$Cl$_2$, rt, 1.5 h.

3. Inhibition of the aminopeptidases, structure–activity relationships

The inhibition constants for the synthesized racemic compound **3–8** against two aminopeptidases are presented in the Table 1. All compounds were evaluated against the following enzymes:[1] the bacterial aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* (APaero, [E.C. 3.4.11.10], M28 family) a prototypic member of the 'two zinc' sub-families and the aminopeptidase N (APN, [E.C. 3.4.11.2], M1 family) a representative of the 'one zinc' sub-family. In this study, the parent compound 3-amino-2-benzosuberone **1a** and bestatin, a standard aminopeptidase inhibitor, were used as reference inhibitors.

In this trisubstituted benzocycloheptane series, substitution at the 8-position of the cycloheptane ring was most likely to lead to a significant decrease in inhibitory activity or a complete loss of potency against the one-zinc APN, while these derivatives were suitable as an inhibitor scaffold for the two-zinc APaero. These differences in activity may reflect steric interferences/conflicts between the C-8 substituent and the APN binding site. Indeed,

Table 1
Enzymes inhibition by benzocyclcoheptane derivatives **3–8**

Compounds	APN (CD13) [EC 3.4.11.2] 'One zinc'	AP (APaero) [EC 3.4.11.10] 'Two zinc'
Bestatin	**3.5***	**0.0016***
1a	**1***	900
3a (*cis*)	>100	**4***
3b (*trans*)	**42***	**24***
4a,b (60/40 mixture)	**380***	**500***
5a,b (93/7 mixture)	>1000	**500***
6	>1000	**0.01***
7	>1000	**78***
8 (*cis*)	>1000	>1000

All substances were evaluated as racemic mixtures ($n = 3$, with 20% as a mean experimental variation). IC_{50} (μM) values were determined from Dixon plots at a substrate concentration set to the K_m value for the corresponding enzyme (see Section 6.5). Inactive compounds were tested up to their solubility limit under the assay conditions. K_i* (μM, in boldface) were also determined from Dixon plots[30] as previously described.[16–18,27]

the conserved, well-defined exopeptidase motif (GAMEN)[1] in the active site of the M1 aminopeptidases probably induces a highly restrained binding mode.

3.1. Aminodiols derivatives 4, 5 and 7

The entire aminodiols series showed poor inhibitory potency against both evaluated aminopeptidases. Compound **4** exhibited similar weak activities against APN and APaero with K_i values of 380 and 500 μM, respectively. Concerning compound **5**, the poor inhibitory activity persisted for APaero, but it was totally inactive on APN up to a concentration of 1 mM. In this aminodiol series the position of the primary amine seemed primordial for APaero activity. This was illustrated with compound **7**, where the amino group at C-7 conferred moderate micromolar inhibitory activity against APaero (K_i 78 μM) with a good selectivity profile, while its corresponding C-8 regioisomers (**4** and **5**) were found about six-fold less active against APaero.

3.2. Aminohydroxyketone derivatives 3a, 3b, 6 and 8

The introduction of a ketone function at the 7-position improved significantly the inhibitory activity. Indeed, *trans*-**3b** was about twice as potent on APaero (K_i = 25 μM) as on APN (K_i = 40 μM). In contrast the *cis*-**3a**, having all three functional groups in a coplanar arrangement, was inactive on APN up to a concentration of 1 mM, but displayed a significant inhibition activity against APaero with a K_i value of 4 μM (LE = 0.54). This coplanar arrangement of the chelating groups generates a potent tridentate zinc binding motif for co-catalytic units of binuclear aminopeptidases.

Compound **6**, having a similar functional group arrangement as bestatin **2** was the most potent molecule tested in this series with a K_i value of 10 nM, displaying an excellent LE of 0.8. Analogue *cis*-**8** did not show any activity against both aminopeptidases. This result was anticipated on APN since interaction of the primary amine to the GAMEN site is crucial for recognition of this class of scaffold[18], however it appeared that the presence of this particular function in 8-position was also a requisite for co-catalytic unit binding.

4. Proposed binding mode

A binding mode of these scaffolds for the two subfamilies of metalloaminopeptidases can be proposed and common features as well as distinct environments can be highlighted and discussed.

The bidentate binding mode of **1a** to APN reported in Figure 1A, has been proposed in previous works.[16,27] In this model, based on higly conserved active site features, the primary amine essential for the inhibitor recognition binds to the 'GAMEN' site.[1] In concert with this specific interaction, the ketone function, most probably in its hydrate form, binds to the catalytic Glu 298 (O1) as well as to the zinc ions and Tyr 381 (O2). This arrangement provides a good mimic of the transition state that occurs during catalysis and likely accounts for the observed high selectivity of this series of inhibitors for the M1 aminopeptidases.

In the metal binding pocket of APaero (Fig. 1B), the ligand chelates zinc ions via both the alcohol and the primary amine. The GAMEN interactions are substituted with a direct tight binding to a zinc ion of the co-catalytic unit as well as Asp 179 which is also a zinc ligand. It probably modifies the pk_a value of the primary amine in order to keep it unprotonated and part of the inner coordination sphere of zinc(II).[31] In this particular enzyme, the S1 hydrophobic pocket is formed by neighboring aromatic rings (Tyr 251, Phe 248, Phe 244 and Tyr 225), which might be involved in several Pi-stacking interactions with the ligand aromatic core. This mode of binding requires precise spatial positioning of the interacting atoms in a specific conformation in order to optimize the 3-centered interactions with a co-catalytic unit. These interactions anchor the amine function, O1 and O2 in the coordination spheres of the zinc ions likely in their deprotonated form. Indeed the pk_a of an alcohol function can be as low as 6.3 in such an environment.[31] Metals are penta-coordinated as usually reported in co-catalytic zinc binding sites,[1,31] it corresponds to a classical illustration of the lack of significant energy barrier to a multiplicity of equally accessible coordination geometry of zinc (III–V) in protein

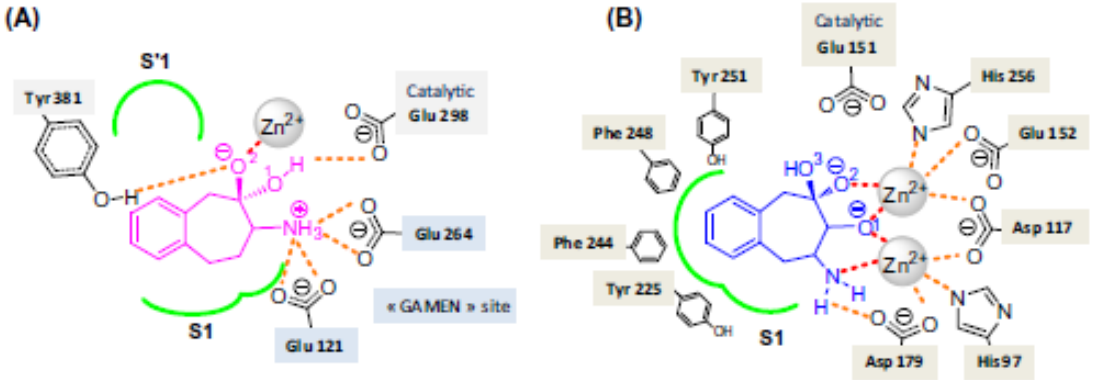


Figure 1. Cartoon diagram of the proposed binding modes. (A) Disubstituted aminobenzosuberone **1a** bound to *E. coli* APN[16] (numbering of pdb entry 3HPT, (B) trisubstituted derivative **6** bound to APaero (numbering of pdb entry 1XRY). Zinc ligands coordination is represented by red dashed lines.

systems.[32,33] This binding mode fits to that described with bestatin[34] the well-known metalloaminopeptidase inhibitor that displays a selectivity profile in favour of bimetallic enzymes. Actually K_i values are reported to be μM on the M1 family of aminopeptidases whereas nM to subnM K_i values account for inhibition of the two-zinc enzymes from the M17 and M28 families.[18] In the present work compound **6** showed a specific selectivity profile for this latter family of metalloaminopeptidases since no inhibition of the one-zinc APN was observed at a 1 mM concentration.

Hence, one can argue that, the binding of this small rigid molecule **6** to APaero compare to the binding of bestatin is subject to enthalpic benefit (no conformational rearrangement of both the amine and hydroxyl substitutents) and entropic one (elimination of multiple rotational degrees of freedom due to benzocycloheptane core rigidity). To gain back potency, additional amino-acid (leucine side chain) is grafted on the amino alcohol core of bestatin. This residue interacts with the shallow channel on the surface of the APaero enzyme and establishes a supplementary H-bond between the acid moiety and Tyr 225.

5. Conclusion

We have synthesized a series of 6,7,8-trifunctionalized compounds in the benzocycloheptane series. Their inhibitory potency on the 'one' and 'two-zinc' prototypic aminopeptidases showed that although aminodiols were inactive or weakly active against the studied enzymes, the aminohydroxyketones **3a** and **6**, having the amino group in position 8, proved to be micromolar and nanomolar inhibitors of the *Aeromonas proteolytica* leucine aminopeptidase, respectively. The main achievement of this study is the selectivity profile of the *cis*-aminohydroxyketone **6** (K_i = 0.01 μM) which appeared to be a highly selective inhibitor of the AP-*Aeromonas proteolitica* since no inhibitory activity on APN was observed up to a concentration of 1 mM. This work highlights the discovery of two scaffolds based on our cyclic benzosuberone structure, the 3-amino-2-benzosuberone **1a** and the 4-amino-3-hydroxy-2-benzosuberone **6** as specific hits for the one and two zinc aminopeptidases, respectively. The development of more refined models for the binding of **1a** or **6** to the metalloaminopeptidase's active sites must await the provision of detailed structural information on the studied enzymes. That research is ongoing and will be reported in due course.

6. Experimental part

6.1. General

Flash chromatography (FC): silica gel (Merck 60, 230–400 mesh). TLC: Al-roll silica gel (Merck 60, F254). Mp: Kofler hot bench, corrected. IR spectra (ν_{in} cm^{-1}): *Nicolet 405 FT-IR*. ^{1}H and ^{13}C NMR (400 MHz and 100.6 MHz, resp.) spectra: *Bruker Avance 400* at 295 K unless otherwise noted, tetramethylsilane (TMS), or sodium (D_4)-trimethylsilylpropionate (D_4-TSP) in D_2O (^{1}H NMR), and $CDCl_3$, or CD_3OD [$\delta(CDCl_3)$ = 77.0, $\delta(CD_3OD)$ = 35.0 with respect to TMS] (^{13}C NMR) as internal references; δ in ppm and J in Hz. High resolution MS were measured on a *Bruker MicrOTof* spectrometer in Institut de Chimie, UMR 7177 CNRS, ULP, Strasbourg, or *Agilent Technologies 6510* (QTof) spectrometer in EA4566, UHA, Mulhouse, France, or on a *Waters Micromass Q-Tof Ultima API* spectrometer in Basilea Pharmaceuticals, Basel. Microanalyses were carried out by the Service Central de Microanalyses du CNRS, F-69390 Vernaison.

6.2. Reagents and solvents

Dess–Martin periodinane (DMP) was obtained as a 1 M solution in CH_2Cl_2 from Aldrich or synthesized according to the literature.[35] Commercial products were purchased from usual suppliers. Usual solvents were freshly distilled, dry EtOH and MeOH distilled over Mg/MgI_2, dry THF over Na and benzophenone, dry Et_2O was distilled and stored over Na, CH_2Cl_2 was distilled over P_2O_5 and kept over Na_2CO_3. Dioxane, NEt_3 were distilled before use.

The preparation of compounds **9–11** and **20** have been previously described and fully characterized in the literature.[16–18]

6.3. Novel chemical entities

6.3.1. *rac-cis*-6-Bromo-8-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5,6,8,9-tetrahydrobenzocyclohepten-7-one (13)

To a stirred solution of **11** (0.87 g, 3 mmol) and Et_3N (1.26 mL, 9 mmol, 3 equiv) in dry toluene (12 mL) was added dropwise TMSOTf (1.3 mL, 7.2 mmol, 2.4 equiv) at 0 °C under Ar. The mixture was stirred for 5 h at 0 °C then rt. The mixture was washed successively with a solution of NH_4Cl and brine, then extracted with cyclohexane. The organic phase was dried ($MgSO_4$) and evaporated to give the intermediate product **12** as an orange oil (quant.), used directly in the next step without further purification.

6.3.1.1. Compound 12. Orange oil. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 0.08, 0.14 (2 s, 6H, $OSiMe_2$); 0.17 (s, 9H, $OSiMe_3$); 0.9 (s, 9H, OtBu); 3.01 (dd, 1H, Hb-9); 3.05 (dd, 1H, Ha-9); 3.17 (dd, 1H, Hb-5); 3.36 (dd, 1H, Ha-5); 4.17 (tdd, 1H, H-8); 5.14 (t, 1H, H-6); 7.06–7.17 (m, 4H, Har). J(5a,5b) = 16.2, J(5a,6) = 6.2, J(5a,8) = 1.2, J(5b,6) = 6.4, J(5b,8) = 1.2, J(8,9a) = 8.2, J(8,9b) = 4.2, J(9a,9b) = 13.4 Hz.

The intermediate **12** was dissolved in dry ether (12 mL) at 0 °C, NBS (561 mg, 3.15 mmol, 1.05 equiv) was then added portion wise and the solution stirred at 0 °C for 40 min. The mixture was successively washed with a solution of $NaHCO_3$ and brine then extracted with AcOEt. The organic phase was dried ($MgSO_4$) and evaporated to give **13** (1.1 g, quant.).

6.3.1.2. Compound 13. Yellow oil. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 0.03, 0.08 (2 s, 6H, $OSiMe_2$); 0.85 (s, 9H, OtBu); 2.97 (dd, 1H, Hb-5); 3.06 (dd, 1H, Ha-5); 3.14 (dd, 1H, Hb-9); 3.41 (dd, 1H, Ha-9); 4.76 (dd, 1H, H-8); 4.83 (dd, 1H, H-6); 7.23-7.28 (m, 4H, Har). J(5a,5b) = 14.6, J(5a,6) = 9.8, J(5b,6) = 3.2, J(8,9a) = 2.6, J(8,9b) = 8.0, J(9a,9b) = 15.0 Hz.

6.3.2. *rac-cis*-6-Azido-8-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5,6,8,9-tetrahydrobenzocyclohepten-7-one (14a) and *rac-trans*-6-Azido-8-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5,6,8,9-tetrahydrobenzocyclohepten-7-one (14b) and 6-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-5,6-dihydro-benzocyclohepten-7-one (15)

To a stirred solution of **13** (1.1 g, 3 mmol) in DMF (12 mL), sodium azide (390 mg, 6 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred for 50 min. The mixture was washed with brine and extracted with cyclohexane. The organic phase was dried ($MgSO_4$) and evaporated to give a 60:22:18 mixture of the *cis*-isomer **14a**, the *trans*-isomer **14b** and the elimination product **15**. Purification of the residue by flash chromatography (cyclohexane/CH_2Cl_2 7/3) gave the separated purified compounds *cis*-**14a** (374 mg, 34%), *trans*-**14b** (220 mg, 20%), and **15** (111 mg, 10%).

6.3.2.1. *cis*-Isomer (14a). Pale yellow oil. IR (KBr): 779, 838, 1108, 1257, 1472, 1728, 2109, 2858, 2897, 2930, 2955, 3024 cm^{-1}. ^{1}H NMR (CDCl3, 400 MHz): 0.04, 0.15 (2 s, 6H, OSiMe2); 0.94 (s, 9H, OtBu); 2.97 (dd, 1H, Hb-5); 3.03 (dd, 1H, Hb-9); 3.11 (dd, 1H, Ha-9); 3.15 (dd, 1H, Ha-5); 3.80 (ddd, 1H, H-6); 4.21 (ddd, 1H, H-8); 7.28 (m, 4H, Har). J(5a,5b) = 14.4, J(5a,6) = 11.2, J(5b,6) = 3.4, J(6,8) = 0.8, J(8,9a) = 11.2, J(8,9b) = 3.2, J(9a,9b) = 14.2 Hz. ^{13}C NMR (CDCl3, 100 MHz): −5.5, −4.6 (OSiMe2); 18.4 (CMe3); 25.7 (OtBu); 37.2, 41.5 (C(5), C(9)); 66.7 (C(6));

77.8 (C(8)); 128.1, 128.4, 130.0, 130.2 (4 CHar); 135.9, 136.0 (C(4a), C(9a)); 203.7 (C(7)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for C17H25N3O2Si [M+Na]: 354.1608, found: 354.1599.

6.3.2.2. *trans*-Isomer (14b). Pale yellow oil. IR (KBr): 779, 838, 1108, 1257, 1728, 2109, 2858, 2897, 2930, 2955 cm−1. ^{1}H NMR (CDCl3, 400 MHz): 0.01, 0.04 (2 s, 6H, OSiMe2); 0.71 (s, 9H, OtBu); 2.97 (dd, 1H, Hb-9); 2.98 (dd, 1H, Hb-5); 3.06 (dd, 1H, Ha-9); 3.12 (dd, 1H, Ha-5); 4.37 (dd, 1H, H-6); 4.54 (dd, 1H, H-8); 7.05–7.25 (m, 4H, Har). J(5a,5b) = 14.2, J(5a,6) = 3.2, J(5b,6) = 10.4, J(8,9a) = 7.8, J(8,9b) = 2.4, J(9a,9b) = 14.8 Hz. ^{13}C NMR (CDCl3, 100 MHz): −5.1, −5.0 (OSiMe2); 17.8 (CMe3); 25.4 (OtBu); 38.0, 40.0 (C(5), C(9)); 64.2 (C(6)); 76.2 (C(8)); 127.6, 127.7, 130.0, 131.5 (4 CHar); 135.0, 135.2 (C(4a), C(9a)); 206.5 (C(7)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for C17H25N3O2Si [M+K]+: 370.13476, found: 370.13439.

6.3.2.3. Elimination product (15). Pale yellow oil. IR (KBr): 837, 1119, 1254, 1679, 1725, 2855, 2929, 2954 cm^{-1}. ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz): 0.02, 0.14 (2 s, 6H, OSiMe$_2$); 0.87 (s, 9H, OtBu); 2.98 (dd, 1H, Hb-5); 3.39 (dd, 1H, Ha-5); 4.30 (dd, 1H, H-6); 6.10 (d, 1H, H-8); 7.09 (d, 1H, H-9); 7.32–7.33 (m, 4H, Har). J(5a,5b) = 14.8, J(5a,6) = 12.0, J(5b,6) = 1.6, J(8,9) = 12.8 Hz. ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100 MHz): −5.7, −4.7 (OSiMe$_2$); 18.4 (CMe$_3$); 25.6 (OtBu); 39.9 (C(5)); 75.7 (C(6)); 125.7 (C(8)); 127.3, 130.0, 130.3, 132.5 (4 CHar); 142.3 (C(9)); 133.9, 137.3 (C(4a), C(9a)); 198.8 (C(7)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{17}H_{24}O_2Si$ [M+H]$^+$: 289.1618, found: 289.1602; calcd for [M+Na]$^+$: 311.1438, found: 311.1433.

6.3.3. *rac-r*-6-Azido-*c*-8-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-benzocyclohepten-*c*-7-ol (16a) and *rac-r*-6-Azido-*c*-8-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-benzocyclohepten-*t*-7-ol (16b)

To a solution of **14a** (155 mg, 0.47 mmol) in THF (18 mL) and AcOH (2.7 mL) was added NaBH$_3$CN (37 mg, 1.25 equiv) and the solution stirred for 4.5 h at rt under Ar. The solution was neutralized with solid Na$_2$CO$_3$. The solids were filtered off and the solvent was evaporated. The residue was dissolved in AcOEt (20 mL) and the solution was filtered and evaporated to give a 60:40 mixture of **16a**/**16b** (160 mg, quant.).

6.3.3.1. Compounds 16a and 16b. Colorless resin. IR (KBr): 778, 899, 1055, 1078, 1255, 2108, 2858, 2930, 2954, 3490, 3582 cm^{-1}. ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz) *Major isomer* **16a**: 0.09, 0.14 (2 s, 6H, OSiMe$_2$); 0.93 (s, 9H, OtBu); 2.37 (d, 1H, Hb-9); 2.62 (d, 1H, Hb-5); 2.76 (s, 1H, OH); 3.21 (d, 1H, H-6); 3.58 (dd, 1H, Ha-9); 3.66 (d, 1H, H-8); 3.74 (dd, 1H, Ha-5); 4.15 (s, 1H, H-7); 7.12–7.22 (m, 4H, Har); J(5a,5b) = 13.8, J(5a,6) = 11.6, J(5b,6) = 0, J(8,9a) = 11.6, J(8,9b) = 0, J(9a,9b) = 13.2 Hz. *Minor isomer* **16b**: 0.12, 0.20 (2 s, 6H, OSiMe$_2$); 0.95 (s, 9H, OtBu); 2.73 (dd, 1H, Hb-9); 2.80 (dd, 1H, Hb-5); 2.92 (s, 1H, OH); 2.95(dd, 1H, Ha-5); 3.0 (dd, 1H, Ha-9); 3.32 (ddd, 1H, H-6); 3.39 (ddd, 1H, H-8); 3.63 (t, 1H, H-7); 7.12–7.22 (m, 4H, Har). J(5a,5b) = 14.4, J(5a,6) = 11.6, J(5b,6) = 2.4, J(6,7) = 9.4, J(7,8) = 8.4, J(8,9a) = 10.8, J(8,9b) = 1.8, J(9a,9b) = 14.0 Hz. ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100 MHz) *Major isomer* **16a**: −5.0, −4.8 (OSiMe$_2$); 18.0 (CMe$_3$); 25.7(OtBu); 32.3 (C(5)); 36.9 (C(9)); 60.9 (C(6)); 72.1 (C(8)); 75.9 (C(7)); 127.2, 127.3, 127.4, 127.7 (4 CHar); 136.3, 136.8 (C(4a), C(9a)). *Minor isomer* **16b**: −4.7, −4.2 (OSiMe$_2$); 17.9 (CMe$_3$); 25.7 (OtBu); 37.3 (C(5)); 40.4 (C(9)); 63.6 (C(6)); 74.5 (C(8)); 82.5 (C(7)); 129.3, 129.7, 129.8, 129.9 (4 CHar); 137.7 (C(4a), C(9a)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{17}H_{27}N_3NaO_2Si$ [M+Na]$^+$: 356.1765, found: 356.1762.

6.3.4. *rac-r*-6-Azido-*t*-8-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-benzocyclohepten-*c*-7-ol (17a) and *rac-r*-6-Azido-*t*-8-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-benzocyclohepten-*t*-7-ol (17b)

Same procedure with **14b** (304 mg, 0.9 mmol) in THF (23 mL) and AcOH (3.2 mL) and with NaBH$_3$CN (71 mg, 1.25 equiv) to give a 80:20 mixture of **17a**/**17b** (320 mg, quant.).

6.3.4.1. Compounds 17a and 17b. Colorless resin. IR (KBr): 880, 1109, 1257, 1568, 1660, 2108, 2858, 2930, 2954, 3436 cm^{-1}. ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz, 323 K): *Major isomer* **17a**: 0.10, 0.14 (2 s, 6H, OSiMe$_2$); 0.86 (s, 9H, OtBu); 2.79 (dd, 1H, Hb-9); 2.84 (d, 1H, Hb-5); 3.01 (d, 1H, Ha-9); 3.18 (dd, 1H, Ha-5); 3.80 (dd, 1H, H-7); 3.85 (t, 1H, H-8); 4.08 (dd, 1H, H-6); 7.08–7.17 (m, 4H, Har). J(5a,5b) = 14.4, J(5a,6) = 8.4, J(5b,6) = ca. 0, J(6,7) = 2.8, J(7,8) = 7.6, J(8,9a) = ca. 0, J(8,9b) = 9.6, J(9a,9b) = 14.4 Hz. *Minorisomer* **17b** (partial data): 0.09, 0.11 (2 s, 6H, OSiMe$_2$); 0.83 (s, 9H, OtBu); 2.61 (m, 1H); 3.28 (m, 1H); 4.01 (m, 1H, H-8). ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100 MHz): *Major isomer* **17a**: −4.8, −4.3 (OSiMe$_2$); 18.0 (CMe$_3$); 25.7 (OtBu); 35.0 (C(5)); 39.7 (C(9)); 61.4 (C(6)); 71.1 (C(8)); 79.4 (C(7)); 126.9, 127.0, 127.3, 130.4 (4 CHar); 136.2, 136.8 (C(4a), C(9a)). *Minorisomer* **17b**: −4.8, −4.6 (OSiMe$_2$); 18.0 (CMe$_3$); 25.7(OtBu); 34.5, 38.0 (C(5), C(9)); 61.8 (C(6)); 70.4 (C(8)); 76.5 (C(7)); 126, 130.2 (4 CHar); 136.5, 136.6 (C(4a), C(9a)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{17}H_{26}N_3OSi$ [M−H$_2$O+H]$^+$: 316.1840, found: 316.1851.

6.3.5. Deprotection of 17a/17b: *rac-r*-8-Azido-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-benzocyclohepten-*t*-6,*c*-7-diol (18a) and *rac-r*-8-Azido-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-benzocyclohepten-*t*-6,*t*-7-diol (18b)

A solution of **17a**/**17b** (300 mg, 0.9 mmol) in EtOH (2 mL) and Et$_2$O (7 mL) was stirred with dry 5 M HCl in Et$_2$O (1.2 mL, 7 equiv) at rt for 30 min under Ar. The solvent was evaporated and the residue recrystallized in MeOH/AcOEt to give a 60:40 mixture of **18a**/**18b** (161 mg, 82%).

6.3.5.1. Compounds 18a and 18b. Colorless crystals, mp 126–128 °C. IR (KBr): 1048, 1268, 1403, 2107, 2850, 2900, 3029, 3292, 3369 cm^{-1}. ^{1}H NMR (CD$_3$OD, 400 MHz, 323 K) *Major isomer* **18a**: 2.82 (dd, 1H, Hb-5); 2.89 (d, 1H, Hb-9); 3.05 (d, 1H, Ha-5); 3.22 (dd, 1H, Ha-9); 3.69 (t, 1H, H-6); 3.80 (dd, 1H, H-7); 3.94 (m, 1H, H-8); 7.12 (m, 4H, Har). J(5a,5b) = 14.4, J(5a,6) = ca. 0, J(5b,6) = 9.2, J(6,7) = 7.4, J(7,8) = 3.0, J(8,9a) = 8.8, J(8,9b) = ca. 0, J(9a,9b) = 14.4 Hz. ^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100 MHz, 323 K): *Major isomer* **18a**: 35.7 (C(9)); 39.9 (C(5)); 63.4 (C(8)); 71.2 (C(6)); 79.7 (C(7)); 127.8, 128.0, 131.2, 131.3 (4 CHar); 137.9, 138.3 (C(4a), C(9a)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{11}H_{13}NaN_3O_2$ [M+Na]$^+$: 242.0900, found: 242.0908.

6.3.6. *rac-r*-8,9-Epoxy-*c*-7-(*tert*-butoxycarbonylamino)-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-benzocyclohepten-*c*-6-ol (21)

A solution of **20** (66 mg, 0.24 mmol) in CH$_2$Cl$_2$ (20 mL) and *m*-CPBA (58 mg, 0.34 mmol) under Ar was stirred at rt for 16 h. An aqueous 0.4 M Na$_2$S$_2$O$_3$ in 1 N NaHCO$_3$ solution was added and the mixture was extracted with AcOEt, the combined organic phases were washed with brine, dried (MgSO$_4$). The solvent was evaporated and the residue crystallized in *i*Pr$_2$O to give **21** (46 mg, 70%).

6.3.6.1. Compound 21. Colorless crystals, mp 161–163 °C. IR (KBr): 1109, 1167, 1520, 1702, 2864, 2925, 2973, 2994, 3350, 3474 cm^{-1}. ^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz): 1.47 (s, 1H, NHBoc); 2.55 (s, 1H, OH); 2.99 (dd, 1H, Hb-5); 3.27 (dd, 1H, Ha-5); 3.73 (ddd, 1H, H-8); 4.08 (d, 1H, H-9); 4.13 (m, 1H, H-6); 4.22 (td, 1H, H-7);

5.63 (d, 1H, NH); 7.16 (dd, 1H, Har); 7.30 (m, 2H, Har); 7.48 (dd, 1H, Har). J(5a,5b) = 15.2, J(5a,6) = 8.2, J(5b,6) = 3.2, J(8,9) = 4.4, J(7,NH) = 9.2 Hz. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): 28.3 (tBu); 39.8 (C(5)); 51.6 (C(7)); 52.6 (C(7)); 60.8 (C(9)); 61.6 (C(8)); 72.7 (C(6)); 80.0 (CMe_3); 127.2, 129.5, 132.1, 132.8 (4 CHar); 132.0, 134.7 (C(4a), C(9a)); 155.8 (NCO). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{16}H_{21}NO_4$ [M+Na]$^+$: 314.1363, found: 314.1362.

6.3.7. *rac-r-7-(tert-Butoxycarbonylamino)-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocyclohepten-c-6,c-8-diol* (22)

To a solution of **21** (150 mg, 0.5 mmol) in dry THF (8 mL) was added at −78 °C a 1 M solution of DIBAL in toluene (3 mL, 3 mmol) and the solution was stirred at −30 °C for 1 h. AcOEt and an aqueous 1 M sodium tartarate solution were added and the biphasic mixture stirred at rt for 30 min. The organic phase was washed with brine, the aqueous phase extracted with AcOEt, and the combined organic phases dried ($MgSO_4$) and evaporated to give **22** after washing with Et_2O (126 mg, 84%).

6.3.7.1. Compound 22. Colorless crystals, mp 159–161 °C. IR (KBr): 1045, 1166, 1520, 1670, 2880, 2917, 2948, 3398, 3527 cm^{-1}. ^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz): 1.47 (s, 9H, NHBoc); 2.21 (s, 1H, OH); 3.08 (d, 4H, H-5, H-9); 3.75 (m, 1H, H-7); 4.24 (m, 2H, H-6, H-8); 5.67 (m, 1H, NH); 7.21 (m, 4H, Har). J(5,6) = 4.0, J(6,7) = 3.6, J(7,NH) = 7.6 Hz. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): 28.4 (OtBu); 39.5 (C(5)); 58.4 (C(7)); 70.9 (C(6)); 79.8 (CMe_3); 127.2, 131.4 (4 CHar); 135.8 (C(4a), C(9a)); 155.4 (NCO). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{16}H_{24}NO_4$ [M+H]$^+$: 294.1700, found: 294.1699.

6.3.8. *rac-cis-7-(tert-Butoxycarbonylamino)-8-hydroxy-5,7,8,9-tetrahydrobenzocyclohepten-6-one* (23)

To a solution of **22** (68 mg, 0.23 mmol) in CH_2Cl_2 (6.4 mL) was added Dess–Martin periodinane (127 mg, 0.3 mmol). This mixture was stirred at rt for 1.5 h, then diluted with Et_2O and reduced by stirring with a solution of $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ (10%, 5 equiv) in aqueous 1 N $NaHCO_3$ for 1 h. After separation, the aqueous layer was extracted with Et_2O and the combined organic phases were dried over $MgSO_4$ and concentrated in vacuum. The obtained solid was recrystallized in MeOH/Et_2O to give **23** (58 mg, 85%).

6.3.8.1. Compound 23. Colorless crystals, mp 151–153 °C. IR (KBr): 1075, 1170, 1512, 1679, 1718, 2903, 2931, 2979, 3414 cm^{-1}. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 1.43 (s, 9H, NHBoc); 1.91 (s, 1H, OH); 3.05 (dd, 1H, Hb-9); 3.35 (dd, 1H, Ha-9); 3.71 (d, 1H, Hb-5); 3.89 (d, 1H, Ha-5); 4.48 (ddd, 1H, H-8); 4.59 (m, 1H, H-7); 5.65 (d, 1H, NH); 7.24 (m, 4H, Har). J(5a,5b) = 15.6, J(7,NH) = 5.6, J(7,8) = 3.4, J(8,9a) = 4.0, J(8,9b) = 8.6 Hz. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): 28.3 (tBu); 38.4 (C(9)); 48.3 (C(5)); 64.6 (C(7)); 70.8 (C(8)); 80.2 (CMe_3); 128.0, 128.2, 129.8, 131.0 (4 CHar); 132.6, 134.8 (C-(4a), C-(9a)); 155.2 (NCO); 202.3 (C(6)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{16}H_{21}NNaO_4$ [M+Na]$^+$: 314.1363, found: 314.1367.

6.3.9. *rac-cis-8-Azido-7-hydroxy-5,7,8,9-tetrahydrobenzocyclohepten-6-one* (19a)

Same procedure as for **23** with *trans*-**18a,b** (40 mg, 0.18 mmol), DMP (199 mg, 0.47 mmol, 1.2 equiv) in CH_2Cl_2 (5 mL) to obtain after recrystallization in EtOH/Et_2O **19a** (29 mg, 74%).

6.3.9.1. Compounds 19a. Colorless crystals, mp 126–128 °C. IR (KBr): 755, 1056, 1715, 2109, 2850, 2918, 3022, 3355 cm^{-1}. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): 3.07 (dd, 1H, Hb-9); 3.30 (dd, 1H, Ha-9); 3.70 (d, 1H, Hb-5); 3.89 (d, 1H, OH); 3.91 (d, 1H, Ha-5); 4.42 (ddd, 1H, H-8); 4.58 (t, 1H, H-7); 7.18–7.28 (m, 4H, Har). J(5a,5b) = 14.6, J(7,8) = 5.0, J(7,OH) = 5.0, J(8,9a) = 3.6, J(8,9b) = 8.2, J(9a,9b) = 14.8 Hz. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): 35.2 (C(9)); 46.7 (C(5)); 63.4 (C(8)); 80.3 (C(7)); 128.1, 128.3, 129.7, 130.9 (4 CHar); 131.3, 135.1 (C(4a), C(9a)); 203.6 (C(6)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{11}H_{11}N_3O_2$ [M+Na]$^+$: 240.0743, found: 240.0741.

6.3.10. *rac-cis-6-Amino-8-hydroxy-5,6,8,9-tetrahydrobenzocyclohepten-7-one, hydrochloride* (3a)

A solution of **14a** (59 mg, 0.18 mmol) in EtOH (7 mL) and 1 N aqueous HCl (0.68 mL, 1 equiv), was hydrogenolyzed over Pd/C 5% (4 mg) at rt for 6 h. The catalyst was centrifuged off and the solution evaporated. The obtained **3a** was washed thrice with hot AcOEt (23 mg, 57%).

6.3.10.1. Compound 3a. Colorless crystals, mp >210 °C (dec). IR (KBr): 753, 1010, 1511, 1722, 2655, 2878, 3025, 3383 cm^{-1}. ^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz): 3.07 (dd, 1H, Hb-5); 3.11 (m, 1H, Ha-5, 1H, Hb-9); 3.14 (dd, 1H, Ha-9); 4.13 (dd, 1H, H-6); 4.32 (dd, 1H, H-8); 7.22–7.40 (m, 4H, Har); J(5a,5b) = 14.0, J(5a,6) = 10.4, J(5b,6) = 4.2, J(6,8) = 0.8, J(8,9a) = 10.6, J(8,9b) = 4.4, J(9a,9b) = 14.0 Hz. ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz): 34.4 (C(9)); 39.3 (C(5)); 57.2 (C(6)); 75.4 (C(8)); 127.6, 128.0, 129.8, 130.2 (4 CHar); 135.8, 136.7 (C(4a), C(9a)); 205.1 (C(7)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{11}H_{14}NO_2$ [M+H]$^+$: 192.1019, found: 192.1018.

6.3.11. *rac-trans-6-Amino-8-hydroxy-5,6,8,9-tetrahydrobenzocyclohepten-7-one, hydrochloride* (3b)

Same procedure as for **3a** with **14b** (130 mg, 0.39 mmol) at 50 °C for 16 h. The obtained solid was stirred with 5 M HCl in Et_2O (5 mL) for 30 min to give **3b** (41 mg, 46%).

6.3.11.1. Compound 3b. Colorless crystals, mp >224 °C. IR (KBr): 670, 1112, 1494, 1727, 3000, 3375 cm^{-1}. ^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz): 3.0 (dd, 1H, Hb-5); 3.05 (dd, 1H, Hb-9); 3.19 (dd, 1H, Ha-5); 3.22 (dd, 1H, Ha-9); 4.43 (dd, 1H, H-6); 4.52 (dd, 1H, H-8); 7.27–7.30 (m, 4H, Har). J(5a,5b) = 14.2, J(5a,6) = 3.4, J(5b,6) = 11.0, J(8,9a) = 7.4, J(8,9b) = 2.2, J(9a,9b) = 15.2 Hz. ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz): 35.5 (C(9)); 37.9 (C(5)); 54.5 (C(6)); 74.1 (C(8)); 127.1, 127.5, 129.7, 131.7 (4 CHar); 135.0, 136.0 (C(4a), C(9a)); 206.3 (C(7)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{11}H_{14}NO_2$ [M+H]$^+$: 192.1019, found: 192.1018.

6.3.12. *rac-c-8-Amino-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocyclohepten-c-6,c-7-diol, hydrochloride* (4a) and *rac-r-8-Amino-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocyclohepten-c-6,t-7-diol, hydrochloride* (4b)

A solution of azide mixture **17a**/**17b** (133 mg, 0.4 mmol) in EtOH (15 mL) was hydrogenolyzed with 1 N aqueous HCl (0.4 mL, 1 equiv) over Pd/C 5% (16 mg) for 16 h at rt. The catalyst was centrifuged off and the solution evaporated. The obtained solid was washed thrice with hot AcOEt and recrystallized in MeOH/AcOEt to give a 60:40 mixture of **4a**/**4b** (59 mg, 65%).

6.3.12.1. Compounds 4a and 4b. Colorless crystals, mp 198–202 °C. IR (KBr): 1098, 1491, 1603, 2923, 3021, 3366 cm^{-1}. ^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz, 323 K) *Major isomer* **4a**: 2.71 (d, 1H, Hb-5); 2.80 (d, 1H, Hb-9); 3.42–3.46 (m, 3H, Ha-9, Ha-5, H-8); 3.85 (m, 1H, H-6); 4.10 (s, 1H, H-7); 7.19 (m, 4H, Har). J(5a,5b) = 14.2, J(9a,9b) = 14.2 Hz. *Minor isomer* **4b**: 2.94 (dd, J = 2.8, 14.4 Hz, 1H, Hb-5); 2.97–3.04 (m, 3H, H-8, Ha-5, Hb-9); 3.14 (dd, J = 11.0, 14.2 Hz, 1H, Ha-9); 3.37 (m, 1H, H-6); 3.64 (dd, J = 8.4, 9.2 Hz, 1H, H-7); 7.19 (m, 4H, Har). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, 323 K): *Major isomer* **4a**: 33.6 (C(9)); 37.8 (C(5)); 54.5 (C(8)); 72.2 (C(6)); 73.8 (C(7)); 128.1, 128.8, 131.3, 131.6 (4 CHar); 136.4, 139.0 (C(4a), C(9a)). *Minor isomer* **4b**: 35.8 (C(9)); 40.7 (C(5)); 55.7 (C(8)); 74.0 (C(6)); 79.3 (C(7)); 128.8, 129.0, 130.7, 131.1 (4 CHar); 138.5, 136.9 (C(4a), C(9a)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{11}H_{17}NO_2$ [M+H]$^+$: 194.1176, found: 194.1175.

6.3.13. *rac-r*-8-Amino-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-benzocyclohepten-*t*-6,*c*-7-diol, hydrochloride (5a) and *rac-r*-8-Amino-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-benzocyclohepten-*t*-6,*t*-7-diol, hydrochloride (5b)

Same procedure as for **4a**/**4b** with the azide mixture **18a**/**18b** (30 mg, 0.14 mmol) to give a 93:7 mixture of **5a**/**5b** (18 mg, 60%).

6.3.13.1. Compounds 5a and 5b. Colorless crystals, mp >264 °C. IR (KBr): 1038, 1402, 1492, 2923, 2937, 3024, 3067, 3108, 3309, 3393 cm^{-1}. ^1H NMR (CD_3OD, 400 MHz, 323 K) *Major isomer* **5a**: 2.74 (d, 1H, Hb-9); 2.82 (dd, 1H, Hb-5); 3.34 (m, 1H, Ha-5); 3.46 (t, 1H, Ha-9); 3.54 (m, 1H, H-8); 3.90 (t, 1H, H-6); 3.98 (dd, 1H, H-7); 7.17 (m, 4H, Har). *J*(5a,5b) = 14.6, *J*(5a,6) = ca. 0, *J*(5b,6) = 7.8, *J*(6,7) = 5.6, *J*(7,8) = 2.4, *J*(8,9a) = 10.4, *J*(8,9b) = ca. 0, *J*(9a,9b) = 13.6 Hz. *Minor isomer* **5b** (partial data): 4.24 (m, 1H); 3.74 (dd, *J* = 3.0, 9.8 Hz, 1H); 3.04 (m, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, 323 K): *Major isomer* **5a**: 33.9 (C(9)); 37.2 (C(5)); 52.6 (C(8)); 70.9 (C(6)); 74.4 (C(7)); 128.1, 128.6, 130.8, 132.4 (4 CHar); 136.5, 138.7 (C(4a), C(9a)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{11}H_{17}NO_2$ $[M+H]^+$: 194.1176, found: 194.1174.

6.3.14. *rac-cis*-8-Amino-7-hydroxy-5,7,8,9-tetrahydrobenzocyclohepten-6-one, hydrochloride (6)

A solution of azide **19a** (20 mg, 0.09 mmol) in MeOH (10 mL) was hydrogenolyzed with 1 N aqueous HCl (90 µl, 1 equiv) over PtO_2 (6 mg) for 4.5 h at rt under H_2 (1 atm). The catalyst was centrifuged off and the solution evaporated. The obtained solid was recrystallized in MeOH/Et_2O to give **6** (2 mg, 10%).

6.3.14.1. Compounds 6. Colorless crystals. ^1H NMR (CD_3OD, 400 MHz) hemiketal form: 3.06 (d, 1H, Hb-5); 3.16 (dd, 1H, Hb-9); 3.38 (d, 1H, Ha-5); 3.38 (d, 1H, Ha-9); 3.72 (dd, 1H, H-8); 4.56 (d, 1H, H-7); 7.28 (m, 4H, Har). *J*(5a,5b) = 14.8, *J*(7,8) = 3.6, *J*(8,9a) = 2.2, *J*(8,9b) = 6.8, *J*(9a,9b) = 15.6 Hz. ^{13}C NMR (CD_3OD, 100 MHz): 35.7 (C(9)); 44.8 (C(5)); 51.8 (C(8)); 74.6 (C(7)); 96.4 (C(6)); 128.7, 129.4, 132.9, 133.0 (4 CHar); 133.5, 145.1 (C(4a), C(9a)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{11}H_{14}NO_2$ $[M+H]^+$: 192.1019, found: 192.1019.

6.3.15. *rac-cis*-7-Amino-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-benzocyclohepten-6-8-diol, hydrochloride (7)

A solution of **22** (20 mg, 0.07 mmol) in dry dioxane (0.6 mL) and dry Et_2O (1 mL), was stirred with a solution of 5 N HCl in Et_2O (0.8 mL) under Ar for 2 days at rt. The precipitate was isolated by centrifugation and recrystallized in MeOH/iPr_2O to give **7** (10 mg, 71%).

6.3.15.1. Compound 7. Colorless crystals, mp 256–258 °C. IR (KBr): 745, 758, 1123, 1496, 2878, 1941, 3022, 3409 cm^{-1}. ^1H NMR (CD_3OD, 400 MHz, 323 K): 2.97 (dd, 2H, Hb-5, Hb-9); 3.20 (dd, 2H, Ha-5, Ha-9); 3.62 (t, 1H, H-7); 4.09 (d, 2H, H-6, H-8); 7.18 (m, 4H, Har). *J*(5a,5b) = 14.6, *J*(5a,6) = 9.4, *J*(5b,6) = ca. 0, *J*(6,7) = 2.8 Hz. ^{13}C NMR (CD_3OD, 100 MHz, 323 K): 39.2 (C(5),C(9)); 61.1 (C(7)); 68.9 (C(6),C(8)); 128.4, 131.8 (CHar)); 137.2 (C(4a),C(9a)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{11}H_{16}NO_2$ $[M+H]^+$: 194.1176, found: 194.1175.

6.3.16. *rac-cis*-7-Amino-8-hydroxy-5,7,8,9-tetrahydrobenzocyclohepten-6-one, hydrochloride (8)

To a solution of **23** (32 mg, 0.1 mmol) in dioxane (0.3 mL) and dry Et_2O (3 mL) was added 5 N HCl in Et_2O (250 µL). The mixture was stirred for 16 h then the precipitate was centrifuged and recrystallized in MeOH/Et_2O to give **8** (10 mg, 40%).

6.3.16.1. Compound 8. Colorless crystals, mp >210 °C (dec). IR (KBr): 1503, 1723, 2924, 3021, 3066, 3322 cm^{-1}. ^1H NMR (CD_3OD, 400 MHz, 323 K): 3.12 (dd, 1H, Hb-9); 3.47 (dd, 1H, Ha-9); 3.74 (d, 1H, Hb-5); 4.10 (d, 1H, Ha-5); 4.35 (d, 1H, H-7); 4.48 (ddd, 1H, H-8); 7.25 (m, 4H, Har). *J*(5a,5b) = 15.2, *J*(7,8) = 4.8, *J*(8,9a) = 3.6, *J*(8,9b) = 8.4, *J*(9a,9b) = 14.6 Hz. ^{13}C NMR (CD_3OD, 100 MHz, 323 K): 39.7 (C(9)); 48.4 (C(5)); 64.1 (C(7)); 69.8 (C(8)); 128.9, 129.0, 130.7, 132.2 (4 CHar)); 133.5, 136.7 (C(4a), C(9a)); 200.8 (C(6)). HR-MS (ESI-Q-Tof) calcd for $C_{11}H_{14}NO_2$ $[M+H]^+$: 192.1019, found: 192.1019.

6.4. Conformational analysis

For **3a**, the large couplings *J*(5a,6) and *J*(8,9b) (10.4–11.2 Hz) corresponded to *trans*-diaxial relation in a chair conformation with axial Ha-5, H-6, H-8 and Hb-9. The amino and hydroxyl substituents in 6 and 8 positions were thus equatorial and in *cis* relation. For **3b**, the large coupling *J*(5a,6) (10.4–11.0 Hz), as above, corresponded with axial H-6 and Ha-5 protons. By contrast, the weaker *J*(8,9a) coupling (7.4–7.8 Hz) pointed out a diequatorial relation for the protons H-8 and Ha-9. The amino group was equatorial and in *trans* relation with the axial hydroxyl groups. (Fig. 2).

6.5. Enzyme assays

6.5.1. Enzyme source: *A. proteolytica*

Aminopeptidase was purchased from Sigma Chemical Co. Porcine kidney APN was purified as a soluble form according to a published procedure.[36]

6.5.2. Typical assay conditions

Spectrophotometric assays were performed with L-leucine-*para*-notroanilide as a substrate APN (K_m = 0.2 mM), and APaero (K_m = 0.03 mM). All kinetic studies were performed at 30 °C and the reactions were started by the addition of enzyme in 1 mL assay medium: APaero, 3 mU in 10 mM Tris–HCl, 0.05 mM $ZnCl_2$, pH 8.0; APN

25 mU in10 mM Tris–HCl, pH 7.5.

The release of *para*-nitroaniline (ε = 10,800 M^{-1} cm^{-1}) at 405 nm was measured to determine initial velocities. K_i values were determined using a Dixon plot.[30]

Acknowledgments

The support of the Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse and the Université de Haute-Alsace is gratefully acknowledged. We also wish to thank the INCa and the Ligue Contre le Cancer for their financial support. We thank Dr. Didier LeNouën for the NMR explanations, Dr. Cécile Joyeux for the HR-MS measurements as well as Dr. Mathias Wind from Basilea Pharmaceuticals Ltd in CH-Basel. We are also grateful to Fabienne Schegg and Sandrine Prudent for their participation to this work.

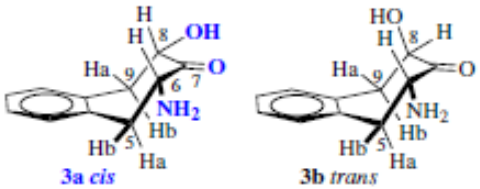


Figure 2. Conformation of the ketones *cis*-**3a** and *trans*-**3b** determined by NMR analysis.

References and notes

1. *Handbook on Proteolytic Enzymes*; Rawling, N. D., Salvesen, G. S., Eds., 3rd ed.; Elsevier, 2013. Vol. 1.
2. McDonald, J. K.; Barrett, A. J. In *Mammalian Protease, A glossary and Bibliography*; Academic Press: New York, 1986; Vol. 2.
3. Hooper, N. M. *FEBS Lett.* **1994**, *28*, 1.
4. Rawling, N. D.; Barrett, A. J. *Enzymology* **1995**, *248*, 183.
5. Taylor, A. *FASEB J.* **1993**, *7*, 290.
6. Hooper, N. M.; Lendeckel, U. *Aminopeptidases in Biology and Diseases*; Springer Science, 2003.
7. Mina-Osorio, P. *Trends in Mol. Med.* **2008**, *14*, 361.
8. Kochan, G.; Krojer, T.; Harvey, D.; Fischer, R.; Chen, L.; Vollmar, M.; von Delft, F.; Kavanagh, K. L.; Brown, M. A.; Bowness, P.; Kessler, B. M.; Oppermann, U. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 1745.
9. Mc Gowan, S.; Oellig, C. A.; Birru, W. A.; Caradoc-Davies, T. T.; Stack, C. M.; Lowther, J.; Skinner-Adams, T.; Mucha, A.; Kafarski, P.; Grembecka, J.; Trenholme, K. R.; Buckle, A. M.; Gardiner, D. L.; Dalton, J. P.; Whisstock, J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 2537.
10. (a) Sträter, N.; Lipscomb, W. N. *Biochemistry* **1995**, *34*, 14792; (b) Lowther, W. T.; Matthews, B. W. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4581.
11. Mucha, A.; Drag, M.; Dalton, J. P.; Kafarski, P. *Biochimie* **2010**, *92*, 1509.
12. Flipo, M.; Florent, I.; Grellier, P.; Sergheraert, C.; Deprez-Poulain, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2659.
13. Grembecka, J.; Mucha, A.; Cierpicki, T.; Kafarski, P. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2641.
14. Xu, W.; Li, Q. *Curr. Med. Chem.—Anti-Cancer Agents* **2005**, *5*, 281.
15. Bauvois, B.; Dauzonne, D. *Med. Res. Rev.* **2006**, *26*, 88.
16. Albrecht, S.; Al-Lakkis-Wehbe, M.; Orsini, A.; Defoin, A.; Pale, P.; Salomon, E.; Tarnus, C.; Weibel, J.-M. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1434.
17. Maiereanu, C.; Schmitt, C.; Schifano-Faux, N.; Le Nouën, D.; Defoin, A.; Tarnus, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5716.
18. Albrecht, S.; Salomon, E.; Defoin, A.; Tarnus, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7241.
19. Allinger, N. L.; Szkrybalo, W. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 722.
20. Russell, G. A.; Blankespoor, R. L.; Trahanovsky, K. D.; Chung, C. S. C.; Whittle, P. R.; Mattox, J.; Myers, C. L.; Penny, R.; Ku, Th.; Kosugi, Y.; Givens, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1906.
21. Mataka, S.; Takahashi, K.; Mimura, T.; Hirota, T.; Takuma, K.; Kobayashi, H.; Tashiro, M. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2653.
22. Simchen, G.; Kober, W. *Synthesis* **1976**, 259.
23. (a) Hassner, A.; Reuss, R. H.; Pinnick, H. W. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3427; (b) Rubottom, G. M.; Vasquez, M. A.; Pelegrina, D. R. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 4319.
24. (a) Blanco, L.; Amice, P.; Conia, J. M. *Synthesis* **1976**, 194; (b) Reuss, R. H.; Hassner, A. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1785.
25. Effenberger, Fr.; Beisswenger, Th.; Az, R. *Chem. Ber.* **1985**, *118*, 4869.
26. Leong, M.; Mastryukov, V.; Boggs, J. *J. Mol. Struct.* **1998**, *445*, 149. From the given dihedral angles, it is possible to calculate the approximate dihedral angle between the different protons: (7,8a) 185°; (7,8e) 65°; (8a,9a) 195°; (8a,9e) 75°; (8e,9e) 45°.
27. Albrecht, S.; Salomon, E.; Defoin, A.; Tarnus, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4942.
28. Boger, D. L.; McKie, J. A.; Boyce, C. W. *Synlett* **1990**, 515.
29. (a) Boeckman, R. K., Jr; Shao, P.; Mullins, J. J. *Org. Synth.* **2000**, *77*, 141; (b) Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155.
30. Segel, I. H. *Enzyme Kinetics*; John Wiley & Son: New York, 1993.
31. Hill, H. O. A.; Sadler, P. J.; Thomson, A. J. *Metal Sites in Proteins and Models*; Springer, 1999.
32. Maret, W.; Li, Y. *Chem. Rev.* **2009**, *10*, 4682.
33. Maret, W. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *111*, 110.
34. Stamper, C. C.; Bienvenue, D. L.; Bennett, B.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Holz, R. C. *Biochemistry* **2004**, *43*, 9620.
35. (a) Ireland, R. E.; Liu, L. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2899; (b) Dess, D.; Martin, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7277.
36. Wacker, H.; Lecky, P.; Fischer, E. H.; Stein, E. A. *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 473.

2) Voie B

a) Stratégie de synthèse

Nous avons mis au point une voie de synthèse énantiosélective permettant d'accéder au diastéréoisomère (7*S*,8*S*)-**1**. La stratégie de synthèse envisagée est représentée schéma 7.

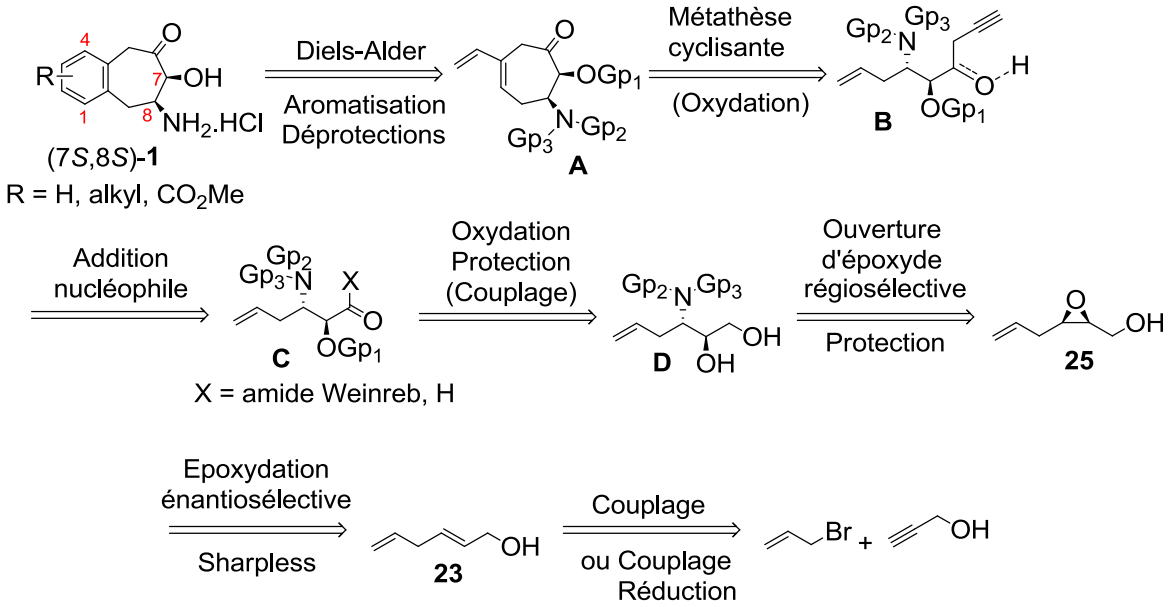


Schéma 7 : rétrosynthèse de la voie B

Le châssis moléculaire de type benzocycloheptane serait formé à partir de l'intermédiaire ène-yne **B** par une séquence métathèse cyclisante ène-yne/réaction de Diels-Alder/aromatisation. La métathèse cyclisante ène-yne intramoléculaire, pouvant être catalysée par un complexe ruthénium-carbène de Grubbs de deuxième génération, fournirait le 1,3-diène **A**. [167,168] Celui-ci serait engagé dans une réaction de cycloaddition [4+2] de Diels-Alder avec un diénophile de type alcène ou alcyne. Quelques exemples de diénophiles envisageables sont représentés figure 57. [169,170,171,172,173] Enfin, une réaction d'oxydation avec un oxydant tel que la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) permettrait l'aromatisation du cycle formé par la réaction de Diels-Alder, pour donner les analogues (7*S*,8*S*)-**1** après déprotection de l'alcool et de l'amine.

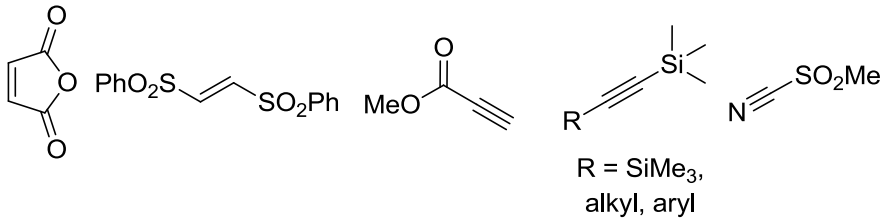


Figure 57 : diénophiles possibles pour la réaction de Diels-Alder

L'intermédiaire ène-yne serait obtenu par addition nucléophile d'un composé propargyle organométallique sur l'amide de Weinreb **C**. A cette étape, il est possible d'avoir formation de l'allène. Pour contourner ce problème, l'addition nucléophile pourrait également être envisagée sur l'aldéhyde **C**. L'alcool propargylique **B** serait obtenu, puis cyclisé par métathèse et oxydé en cétone.

L'amide de Weinreb et l'aldéhyde **C** seraient formés en trois et deux étapes respectivement, à partir de l'aminodiol **D** : l'oxydation sélective de l'alcool primaire en aldéhyde ou en acide carboxylique, suivie de la protection de l'alcool secondaire et du couplage de l'acide carboxylique avec la *N,O*-dimethylhydroxylamine. L'aminodiol **D** serait obtenu par ouverture régiosélective de l'époxyde **25** selon les conditions de Sharpless, puis par protection de l'amine. L'époxyde serait formé par époxydation énantiosélective de Sharpless de l'alcool allylique **23**. Ce dernier serait accessible à partir des réactifs commerciaux alcool propargylique et bromure d'allyle, soit par couplage catalysé à l'indium, soit par couplage catalysé au cuivre suivi d'une réduction.

b) Synthèse

L'alcool allylique **23** est obtenu par couplage de l'alcool propargylique avec le bromure d'allyle, catalysé à l'indium (schéma 8).

[167] S. T. Diver, A. J. Giessert, *Chem. Rev.* **2004**, *104,* 1317-1382.
[168] J. J. Lippstreu, B. F. Straub, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7444-7457.
[169] S. Kotha *et al.*, *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17*, 253-302.
[170] A. V. Vorogushin *et al.*, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5826-5831.
[171] M. W. Grafton *et al.*, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7199-7207.
[172] G. Hilt, J. Janikowski, *Org. Lett.* **2009***, 11*, 773-776.
[173] G. Hilt, K. I. Smolko, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2003**, *42*, 2795-2797.

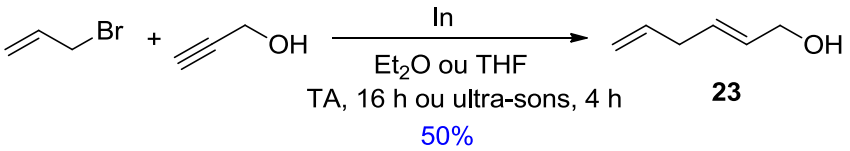


Schéma 8 : allylindation de l'alcool propargylique

Les organoindiens, utilisés à partir des années 80, présentent plusieurs avantages par rapport à d'autres organométalliques, tels que les organolithiens ou les réactifs de Grignard. [174,175] Les organoindiens ne sont sensibles ni à l'air, ni à l'humidité et présentent peu ou pas de toxicité. Ils peuvent être utilisés pour des réactions d'allylation en milieu aqueux et ils sont compatibles avec des groupements fonctionnels comportant des protons acides. [176] L'allylindien est préparé par insertion d'indium (0) dans la liaison C-Br du bromure d'allyle. Araki *et al.* suggèrent que dans les solvants tels que DMF et THF, l'espèce allylindium formée est le sesquibromure d'allylindium (schéma 9). L'indium est introduit en quantité stœchiométrique sous forme de grains coupés en petits morceaux alors que le bromure d'allyle est introduit en large excès (5 à 8 eq.). [177] La réaction d'allylation s'effectue dans le THF sous agitation à température ambiante [177], ou sous ultra-sons [178].

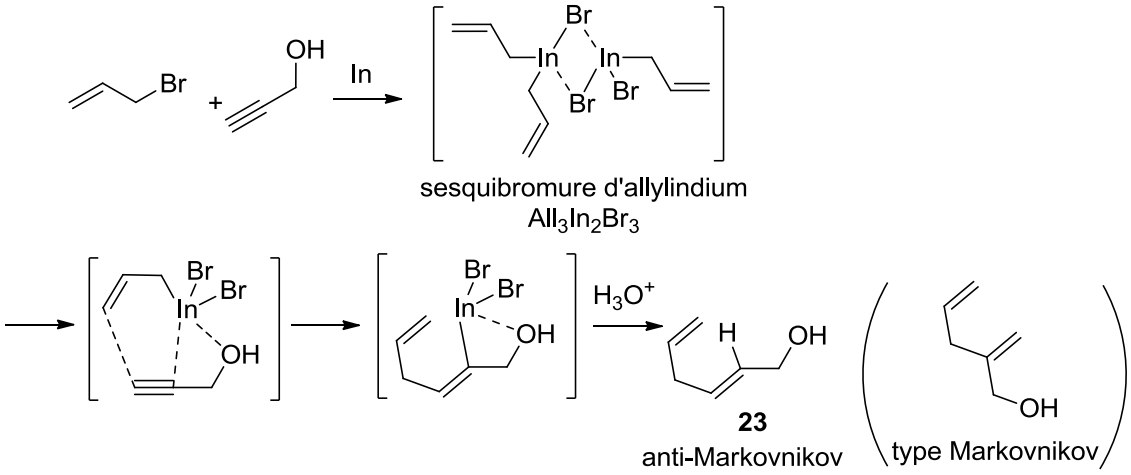


Schéma 9 : mécanisme d'allylindation de l'alcool propargylique

Araki *et al.* suggèrent qu'ensuite la réaction passe par un état de transition avec chélation, sous forme bicyclique dans lequel l'indium occupe une position tête de pont (schéma 9). [175,179] Le produit d'allylindation est ensuite traité en milieu acide pour donner le 1,4-diène linéaire.

Le 1,4-diène linéaire **23** ou produit de type anti-Markovnikov est obtenu très majoritairement par rapport au produit de type Markovnikov (>97/3). L'alcool allylique **23** est un produit volatil et il est difficile de l'isoler sans perte de produit ; le rendement obtenu n'est que de 50%.

Une autre méthode en deux étapes permet d'obtenir ce composé de manière propre sans étape de purification. La première étape consiste en un couplage de l'alcool propargylique et du bromure d'allyle en

[174] Science of Synthesis, Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations Vol. 7, Organometallics, H. Yamamoto, *Georg Thieme Verlag* **2014**, 1-802.
[175] Z.-L. Shen *et al.*, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 271-401.
[176] C. J. Li, T. H. Chan, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7017-7020.
[177] B. C. Ranu, A. Majee, *Chem. Comm.* **1997**, 1225-1226.
[178] E. Klaps, W. Schmid, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7537-7546.
[179] S. Araki *et al.*, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1841-1847.

présence d'une quantité catalytique de cuivre, d'une base faible K_2CO_3, de Na_2SO_3 dans l'eau (schéma 10).[180,181] Le produit de couplage **24** est obtenu avec un rendement de 65%.

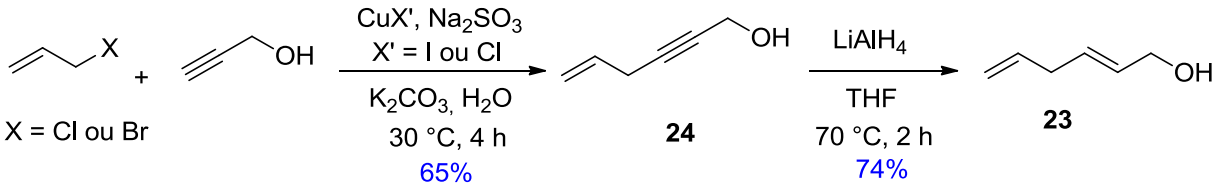


Schéma 10 : autre voie d'accès à l'alcool allylique 23

Le mécanisme de la réaction est présenté schéma 11. Il y a formation d'un complexe π-alcyne entre le sel de cuivre et l'alcool propargylique, conduisant à un acétylénure de cuivre par action de la base. La substitution nucléophile de type S_N2 ou S_N2' de l'acétylénure de cuivre sur l'halogénure d'allyle donne le composé ène-yne **24**. Le réducteur sulfite de sodium est additionné pour empêcher la réaction d'homocouplage oxydant d'alcynes de type Glaser, qui donnerait le 1,3-diyne symétrique.

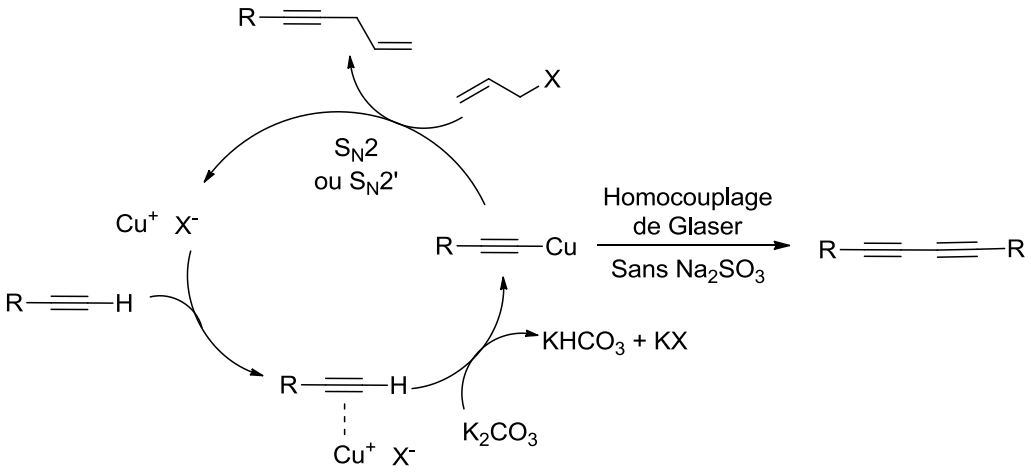


Schéma 11 : mécanisme du couplage cupro-catalysé d'un alcyne vrai et d'un halogénure d'allyle

La deuxième étape consiste en la réduction de l'alcyne du composé **24** en alcène-*E* par $LiAlH_4$ (schéma 10).[182] Cette réaction est une hydrométallation *trans*-sélective de la triple liaison, facilitée par la présence du groupement alcool à proximité de la triple liaison (schéma 12). Il y a formation d'un intermédiaire *trans*-vinyl alane par coordination de l'alcool et de la triple liaison avec l'aluminium ; cet intermédiaire est ensuite protoné pour donner l'alcool allylique **23**.

[180] L. W. Bieber, M. F. da Silva, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7088-7090.
[181] A. Sevin *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1965**, *24*, 1953-1959.
[182] T. Yoshinari *et al.*, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2010**, *49*, 881-885.

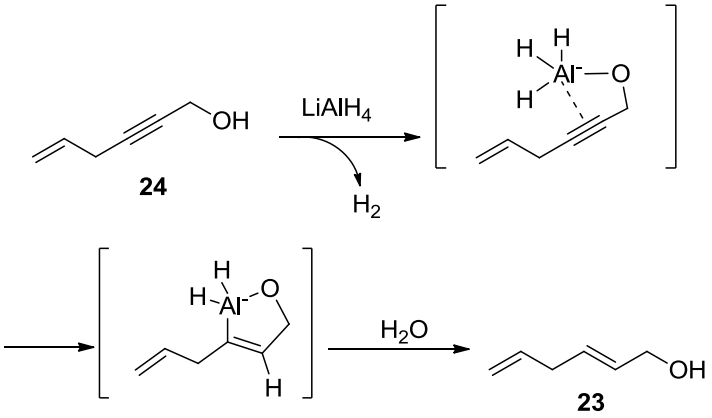


Schéma 12 : mécanisme de réduction d'un alcool propargylique par les hydrures

L'alcool allylique **23** est ensuite engagé dans une réaction d'époxydation énantiosélective de Sharpless avec l'oxydant *tert*-butylhydroperoxyde (TBHP), une quantité catalytique du ligand chiral tartrate D-diisopropyl-(-) (D(-)DIPT) et de Ti(O*i*Pr)$_4$ et du tamis moléculaire 4 Å (schéma 13). [182,183,184,185] L'énantiomère (*R*, *R*) **25** est le produit majoritaire de cette réaction et est obtenu avec un faible rendement de 35%.

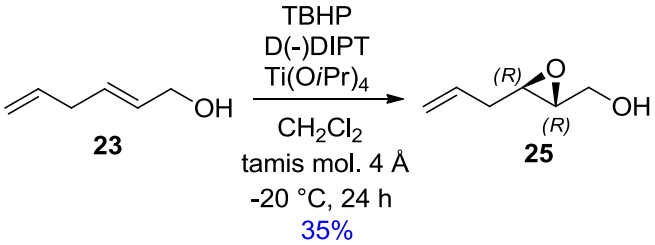


Schéma 13 : séquence époxydation énantiosélective de Sharpless

Le mécanisme de la réaction de Sharpless est décrit schéma 14. [183,186] La première étape consiste en un échange rapide de ligand entre Ti(O*i*Pr)$_4$ et D(-)DIPT, formant un complexe dimérique de titane **I**. Ce dernier subit un échange de ligand avec l'oxydant TBHP et l'alcool allylique (**II**, **III**). L'orientation des coordinats réactifs est gouvernée par le caractère chiral du tartrate. Dans l'état de transition, un atome d'oxygène issu du peroxyde est transféré sur l'alcène. L'énantiosélectivité est en accord avec l'état de transition **IV**. Le tamis moléculaire est utilisé pour emprisonner l'eau qui a un effet délétère à la fois sur la vitesse et l'énantiosélectivité de la réaction. [187]

[183] T. Katsuki, V. Martin, *Org. Reactions* **1996**, *48*, 1-300.
[184] M. Alcón *et al.*, *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, *10*, 4639-4651.
[185] S. Ma, B. Ni, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3286-3300.
[186] K. B. Sharpless *et al.*, *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 1823-1836
[187] R.M. Hanson, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1922-1925.

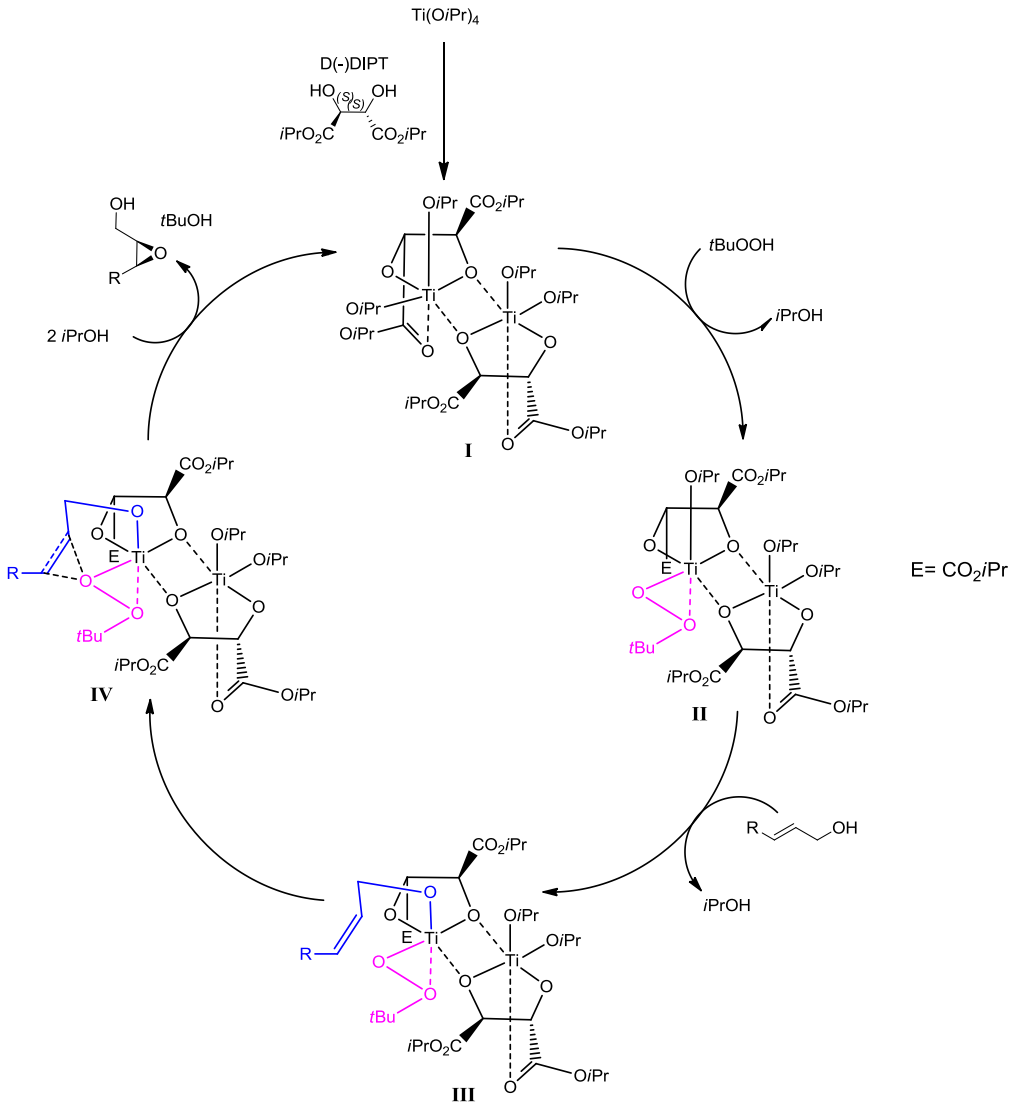


Schéma 14 : mécanisme de l'époxydation de Sharpless avec D(-)DIPT

L'étape suivante est l'ouverture régiosélective de l'époxyde **25** par la *para*-méthoxybenzylamine en présence de Ti(O*i*Pr)$_4$ (schéma 15). [184]

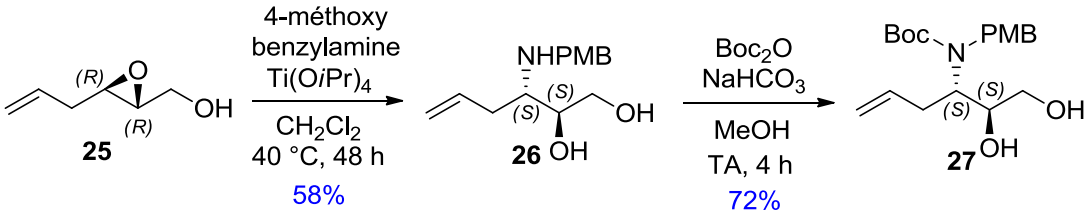


Schéma 15 : ouverture régiosélective de l'époxyde et protection de l'amine

Sharpless a montré que l'utilisation de Ti(O*i*Pr)$_4$ permet de diriger l'ouverture nucléophile de l'époxyde au niveau du carbone C3 par coordination entre les deux oxygènes du substrat et le titane (schéma 16). [188,189] Il est suggéré que la liaison entre le carbone C3 et l'oxygène soit mieux orientée que la liaison entre le carbone

[188] M. Caron, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1557-1560.
[189] A. Riera, M. Moreno, *Molecules* **2010**, *15*, 1041-1073.

C2 et l'oxygène pour recouvrir l'orbitale vide *d* du titane. Infante *et al.* ont également montré que l'attaque nucléophile de l'époxyde au niveau du carbone C3 est cinétiquement favorisée. [190]

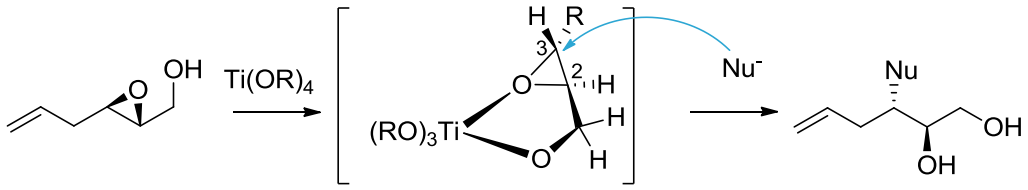


Schéma 16 : ouverture régiosélective de l'époxyde en présence de Ti(OR)$_4$

L'énantiomère (*S*, *S*) **26** est obtenu avec un rendement de 58%, puis il est protégé au niveau de l'amine par un groupement Boc (produit **27**, schéma 15). [184]

L'époxyde est également ouvert régiosélectivement avec le diazidodiisopropoxide de titane Ti(O*i*Pr)$_2$(N$_3$)$_2$ (schéma 17). [191,192] Ce réactif est préparé *in situ* par réaction entre Ti(O*i*Pr)$_4$ et l'azoture de triméthylsilyle Me$_3$SiN$_3$ au reflux du toluène, puis l'époxyde est ajouté goutte à goutte. [193,194] La coordination entre le titane et les deux oxygènes du substrat permet de diriger l'attaque nucléophile sur le carbone C3 de l'époxyde pour les mêmes raisons que précédemment. [188] Ainsi, nous obtenons majoritairement l'énantiomère (*S*, *S*) **28**.

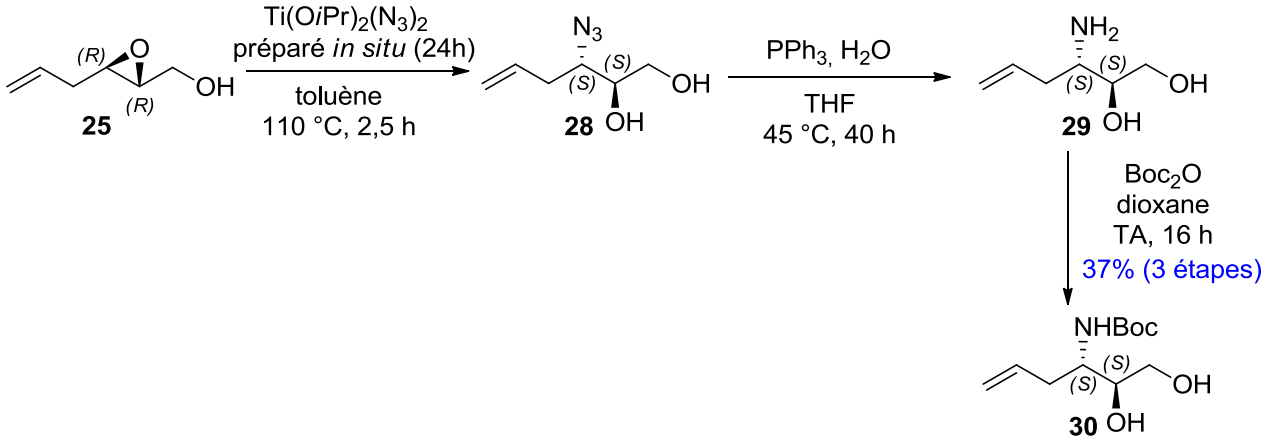


Schéma 17 : séquence ouverture régiosélective de l'époxyde/réduction de Staudinger/protection de l'amine

L'azoture de l'intermédiaire **28** est réduit en amine primaire dans les conditions de Staudinger (PPh$_3$, H$_2$O) pour donner l'amino-diol **29**. L'amine est ensuite protégée par un groupement Boc pour donner le composé **30**. [191] Un rendement de 37% est obtenu sur les trois étapes depuis l'époxyde **25**.

Nous souhaitions ensuite oxyder sélectivement l'alcool primaire du diol **27**. Dans un premier temps, nous avons testé l'oxydation au periodinane de Dess-Martin (schéma 18). Du fait de l'encombrement stérique de cet agent oxydant, l'oxydation de l'alcool primaire en aldéhyde serait favorisée par rapport à celle de l'alcool secondaire. Etonnamment, avec le substrat **27**, aucune oxydation n'a été observée, nous récupérons la

[190] I. Infante *et al.*, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3773-3780.
[191] X. Ginesta *et al.*, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3001-3004.
[192] C. Alegret *et al.*, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3069-3072.
[193] M. Caron *et al.*, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5185-5187.
[194] R. Choukroun, D. Gervais, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1980**, 1800-1802.

totalité du substrat de départ à chaque essai. Il a été prouvé que la présence d'eau accélère la réaction d'oxydation au periodinane de Dess-Martin [195], mais après ajout d'une goutte d'eau, nous récupérons encore uniquement le substrat de départ.

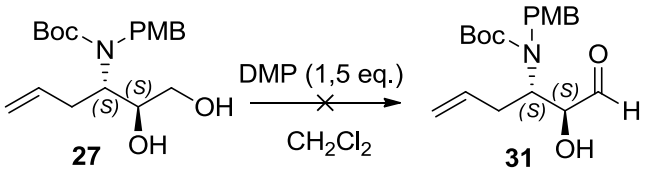


Schéma 18 : oxydation sélective de l'alcool primaire en aldéhyde

Dans un deuxième temps, les conditions d'Anelli ont été testées (schéma 19). [196,197,198] Il s'agit de traiter le diol **27** avec de l'hypochlorite de sodium NaOCl, en présence de $NaHCO_3$, de KBr et d'une quantité catalytique de TEMPO.

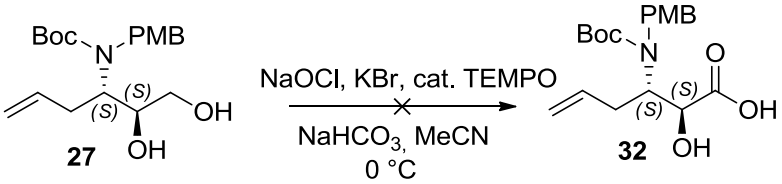


Schéma 19 : oxydation sélective de l'alcool primaire en acide carboxylique

Le mécanisme de cette réaction est indiqué schéma 20. [198] L'oxydant secondaire HOBr transforme le TEMPO (ou un radical parent stable) en un sel d'oxoammonium qui agit en tant qu'oxydant primaire pour transformer l'alcool en aldéhyde correspondant. Cette oxydation peut avoir lieu, soit via un état de transition cyclique compact à cinq membres en conditions basiques, soit via un état de transition linéaire en conditions acides. En conditions basiques, l'oxydation est plus rapide et présente une plus grande sélectivité pour les alcools primaires. La réaction conduit à la formation d'une hydroxylamine qui est à nouveau oxydée en radical TEMPO par l'oxydant secondaire, complétant ainsi le cycle catalytique. En présence d'eau, l'aldéhyde est en équilibre avec sa forme hydrate, pouvant être oxydée en acide carboxylique via un mécanisme similaire. La sélectivité observée pour cette réaction est liée à l'encombrement stérique du sel d'oxoammonium, favorisant l'attaque de l'alcool primaire moins encombré que l'alcool secondaire.

[195] S. D. Meyer, S.L. Schreiber, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7549-7552.
[196] P. L. Anelli *et al.*, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2559-2562.
[197] M. L. Testa *et al.*, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 655-660.
[198] Oxidation of Primary Alcohols to Carboxylic Acids, G. Tojo, M. I. Fernandez, *Springer-Verlag New York* **2007**, 1-116.

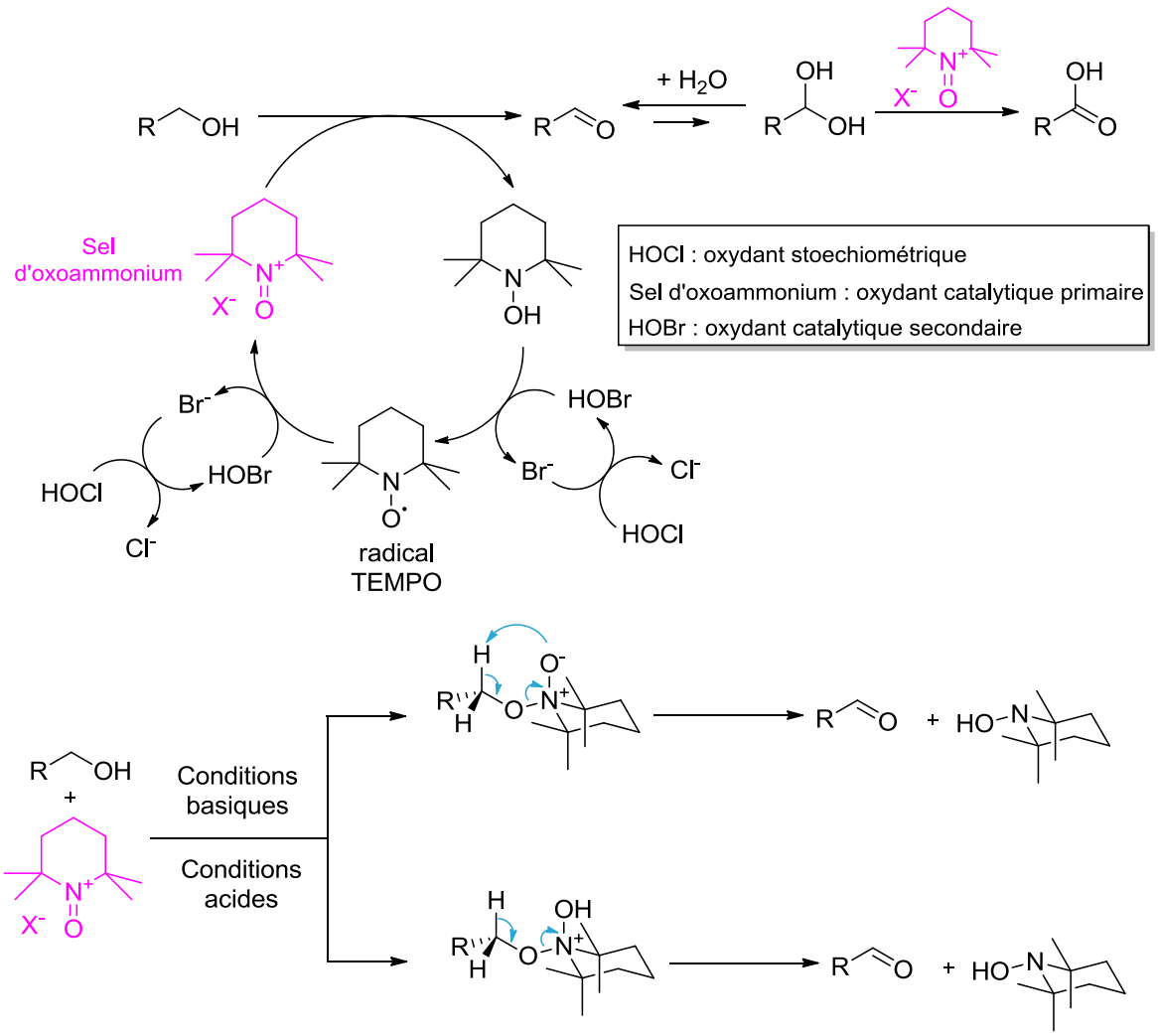


Schéma 20 : mécanisme de l'oxydation d'Anelli

Avec le substrat **27**, seuls des produits de dégradation ont été obtenus. Cela peut s'expliquer par le fait que les alcènes et cycles aromatiques réagissent facilement avec l'acide hypochloreux HOCl formé au cours du cycle catalytique (chloration). [198]

Nous aurions pu utiliser une quantité stœchiométrique de TEMPO agissant comme scavenger du chlore [199] ou utiliser les conditions améliorées de Zhao : quantité catalytique de NaOCl et quantité stœchiométrique de chlorite de sodium $NaOCl_2$, moins susceptible de produire des chlorations non-désirées. [198,200] Cependant, même dans ces conditions, les oléfines semblent être des substrats sensibles. [200]

[199] K. L. Reddy, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1207-1217.
[200] M. M. Zhao *et al.*, *Org. Synth.* **2005**, *81*, 195-203.

Nous nous sommes alors tournés vers une autre stratégie consistant à protéger l'alcool secondaire afin de pouvoir oxyder sélectivement l'alcool primaire. L'alcool **35** est obtenu par une séquence protection de l'alcool primaire, formation du cycle oxazolidine et déprotection de l'alcool primaire (schéma 21). [191,201]

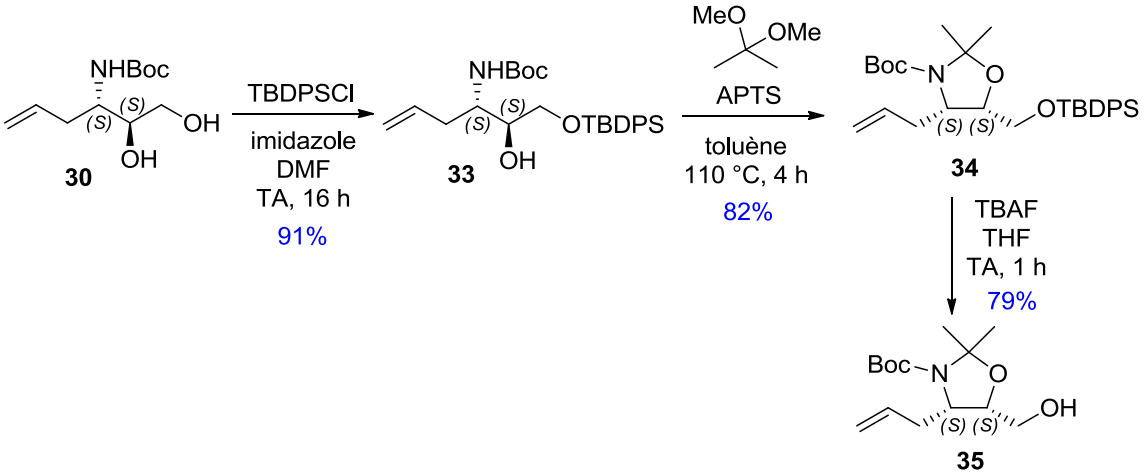


Schéma 21 : séquence protection de l'alcool primaire/formation du cycle oxazolidine/déprotection de l'alcool primaire

Le traitement de **30** avec le chlorure de *tert*-butyldiphénylsilyle en présence d'imidazole dans le DMF donne sélectivement l'éther *tert*-butyldiphénylsilylé **33**. La sélectivité de cette protection s'explique par l'encombrement stérique du réactif silylé. Le mécanisme de cette réaction est illustré schéma 22. La réaction passe par le *N*-*tert*-butyldiphénylsilylimidazole, agent de silylation très réactif.

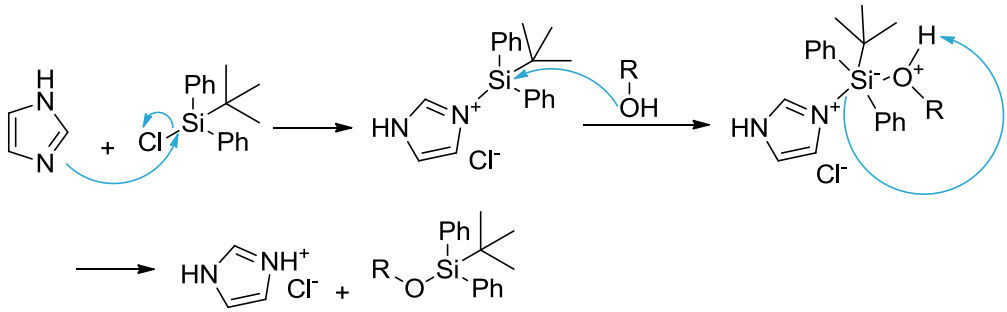


Schéma 22 : mécanisme de formation de l'éther *tert*-butyldiphénylsilylé

L'alcool secondaire et l'amine sont ensuite protégés par formation d'un cycle oxazolidine en traitant avec un excès de 2,2-diméthoxypropane en présence d'une quantité catalytique d'acide *para*-toluène sulfonique (schéma 21). L'alcool primaire du composé **34** obtenu est sélectivement déprotégé avec du fluorure de tétrabutylammonium dans le THF pour donner **35** avec de bons rendements.

[201] M. Pasto *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1233-1236.

L'étape suivante consiste en l'oxydation de l'alcool primaire du composé **35** en aldéhyde (schéma 23). Cette réaction a été décrite avec un très bon rendement dans les conditions de Swern pour ce même substrat [202] et pour son énantiomère (4*R*, 5*R*) [191]. Entre nos mains, des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés et le meilleur rendement obtenu fut seulement de 56%. L'oxydation de l'alcool au periodinane de Dess-Martin a également été tentée, mais malgré l'ajout de plusieurs équivalents de cet agent oxydant, la réaction était lente et avec des taux de conversion modérés.

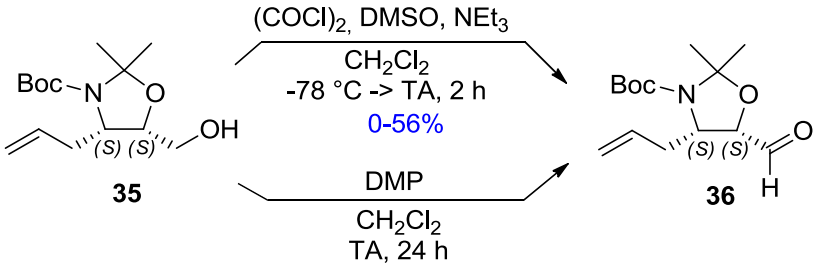


Schéma 23 : oxydation de l'alcool primaire dans les conditions de Swern

Aucun autre essai n'a pu être réalisé pour l'étape d'oxydation, par manque de matière dû aux problèmes de rendement et de reproductibilité à certaines étapes. La voie B n'a donc pas abouti et nous avons mis au point une nouvelle stratégie de synthèse.

[202] A. K. Ghosh *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 821-832.

II- Voie C

Nous avons mis au point une voie de synthèse diastéréosélective permettant d'accéder à une grande diversité de substrats.

1) Rétrosynthèse

La rétrosynthèse de cette voie est proposée schéma 24. L'époxyde **F** et les *N-tert*-butanesulfinimines chirales R_S-**45** et S_S-**45** sont des intermédiaires clés de cette synthèse. Grâce à l'addition d'un nucléophile sur les *N-tert*-butanesulfinimines chirales, un nouveau centre stéréogène est formé. En fonction de la stéréosélectivité faciale au niveau de l'imine chirale, l'isomère *anti* ou *syn* peut être obtenu majoritairement.

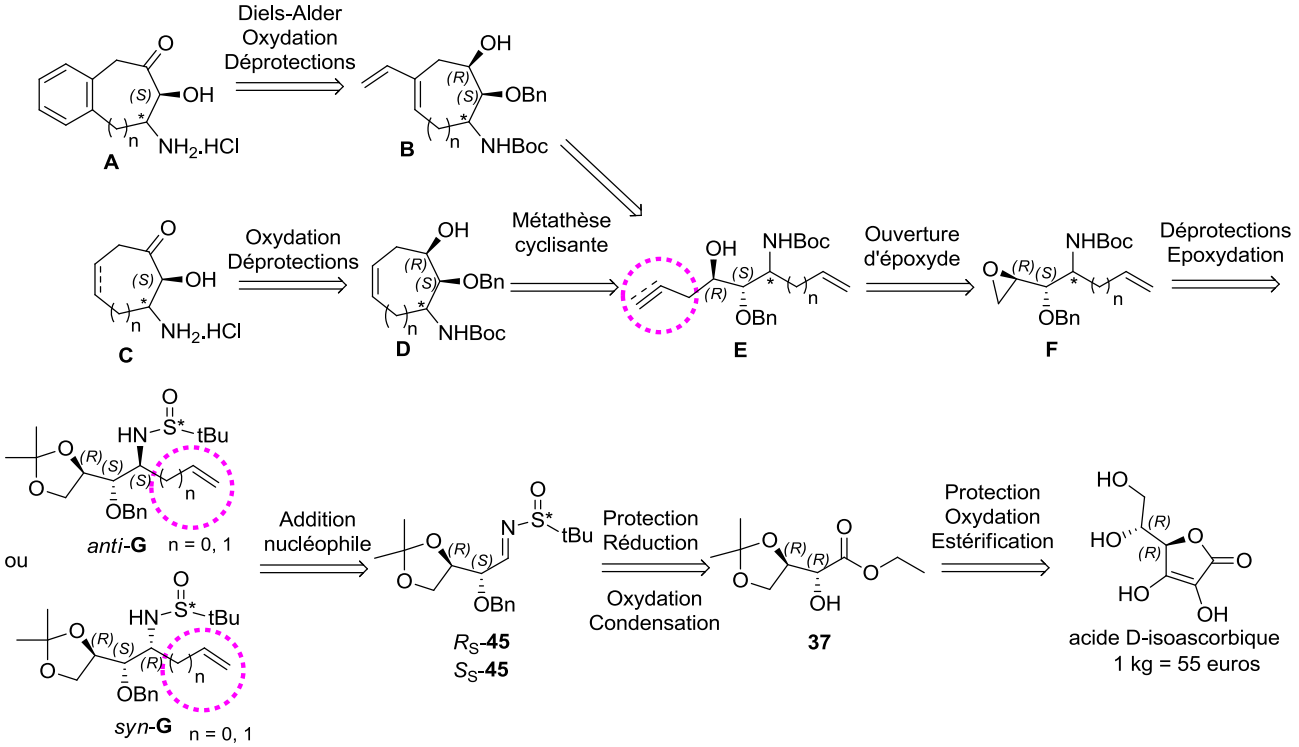


Schéma 24 : rétrosynthèse de la voie C

Le châssis moléculaire benzocycloheptane du composé **A** est obtenu à partir de l'intermédiaire ène-yne **E** par une séquence métathèse cyclisante/réaction de Diels-Alder/aromatisation. L'intermédiaire ène-yne **E** est formé par ouverture nucléophile de l'époxyde **F** par un acétylure de métal. L'époxyde **F** peut également être ouvert par un nucléophile vinylique et donner l'intermédiaire diène **E**. A partir de ce dernier, une métathèse cyclisante permet d'obtenir le composé cyclique **D** qui après oxydation et déprotections donne le cycloheptane trisubstitué **C**.

L'époxyde **F** est quant à lui formé en deux étapes à partir des amines chirales **G** : déprotection par un traitement acide du diol et de l'amine et reprotection de l'amine avec le groupement protecteur Boc. Les amines chirales **G** sont obtenues par addition nucléophile diastéréosélective sur les *N-tert*-butanesulfinimines chirales **45** de composés organométalliques de type allyle, vinyle. Les *N-tert*-butanesulfinimines **45** sont synthétisées en sept étapes à partir de l'acide D-isoascorbique commercial.

2) Synthèse des *N-tert*-butanesulfinimines R_S-45 et S_S-45

a) Synthèse de l'ester 37 à partir de l'acide D-isoascorbique

L'acide D-isoascorbique bon marché est utilisé comme précurseur de cette synthèse. D'après Abushanab *et al.*, l'acide D-isoascorbique peut être converti en trois étapes en l'ester **37** (schéma 25). [203,204]

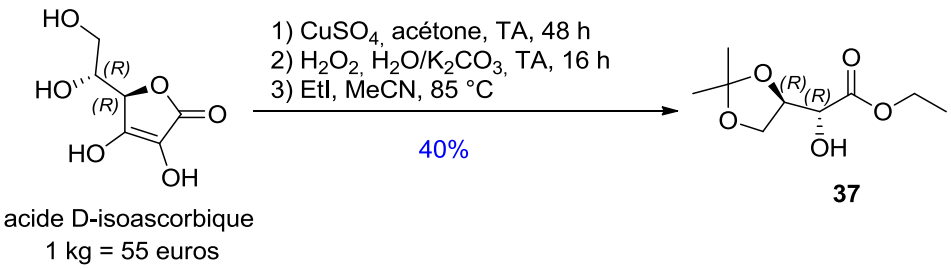


Schéma 25 : synthèse de 37 à partir de l'acide D-isoascorbique

Dans un premier temps, le diol est protégé sous forme d'acétonide par réaction avec l'acétone en présence de $CuSO_4$ anhydre. Ensuite, le traitement de ce composé, noté **A**, par un excès d'H_2O_2 en milieu aqueux basique conduit au D-thréonate **F** et à l'oxalate (schéma 26). [205]

La première étape consiste en l'oxydation de **A** en acide déshydro-D-isoascorbique **C**. Il y a tout d'abord réduction de H_2O_2 par **A** (transfert mono-électronique), avec formation du radical semidéshydro-D-isoascorbate **B** stabilisé par résonance, du radical hydroxyle et d'une molécule d'eau. Le radical hydroxyle oxyde ensuite **B** en acide déshydro-D-isoascorbique **C** (transfert mono-électronique). Dans la seconde étape du procédé, l'addition d'H_2O_2 a lieu sur le carbone C-2 (ou C-3) pour donner l'adduit **D** (ou équivalent). La décomposition de **D** en **E** implique l'addition d'un ion hydroxyde sur le carbonyle adjacent, puis la rupture d'une liaison carbone-carbone par élimination d'un ion hydroxyle. L'hydrolyse de **E** produit le D-thréonate **F** et l'oxalate.

Il est aussi possible que l'acide D-isoascorbique **A** soit oxydé par le Cu (II) résiduel de l'étape de protection.

[203] E. Abushanab *et al.*, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2598-2602.
[204] C. André *et al.*, *Tetrahedron Asymmetry* **1998**, *9*, *1*359-1367.
[205] H. S. Isbell, H. L. Frush, *Carbohydr. Res.* **1979**, *72*, 301-304.

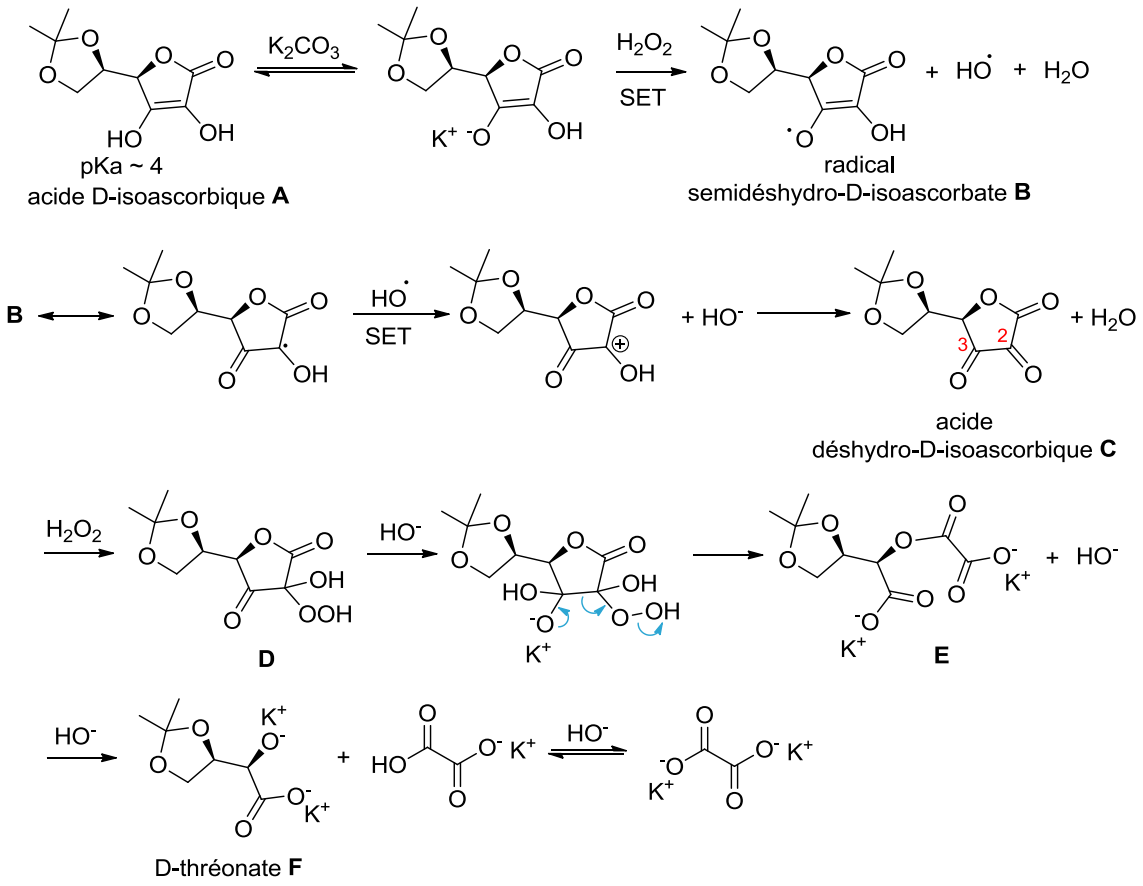


Schéma 26 : mécanisme de la réaction d'oxydation de l'acide D-isoascorbique protégé

Le dérivé de D-thréonate est enfin estérifié avec l'iodure d'éthyle dans l'acétonitrile pour donner le composé **37** avec un rendement total de 40% (schéma 25).

b) Protection de l'alcool du composé 37

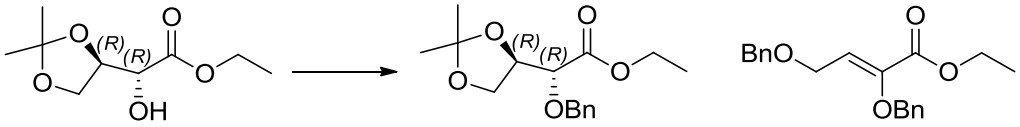
Il est intéressant de protéger l'alcool du composé **37** sous forme d'éther de benzyle (benzyle Bn, *para*-méthoxybenzyle PMB) et d'éther silylé (*tert*-butyldiméthylsilyle TBS). En fonction de leur propriété électronique et stérique respective, ces différents groupes protecteurs auront une influence sur la sélectivité diastéréofaciale lors de l'addition de nucléophiles sur les *N*-*tert*-butanesulfinimines chirales **45** (cf partie II-3, page 102).

Ether de benzyle

L'éther de benzyle est un groupement protecteur robuste et stable dans une grande variété de conditions acides et basiques.[206,207] Ils supportent également des agents réducteurs tels que les hydrures et des

[206] Organic Synthesis with Carbohydrates, G.-J. Boons, K. J. Hale, *Sheffield Academic Press* **2000**, 1-354.
[207] Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Fourth Edition, P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Wiley Interscience* **2006**, 1-1110.

conditions oxydantes douces. Ils peuvent être préparés en condition acide, basique ou neutre. Le tableau 12 rassemble les conditions testées pour l'*O*-benzylation du substrat **37**.



37 **38** **39**

Entrée	Conditions	Produit	Rendement
1	NaH (2 eq.), BnBr (1.2 eq.), THF, TA, 16 h	Sous-produit **39**	-
2	Cs_2CO_3 (3 eq.), BnBr (1.5 eq.), DMF, TA, 36 h	**38**	51-85%
3	Ag_2O (1.5 eq.), BnBr (1.1 eq.), CH_2Cl_2, TA, 16 h	**38**	69%
4	Ag_2O (1.5 eq.), BnBr (1.1 eq.), toluène, 110 °C, 4 h	**38**	10-91%
5	2-benzyloxy-1-méthylpyridinium triflate (2 eq.), MgO (2 eq.), toluène, 110 °C, 24 h	Mélange complexe	-

Tableau 12 : *O*-benzylation du substrat 37

La procédure la plus couramment utilisée est la *O*-alkylation de type Williamson d'un alkoxyde de sodium (ou de potassium) avec le bromure de benzyle. [206, 208] L'alkoxyde est généré par NaH (ou KH) et la réaction est réalisée dans un solvant polaire aprotique tel que DMF et THF. L'application de ces conditions au substrat **37** (tabl. 12, entrée 1) a conduit à la formation du sous-produit non désiré **39** par déprotonation en α de l'ester et *O*-benzylation des deux alkoxydes de sodium (schéma 27).

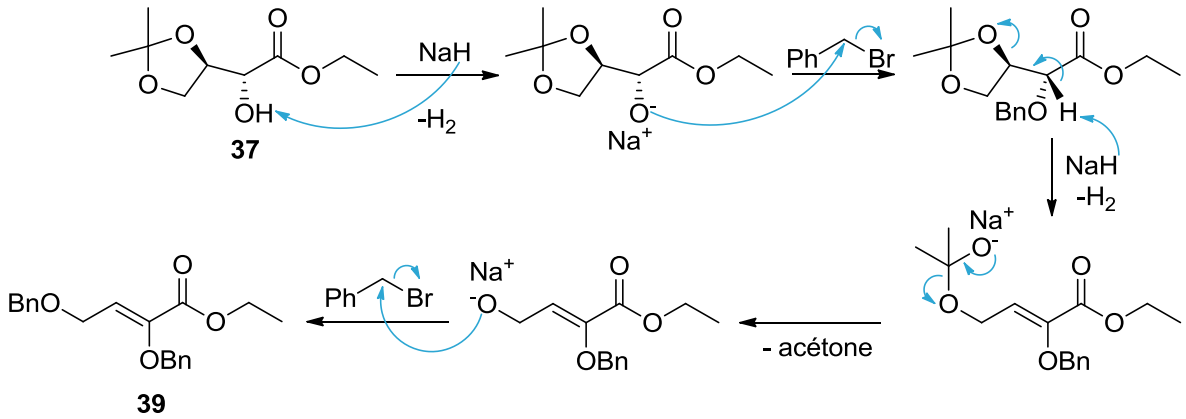


Schéma 27 : formation du sous-produit 39 dans les conditions NaH, BnBr, THF

[208] J. J. P. Selvam *et al.*, *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, *20*, 1115-1119.

Pour l'*O*-benzylation des α-hydroxyesters, Jung *et al.* préconisent l'utilisation d'hydroxyde de césium et de tamis moléculaire 4 Å. [209] Les bases de césium ont des propriétés intéressantes par rapport aux autres bases alcalines, comme leur grande solubilité, leur bonne stabilité et leur faible degré de solvatation. [210] Les sels de césium sont presque totalement dissociés en ions libres (« anions nus ») ; les alcoolates de césium générés *in situ* sont alors considérés comme des nucléophiles plus réactifs que les alkoxydes associés à d'autres métaux alcalins, facilitant la réaction de type S_N2.

Nous avons utilisé le carbonate de césium comme base pour l'*O*-benzylation du substrat **37** et le produit désiré **38** a été obtenu avec des rendements de 51 à 85% (tabl. 12, entrée 2). Des conditions anhydres ne semblent pas favorables car un rendement de 38% a été obtenu pour une réaction dans de la DMF anhydre.

Nous avons également préparé l'éther de benzyle du substrat **37** avec l'oxyde d'argent (I) et le bromure de benzyle (tabl. 12). [208,211] Dans du dichlorométhane et à température ambiante, nous obtenons un rendement de 69% (entrée 3), tandis qu'au reflux du toluène, les rendements varient de 10 à 91% (entrée 4). Un mélange complexe est parfois obtenu dans lequel on distingue en RMN plusieurs espèces *O*-benzylées indéterminées. Les faibles rendements peuvent être expliqués par l'utilisation d'oxyde d'argent non fraîchement préparé.

Le mécanisme de cette réaction est présenté schéma 28. L'oxyde d'argent se complexerait avec l'atome de brome du bromure de benzyle pour générer un cation benzylium électrophile, qui alkylerait ensuite la fonction hydroxyle du substrat. [206]

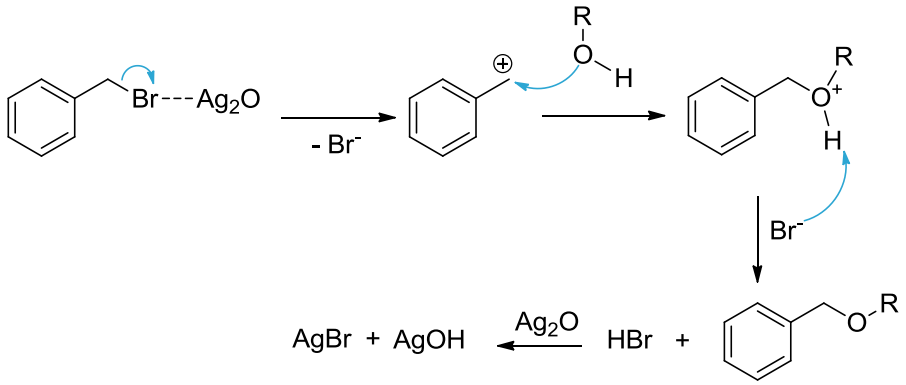


Schéma 28 : mécanisme de l'*O*-benzylation avec Ag_2O

Nous avons aussi essayé l'alkylation par le 2-benzyloxy-1-méthylpyridinium triflate, sel organique stable, convertissant les alcools en éthers benzyliques dans des conditions neutres et douces (tabl. 12, entrée 5). [212,213] Ce sel est synthétisé en deux étapes à partir de la 2-chloropyridine, puis est utilisé dans la réaction d'*O*-benzylation avec l'oxyde de magnésium MgO au reflux du toluène. Le mécanisme de cette réaction est indiqué schéma 29.

[209] E. E. Dueno *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1843-1846.
[210] C. Galli, *Org. Prep. Proc. Int.* **1992**, *24*, 285-307.
[211] T. Tschamber *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1335-1347.
[212] K. W. C. Poon, G. B. Dudley, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3923-3927.
[213] P. A. Albiniak, G. B. Dudley, *Synlett* **2010**, *6*, 841-851.

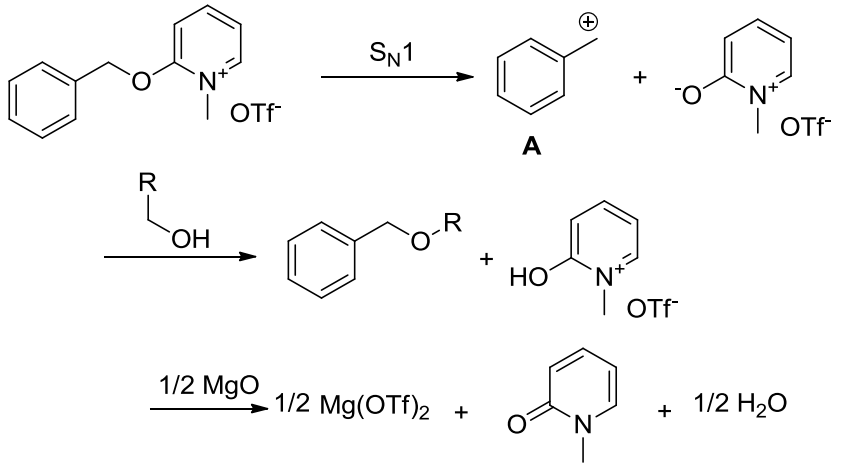


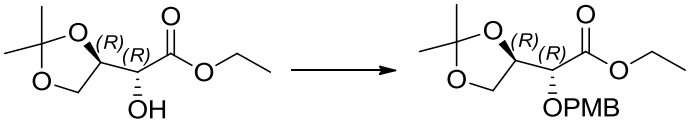
Schéma 29 : mécanisme de l'*O*-benzylation avec le 2-benzyloxy-1-méthylpyridinium triflate

Poon et Dudley proposent un mécanisme de type S_N1 suite à deux observations clés. [212,213] La réaction d'*O*-benzylation menée dans le toluène conduit à la formation de faibles quantités des produits d'*ortho*- et de *para*-benzylation du toluène. Ces composés pourraient provenir d'une alkylation de type Friedel-Crafts, ce qui suggère la présence d'espèces benzyliques très électrophiles, tel que le cation benzylique **A**, dans le milieu réactionnel. De plus, le sel de méthoxypyridinium est complètement inerte sous les mêmes conditions, ce qui va contre le mécanisme de type S_N2. L'oxyde de magnésium piège l'acide triflique, libérant la *N*-méthyl-2-pyridone.

En utilisant le sel de 2-benzyloxy-1-méthylpyridinium pour l'*O*-benzylation du substrat **37**, nous obtenons un mélange complexe (tabl. 12, entrée 5).

Ether de para-méthoxybenzyle

L'alcool du substrat **37** a également été protégé par le groupement protecteur *para*-méthoxybenzyle. Les éthers de benzyle substitués présentent l'avantage d'être plus rapidement clivés (par oxydation) que les éthers de benzyles non-substitués. [207] Les conditions testées sont rassemblées dans le tableau 13.



37 **40**

Entrée	Conditions	Produit	Rendement
1	Cs_2CO_3 (3 eq.), PMBCl (1.5 eq.), DMF, TA, 24 h	**37**	-
2	Cs_2CO_3 (3 eq.), PMBCl (1.5 eq.), TBAI (0.05 eq.), tamis mol. 4 Å, DMF, TA, 24 h	**40**	27-43%
3	PMB-trichloroacétimidate (2 eq.), PPTS (0.5 eq.), CH_2Cl_2, TA, 5 h	Mélange complexe	-

Tableau 13 : protection du substrat 37 avec le *para*-méthoxybenzyle

Avec le carbonate de césium et le chlorure de *para*-méthoxybenzyle, nous avons récupéré le substrat de départ (tabl. 13, entrée 1). En revanche, lorsque la réaction a été menée avec une quantité catalytique

d'iodure de tétrabutylammonium en présence de tamis moléculaire 4 Å, l'alcool protégé désiré a été obtenu avec de faibles rendements allant de 27 à 43% (tabl. 13, entrée 2). [209,211] L'iodure de tétrabutylammonium permet d'accélérer la réaction en formant l'iodure de *para*-méthoxybenzyle, plus réactif que le chlorure de *para*-méthoxybenzyle (réaction de type Finkelstein). Le tamis moléculaire permet de piéger l'eau, empêchant ainsi la protonation des alcoolates.

Le réactif *para*-méthoxybenzyle trichloroacétimidate est aussi classiquement utilisé pour la synthèse d'éther de benzyle substitué. [214 , 215] Ce réactif est synthétisé en une étape à partir de l'alcool *para*-méthoxybenzylique et du trichloroacétonitrile en présence d'hydrure de sodium, puis il est engagé avec l'alcool en présence d'une quantité catalytique de pyridinium *para*-toluènesulfonate. Le mécanisme de cette réaction est indiqué schéma 30. Le *para*-méthoxybenzyle trichloroacétimidate est protoné, puis il réagit rapidement avec l'alcool pour former l'éther de *para*-méthoxybenzyle. Un proton est libéré et peut retourner dans le cycle catalytique.

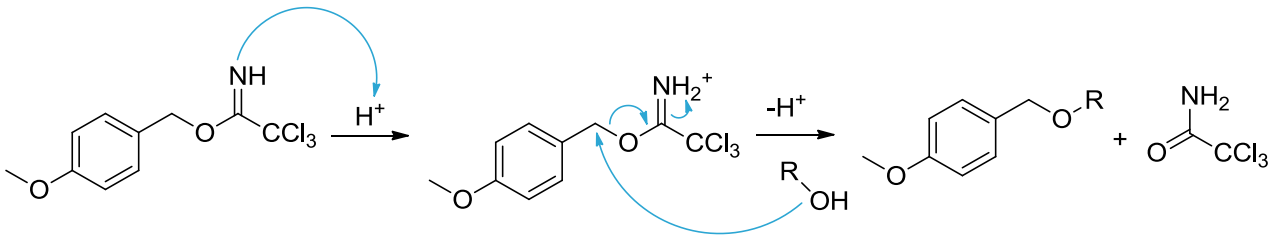


Schéma 30 : mécanisme de l'*O*-benzylation avec le réactif *para*-méthoxybenzyle trichloroacétimidate

En utilisant ces conditions pour le substrat **37**, un mélange complexe a été obtenu (tabl. 13, entrée 3). Le réactif *para*-méthoxy benzyle trichloroacétimidate est parfois décrit comme instable, ce qui pourrait expliquer le résultat décevant. [207] De plus il est possible qu'il y ait déprotection de l'acétonide en présence de pyridinium *para*-toluènesulfonate.

La protection au *para*-méthoxybenzyle du substrat **37** semble capricieuse et donne des rendements assez modérés, c'est pourquoi nous n'avons pas poursuivi avec ce groupement protecteur.

Ether de silyle

L'alcool du substrat **37** a d'autre part été protégé quantitativement par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle dans les conditions classiques chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle/imidazole (schéma 31). [207,216] La réaction passe par le *N-tert*-butyldiméthylsilylimidazole **A**, agent de silylation très réactif.

[214] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1980**, *19*, 731-732.
[215] T. Iversen, D. R. Bundle, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1981**, 1240-1241.
[216] D. C.Babu *et al.*, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3815-3819.

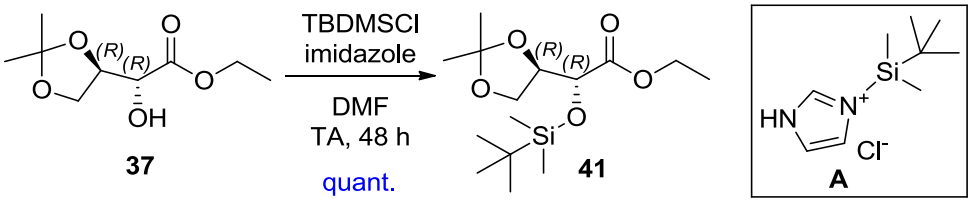


Schéma 31 : formation de l'éther de silyle 41

c) Obtention de l'aldéhyde 43

Il est possible de former l'aldéhyde **43** en une étape à partir de l'ester, en utilisant le réactif DIBAL-H. [204,211,216] Mais seul le produit de sur-réduction, l'alcool **42**, est obtenu dans notre cas (schéma 32). Nous passons alors par une séquence réduction quantitative de l'ester **38** en alcool primaire avec $LiAlH_4$ [217], puis oxydation en aldéhyde.

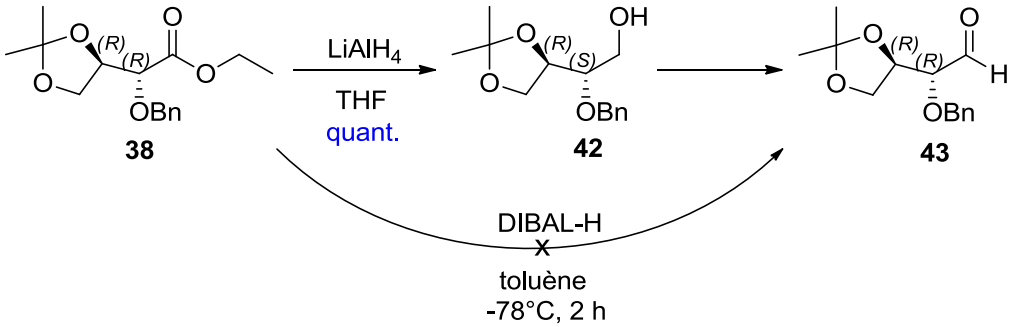
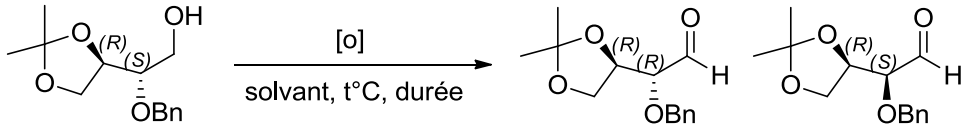


Schéma 32 : passage de l'ester 38 à l'aldéhyde 43

La réduction de l'ester du composé silylé **41** avec $LiAlH_4$ a conduit à une perte de la protection *tert*-butyldiméthylsilyle. Nous avons donc poursuivi la voie de synthèse avec le groupement protecteur benzyle.

Plusieurs conditions d'oxydation de l'alcool **42** ont été réalisées. L'oxydation a été décrite dans les conditions de Swern avec un très bon rendement à partir de l'énantiomère (2*R*, 3*S*) et du diastéréoisomère (2*S*, 3*S*) de l'alcool **42**. [217,218,219] Cependant, avec le substrat **42**, nous n'observons qu'une très faible quantité d'aldéhyde **43** formée et essentiellement de la dégradation (tabl. 14, entrée 1). L'utilisation de chlorure d'oxalyle fraîchement distillé n'a pas amélioré le résultat.

[217] X. Shen *et al.*, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 943-953.
[218] L. Ermolenko, N. A. Sasaki, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 693-703.
[219] P. Dimopoulos *et al.*, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5369-5372.



Entrée	Conditions	Produits	Rendement
1	$(COCl)_2$, DMSO, NEt_3, -78 °C → TA, 2 h	**43** + dégradation	-
2	DMP, CH_2Cl_2 cons./K_2CO_3, TA, 24 h	**43**	39-66%
3	SO_3•pyridine, DMSO, DIPEA, CH_2Cl_2, TA, 1.5 h	**43**:**44** 67:33	-
4	SO_3•pyridine, DMSO, DIPEA, CH_2Cl_2, -20 °C, 1.5 h	**43**:**44** 100:0	79%

Tableau 14 : oxydation de l'alcool 42

Les conditions d'oxydation de Dess-Martin ont permis d'obtenir l'aldéhyde **43** avec un rendement de 39-66% (tabl. 14, entrée 2). Le dichlorométhane est distillé sur P_2O_5, puis conservé sur K_2CO_3. Comme précisé dans plusieurs travaux, nous constatons que l'aldéhyde formé n'est pas stable dans le temps et qu'il est préférable de l'engager rapidement dans l'étape suivante après purification.

Enfin, nous avons testé les conditions d'oxydation de Parikh-Doering, dérivée de l'oxydation de Swern et engageant les réactifs suivants : un complexe trioxyde de soufre/pyridine, du DMSO et une base telle que la TEA ou la DIPEA. [220] La réaction menée à température ambiante a conduit à un mélange 67/33 des deux épimères **43** et **44** (tabl. 14, entrée 3), tandis qu'à froid (-20°C), seul l'épimère **43** est formé avec un rendement de 79% (tabl. 14, entrée 4). Cette méthode a donc été sélectionnée pour l'oxydation du substrat **42**.

Le mécanisme de l'oxydation de Parikh-Doering est indiqué schéma 33. Le complexe trioxyde de soufre/pyridine agit en tant qu'activateur du DMSO pour générer l'intermédiaire réactif **A**. L'alcool primaire déplace l'ion sulfate, puis la base permet la formation d'un ylure de sulfonium qui se décompose en diméthylsulfure et en aldéhyde.

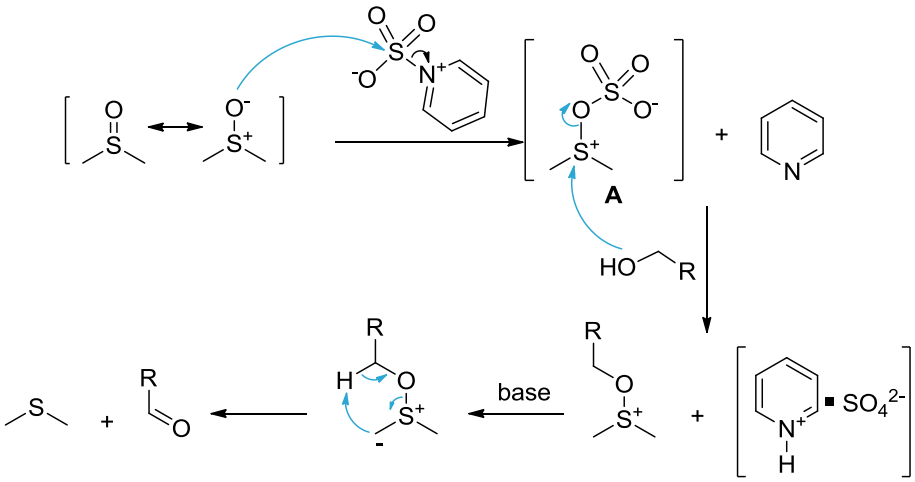


Schéma 33 : mécanisme de l'oxydation de Parikh-Doering

[220] J. R. Parikh, W. v. E. Doering, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5505-5507.

d) Condensation de l'aldéhyde 43 avec les *tert*-butanesulfinamides

Les *N*-sulfinimines sont très utilisées dans la synthèse asymétrique d'amines chirales, telles que les amines α-substituées, α,α-disubstituées, les acides aminés α et β. [221,222,223,224] Une revue fort intéressante concernant la synthèse et l'application des *tert*-butanesulfinamides a été publiée par Ellman *et al.* [225] Le groupement *tert*-butanesulfinyl, développé par Ellman en 1997 [226], active l'imine pour l'addition de différentes classes de nucléophiles. C'est un puissant groupe chiral directeur qui fournit une haute sélectivité diastéréofaciale lors des additions nucléophiles. [221,226,227,228] De plus, il présente l'avantage d'être clivable par une simple hydrolyse acide.

Les *N-tert*-butanesulfinimines sont obtenues par condensation d'un aldéhyde (ou cétone) avec les *tert*-butanesulfinamides énantiopurs. [225,229] Les agents $MgSO_4$/PPTS, $CuSO_4$, sels de titane (IV) sont généralement utilisés comme acides de Lewis et agents déshydratants. La condensation du substrat **43** avec les *tert*-butanesulfinamides énantiopurs commerciaux a été réalisée avec le sel de titane $Ti(OiPr)_4$ dans le dichlorométhane (schéma 34). Des rendements de 64% et de 85% sont obtenus pour la *N-tert*-butanesulfinimines R_S et S_S respectivement.

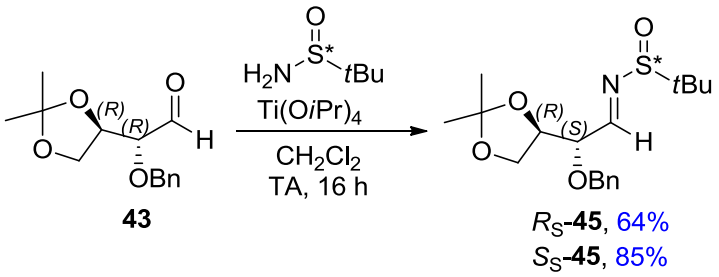


Schéma 34 : condensation de l'aldéhyde 43 avec les *tert*-butanesulfinamides R_S et S_S

Récemment, Reeves *et al.* ont publié une nouvelle méthode pour la formation d'imine, dont les *N-tert*-butanesulfinimines, utilisant le tris(2,2,2-trifluoroethyl)borate $B(OCH_2CF_3)_3$. [230] La procédure avec les sels de titane présente l'inconvénient de nécessiter une filtration pour éliminer l'oxyde de titane TiO_2 insoluble formé par hydrolyse. Cette filtration est souvent très lente et peut être un problème pour des réactions à grande échelle. Avec l'agent $B(OCH_2\text{-}CF_3)_3$, l'acide borique formé par hydrolyse est soluble en phase aqueuse et donc facilement éliminé.

[221] J. A. Ellman *et al.*, *Accounts Chem. Res.* **2002**, *35*, 984-995.
[222] A. W. Patterson, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7110-7112.
[223] J. W. Evans, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9948-9957.
[224] J. A. Ellman, *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 39-46.
[225] M.-A. T. Robak *et al.*, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3600-3740.
[226] G. Liu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9913-9914.
[227] D. A. Cogan *et al.*, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 8883-8904.
[228] J. P. McMahon, J. A. Ellman, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1645-1647.
[229] G. Liu et al., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1278-1284.
[230] J. T. Reeves *et al.*, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2442-2445.

3) Additions diastéréosélectives sur les *N-tert*-butanesulfinimines 45

Le caractère électrophile des *N-tert*-butanesulfinimines est supérieur à celui des *N*-alkyl ou *N*-aryl imines classiques et permet l'addition propre et à haut rendement de divers nucléophiles, tels que des organo-magnésiens, lithiens, zinciques, indiens, siliciens et agents borés. [225] Le groupe *N-tert*-butanesulfinyle est non seulement chiral, mais aussi capable de coordiner les métaux, conduisant à de hautes diastéréosélectivités pour l'addition de nombreux nucléophiles.

Modèle d'Ellman

Les premiers exemples d'1,2-addition de réactifs organométalliques sur les *N-tert*-butanesulfinimines ont été décrits par Ellman *et al.* en 1997. [226,227] Ils ont observé que le solvant, le métal et certains additifs ont un effet considérable sur la stéréosélectivité de ces additions, comme l'ont montré Moreau *et al.* avec les *para*-toluènesulfinimines. [231] Sur la base de ces observations, des modèles d'état de transition ont été proposés pour expliquer les stéréosélectivités observées. Selon les conditions, chacun des deux diastéréoisomères peut être obtenu (schéma 35). Les solvants non-coordinants, comme le toluène et le dichlorométhane, favorisent un modèle avec chélation : Ellman propose un **état de transition de type Zimmerman-Traxler A** dans lequel l'oxygène du groupement *tert*-butanesulfinyle coordine le métal. Ces conditions permettent d'accéder majoritairement au produit d'attaque face *Si*. Au contraire, les solvants coordinants, comme THF et Et_2O, perturbent la formation de l'état de transition cyclique par coordination du métal. Ils favorisent alors un **état de transition ouvert B** où le nucléophile approche la face la moins encombrée pour donner majoritairement le produit d'attaque face *Re*.

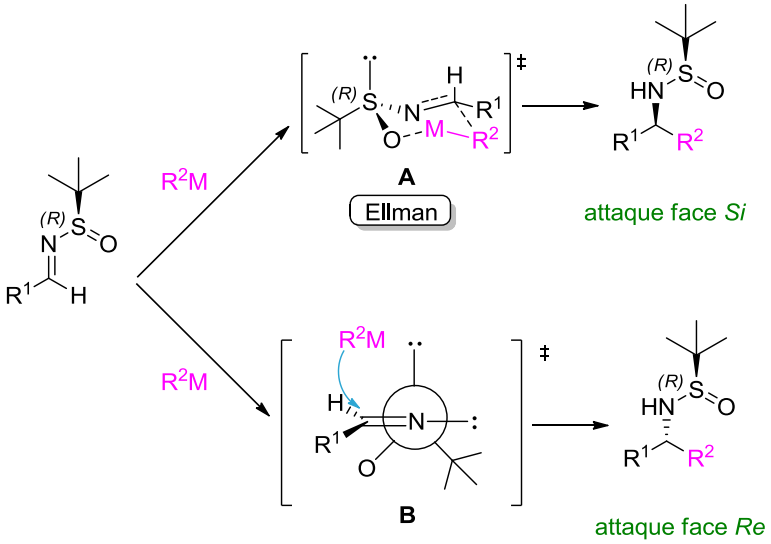


Schéma 35 : états de transition proposés pour la stéréosélectivité des 1,2-additions sur des *N-tert*-butanesulfinimines

[231] P. Moreau *et al.*, *Tetrahedron Asymmetry* **1997**, *8*, 591-598.

α-Alkoxy N-tert-butanesulfimines α-chirales

Un groupement alkoxy situé en position α d'une *N-tert*-butanesulfinimine va influencer la diastéréosélectivité faciale des additions selon ses propriétés stériques et électroniques. [232,233,234,235] Les sélectivités observées pour l'addition de réactifs organométalliques sur des α-alkoxy *N-tert*-butanesulfimines α-chirales sont alors le résultat de deux inductions : l'induction par le groupe *N-tert*-butanesulfinyle et l'induction par le stéréocentre en α. La sélectivité induite par le stéréocentre en α est prédite par les modèles de Felkin-Anh polaire, Cornforth-Evans et Cram chélate en fonction de la nature du groupe α-alkoxy (fig. 57). En effet, le groupe α-benzyloxy, capable de chélater les métaux, peut suivre un modèle de type Cram-chélate tandis que le groupe α-silyloxy, de par son encombrement stérique, est incapable de coordiner les métaux et suit les modèles de Felkin-Anh polaire et Cornforth-Evans. Par ailleurs, la présence d'un groupement coordinant en β peut également influer sur la diastéréosélectivité via un modèle β-chélate (fig. 57). [236]

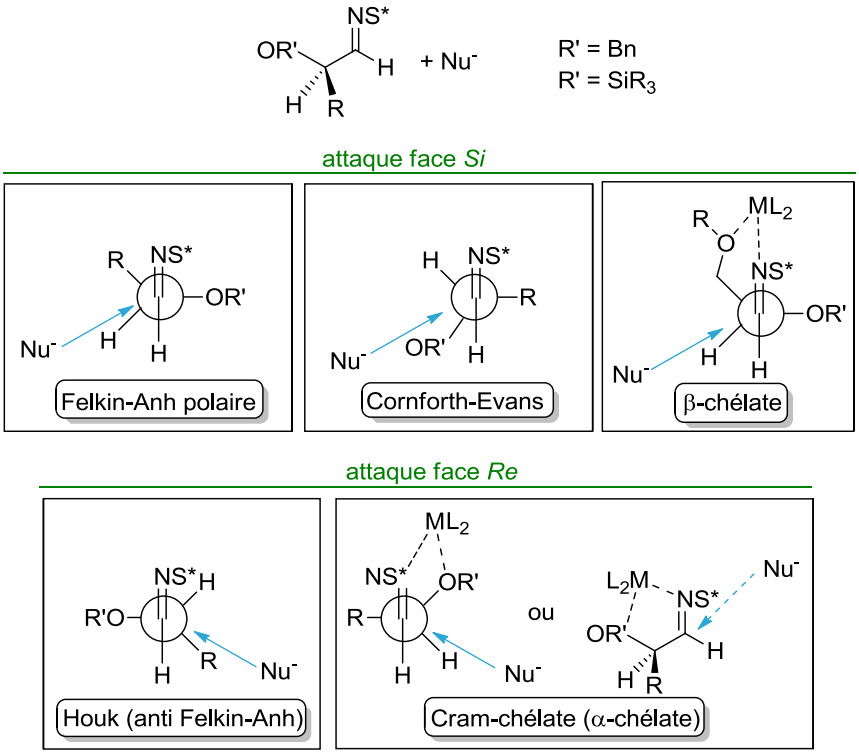


Figure 57 : modèles pour l'addition nucléophile sur des α-alkoxy imines

Barrow *et al.* ont publié la première étude concernant l'addition de réactifs organométalliques sur des α-alkoxy *N-tert*-butanesulfinimines pour la synthèse de 1,2-aminoalcools. [232] Ils ont montré que le sens de l'induction pour les additions sur les α-benzyloxy ou α-silyloxy *N*-sulfinimines est opposé à celui observé précédemment pour les additions sur des *N*-sulfinimines substituées par un alkyle ou un aryle. Pour expliquer ces sélectivités « anti-Ellman », ils proposent un **état de transition bicyclique** avec chélation **C** dans

[232] J. C. Barrow *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2051-2054.
[233] S. D. Kuduk *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6641-6643.
[234] F. A. Davis, W. McCoull, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3396-3397.
[235] T. P. Tang *et al.*, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8772-8778.
[236] R. Badorrey *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2268-2275.

lequel l'imine-Z est stabilisée par coordination du métal par le substituant α-alkoxy en position axiale (fig. 58). Cet état de transition demande une isomérisation rapide de l'imine en l'isomère Z thermodynamiquement défavorisé (énergie d'activation de l'isomérisation E/Z de *para*-toluènesulfinimines : ΔG‡ = 13-17 kcal/mol). [227] Davis *et al.* ont étudié l'addition de réactifs organométalliques sur des *N*-sulfinylimino esters et ont également observé des sélectivités « anti-Ellman ». [234] La présence de l'oxygène en α perturbe la formation de l'état de transition de type chélate et donne lieu à deux états de transition ouverts : le modèle de Davis **D** et le modèle de Cram-chélate **E** (coordination du métal à la fois par l'azote de l'imine et par l'oxygène du groupement α-alkoxy) (fig. 58). Il est difficile de distinguer quel modèle s'applique car les modèles **C**, **D**, **E** mènent au même produit (attaque face *Re*).

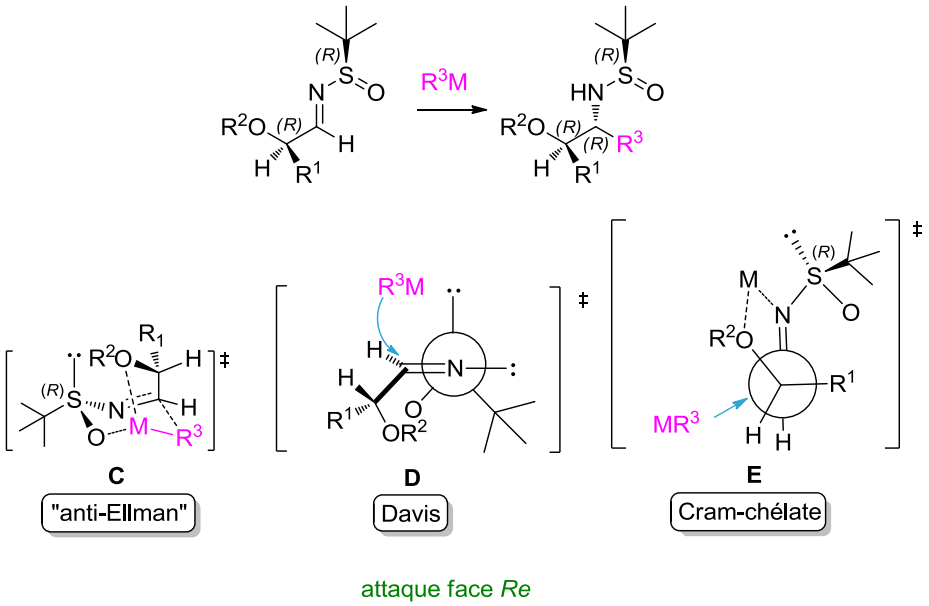
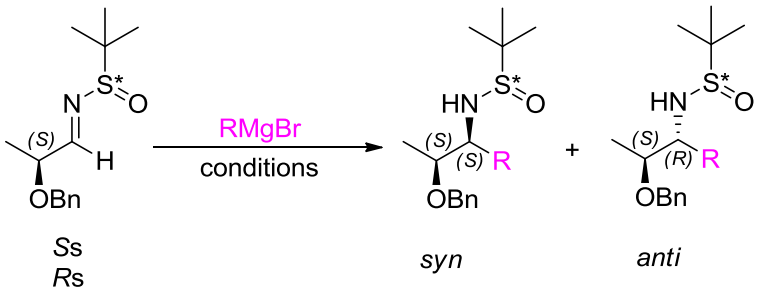


Figure 58 : états de transition proposés pour la stéréosélectivité des 1,2-additions sur des α-alkoxy imines

Evans et Ellman ont étudié l'addition de réactifs de Grignard sur des *N*-*tert*-butansulfinimines α-chirales. [223] L'addition de PhMgBr et d'EtMgBr sur l'α-benzyloxy imine S_S dans le toluène a donné l'adduit *syn*-1,2-aminoalcool avec de bons rendements et de hautes diastéréosélectivités (tabl. 15, entrées 1 et 2).



Entrée	Sulfinimine	R	Conditions	*dr syn:anti*	Rendement
1	*S*	Ph	Toluène, -78 °C	99:1	94%
2	*S*	Et	Toluène, -78 °C	91:9	75%
3	*R*	Ph	Toluène, -78 °C	23:77	98%
4	*R*	Et	Toluène, -78 °C	14:86	93%
5	*R*	Ph	THF/TMEDA, -78 °C	5:95	80%
6	*R*	Et	THF/TMEDA, -78 °C	2:98	86%

Tableau 15: diastéréosélectivités observées par Evans et Ellman

Cette réaction d'addition représente un « cas match » entre le stéréocontrôle induit par le groupe *N*-sulfinyle et le modèle de Cram-chélate dicté par le stéréocentre en α (fig. 59, a). Au contraire, dans le « cas mismatch » pour l'addition sur l'α-benzyloxy imine R_S, seules des stéréosélectivités modérées sont obtenues dans le toluène (tabl. 15, entrées 3 et 4). [223] Cependant, l'utilisation d'une base de Lewis comme la *N*,*N*,*N*',*N*'-tétraméthyléthylènediamine (TMEDA) dans le THF a permis la formation de l'*anti*-1,2-aminoalcool avec une très bonne diastéréosélectivité (tabl. 15, entrées 5 et 6). Il est intéressant de noter que la sélectivité *anti* est observée, ce qui suggère que la sélectivité diastéréofaciale induite par le groupe *N*-sulfinyle prime sur la sélectivité prédite par le modèle de Cram-chélate. La présence de TMEDA, en empêchant très probablement la formation de l'état de transition de Cram-chélate, favoriserait un état de transition ouvert avec approche du nucléophile du côté opposé au groupement *tert*-butyle, en respectant les modèles de Felkin-Anh polaire et Cornforth-Evans (fig. 59, b).

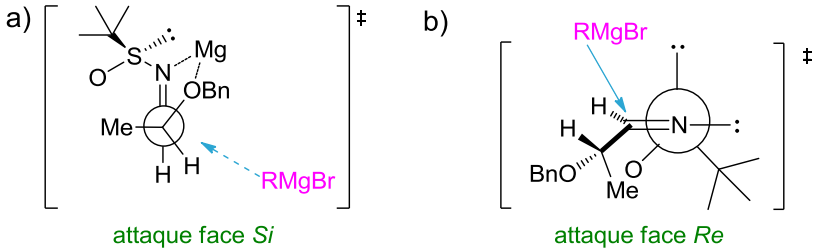


Figure 59 : a) état de transition de type Cram-chélate pour l'addition de RMgBr sur l'α-benzyloxy imine S_S dans le toluène ; b) état de transition ouvert pour l'addition de RMgBr sur l'α-benzyloxy imine R_S dans le THF/TMEDA

Lors de mes travaux de thèse, nous avons étudié la diastéréosélectivité des additions de divers nucléophiles sur les *N*-*tert*-butanesulfinimines R_S-**45** et S_S-**45** possédant un stéréocentre en α et en β.

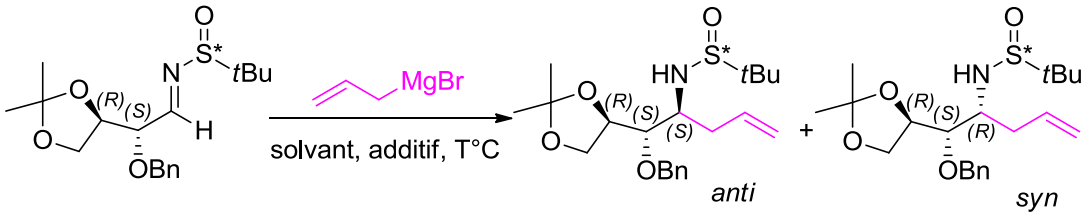
a) Addition d'un nucléophile allylique

Bromure d'allyle magnésium

Nous avons réalisé l'addition de bromure d'allyle magnésium sur les *N*-*tert*-butanesulfinimines **45** chirales. Les différentes conditions utilisées et résultats obtenus sont rassemblés tableau 16.

En partant de la sulfinimine R_S dans le toluène, que ce soit à -20 °C ou à -78 °C, des rendements et diastéréosélectivités similaires sont obtenus (tabl. 16, entrées 1 et 2). Pour des raisons de simplicité opératoire, nous avons conservé la température de -20 °C pour les réactions d'addition menées ultérieurement. Dans le dichlorométhane, nous obtenons également le produit *anti* **46** avec une bonne diastéréosélectivité et un bon rendement (entrée 3).

La sélectivité est inversée lorsque la réaction est menée dans le THF en présence de l'additif TMEDA : le produit *syn* **47** est formé majoritairement. En revanche, une faible diastéréosélectivité est observée (entrée 4).



R_S-**45** S_S-**45** | **46** **48** | **47** **49**

Entrée	Imine	Solvant/additif	Adduit	*dr anti:syn*[a, b]
1	R_S-**45**	Toluène	**46** + **47**, 83%	94:6
2[c]	R_S-**45**	Toluène	**46** + **47**, 88%	92:8
3	R_S-**45**	CH_2Cl_2	**46** + **47**, 78%	89:11
4	R_S-**45**	THF/TMEDA (2 eq.)	**46** + **47**, 85%	38:62
5	S_S-**45**	Toluène	**48** + **49**, 74%	13:87
6	S_S-**45**	CH_2Cl_2	**48** + **49**, 55%	30:70
7	S_S-**45**	THF/TMEDA (2 eq.)	**48** + **49**, 72%	97:3

Tableau 16 : 1,2-additions de bromure d'allyle magnésium sur R_S-45 et S_S-45 ; conditions : 3 eq. AllylMgBr (1 M Et_2O), -20 °C ; (a) ratio déterminé par HPLC du brut ; (b) stéréochimie du produit majoritaire déterminée par RMN GOESY après dérivatisation en carbamate cyclique (cf page 117) ; (c) -78 °C

En partant de la sulfinimine S_S dans le toluène ou le dichlorométhane, le produit *syn* **49** est obtenu avec une diastéréosélectivité modérée (entrées 5 et 6). La sélectivité est inversée en réalisant la réaction dans le THF en présence de TMEDA : le produit *anti* **48** est obtenu avec une très bonne diastéréosélectivité (entrée 7).

L'addition diastéréosélective de bromure d'allyle magnésium a été étudiée sur des *N-tert*-butanesulfinimines par Ellman [227] et sur des *para*-toluènesulfinimines par Hua [237]. Dans les solvants non-coordinants (CH_2Cl_2, toluène), ils proposent un **état de transition cyclique à six centres de type Zimmerman-Traxler** dans lequel l'oxygène du groupe *N*-sulfinyle et l'azote de l'imine coordinent le métal. Ainsi la réaction d'addition sur la sulfinimine R_S-**45** dans les solvants non-coordinants passerait par l'état de transition **A** avec une attaque face *Si* conduisant aux adduits *anti* (schéma 36). La coordination du métal par l'azote activerait l'imine, expliquant les meilleurs rendements et diastéréosélectivités observés pour les allylations par rapport aux additions d'autres réactifs de Grignard.

La très bonne sélectivité pour le composé *anti* peut s'expliquer par le « cas match » entre le modèle de Felkin-Anh ou Cornforth-Evans (attaque face *Si*) (cf fig. 57) et le stéréocontrôle induit par le groupe *N*-sulfinyle (schéma 36).

La réaction d'addition sur la sulfinimine S_S-**45** dans les solvants non-coordinants passe par l'état de transition **B** avec une attaque face *Re* conduisant aux adduits *syn* (schéma 36). Le « cas mismatch » entre les stéréocontrôles induits par le stéréocentre en α (attaque face *Si*) et par le groupe *N*-sulfinyle (attaque face *Re*) explique la diastéréosélectivité modérée.

[237] D. H. Hua *et al.*, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4-6.

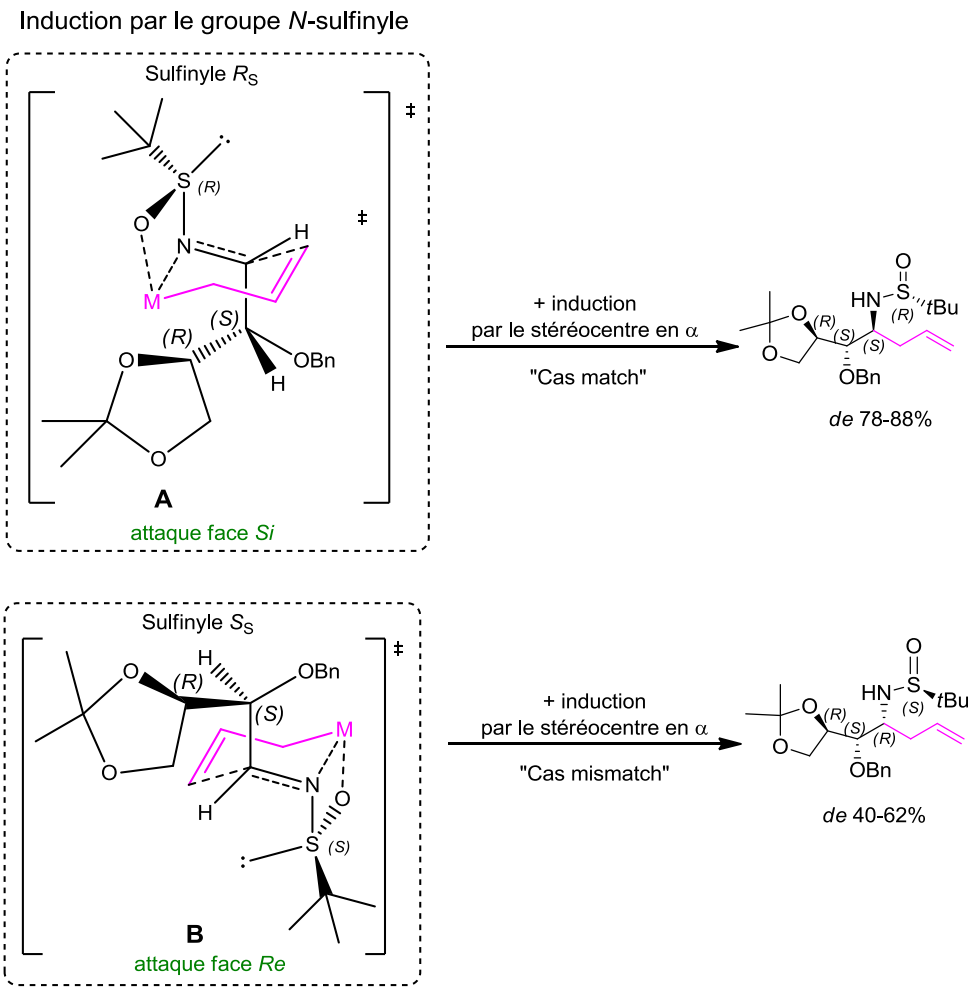


Schéma 36 : modèle d'induction par le groupe *N*-sulfinyle et diastéréosélectivités obtenues

Les solvants coordinants (THF, Et_2O) et les bases de Lewis (TMEDA) empêchent, par coordination du métal, la formation de l'état de transition cyclique à six centres. Ainsi la réaction d'addition menée dans ces conditions passe par un **état de transition ouvert**. [223,238] Les états de transition **C** et **D** sont proposés à partir des sulfinimines R_S et S_S (schéma 37). Le « cas mismatch » entre le modèle de Felkin-Anh polaire ou Cornforth-Evans (attaque face *Si*) et le stéréocontrôle par le groupe N-sulfinyle (attaque face *Re*) explique le faible excès diastéréoisomérique obtenu avec la sulfinimine R_S. Le groupement benzyloxy peut également gêner l'approche du nucléophile sur la face *Re*. Pour la sulfinimine S_S, un « cas match » entre les deux types de stéréocontrôle permet d'atteindre une très bonne diastéréosélectivité (schéma 37).

[238] X.-W Sun *et al.*, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4979-4982.

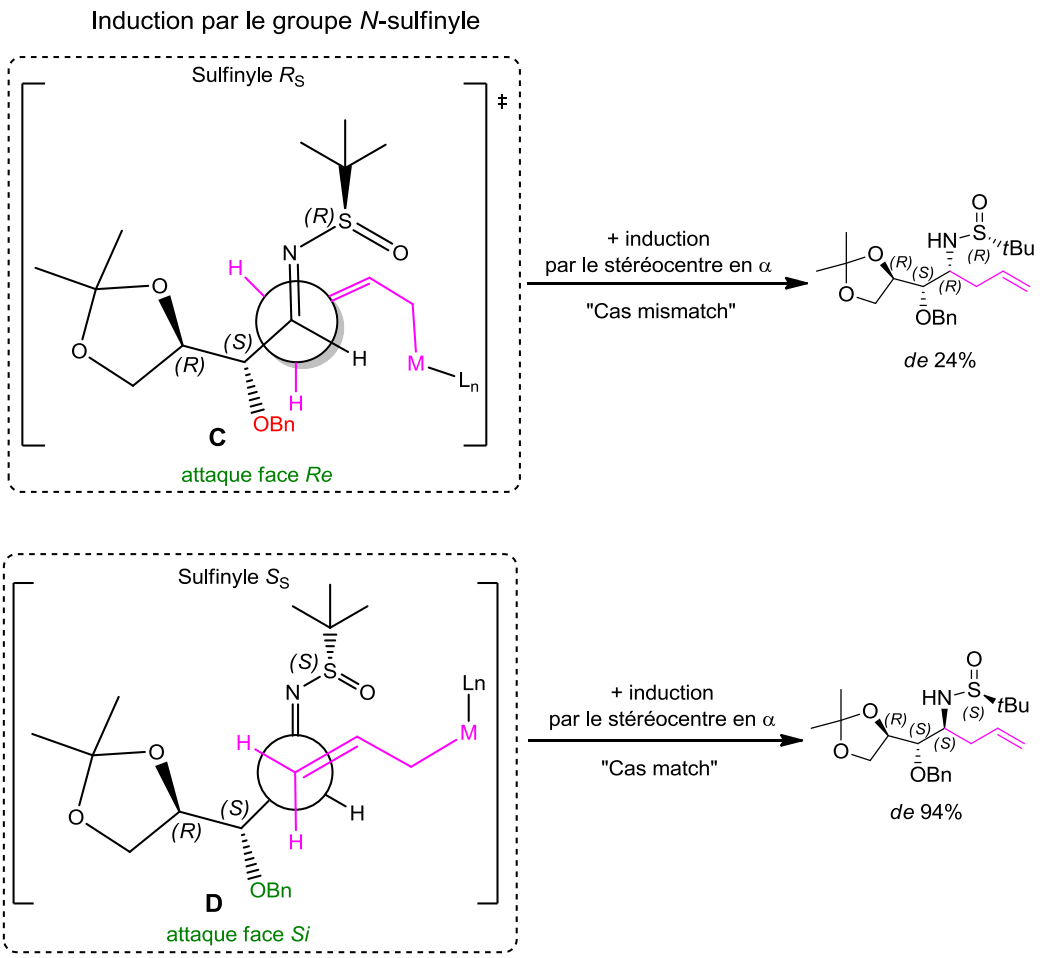


Schéma 37 : modèle d'induction par le groupe *N*-sulfinyle et diastéréosélectivités obtenues

Grâce à cette méthode, nous avons accès aux deux diastéréoisomères *anti* et *syn* avec des diastéréosélectivités et rendements intéressants.

Allyle indium

Foubelo et Yus ont étudié l'addition de bromure d'allyle sur des *N-tert*-butanesulfinimines en présence d'indium dans le THF (addition de type Barbier) et ont observé de très bonnes diastéréosélectivités. [239] Ils proposent un état de transition cyclique à 6 centres de type Zimmerman-Traxler dans lequel l'indium coordine l'azote de l'imine et l'oxygène du groupe sulfinyle. Ils ont par la suite mis au point l'**α-aminoallylation d'aldéhydes « one-pot »** avec un *tert*-butanesulfinamide énantiopur, du bromure d'allyle, de l'indium et du $Ti(OEt)_4$ dans le THF. [240] Tous les réactifs sauf le bromure d'allyle sont agités à température ambiante pendant 1 h, puis après addition du bromure d'allyle, le mélange réactionnel est chauffé à 60 °C pendant 5 h. Les diastéréosélectivités obtenues par cette méthode sont identiques à celles observées par allylation des *N*-sulfinimines préformées.

[239] F. Foubelo, M. Yus, *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, *15*, 3823-3825.
[240] J. C. González-Gómez *et al.*, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6308-6311.

Dans ces conditions, à partir de l'aldéhyde **43** et avec le *tert*-butanesulfinamide R_S (schéma 38), nous obtenons le produit *anti* **46** majoritaire avec un rendement de 69% et un ratio diastéréoisomérique de 88:12 (ratio déterminé par HPLC).

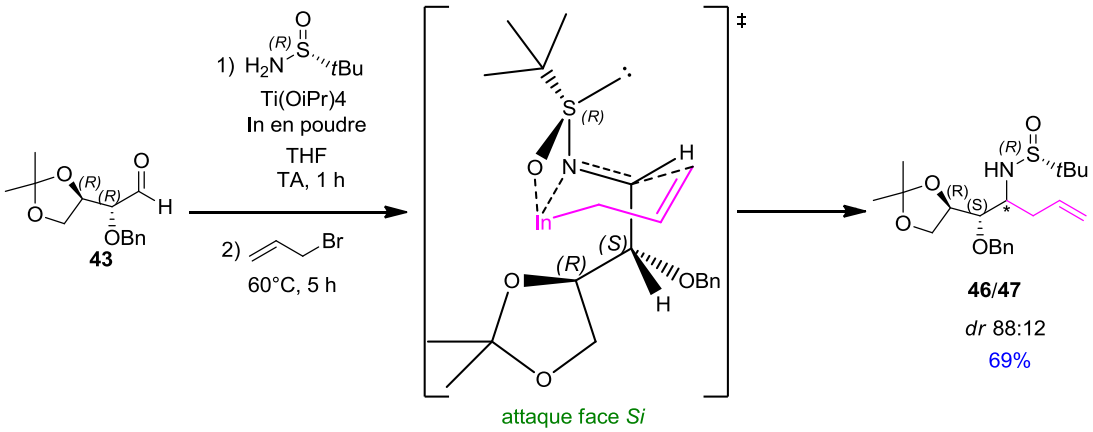
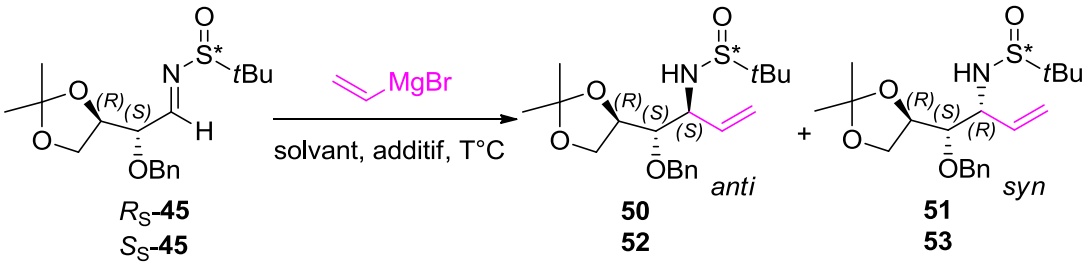


Schéma 38 : α-aminoallylation de l'aldéhyde 43 en présence d'indium

b) Addition d'un nucléophile vinylique

Nous avons réalisé l'addition de bromure de vinyle magnésium sur les *N-tert*-butanesulfinimines R_S-**45** et S_S-**45**. Les différentes conditions utilisées et résultats obtenus sont rassemblés tableau 17.



Entrée	Imine	Solvant/additif	Adduit	*dr anti:syn*[a, b]
1	R_S-**45**	Toluène	**50** + **51**, 80%	54:46
2	R_S-**45**	THF/TMEDA (2 eq.)	**50** + **51**, 76%	97:3
3[c]	R_S-**45**	THF/TMEDA (2 eq.)	**50** + **51**, 74%	94:6
4	S_S-**45**	Toluène	**52** + **53**, 76%	92:8
5	S_S-**45**	THF/TMEDA (2 eq.)	**52** + **53**, 79%	89:11

Tableau 17 : 1,2-additions de bromure de vinyle magnésium sur R_S-45 et S_S-45 ; conditions : 3 eq. vinylMgBr (1 M Et_2O), -78 °C ; (a) ratio déterminé par HPLC du brut ; (b) stéréochimie du produit majoritaire déterminée par RMN GOESY après dérivatisation en carbamate cyclique (cf page 117) ; (c) -20 °C

De bonnes et très bonnes sélectivités pour le produit *anti* sont obtenues à partir de la sulfinimine R_S dans le THF/TMEDA et à partir de la sulfinimine S_S dans le toluène ou le THF/TMEDA (entrées 2, 3, 4 et 5), correspondant à une attaque du nucléophile face *Si* et un état de transition non-chélaté suivant le modèle de Felkin-Anh polaire (fig. 60). L'état de transition proposé est en accord avec le caractère non-chélatant des vinyl-magnésiens souligné par Coleman et Carpenter [241], qui pourrait être lié à leur présence sous forme

[241] R. S. Coleman, A. J. Carpenter, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1697-1700.

d'oligomères et d'agrégats. Dans le cas de la sulfinimine R_S, le groupement *tert*-butyl semble gêner l'approche du nucléophile, ce qui peut expliquer la mauvaise diastéréosélectivité obtenue.

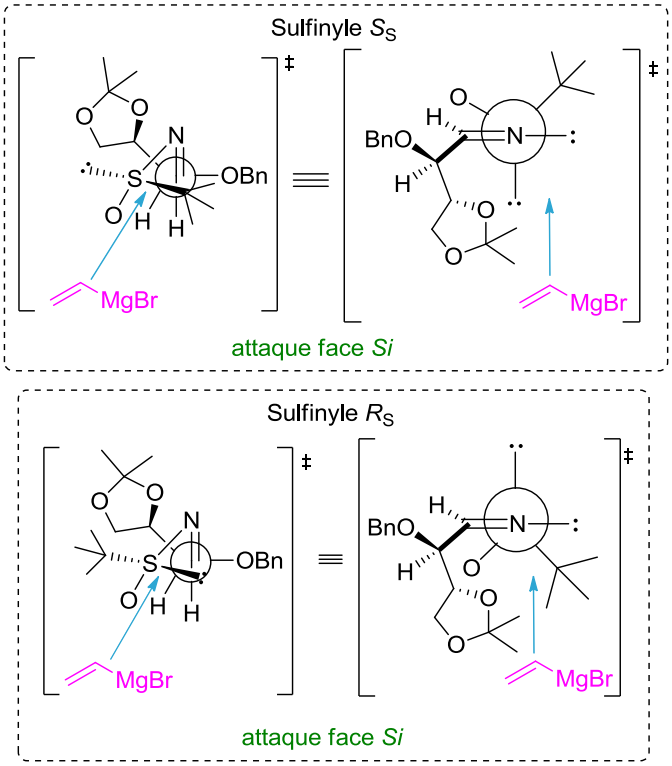


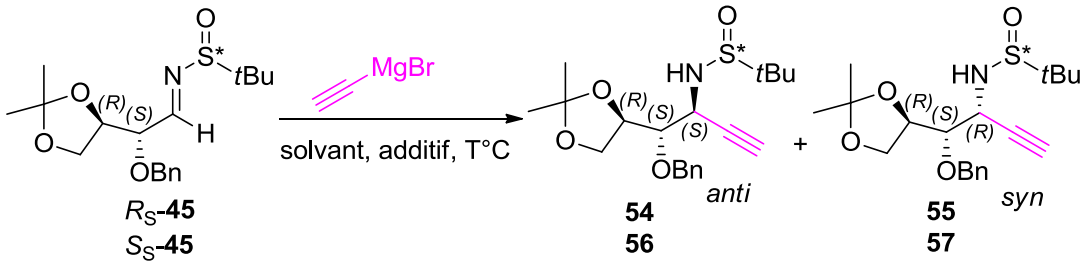
Figure 60 : états de transition de type Felkin-Anh pour l'addition du bromure de vinyle magnésium

Dans le THF/TMEDA, nous remarquons que quelque soit la chiralité du groupe sulfinyle, le produit *anti* est formé très majoritairement (tabl. 17, entrées 2, 3 et 5). Wang a également fait cette observation pour l'addition de bromure de vinyle magnésium sur des *N*-*tert*-butanesulfinimines dérivées de thréitol et dérivées de D-xylofuranose. [242,243] La chiralité du soufre ne semble pas jouer un rôle important dans ce cas, la diastéréosélectivité suit alors le modèle de Felkin-Anh polaire ou Cornforth-Evans (attaque face *Si*).

c) Addition d'un nucléophile éthynylique

Le bromure d'éthynyle magnésium a été additionné aux sulfinimines chirales **45** (tabl. 18). Il n'y a eu aucune conversion dans le THF/TMEDA (entrées 2 et 4). Dans le toluène, l'addition sur la sulfinimine R_S a donné le produit *anti* **54** majoritaire avec une diastéréosélectivité correcte (entrée 1) tandis que l'addition sur la sulfinimine S_S donne une conversion médiocre (entrée 3).

[242] B. Wang, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6012-6015.
[243] B. Wang, P.-P. Zhang, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 119-122.



Entrée	Imine	Solvant/additif	Conversion	Adduit	*dr anti:syn*[a, b]
1	R_S-**45**	Toluène	100%	**54** + **55**, 65%	88:12
2	R_S-**45**	THF/TMEDA (2 eq.)	0	-	-
3	S_S-**45**	Toluène	23%	**56** + **57**	-
4	S_S-**45**	THF/TMEDA (2 eq.)	0	-	-

Tableau 18 : 1,2-additions de bromure d'éthynyle magnésium sur R_S-45 et S_S-45 ; conditions : 5 eq. éthynylMgBr (0.5 M Et_2O), -20 °C ; (a) ratio déterminé par HPLC du brut ; (b) stéréochimie du produit majoritaire déterminée par RMN après dérivatisation (cf page 117)

L'addition du bromure d'éthynyle magnésium sur la sulfinimine R_S passe certainement par un état de transition cyclique à six centres selon le modèle d'Ellman (fig. 61).

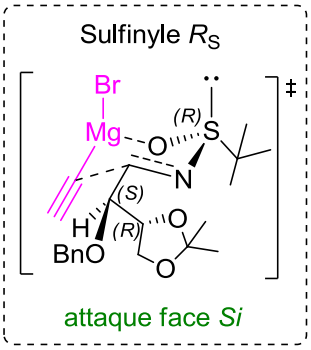


Figure 61 : état de transition proposé pour l'addition du bromure d'éthynyle magnésium sur la sulfinimine R_S

d) Addition d'un nucléophile propargylique

Propargyle indium

Foubelos et Yus ont décrit en 2013 la propargylation diastéréosélective de type Barbier de *N-tert*-butanesulfinimines à partir du bromure de triméthylsilyle propargyle et d'indium.[244] Ils proposent le mécanisme illustré schéma 39. La réaction de l'indium sur le bromure de triméthylsilyle propargyle donne le prorpargyle indium **A** qui, par réarrangement métallotropique, est en équilibre avec l'indium allényle **B**. Dû à l'effet stabilisant de l'atome de silice sur les α-carbanions [245], l'espèce la plus stable est **B**. En considérant que dans les intermédiaires allyles indiums, l'addition γ est préférée à l'addition α, la réaction passe préférentiellement par l'état de transition **D** et le produit **F** est obtenu majoritairement ou exclusivement.

[244] M. J. García-Muñoz *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1287-1295.
[245] D. M. Wetzel, J. I. Brauman, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8333-8336.

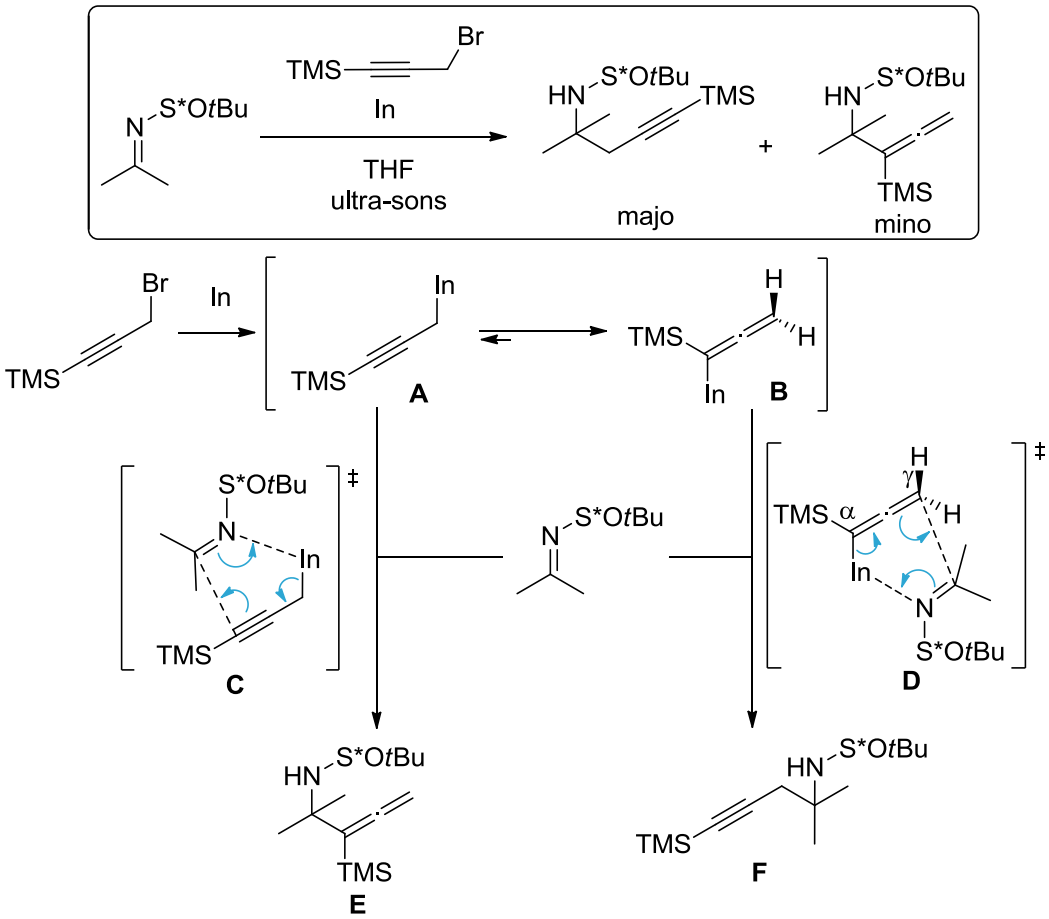


Schéma 39 : mécanisme proposé pour la propargylation des *N-tert*-butanesulfinimines

Nous avons testé la réaction de propargylation de la *N-tert*-butanesulfinimine R_S-**45** avec le bromure de triméthylsilyle propargyle en présence d'indium, sous ultra-sons (schéma 40). La réaction est lente et au bout de 8 h, nous observons un mélange de 28% de substrat de départ et 72% d'un mélange 67/33 des alcynes *anti*-**58**/*syn*-**59** (ratio déterminé par RMN). Il est à noter qu'il n'y a pas eu formation des produits allènes *anti*-**60** ou *syn*-**61**. Nous n'avons cependant pas poursuivi avec cette méthode au vu de la faible diastéréosélectivité et de la lenteur de la réaction.

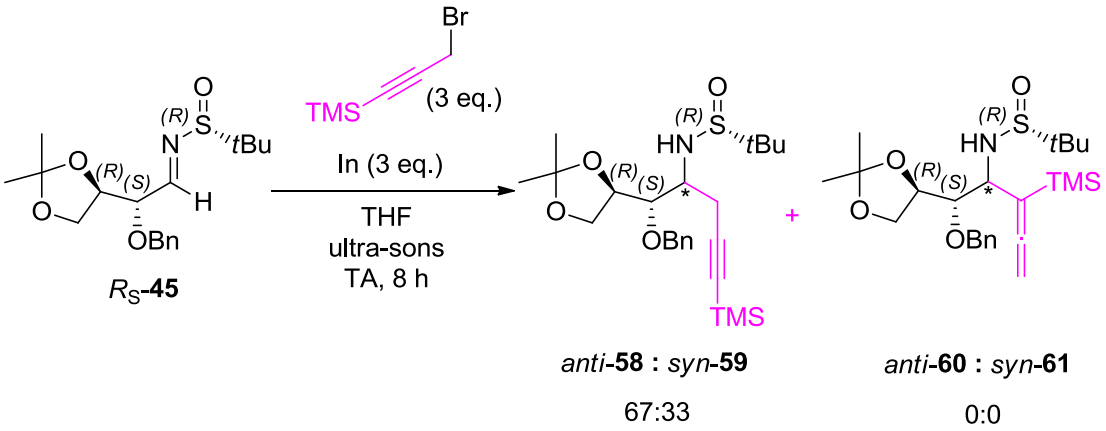


Schéma 40 : propargylation de R_S-45 avec le bromure de triméthysilyle propargyle et l'indium

Ester pinacolique de l'acide allénylboronique

La réaction de propargylation diastéréosélective des *N-tert*-butanesulfinimines chirales **45** peut être envisagée avec l'allényl-boronate en présence d'une quantité catalytique de diéthylzinc, comme décrit par Fandrick *et al.*. [246,247] Ils proposent le cycle catalytique illustré schéma 41, passant par un échange B/Zn entre le diéthylzinc et le réactif allényl-boronate pour donner le réactif nucléophile allényl-zinc **A** et l'éthyldioxaborolane. [246,248] Il y a ensuite addition de l'allényl-zinc sur la *N-tert*-butanesulfinimine conduisant à l'intermédiaire **B**, qui participe à un nouvel échange B/Zn avec le réactif allényl-boronate pour régénérer l'allényl-zinc **A** et compléter le cycle catalytique.

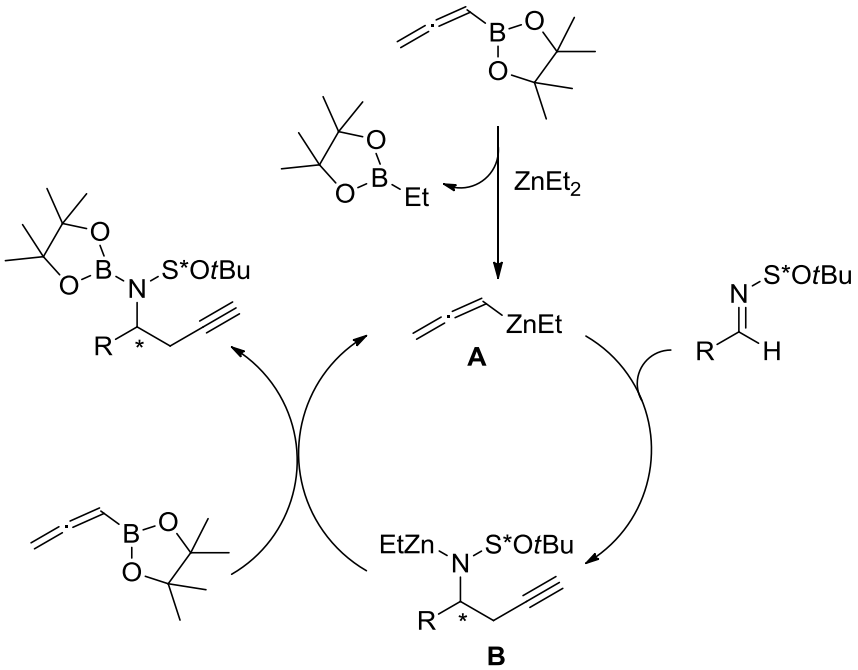
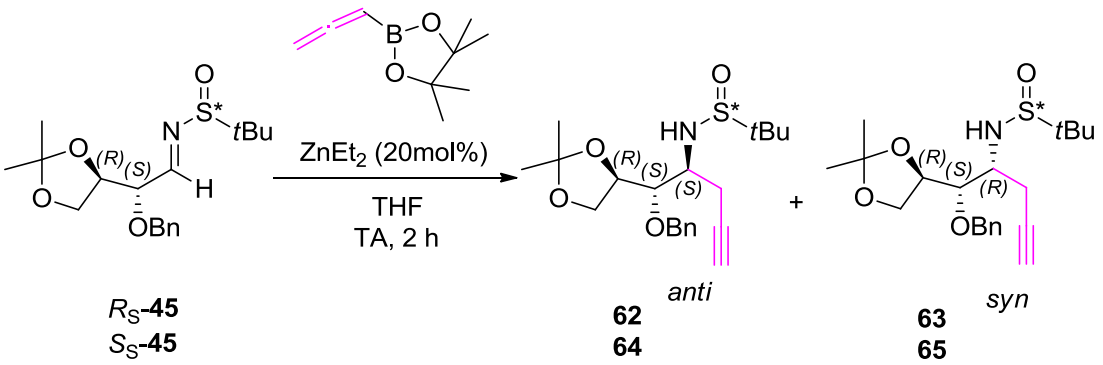


Schéma 41 : mécanisme de propargylation avec l'ester pinacolique de l'acide allénylboronique catalysée par $ZnEt_2$

Les résultats obtenus dans ces conditions pour les *N-tert*-butanesulfinimines chirales **45** sont rassemblés tableau 19.

[246] D. R. Fandrick *et al.*, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 748-751.
[247] H. M. Wisniewska, E. R. Jarvo, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 11629-11636.
[248] D. R. Fandrick *et al.*, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 88-91.



Entrée	Imine	Adduit	*dr anti:syn*[a]
1	R_S-**45**	**62** + **63**, 72%	3:97[b]
2	S_S-**45**	**64** + **65**, 79%	20:80[c]

Tableau 19 : 1,2-additions d'un nucléophile propargylique sur R_S-45 et S_S-45 ; conditions : 1.5 eq. d'ester pinacolique de l'acide allénylboronique, 20% $ZnEt_2$, THF, TA ; (a) stéréochimie du produit majoritaire déterminée par RMN après dérivatisation (cf page 117) ; (b) ratio déterminé par HPLC du brut ; (c) ratio déterminé par RMN du brut

Le produit *syn* est obtenu avec une très bonne diastéréosélectivité à partir de la sulfinimine R_S (entrée 1) et avec une diastéréosélectivité correcte à partir de la sulfinimine S_S (entrée 2). Les états de transition de type Cram-chélate présentés figure 62 peuvent expliquer les sélectivités diastéréofaciales observées (attaque face *Re*). L'approche du nucléophile est synclinale avec coordination du zinc par l'oxygène du groupe sulfinyle. Les sulfinimines adoptent la conformation favorisée avec le doublet non-liant de l'azote et la liaison S-O en antipériplanaire. Pour la sulfinimine S_S, le moins bon excès diastéréoisomérique peut s'expliquer par la non-coopération entre le modèle de Cram-chélate et l'induction par le groupe sulfinyle.

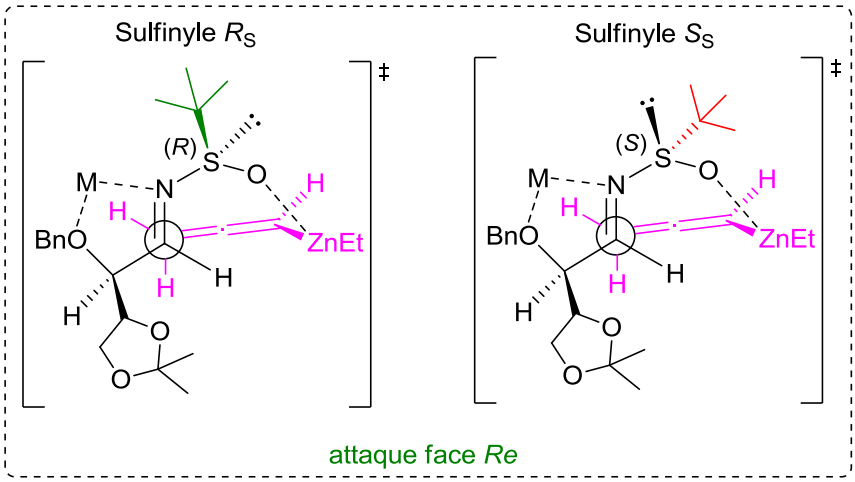


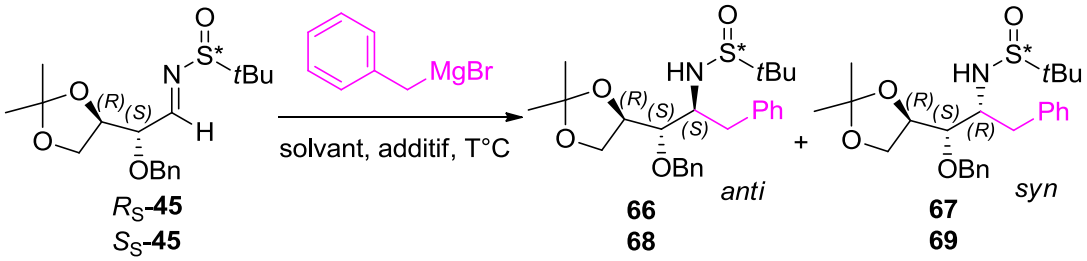
Figure 62 : possibles états de transition pour l'addition de l'ester pinacolique de l'acide allénylboronique

e) Addition d'un nucléophile benzylique

Bromure de benzyle magnésium

Les conditions et résultats obtenus pour l'addition du bromure de benzyle magnésium sur les sulfinimines chirales **45** sont indiqués dans le tableau 20. De très bonnes diastéréosélectivités pour le produit *anti* sont obtenues à partir de la sulfinimine R_S dans le toluène et dans le THF/TMEDA (entrées 1 et 2). Pour l'addition

sur la sulfinimine S_S, nous observons des mauvaises diastéréosélectivités dans les deux types de solvant (entrées 3 et 4).



Entrée	Imine	Solvant/additif	Adduit	*dr anti:syn*[a, b]
1	R_S-**45**	Toluène	**66** + **67**, 78%	92:8
2	R_S-**45**	THF/TMEDA (2 eq.)	**66** + **67**, 74%	96:4
3	S_S-**45**	Toluène	**68** + **69**, 89%	52:48
4	S_S-**45**	THF/TMEDA (2 eq.)	**68** + **69**, 85%	53:47

Tableau 20 : 1,2-additions de bromure de benzyle magnésium sur R_S-45 et S_S-45 ; conditions : 3 eq. benzylMgBr (1 M Et_2O), -20 °C ; (a) ratio déterminé par HPLC du brut ; (b) stéréochimie du produit majoritaire déterminée par RMN GOESY après dérivatisation en carbamate cyclique (cf page 117)

Le modèle d'Ellman est proposé pour expliquer la sélectivité diastéréofaciale observée dans le toluène pour l'addition sur la sulfinimine R_S (approche Felkin-Anh) (fig. 63). Pour la sulfinimine S_S, le mauvais ratio diastéréoisomérique peut s'expliquer par la non-coopération entre le modèle de Felkin-Anh/Cornforth-Evans et le modèle d'Ellman (approche anti-Felkin-Anh).

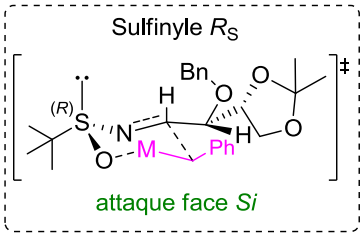
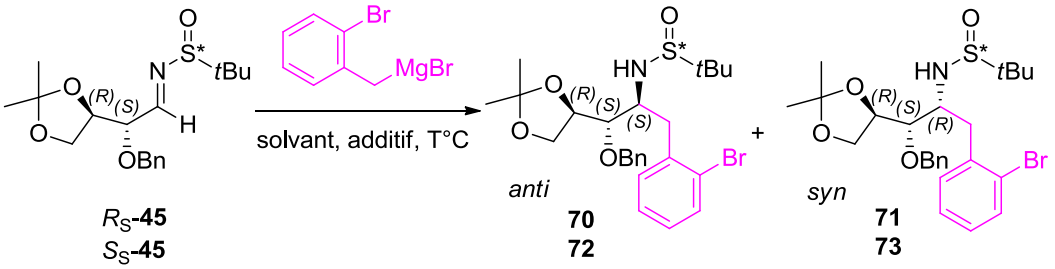


Figure 63 : état de transition de type Ellman pour l'addition sur la sulfinimine R_S

Bromure de 2-bromobenzyle magnésium

Enfin, nous avons réalisé l'addition du bromure de 2-bromobenzyle magnésium sur les sulfinimines R_S-**45** et S_S-**45** (tabl. 21). Étonnamment, les diastéréosélectivités obtenues sont très différentes de celles observées avec le bromure de benzyle magnésium.



Entrée	Imine	Solvant/additif	Adduit	*dr anti:syn*[a, b]
1	R_S-**45**	Toluène	**70** + **71** **70** isolé (33%)	60:40
2	R_S-**45**	THF/TMEDA (2 eq.)	**70** + **71** **70** isolé (20%)	50:50
3	S_S-**45**	Toluène	**72** + **73**, 70%	2:98
4	S_S-**45**	THF/TMEDA (2 eq.)	**72** + **73**, 63%	44:56

Tableau 21 : 1,2-additions de bromure de 2-bromobenzyle magnésium sur R_S-45 et S_S-45 ; conditions : 3 eq. 2-Br-benzylMgBr (1 M Et_2O) fraîchement synthétisé, -20 °C ; (a) ratio déterminé par HPLC du brut ; (b) stéréochimie du produit majoritaire déterminée par RMN GOESY après dérivatisation en carbamate cyclique (cf page 117)

L'addition du bromure de 2-bromobenzyle magnésium donne de mauvaises diastéréosélectivités dans le toluène et le THF/TMEDA à partir de la sulfinimine R_S (entrées 1 et 2) et dans le THF/TMEDA à partir de la sulfinimine S_S (entrée 4). Au contraire, une très bonne diastéréosélectivité pour le composé *syn* est obtenue à partir de la sulfinimine S_S dans le toluène (entrée 3) et pourrait être expliquée par l'état de transition présenté figure 64. Le conformère de la sulfinimine S_S le plus stable est le rotamère **A** (rotation autour de la liaison N-S), dans lequel l'oxygène du sulfinyle est en arrangement *s-cis* par rapport à la liaison C=N, permettant une interaction stabilisante entre l'oxygène du sulfinyle et l'hydrogène de l'imine. Pour un substrat benzylimine, l'équilibre entre les deux rotamères est associé à un ΔG de 4.0 kcal/mol.[249] En présence d'acides de Lewis tel que $MgBr_2$, l'équilibre est déplacé vers le rotamère **B** grâce à la coordination stabilisante de l'acide de Lewis par l'oxygène du groupe sulfinyle (fig .64).[249] La présence significative de $MgBr_2$ (ou d'autres sels de magnésium) est peut-être liée au fait que le bromure de 2-bromobenzyle a été synthétisé préalablement au laboratoire.

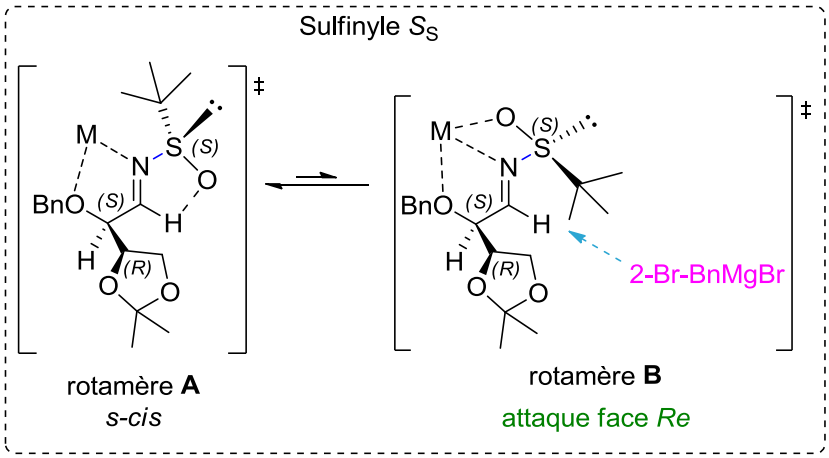


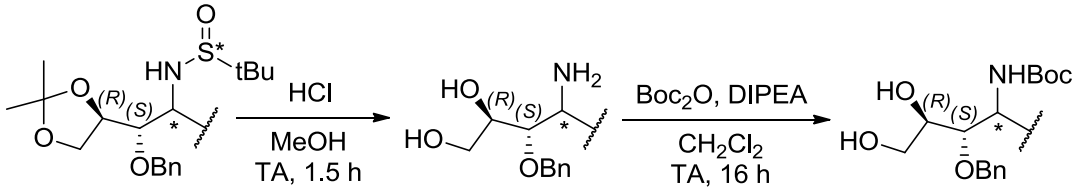
Figure 64 : état de transition possible pour l'addition sur la sulfinimine S_S dans le toluène en présence de $MgBr_2$

[249] J. A. Fernández-Salas *et al.*, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1658-1661.

f) Détermination de la stéréochimie des produits d'addition

Afin de déterminer la stéréochimie relative des différents adduits, ces derniers ont été dérivatisés en carbamates cycliques permettant des expériences de RMN.

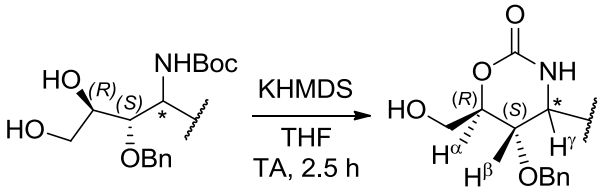
Pour chaque produit d'addition, le groupe *N-tert*-butanesulfinyle est ainsi facilement retiré par traitement acide avec HCl dans le méthanol. [225] Le sous-produit de cette réaction est le *tert*-butanesulfinyle méthylester qui est volatil. Dans ces conditions, la protection acétonide est également retirée, ce qui donne un aminodiol. Celui-ci est directement engagé, après concentration à l'évaporateur rotatif, dans la réaction de protection de l'amine par le groupement Boc (tabl. 22).



Entrée	Substrat	Produit	Rendement
1	Allyle **46**/**47** (94:6)	*anti*-**74**	85%
2	Allyle **48**/**49** (13:87)	*syn*-**75**	71%
3	Vinyle **50**/**51** (97:3)	*anti*-**76**	90%
4	Ethynyle **54**/**55** (88:12)	*anti*-**77**/*syn*-**78** (88:12)[a]	71%
5	Propargyle **62**/**63** (3:97)	*syn*-**79**	83%
6	Benzyle **66**/**67** (96:4)	*anti*-**80**	79%
7	Benzyle **68**/**69** (52:48)	*syn*-**81**	30%
8	2-Br-benzyle **70**	*anti*-**82**	51%
9	2-Br-Benzyle **72**/**73** (2:98)	*syn*-**83**	73%

Tableau 22 : séquence déprotection de la *N-tert*-butanesulfinyle amine et du diol/protection de l'amine ; (a) ratio déterminé par RMN

Les composés allyles *anti*-**74** et *syn*-**75**, vinyle *anti*-**76**, benzyle *anti*-**80** et 2-bromobenzyle *syn*-**83** sont ensuite dérivatisés en carbamates cycliques en conditions basiques (KHMDS). Les carbamates cycliques ainsi obtenus sont analysés en RMN ^{1}H et RMN GOESY (tabl. 23).



Entrée	Produit	Constante de couplage $J(H^{\alpha}\text{-}H^{\beta})$ / $J(H^{\beta}\text{-}H^{\gamma})$	Effet NOE par irradiation de H^{α}	Stéréochimie relative du produit d'addition
1	Allyle *anti*-**84**	9 Hz / 8.8 Hz	2% (sur H^{γ})	*anti*
2	Allyle *syn*-**85**	6.3 Hz / 4.0 Hz	0	*syn*
3	Vinyle *anti*-**86**	9.3 Hz / 9.1 Hz	2% (sur H^{γ})	*anti*
4	Benzyle *anti*-**87**	9.4 Hz / 9.3 Hz	nd	*anti*
5	2-Br-benzyle *syn*-**88**	7.5 Hz / 5.1 Hz	2% (sur CHPhBr)	*syn*

Tableau 23 : détermination de la stéréochimie relative des produits d'addition ; nd : non déterminé

En RMN ^{1}H, nous nous intéressons plus particulièrement aux constantes de couplage ^3J entre les protons H^α/H^β et H^β/H^γ. Dans un cycle à 6 centres, lorsque des protons sont en position *trans*-diaxiale, leur constante de couplage est de l'ordre de 8-10 Hz (schéma 42) ; sinon celle-ci est plus faible et de l'ordre de 0-5 Hz. Ainsi, la mesure de la constante $^3J(H^\beta/H^\gamma)$ nous permet de déduire la configuration relative du carbone portant l'amine.

La RMN GOESY (Gradient-enhanced nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) est utilisée pour évaluer la proximité spatiale entre des protons au sein d'une molécule. Le proton H^α est irradié et nous observons les effets de cette irradiation sur le proton H^γ de la molécule. Lorsque les protons « se voient » dans l'espace, un effet NOE (Nuclear Overhauser Effect) est observé (schéma 42) ; cela se traduit par un signal négatif au déplacement chimique du proton perturbé après soustraction des spectres proton et GOESY. Lorsque les protons ne « se voient » pas dans l'espace, aucun signal n'est observé. Ainsi, nous en déduisons la configuration relative du carbone portant l'amine des produits d'addition (tabl. 23).

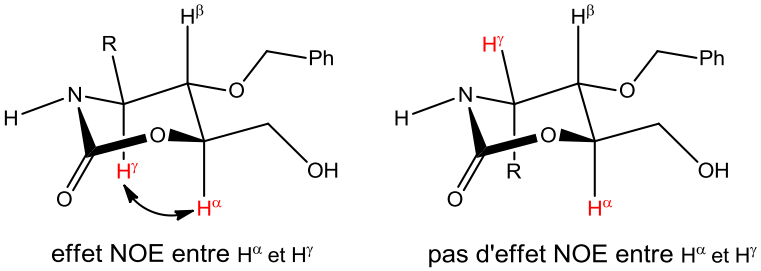


Schéma 42 : effet NOE entre les protons H^α et H^γ

Pour le composé benzyle *anti*-**80**, la formation du carbamate cyclique *anti*-**87** n'est pas complète malgré l'ajout répété de KHMDS (entrée 4). Le mélange de substrat de départ/carbamate cyclique (42/58) est donc simplement analysé en RMN ^{1}H. Le profil des signaux pour les protons H^α, H^β et H^γ est similaire à celui du carbamate cyclique *anti*-**84** et les constantes de couplage $J(H^\alpha\text{-}H^\beta)$ et $J(H^\beta\text{-}H^\gamma)$ sont de l'ordre de 9 Hz, ce qui nous permet de conclure quant à une stéréochimie relative *anti* pour le produit d'addition benzyle *anti*-**87**.

Pour les composés éthynyle *anti*-**77**/*syn*-**78** (88:12) et propargyle *syn*-**79**, la fonction alcyne est réduite en alcène par hydrogénation catalytique au palladium de Lindlar (schéma 43). Les analyses RMN ^{1}H des composés ainsi formés sont comparées à celles des produits allyles *anti*-**74** et *syn*-**75** et vinyle *anti*-**76**. Nous en déduisons la configuration relative du carbone portant l'amine pour le diastéréoisomère majoritaire : *anti* pour l'éthynyle et *syn* pour le propargyle.

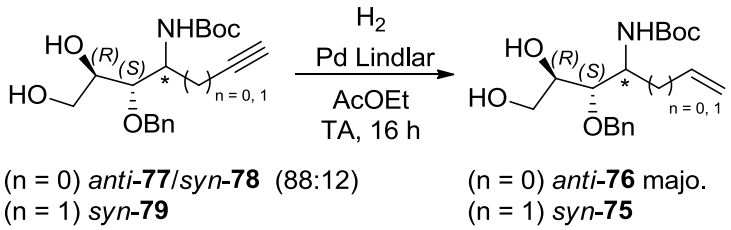


Schéma 43 : hydrogénation catalytique de l'alcyne au Pd de Lindlar

Afin de déterminer la configuration absolue des produits d'addition, des essais de cristallisation ont été réalisés pour le composé allyle *anti*-**74**, en vain. Pour faciliter la cristallisation, nous avons synthétisé le dérivé ester *anti*-**89** par estérification avec le chlorure de *para*-nitrobenzoyle (schéma 44). Cependant, nous n'avons pas non plus obtenu de cristaux à partir d'*anti*-**89**.

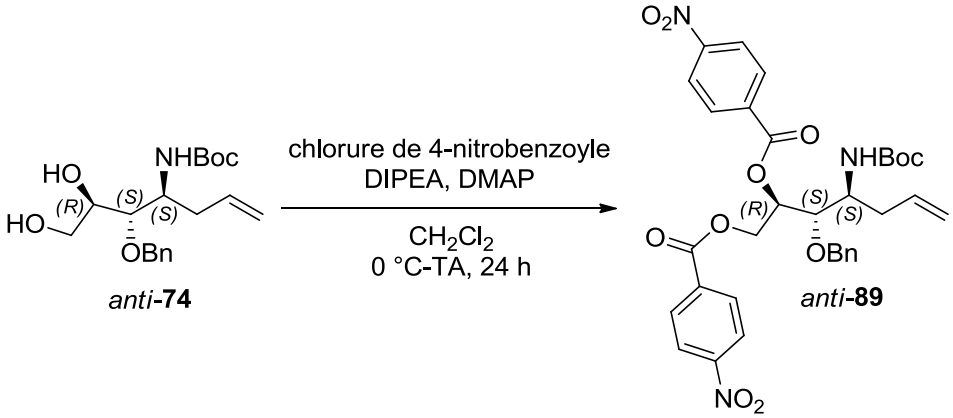


Schéma 44 : estérification d'*anti*-74

Des essais de cristallisation sur des molécules telles que *syn*-**79** sont également en cours. D'autres méthodes de détermination de la configuration absolue auraient pu être utilisées, à savoir le dichroïsme circulaire et la RMN (agents chiraux de dérivatisation).

4) Synthèse des époxydes 90-97

L'étape suivante consiste à synthétiser les époxydes **90**-**97** à partir des diols **74**-**83**.

A partir du composé allyle *anti*-**74**, nous avons d'abord essayé les conditions chlorure de mésyle/DIPEA (schéma 45). [250] L'alcool primaire est transformé en mésylate par réaction avec du sulfène, formé *in situ* par élimination du chlorure de mésyle en présence de base (DIPEA). Le mésylate peut alors subir l'attaque intramoléculaire de l'alcool secondaire pour donner l'époxyde.

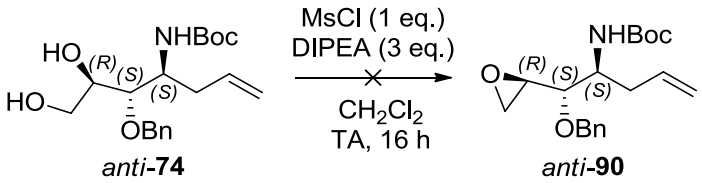


Schéma 45 : époxydation de *anti*-74 par activation de l'alcool primaire avec le chlorure de mésyle

Dans ces conditions, nous avons observé un mélange complexe. De la même façon, l'activation sélective de l'alcool primaire peut être réalisée avec une quantité catalytique d'oxyde de dibutylétain et du chlorure de tosyle en présence de triéthylamine (schéma 46). [251] Après isolement du produit de tosylation, l'époxyde est formé en condition basique douce.

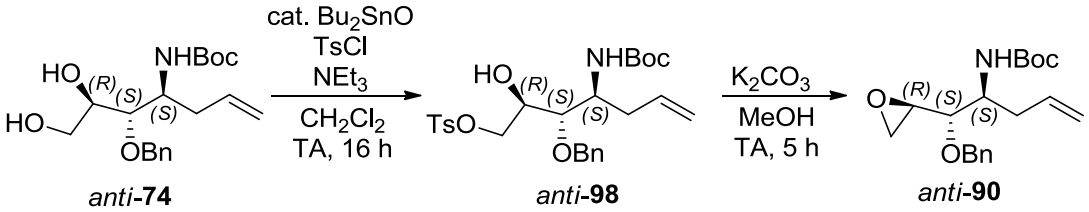


Schéma 46 : tosylation sélective de l'alcool

[250] S. S. Harried *et al.*, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5975-5982.
[251] M. J. Martinelli *et al.*, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 447-450.

Le mécanisme de cette réaction est illustré schéma 47. Le traitement du diol par Bu_2SnO conduit à la formation d'un acétal étain **A**. Ce dernier permet l'activation de l'alcool primaire et la protection temporaire de l'alcool secondaire. L'acétal étain subit ensuite une tosylation sélective pour donner **B**, puis **C** après traitement.

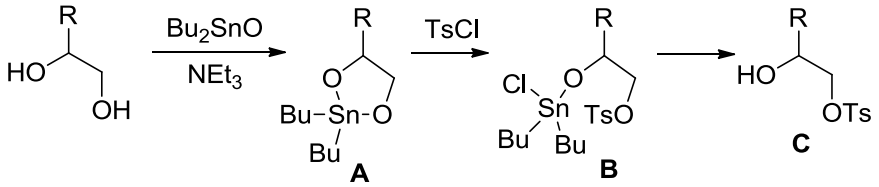


Schéma 47 : mécanisme de la réaction de tosylation sélective avec Bu_2SnO

Dans ces conditions, nous observons certes la formation du produit de tosylation *anti*-**98**, mais en présence d'un sous-produit *anti*-**99** majoritaire issu d'une cyclisation du carbamate Boc sur le tosylate intermédiaire (schéma 48).

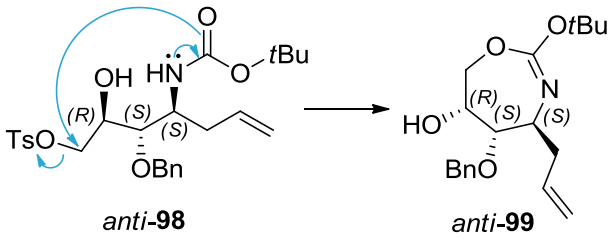
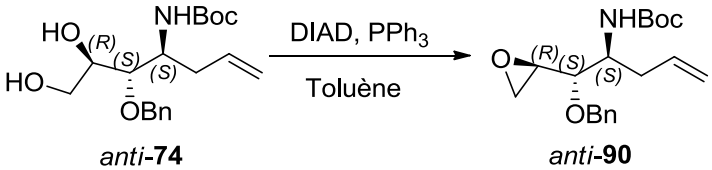


Schéma 48 : formation du sous-produit *anti*-99

Nous nous sommes donc tournés vers une époxydation dans les conditions de Mitsunobu, à savoir diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) en présence de triphénylphosphine au reflux du toluène (tabl. 24). [252,253]



Entrée	Conditions	Formation du sous-produit *anti*-99	Rendement
1	3 h – 5 h, 110 °C	oui (jusqu'à 50%)	44-77%
2	5 min, MW, 150 °C	non	65%

Tableau 24 : époxydation dans les conditions de Mitsunobu

Le mécanisme de cette réaction est indiqué schéma 49. La triphénylphosphine réagit avec le DIAD pour donner un ion phosphonium **A**, sur lequel va réagir l'alcool primaire du diol. L'alcool primaire ainsi activé est attaqué par l'alcool secondaire pour donner un ion oxonium **B**. Il y a enfin libération de l'époxyde et de l'hydrazine du DIAD **100**.

[252] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, *1*, 1-28.
[253] T. Hanaya *et al.*, *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1641-1650.

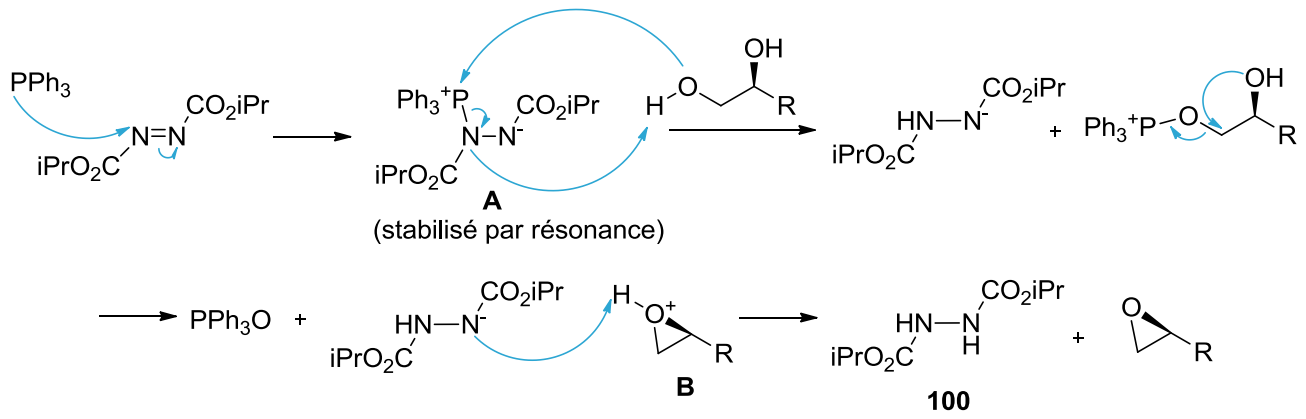


Schéma 49 : mécanisme de la réaction de Mitsunobu

Dans les conditions de Mitsunobu, nous avons obtenu le produit désiré avec des rendements de 44 à 77%, mais le sous-produit de cyclisation *anti*-**99** a été également observé (tabl. 24, entrée 1). Afin d'éviter la formation de ce sous-produit, la réaction est testée sur des temps courts au micro-onde (5 min) à 150 °C, comme décrit par Steinreiber *et al.* (tabl. 24, entrée 2). [254] Nous observons une conversion complète du substrat de départ sans formation du sous-produit de cyclisation *anti*-**99**. Le chauffage par micro-onde sur des courtes durées offre ici un réel avantage par rapport à la voie thermique. Lors de la purification par chromatographie sur colonne, le sous-produit diisopropyl hydrazine dicarboxylate **100** et le produit désiré sont difficilement séparables. Nous obtenons le produit désiré avec un rendement de 65% en présence de 26% du sous-produit **100**.

Pour contourner ce problème de séparation, Hagiya *et al.* ont mis au point un réactif, le di-2-méthoxyéthyl azodicarboxylate (DMEAD) (schéma 50). [255] Le sous-produit hydrazine dérivé du DMEAD est beaucoup plus soluble dans l'eau (0.55g/ml, TA) que les analogues éthyle et isopropyle (<0.01g/ml, TA) et peut donc être retiré du mélange réactionnel par simple extraction. De plus, la forte polarité du sous-produit hydrazine dérivé du DMEAD (Rf = 0.08, acétate d'éthyle/hexane 1/1) par rapport aux analogues éthyle (Rf = 0.44) et isopropyle (Rf = 0.65) permet une séparation complète du produit désiré par chromatographie sur colonne. La réaction de Mitsunobu avec le DMEAD a été testée avec le composé *anti*-**80** et a donné un bon rendement de 78% (schéma 50).

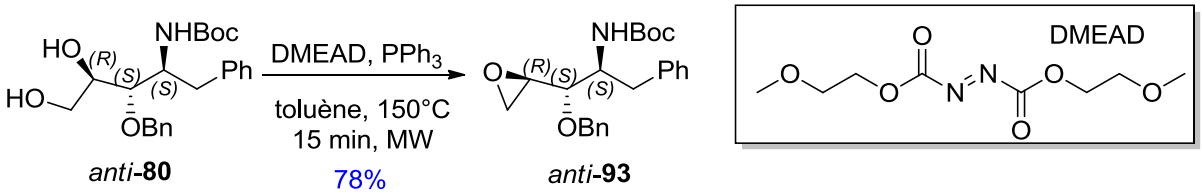
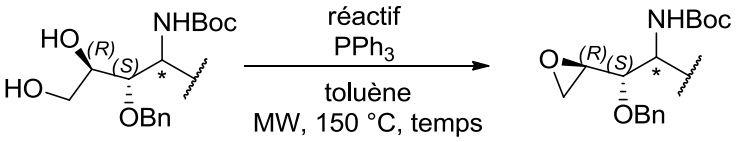


Schéma 50 : époxydation dans les conditions de Mitsunobu avec le réactif DMEAD

[254] A. Steinreiber *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6283-6286.
[255] K. Hagiya *et al.*, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6109-6114.

L'époxydation est ainsi réalisée dans les conditions de Mitsunobu au micro-onde pour les produits **90-97** (tabl. 25).



Entrée	Composé	Réactif	Temps	Rendement
1	Allyle *anti*-**74**	DIAD	5 min	*anti*-**90**, nd
2	Allyle *syn*-**75**	DIAD	5 min	*syn*-**91**, nd
3	Vinyle *anti*-**76**	DIAD	5 min	*anti*-**92**, nd
4	Benzyle *anti*-**80**	DMEAD	15 min	*anti*-**93**, 78%
5	Benzyle *syn*-**81**	DMEAD	15 min	*syn*-**94**, 81%
6	2-Bromobenzyle *anti*-**82**	DMEAD	1h	*anti*-**95**, 60%
7	2-Bromobenzyle *syn*-**83**	DMEAD	1h	*syn*-**96**, 69%
8	Propargyle *syn*-**79**	DMEAD	10min	*syn*-**97**, 72%

Tableau 25 : époxydation dans les conditions de Mitsunobu au micro-onde

Ces époxydes sont de réelles plateformes modulables sur lesquelles il est possible d'additionner divers nucléophiles. Nous allons ainsi étudier l'addition de nucléophiles de type vinylique, acétylénique, ainsi que l'ouverture de l'époxyde par des azotures et thiols.

5) Synthèse de cycloheptanes et cyclohexanes trisusbtitués

Les composés (2*S*,3*S*)-**120** et (2*S*,3*R*)-**121** sont synthétisés afin d'évaluer l'effet de l'absence du cycle benzénique (par rapport au composé **1**) sur l'inhibition de *Pf*A-M17 et *AP*aero (schéma 51). Nous pouvons également observer l'effet de la configuration relative *anti*/*syn* du carbone portant l'amine puisque les deux diastéréoisomères sont obtenus. L'importance de la cétone peut elle aussi être mise en évidence en testant le composé (1*R*,2*S*,3*S*)-**119**. Enfin, il peut être intéressant de faire varier la taille du cycle en synthétisant le composé (2*S*,3*S*)-**124**. Tous ces composés sont obtenus en quelques étapes décrites ci-dessous à partir des époxydes *anti*-**90**, *syn*-**91** ou *anti*-**92** (schéma 51).

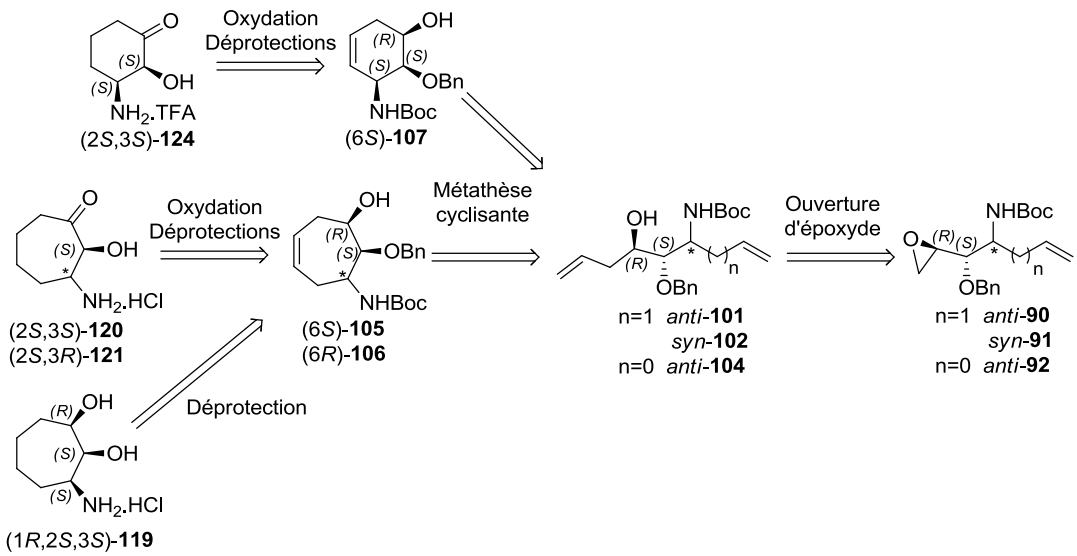
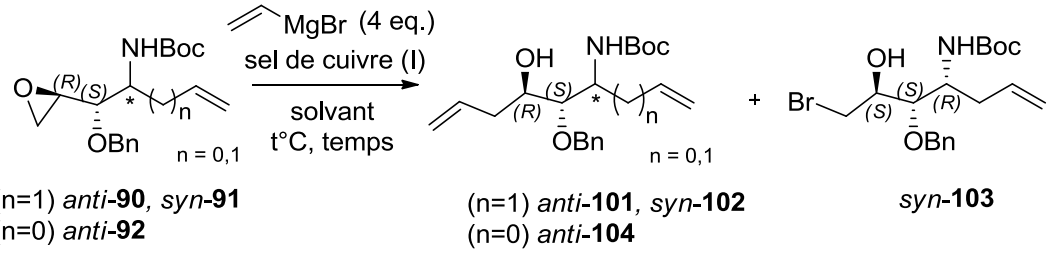


Schéma 51 : rétrosynthèse depuis les époxydes *anti*-90, *syn*-91 et *anti*-92

Ouverture régiosélective de l'époxyde

La première étape consiste en l'ouverture régiosélective des époxydes *anti*-**90**, *syn*-**91** et *anti*-**92** avec un nucléophile vinylique. Les résultats sont reportés dans le tableau 26. Dans leur synthèse de l'(-)-isoprelaurefucine, Lee *et al.* ont décrit l'ouverture d'un époxyde avec le bromure de vinyle magnésium catalysée à l'iodure de cuivre dans le THF à -30 °C. [256] Dans ces conditions, nous obtenons le produit désiré à partir du substrat allyle *anti*-**90** avec un rendement de 44% (entrée 1). Cette réaction catalytique en cuivre (I) passe très certainement par la formation de l'organocuprate $(vinyl)_2CuMgBr$. [257]



Entrée	Substrat	Conditions	Produits	Rendement
1	Allyle *anti*-**90**	CuI (50%), THF, -30 °C, 4 h[a]	*anti*-**101**	44%
2	Allyle *anti*-**90**	CuCN (50%), Et_2O, 0 °C-TA, 1h	*anti*-**101**	59%
3	Allyle *syn*-**91**	CuCN (50%), Et_2O, 0 °C-TA, 3.5 h	*syn*-**102** + *syn*-**103** (20%)[b]	53%
4	Vinyle *anti*-**92**	CuCN (50%), Et_2O, 0 °C-TA, 1.5 h	*anti*-**104**	67%

Tableau 26 : ouverture régiosélective des époxydes *anti*-90, *syn*-91 et *anti*-92 avec un nucléophile vinylique ; (a) vinylMgBr 5 eq. ; (b) *syn*-102 et *syn*-103 sont inséparables par chromatographie

[256] H. Lee *et al.*, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8723-8729.
[257] Organometallics in Synthesis: A Manual, 2nd Edition, M. Schlosser, *Wiley* **2002**, 1-1243.

Nous avons également testé les conditions décrites par Chida *et al.* avec une catalyse au cyanure de cuivre (entrée 2). [258] L'utilisation de ce catalyseur a permis une amélioration du rendement jusqu'à 59%. La réaction passe ici très certainement par la formation de l'organocuprate vinylCu(CN)MgBr ou $(vinyl)_2Cu(CN)(MgBr)_2$. [257] Ces conditions se sont aussi révélées satisfaisantes pour l'ouverture de l'époxyde du substrat vinyle *anti*-**92** (entrée 4). Par contre, pour l'allyle *syn*-**91**, nous avons observé 20% du sous-produit bromhydrine *syn*-**103** correspondant au produit d'ouverture de l'époxyde par le brome du réactif $MgBr_2$ obtenu par équilibre de Schlenk (à partir du réactif de Grignard ou de ses dérivés) (schéma 52). Allepuz *et al.* ont également observé que l'halogène du réactif de Grignard et celui du sel de cuivre (I) entrent sérieusement en compétition avec le réactif de Grignard pour l'ouverture d'un époxyde. [259] Alexakis *et al.* ont montré que l'ajout de $BF_3 \bullet OEt_2$ peut minimiser la formation d'halohydrine, mais nous n'avons pas essayé avec le substrat *syn*-**91**. [260]

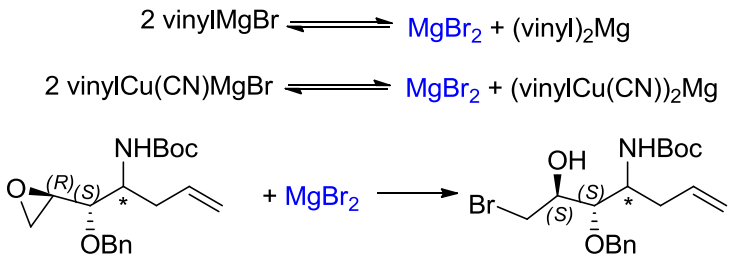
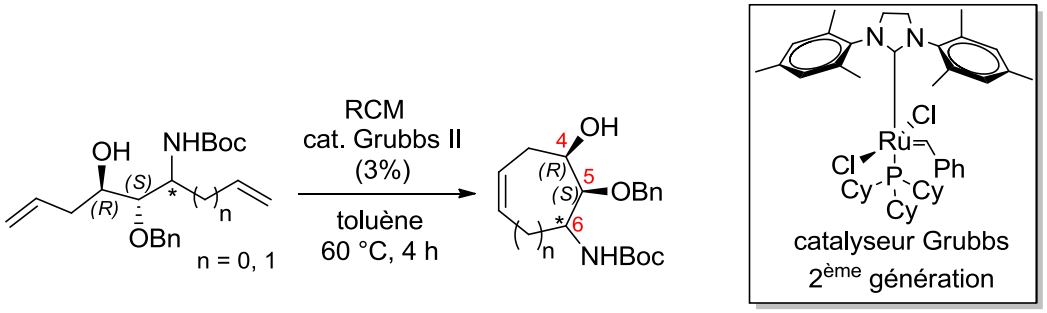


Schéma 52 : équilibre de Schlenk et formation de la bromhydrine

Fermeture du cycle par réaction de métathèse cyclisante

Nous réalisons ensuite la fermeture du cycle à six chaînons pour le substrat *anti*-**104** et sept chaînons pour les substrats *anti*-**101** et *syn*-**102** par une réaction de métathèse cyclisante (schéma 53). [261] Le complexe ruthénium-carbène de Grubbs de deuxième génération a été utilisé dans le toluène à 60 °C et a donné de bons rendements pour les produits (4*R*,5*S*,6*S*)-**105**, (4*R*,5*S*,6*R*)-**106** et (4*R*,5*S*,6*S*)-**107**. Bien que la configuration absolue des carbones n'ait pas été démontrée, nous nommons désormais les composés via les descripteurs *R* et *S* par souci de clarté.



(n=1) *anti*-**101**, *syn*-**102**
(n=0) *anti*-**104**

(n=1) (4*R*,5*S*,6*S*)-**105**, 95%
(n=1) (4*R*,5*S*,6*R*)-**106**, 44% (2 étapes)
(n=0) (4*R*,5*S*,6*S*)-**107**, 83%

Schéma 53 : réaction de métathèse cyclisante

[258] N. Chida *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1998**, *71*, 259-272.
[259] A. C. Allepuz *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 6172-6178.
[260] A. Alexakis *et al.*, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 5607-5619.
[261] P. R. Skaanderup, R. Madsen, *Chem. Comm.* **2001**, 1106-1107.

Le mécanisme de la réaction de métathèse cyclisante proposé par Hérisson et Chauvin est illustré schéma 54.[262] Il y a tout d'abord dissociation du ligand phosphine pour donner l'intermédiaire **A**. L'oléfine se coordine ensuite au ruthénium et une réaction de cycloaddition [2+2] donne le ruthénacyclobutane **B**. L'ouverture de celui-ci conduit à la libération de l'intermédiaire clé **C** qui est engagé dans le cycle catalytique.

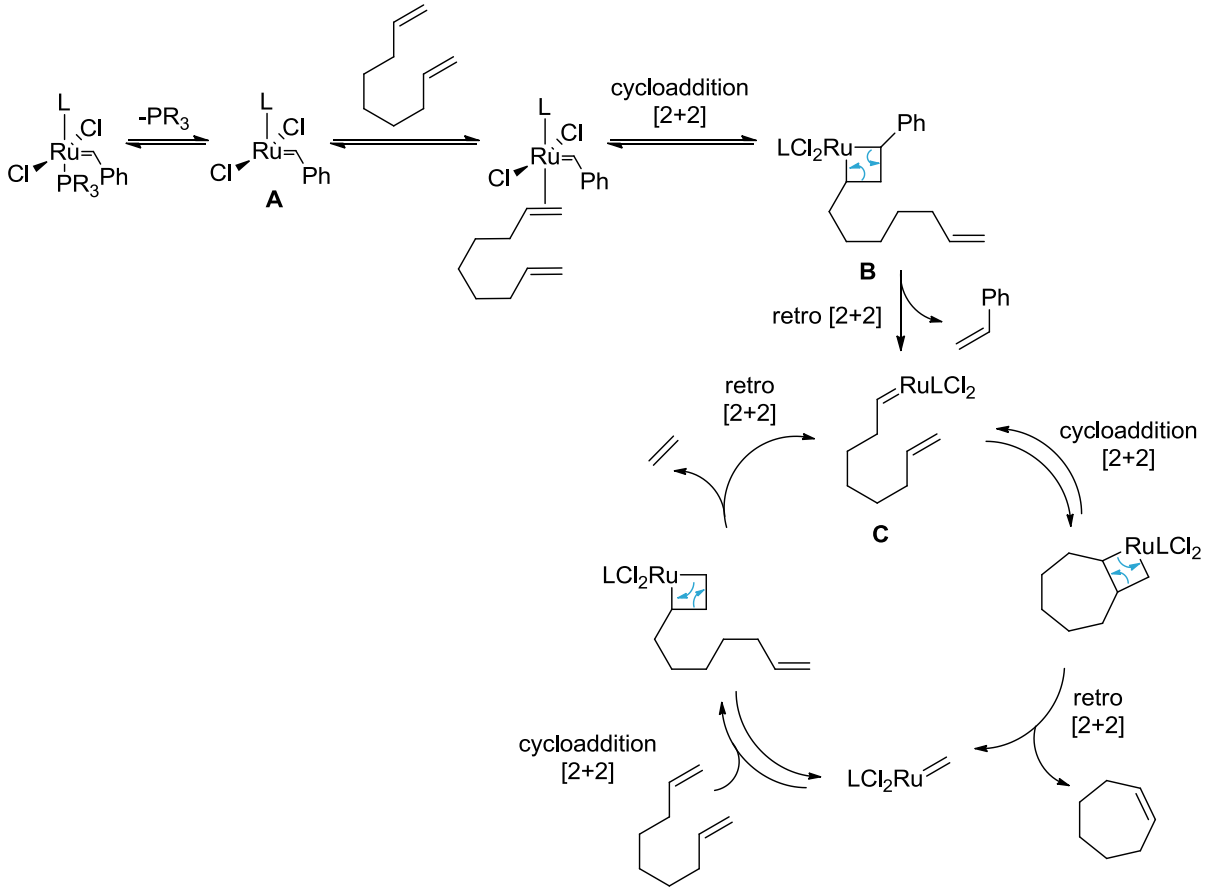


Schéma 54 : mécanisme de la réaction de métathèse cyclisante

Oxydation de l'alcool

L'alcool des composés (4*R*,5*S*,6*S*)-**105** et (4*R*,5*S*,6*R*)-**106** est ensuite oxydé en cétone dans les conditions de Parikh-Doering (schéma 55). Nous obtenons les composés (5*S*,6*S*)-**108** et (5*S*,6*R*)-**109** avec des rendements de 83% et 59% respectivement.

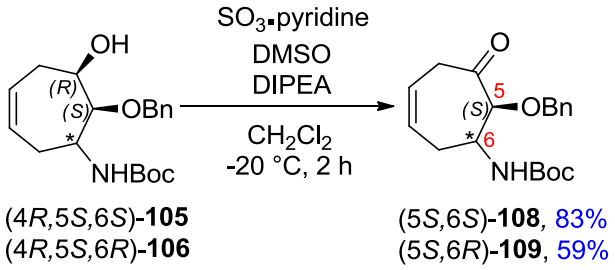


Schéma 55 : oxydation de l'alcool des substrats (4*R*,5*S*,6*S*)-105 et (4*R*,5*S*,6*R*)-106 en cétone

[262] J.-L. Hérisson, Y. Chauvin, *Die Makromolekular Chemie* **1970**, *141*, 161-176.

Pour le composé (4*R*,5*S*,6*S*)-**107**, nous obtenons un mélange inséparables de trois composés (schéma 56) : le produit désiré (5*S*,6*S*)-**110** (75%), le produit (5*S*,6*S*)-**111** d'isomérisation de la double liaison en position α,β de la cétone (19%), ainsi que le produit (5*R*,6*S*)-**112** d'épimérisation au niveau de l'alcool (6%) (ratios déterminés par RMN).

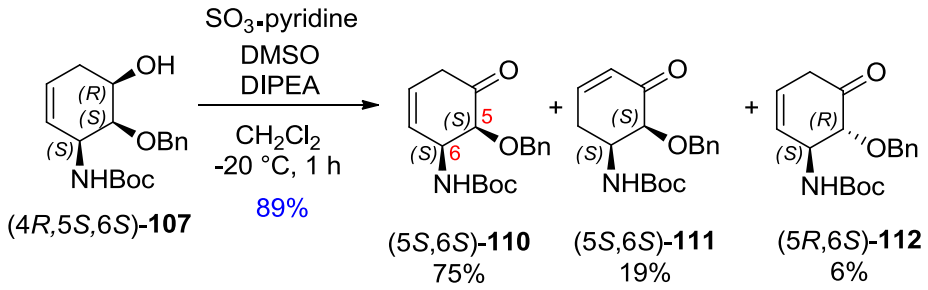


Schéma 56 : oxydation de l'alcool du substrat (4*R*,5*S*,6*S*)-107 en cétone

Déprotections

Le groupement protecteur benzylique peut être retiré de plusieurs manières : par hydrogénolyse, par réduction monoélectronique, par oxydation ou par réaction avec un agent de type acide de Lewis. [207] La méthode la plus utilisée est l'hydrogénolyse pallado-catalysée qui libère l'alcool déprotégé et du toluène selon le mécanisme présenté schéma 57. La première étape consiste en l'addition oxydante du substrat sur le palladium (0), puis il y a coordination du dihydrogène sur le palladium. Le produit déprotégé et le toluène sont ensuite libérés.

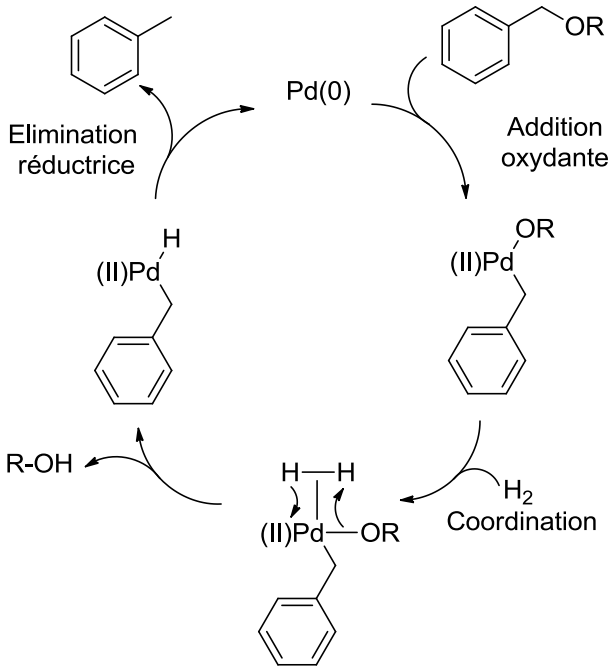


Schéma 57 : mécanisme de déprotection d'un éther benzylique par hydrogénolyse pallado-catalysée

Le groupement benzyle des produits (4*R*,5*S*,6*S*)-**105**, (5*S*,6*S*)-**108** et (5*S*,6*R*)-**109** est retiré par hydrogénolyse catalysée à l'hydroxyde de palladium sur charbon $Pd(OH)_2/C$ (20%) dans le méthanol (schéma 58). Dans ces conditions, l'hydrogénation de la double liaison a également lieu et nous obtenons les composés (1*R*,2*S*,3*S*)-**113**, (2*S*,3*S*)-**114** et (2*S*,3*R*)-**115** avec de bons rendements.

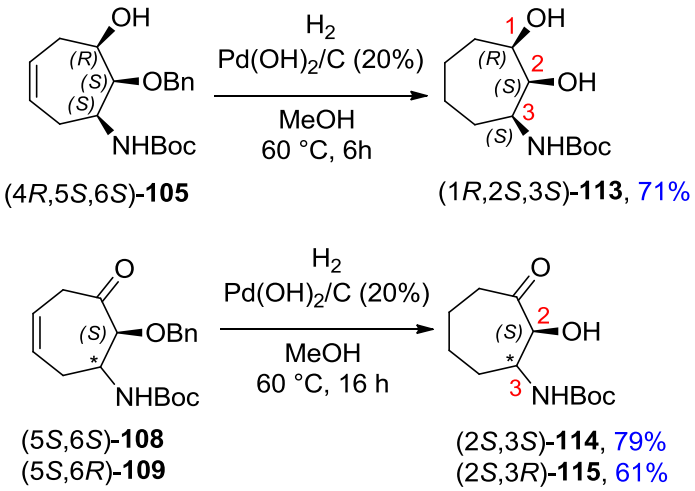


Schéma 58 : déprotection de l'éther benzylique

Le mélange 75:6:19 des composés (5*S*,6*S*)-**110**/(5*S*,6*S*)-**111**/(5*R*,6*S*)-**112** est engagé dans la réaction d'hydrogénolyse du groupement benzyle et d'hydrogénation de la double liaison dans les mêmes conditions (schéma 59). Nous obtenons un mélange de trois composés : le produit désiré (2*S*,3*S*)-**116**, le produit (2*R*,3*S*)-**117** d'épimérisation au niveau de l'alcool et le produit (2*S*,3*S*)-**118** avec l'acétal diméthylique dû à l'utilisation du méthanol comme solvant. L'acétal diméthylique est séparé des deux autres produits par chromatographie sur colonne et est obtenu avec 74% de rendement. Lorsque la réaction est menée dans l'acétate d'éthyle, un mélange 73:27 des produits (2*S*,3*S*)-**116** et (2*R*,3*S*)-**117** est obtenu avec un rendement de 60% (ratio déterminé par RMN) (schéma 59).

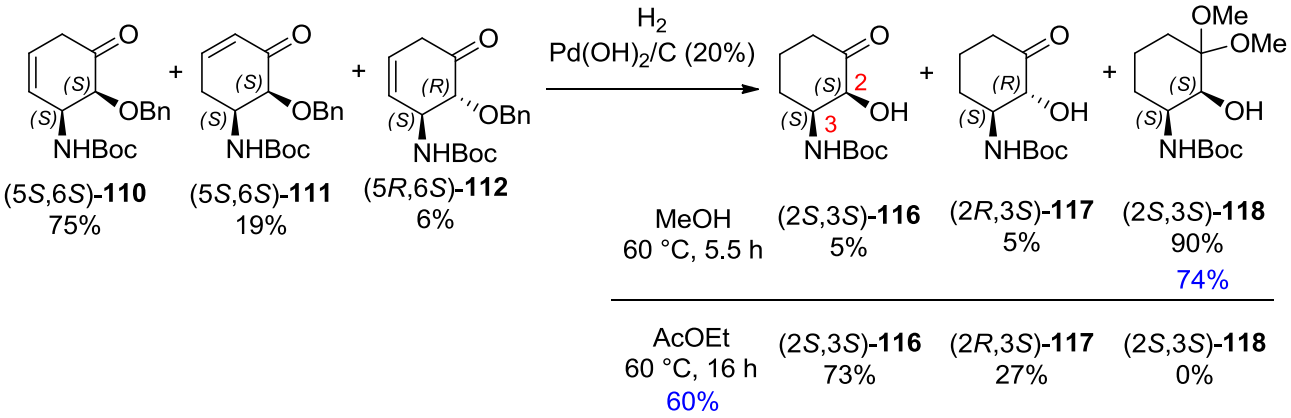


Schéma 59 : déprotection de l'éther benzylique

La déprotection du groupement Boc se fait généralement en milieu acide fort. [207] Pour les composés (1*R*,2*S*,3*S*)-**113** et (2*S*,3*S*)-**114**, nous utilisons HCl dans le diéthyléther et nous obtenons les chlorhydrates désirés (1*R*,2*S*,3*S*)-**119** et (2*S*,3*S*)-**120** en une nuit (schéma 60).

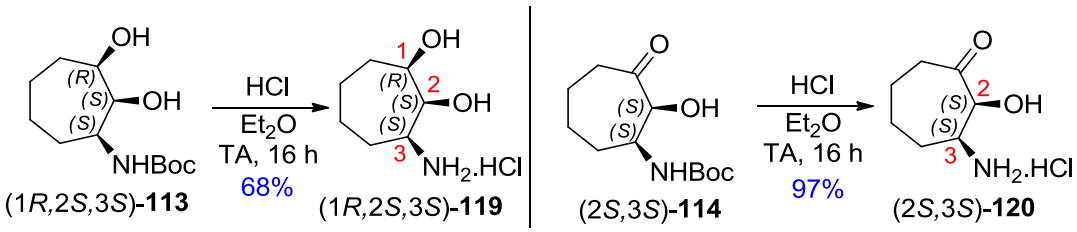


Schéma 60 : déprotection du Boc

Cependant la déprotection au HCl dans Et_2O de l'α-hydroxy β-aminocétone (2*S*,3*R*)-**115** est étrangement lente ; après une nuit, nous observons toujours majoritairement le substrat de départ. La réaction est concentrée à l'évaporateur rotatif et relancée avec HCl dans Et_2O pendant 16 h. La réaction est complète mais donne un mélange d'au moins trois produits : le produit désiré (2*S*,3*R*)-**121** (majoritaire), le produit (2*R*,3*R*)-**122** avec épimérisation au niveau de l'alcool et un produit non-identifié (schéma 61). Le temps de réaction est peut-être trop important et des réactions de dégradation ont pu avoir lieu. Nous passons alors par une autre méthode de déprotection : acide trifluoroacétique, à froid et sur des temps courts. Nous obtenons uniquement le produit désiré (2*S*,3*R*)-**121** avec un rendement de 56% (schéma 61).

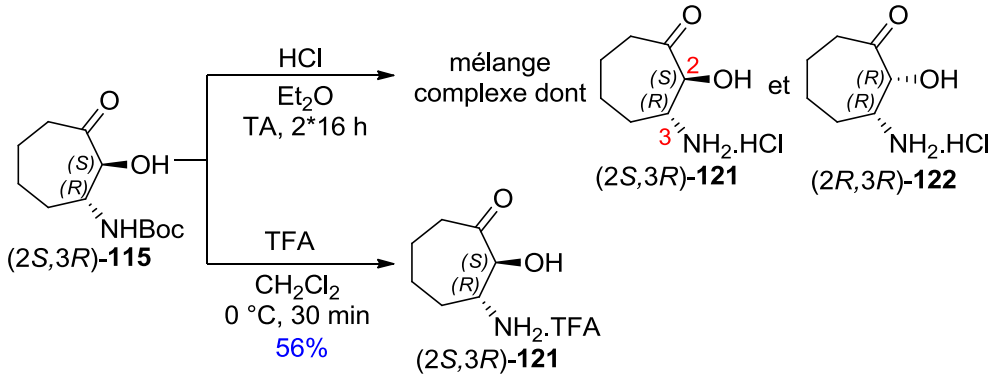


Schéma 61 : déprotection du Boc

Le composé (2S,3S)-**118** est engagé dans la réaction de déprotection avec HCl dans le diéthyl éther (schéma 62). Seuls des produits de dégradation non-identifiés sont obtenus. Nous utilisons donc le TFA à 0 °C pendant 30 min pour déprotéger le mélange 73:27 des α-hydroxy β-aminocétones (2*S*,3*S*)-**116** et (2*R*,3*S*)-**117**. Un mélange de quatre produits est obtenu : les deux épimères (2*S*,3*S*)-**124** (8%) et (2*R*,3*S*)-**125** (30%) et leurs hydrates respectifs (2*S*,3*S*)-**126** (40%) et (2*R*,3*S*)-**127** (22%) (schéma 62).

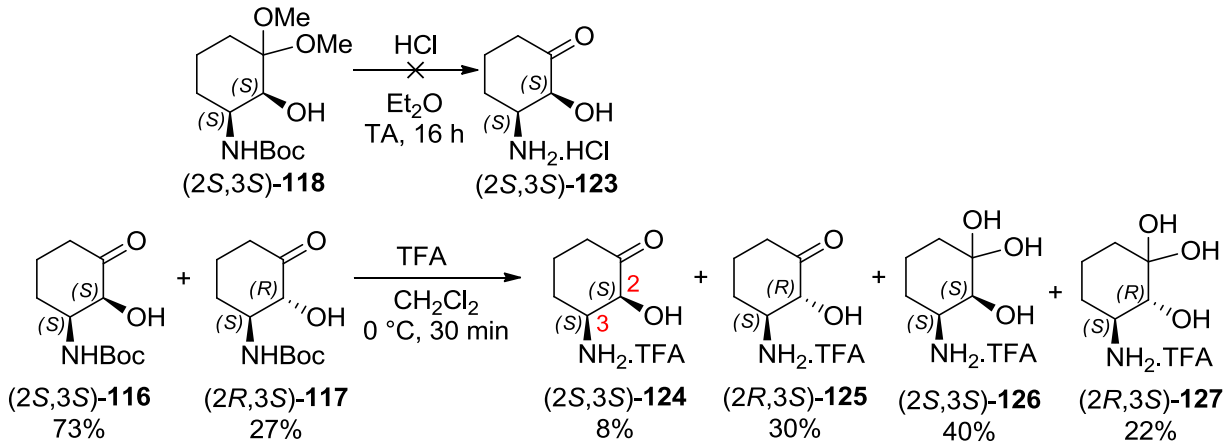


Schéma 62 : déprotection du Boc

L'épimérisation en α de la cétone rend plus difficile l'analyse des produits finaux, mais du point de vue des essais biologiques, elle n'est pas nécessairement problématique. Il est possible que l'enzyme ait une préférence pour un des deux épimères, mais nous ne savons pas lequel et le ratio entre les deux épimères évoluera très certainement en solution dans le tampon.

6) Synthèse de benzocycloheptanes trisubstitués

a) Voie C1

D'après la rétrosynthèse générale présentée schéma 24 et rappelée brièvement schéma 63, les analogues benzocycloheptanes trisubstitués **A** pourraient être obtenus en quelques étapes à partir des époxydes *anti*-**90** et *syn*-**91**. L'époxyde serait cette fois ouvert par un nucléophile éthynyle pour donner l'intermédiaire ène-yne **C**.

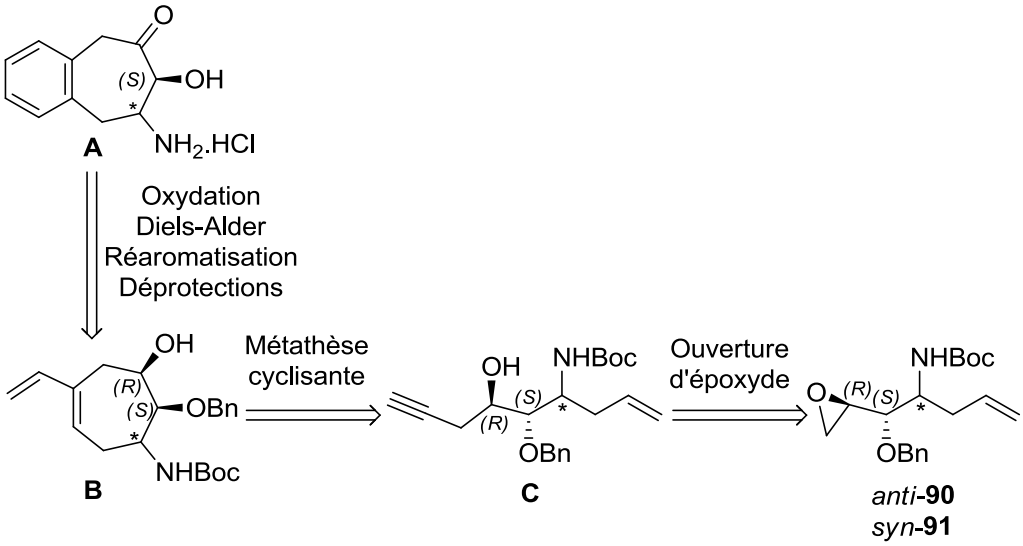


Schéma 63 : rétrosynthèse depuis les époxydes *anti*-90 et *syn*-91

Ouverture régiosélective de l'époxyde

Yamaguchi *et al.* ont décrit en 1983 l'ouverture d'époxyde par des **boranes alcynyles** obtenus par réaction entre un alcyne, le *n*-buthyllithium et BF_3•OEt_2. [263] Le groupe alcynyle est introduit régiosélectivement sur le carbone le moins encombré dans le cas d'époxydes mono-substitués par une chaîne alkyle. Nous avons utilisé ces conditions pour l'ouverture de l'époxyde *anti*-**90** avec le triméthylsilyle acétylure de lithium (schéma 64). Le groupement triméthysilyle pourrait ensuite être facilement retiré en conditions basiques ou avec une source d'ions fluorures pour donner l'intermédiaire ène-yne *anti*-**129**. [207]

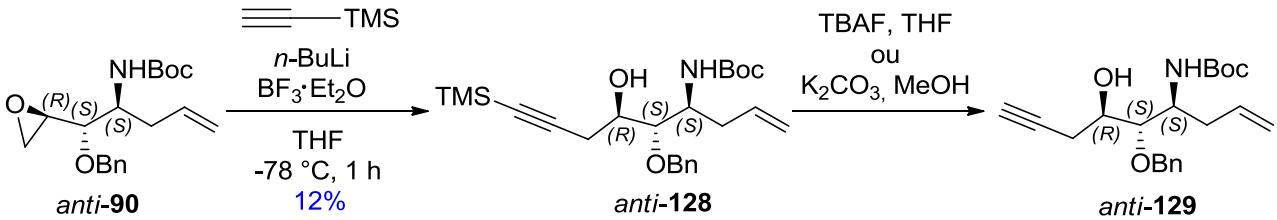
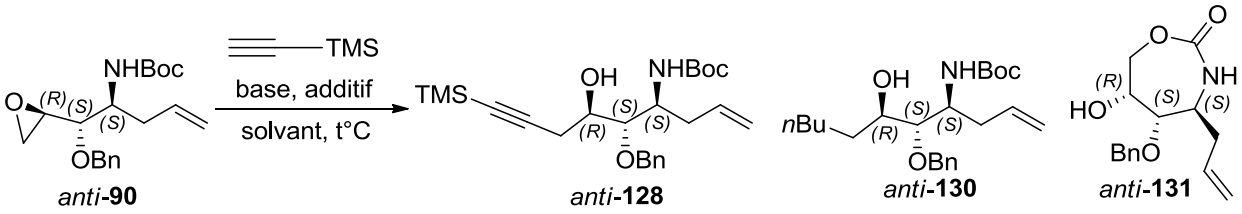


Schéma 64 : ouverture de l'époxyde dans les conditions de Yamaguchi

Malheureusement, le rendement obtenu sur l'étape d'ouverture de l'époxyde *anti*-**90** n'est que de 12%. D'autres conditions opératoires ont alors été testées et sont reportées dans les tableaux 27 et 28.

[263] M. Yamaguchi, I. Hirao, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 391-394.



Entrée	Base	Additif	Solvant	Produit
1	*n*-BuLi (2 eq.)	BF_3•Et_2O (2 eq.)	THF, -78 °C	*anti*-**128** (12%)
2	*n*-BuLi (2 eq.)	-	THF, -78 °C	*anti*-**90**
3	*n*-BuLi (2 eq.)	BF_3•Et_2O (2 eq.)	THF/HMPA, -78 °C	*anti*-**131**
4	*n*-BuLi (2 eq.)	$AlMe_3$ (2 eq.)	Toluène, 0 °C -> 50°C	Dégradation
5	*n*-BuLi (3 eq.)	Me_2AlCl (3 eq.)	Toluène, -78 °C -> TA	*anti*-**90**
6	*n*-BuLi (3 eq.)	Me_2AlCl (3 eq.)	Toluène, -78 °C -> 80 °C	Dégradation
7	*n*-BuLi (3 eq.)	Li_2CuCl_4 (15 mol%)	THF, -78 °C	mlge dont *anti*-**130**
8	*n*-BuLi (3 eq.)	CuCN (50 mol%)	THF, -78 °C	*anti*-**90**
9	KHMDS (2 eq.)	BF_3•Et_2O (2 eq.)	THF, -78 °C	mlge dont *anti*-**131**
10	KHMDS (2 eq.)	Li_2CuCl_4 (15 mol%)	THF, -78 °C	*anti*-**90**
11[a]	*n*-BuLi (2 eq.)	BF_3•Et_2O (2 eq.)	THF, -25 °C -> 0 °C	mlge ; perte Boc

Tableau 27 : ouverture de l'époxyde *anti*-90 avec l'acétylure de triméthylsilyle ; conditions : introduction de l'acétylure de triméthysilyle et de la base dans le solvant à -78 °C (ou 0 °C), suivie de 2 cycles vide/azote ; agitation à -78 °C (ou 0 °C) pendant 30 min à 1 h ; ajout de l'époxyde *anti*-90 en solution dans le solvant et agitation ; (a) pas de cycle vide/azote ; mlge = mélange

Sans BF_3•OEt_2, il n'y a pas de conversion (entrée 2). L'utilisation du solvant dissociant hexaméthylphosphoramide (HMPA) en tant que co-solvant conduit à la formation du sous-produit de cyclisation *anti*-**131** (entrée 3), dérivé du sous-produit *anti*-**99** déjà observé lors de l'étape d'époxydation (schéma 65). [264]

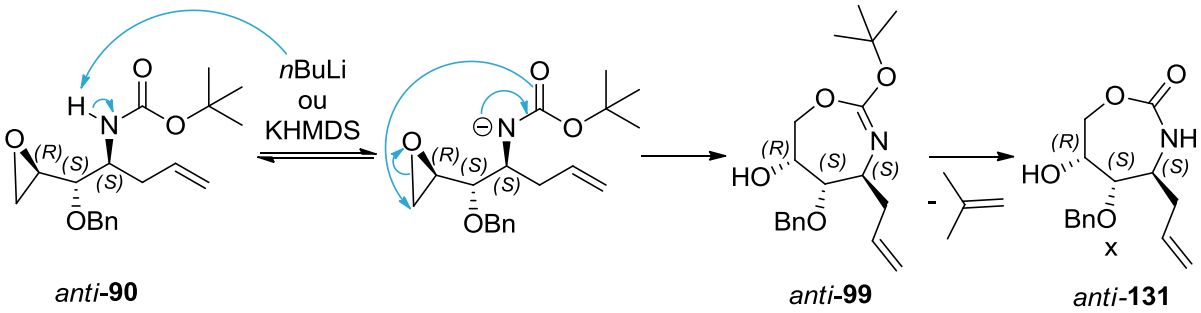


Schéma 65 : formation du sous-produit de cyclisation *anti*-131

[264] F. Le Strat *et al.*, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 489-498.

Afin d'empêcher cette cyclisation, nous avons envisagé la double protection de l'amine. Nous avons voulu introduire un deuxième groupement protecteur Boc sur l'amine du composé *anti*-**74** pour obtenir le composé *anti*-**132** (schéma 66). Cependant, seul le produit *anti*-**133** a été formé.

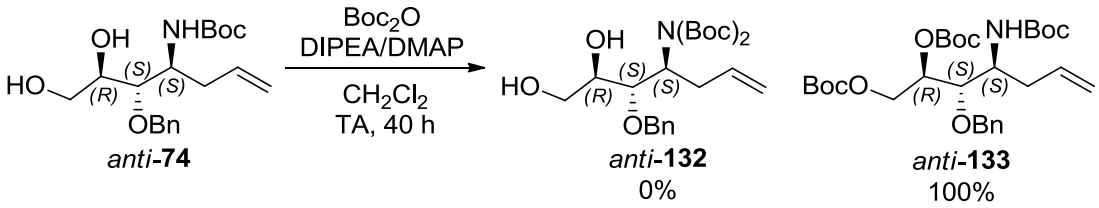


Schéma 66 : double protection de l'amine par le groupement Boc

L'ouverture régiosélective d'époxydes a également été décrite avec des **alanes alcynyles**.[265, 266, 267, 268] Ces réactifs sont générés *in situ* à froid par réaction entre le triméthylaluminium ou un chlorodialkylaluminium avec l'alcyne et le *n*-BuLi. L'époxyde est ensuite ajouté et la réaction est menée à température ambiante ou est chauffée. Avec l'époxyde *anti*-**90**, nous avons observé soit aucune réaction (tabl. 27, entrée 5), soit de la dégradation (entrée 4 et 6).

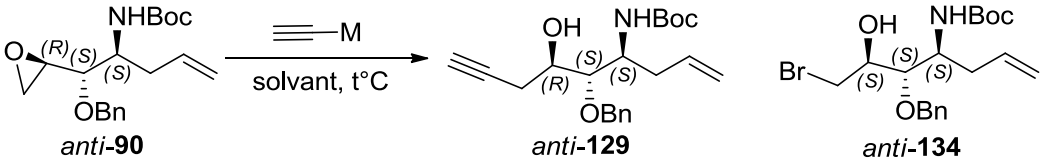
Nous avons également essayé l'ouverture de l'époxyde *anti*-**90** par des **cuprates alcynyles** avec l'addition d'une quantité catalytique de CuCN ou de cuivre tétrachlorodilithium (entrée 7 et 8). Avec CuCN, il n'y aucune conversion et avec Li_2CuCl_4, nous obtenons un mélange dont le produit majoritaire est le produit d'ouverture de l'époxyde par *n*-BuLi. L'emploi d'une base moins nucléophile, comme le KHMDS, permet de contourner ce problème. Cependant, nous n'observons toujours pas de produit désiré (entrée 9 et 10).

L'acétylure de triméthysilyle est un composé volatil qu'il faut manipuler à basse température (-78 °C – 0 °C). Pour chaque réaction du tableau 27, deux cycles vide/azote ont été réalisés dans le ballon à -78 °C après introduction du solvant, de l'acétylure de triméthysilyle, de la base et de l'additif. N'observant que très peu de conversion dans certains cas, nous avons finalement émis l'hypothèse qu'une partie de l'acétylure de triméthysilyle est retirée du milieu réactionnel lorsque nous faisons le vide. Nous avons testé la réaction sans faire le vide avec BF_3•OEt_2 et *n*-BuLi (entrée 11) : nous observons certes une conversion complète du substrat de départ mais le produit désiré n'est pas formé. De plus, le signal RMN correspondant au groupement *tert*-butyle de la protection Boc n'est plus visible.

Le complexe acétylure de lithium/éthylènediamine, non volatil, est un bon substitut de l'acétylure de triméthysilyle. Nous avons testé l'ouverture de l'époxyde *anti*-**90** avec ce complexe dans le DMSO [269] et dans un mélange THF/HMPA [270]. Il y a eu peu ou pas de conversion et le produit désiré n'est pas formé (tabl. 28, entrées 1 et 2).

Enfin, l'ouverture de l'époxyde *anti*-**90** par le bromure d'éthynyle magnésium avec ou sans catalyse au CuCN a conduit au produit d'ouverture par le brome *anti*-**134** (tabl. 28, entrée 3 et 4).

[265] T. Inghardt, T. Frejd, *Synthesis* **1990**, 285-291.
[266] G. Zweifel, J. A. Miller, *Org. Reactions* **1984**, *32*, 375-517.
[267] J. Fried *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 1379-1381.
[268] J. Fried *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4343-4345.
[269] S. P. Chavan, C. Praveen, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1939-1941.
[270] H.Yun, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4519-4522.



Entrée	Condition	Produit
1	Complexe acétylure de lithium/éthylènediamine (3 eq.) DMSO, 0 °C -> TA	mlge dont *anti*-**90**
2	Complexe acétylure de lithium/éthylènediamine (3 eq.) THF/HMPA, 0 °C -> TA	*anti*-**90**
3	EthynylMgBr (4 eq.), Et_2O, -20 °C	mlge dont *anti*-**134**
4	EthynylMgBr (4 eq.), CuCN (50mol%), Et_2O, -20 °C	mlge dont *anti*-**134**

Tableau 28 : ouverture de l'époxyde anti-90 avec un autre nucléophile acétylénique

L'ouverture de l'époxyde par un nucléophile de type éthynyle est peut-être sensible à la présence du sous-produit hydrazine du DIAD **100** en mélange avec le substrat *anti*-**90**. L'hydrazine du DIAD perturberait la formation des espèces boranes/alanes/cuprates alcynyles en formant des complexes avec le bore et les métaux.

Face aux difficultés rencontrées pour l'obtention de l'intermédiaire ène-yne *anti*-**129** à partir de l'époxyde *anti*-**90**, nous nous sommes tournés vers une autre voie de synthèse.

b) Voie C2

Dans la voie de synthèse C2, le benzocycloheptane serait construit par une étape clé de substitution électrophile aromatique intramoléculaire des sulfoxydes *anti*-**141** et *syn*-**142** dans les conditions de Pummerer (schéma 67). Les intermédiaires sulfoxydes *anti*-**141** et *syn*-**142** sont obtenus par oxydation de l'alcool et du soufre des composés *anti*-**135** et *syn*-**136**. Ces derniers sont formés par ouverture régiosélective des époxydes *anti*-**93** et *syn*-**94** par le thiophénol.

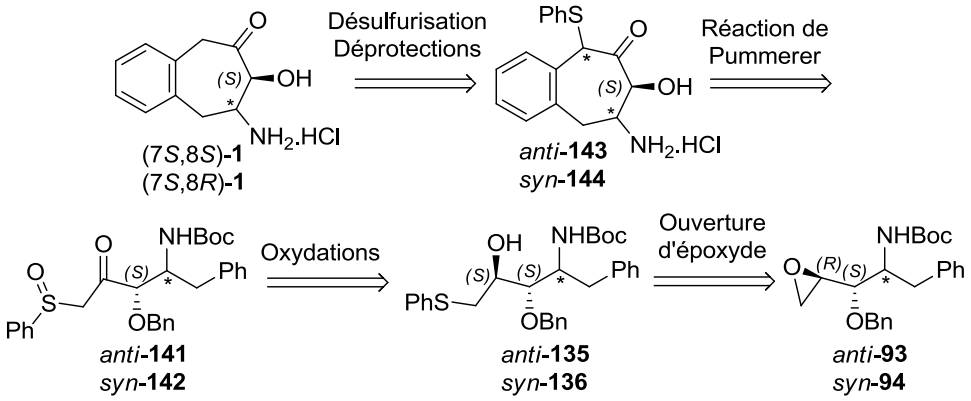


Schéma 67 : rétrosynthèse voie C2

Ouverture des époxydes anti-93/syn-94 et oxydation du thioéther

L'ouverture régiosélective des époxydes *anti*-**93** et *syn*-**94** avec le thiophénol est réalisée en condition basique au reflux du méthanol et donne les composés *anti*-**135** et *syn*-**136** avec de bons rendements (schéma 68). [271]

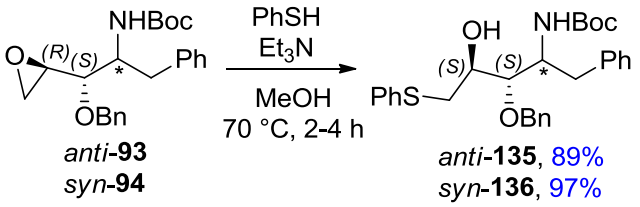


Schéma 68 : ouverture des époxydes *anti*-93 et *syn*-94 par le thiophénol

Il est préférable d'oxyder le thioéther, puis l'alcool et non l'inverse, afin d'éviter le réarrangement de Baeyer-Villiger. Le thioéther est donc oxydé en sulfoxyde pour donner les composés *anti*-**137** et *syn*-**138**. Les conditions d'oxydation doivent être maîtrisées pour éviter la sur-oxydation en sulfone. Il existe plusieurs méthodes d'oxydation sélective des thioéthers en sulfoxydes : (i) la réaction avec un dérivé halogéné permettant la formation d'un sel halosulfonium, ensuite hydrolysé en sulfoxyde [272], (ii) l'oxydation avec le peroxyde d'hydrogène catalysée par un métal de transition tel que le molybdène, le vanadium, le rhénium. [273] Adam *et al.* ont étudié le catalyseur méthyltrioxorhénium (MTO) qui forme avec H_2O_2 les complexes mono- **A** et diperoxo **B**. [272] **B** est considéré comme l'espèce donnant l'oxygène dans la réaction d'époxydation des alcènes ou d'oxydation des soufres (schéma 69).

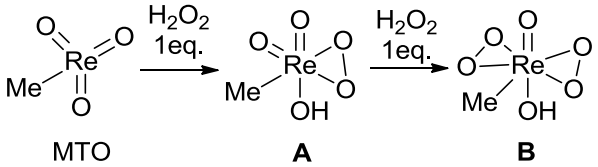
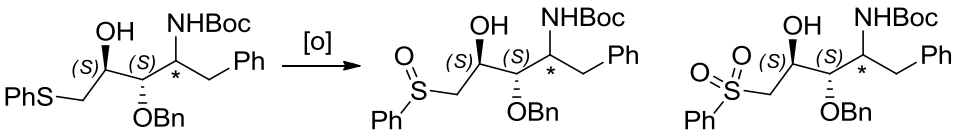


Schéma 69 : complexes formés par réaction entre le MTO et H_2O_2

L'oxydation au H_2O_2 catalysée au MTO a donné uniquement la sulfone *anti*-**139** à partir du sulfure *anti*-**135** (tabl. 29, entrée 1). Ce résultat peut certainement s'expliquer par le fait que la bouteille d'H_2O_2 utilisée était ouverte depuis quelques années et que la quantité d'eau y est plus importante qu'indiquée. En effet, Adam *et al.* ont montré que la sur-oxydation augmente avec la quantité d'eau présente dans le milieu réactionnel. [274]

[271] A. Picó *et al.*, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5075-5083.
[272] P. Kowalski *et al.*, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1933-1953.
[273] K. Kaczorowska *et al.*, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8315-8327.
[274] W. Adam *et al.*, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 13121-13124.



anti-**135**
syn-**136**

anti-**137**
syn-**138**

anti-**139**
syn-**140**

Entrée	Thioéther	Conditions	Sulfoxyde:Sulfone
1	*anti*-**135**	H_2O_2 (1 eq.), ReO_3Me (1 mol%), CH_2Cl_2, TA, 16 h	0:100
2	*anti*-**135**	*m*CPBA 70% (1 eq.), CH_2Cl_2, 0 °C, 1 h	88:12
3	*anti*-**135**	*m*CPBA 75% (1 eq.), CH_2Cl_2, 0 °C, 1 h	100:0 (89%)
4	*syn*-**136**	*m*CPBA 75% (1 eq.), CH_2Cl_2, 0 °C, 1 h	100:0 (95%)

Tableau 29 : oxydation des thioéthers en sulfoxydes

Nous avons, dans un deuxième temps, réalisé l'oxydation du thioéther avec l'acide *meta*-chloroperbenzoïque, avec lequel il est plus difficile d'éviter la formation de sulfone étant donnée l'incertitude de sa pureté. Avec un équivalent de *m*CPBA considéré pur à 70%, la réaction menée à 0 °C avec le sulfure *anti*-**135** conduit à un mélange 88:12 sulfoxyde *anti*-**137**:sulfone *anti*-**139** (entrée 2), tandis qu'en le considérant à 75%, nous obtenons uniquement le sulfoxyde *anti*-**137** (entrée 3). Les sulfoxydes *anti*-**137** et *syn*-**138** sont obtenus dans ces conditions avec un rendement de 89% et 95%, respectivement. Il est à noter que chaque réaction a conduit à un mélange de deux isomères dû à la création d'un centre stéréogène au niveau de l'atome de soufre.

Oxydation de l'alcool

La fonction alcool des sulfoxydes *anti*-**137** et *syn*-**138** est oxydée en cétone. A partir de l'un ou l'autre des deux diastéréoisomères, nous n'observons qu'une faible conversion dans les conditions d'oxydation de Parikh-Doering (schéma 70). Le motif sulfoxyde des substrats de départ perturbe certainement la réaction qui passe par l'addition du trioxyde de soufre sur le sulfoxyde du DMSO (cf schéma 33, mécanisme de la réaction de Parikh-Doering).

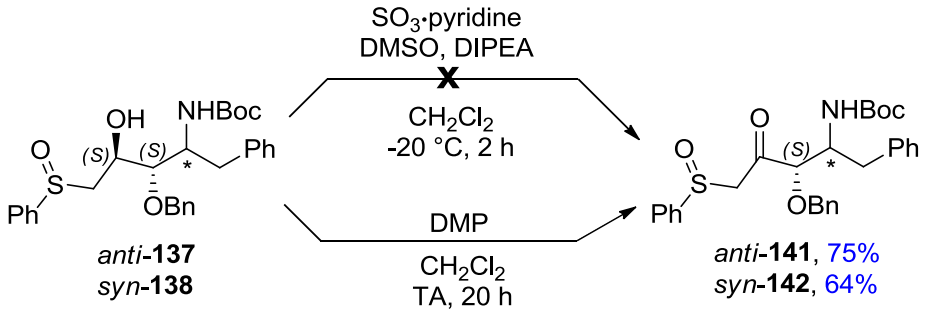


Schéma 70 : oxydation de l'alcool en cétone

Avec le periodinane de Dess-Martin, nous obtenons les cétones désirées *anti*-**141** et *syn*-**142** avec des rendements de 75% et 64%, respectivement (schéma 70).

Réaction de Pummerer

Les sulfoxydes *anti*-**141** et *syn*-**142** sont engagés dans l'étape clé de SEAr intramoléculaire dans les conditions de Pummerer afin d'obtenir le cycle benzénique accolé au cycle à sept chaînons. La réaction de Pummerer correspond à la formation d'un sulfure α-fonctionnalisé à partir d'un sulfoxyde comportant en α au moins un atome d'hydrogène (schéma 71). [275,276]

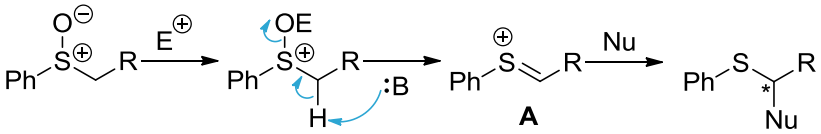


Schéma 71 : réaction générale de Pummerer

Le sulfoxyde est activé par un électrophile et subit une élimination en ion thionium **A**, qui est attaqué par un nucléophile pour donner le sulfure α-fonctionnalisé. En général, le sulfoxyde est activé par l'anhydride acétique (Ac_2O), l'anhydride trifluoroacétique (TFAA), l'anhydride trifluorométhanesulfonique (Tf_2O) ou un réactif silylé. Les nucléophiles utilisés sont souvent de l'acétate, des arènes, des alcènes, des amides.

Nous envisageons la formation des produits désirés *anti*-**143** et *syn*-**144** à partir des sulfoxydes *anti*-**141** et *syn*-**142** selon le mécanisme présenté schéma 72. Il s'agit dans un premier temps de former l'ion thionium **A**. La présence du carbonyle en β du sulfoxyde est un avantage dans ce type de réaction puisqu'il acidifie les protons en α. Des études ont montré que certains substrats pour lesquels il manque le carbonyle en β ne donnent pas le produit de cyclisation désiré. [275] L'ion thionium est en équilibre avec le produit d'addition du contre-ion X^- sur le carbone α. Puis une SEAr intramoléculaire, faisant intervenir l'ion thionium et le cycle benzénique, donnerait le produit désiré.

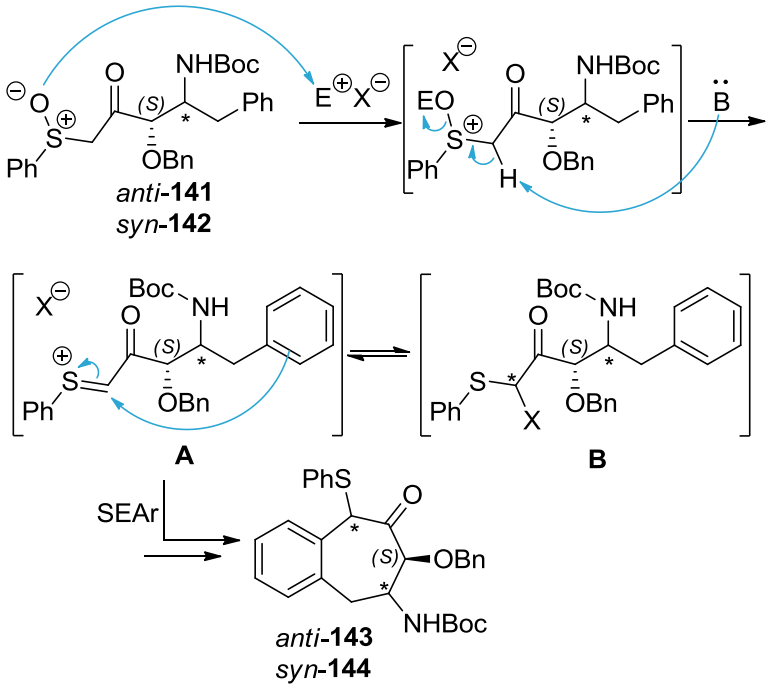
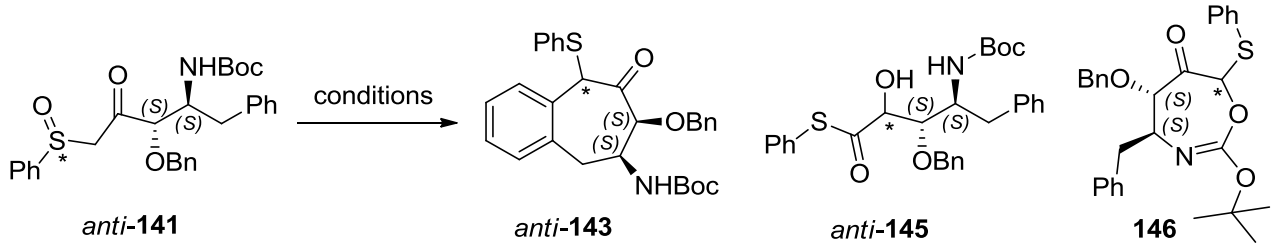


Schéma 72 : mécanisme de la réaction de Pummerer

[275] K. S. Feldman, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5003-5034.
[276] S. Akai, Y. Kita, *Topics Curr. Chem.* **2007**, *274*, 35-76.

Les conditions testées pour la réaction de Pummerer sur le sulfoxyde *anti*-**141** sont rassemblées dans le tableau 30. Des produits de dégradation sont obtenus lorsque le substrat est mis à réagir avec 5 équivalents de triméthylsilyl trifluorométhanesulfonate et de DIPEA (entrée 1). [277,278] Lorsque le nombre d'équivalents est abaissé à 2.2, nous observons majoritairement le substrat de départ déprotégé au niveau de l'amine (entrée 2). [279]



Entrée	Conditions	Produit
1	TMSOTf (5 eq.), DIPEA (5 eq.), CH_2Cl_2, 0 °C -> TA	dégradation
2	TMSOTf (2.2 eq.), DIPEA (2.2 eq.), CH_2Cl_2, 0 °C -> TA	*anti*-**141** déprotégé
3	TFAA (5 eq), NEt_3 (5 eq.), CH_2Cl_2, TA	*anti*-**145** + **146** (90:10)
4	TFAA (5 eq), NEt_3 (5 eq.), $CH_3CH_2Cl_2$, 60 °C	*anti*-**145**
5	APTS (5 eq.), toluène, 110 °C	dégradation

Tableau 30 : réaction de Pummerer sur le sulfoxyde *anti*-141

Dans les conditions TFAA/NEt_3, nous obtenons deux sous-produits *anti*-**145** (90%) et **146** (10%) (entrée 3). Leur formation peut s'expliquer par les mécanismes présentés schéma 73. Dans les deux cas, nous parvenons à la conclusion qu'il y a bien formation de l'ion thionium **A**. Nous observons encore une fois l'intervention du carbamate de la protection Boc dans la formation d'un produit cyclisé **146** par addition sur l'ion thionium. Pour expliquer la formation du produit majoritaire *anti*-**145**, nous avons suivi la réaction par CCM. Au bout de 45 min, il n'y a plus de substrat de départ et nous observons deux tâches : un produit majoritaire et *anti*-**145** minoritaire. Après traitement aqueux, il n'y a plus qu'une tâche correspondant au produit *anti*-**145**. Ce dernier est donc issu d'une addition nucléophile de H_2O sur l'ion thionium **A** (**A** correspondant à la tâche majoritaire avant traitement). L'α-hydroxycétone **B** se réarrange en *anti*-**145** par équilibre céto-énolique.

[277] J. L. García Ruano *et al.*, *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, *10*, 2935-2944.
[278] J. L. García Ruano, C. García Paredes, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 261-265.
[279] D. Craig, K. Daniels, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 7803-7816.

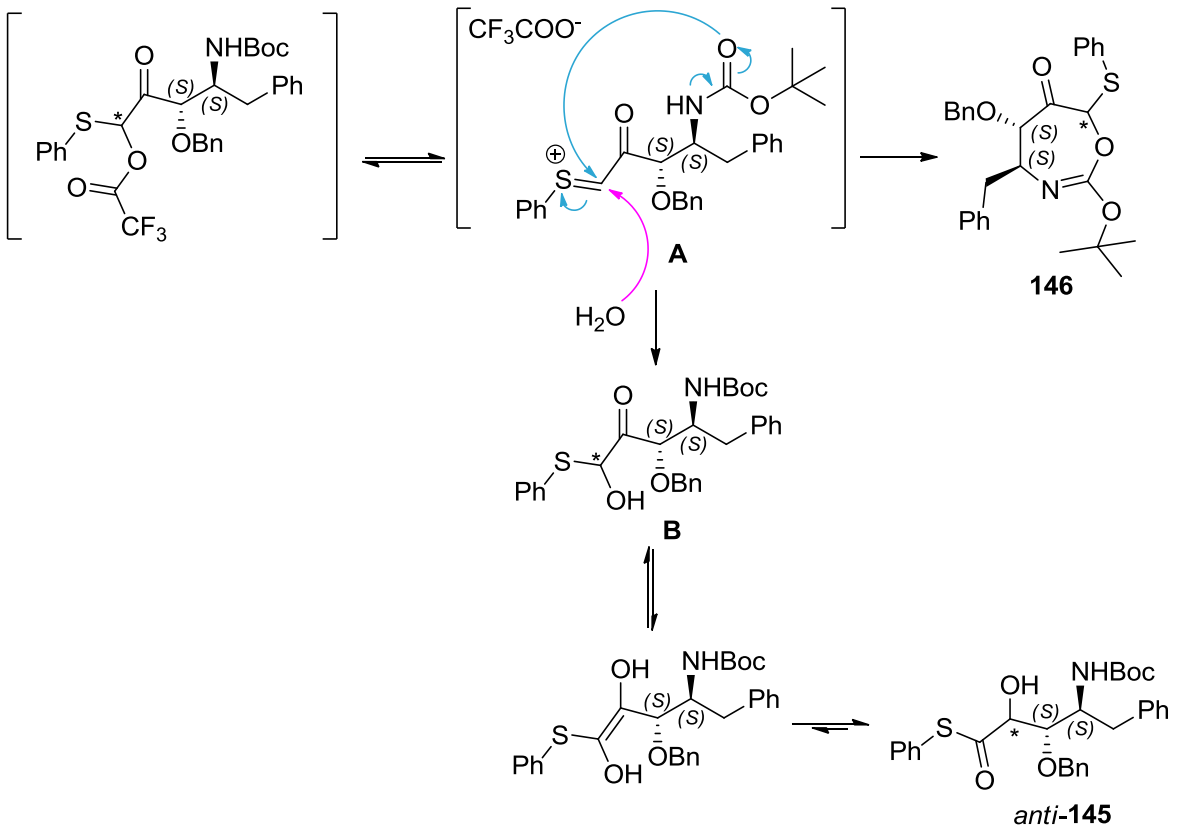


Schéma 73 : mécanisme proposé pour la formation des deux sous-produits

Le cycle benzénique ne semble pas assez riche en électrons pour attaquer l'ion thionium **A**. Nous avons modifié le solvant et chauffé le milieu réactionnel afin de forcer cette attaque, mais nous avons encore obtenu le produit *anti*-**145**.

Des produits de dégradation sont obtenus avec l'acide *para*-toluènesulfonique au reflux du toluène (entrée 5).

Pour des nucléophiles peu réactifs, Sano *et al.* ont montré que l'utilisation d'une combinaison de TFAA avec BF_3•Et_2O ou de l'acide triflique accélère considérablement les réactions. [280] Nous avons testé ces conditions sur *syn*-**142**, mais seuls des produits de dégradation ont été observés.

La solution aurait pu être de partir d'un cycle benzénique enrichi en électron avec un groupement mésomère donneur tel qu'un méthoxy, mais la présence de ce groupement sur le composé final n'est pas souhaitable d'après les études de docking dans le site actif de *Pf*A-M17.

Face à la non-réactivité du cycle benzénique dans la réaction de type Pummerer, nous nous sommes tournés vers une autre voie.

[280] T. Sano, *Trends in Heterocycl. Chem.* **2001**, *7*, 117-142.

c) Voie C3

Cette synthèse a été réalisée en collaboration avec Laura Mourot, étudiante M1, que j'ai encadrée durant son stage.

En développant la voie C2, nous avons constaté que l'ouverture de l'époxyde par le thiophénol se fait plus facilement et avec de meilleurs rendements que par un nucléophile en séries vinylique et acétylénique. Par ailleurs, le thioéther formé peut être oxydé en sulfone, qui grâce à son fort caractère électroattracteur, facilite la déprotonation des protons en α (pKa ~ 11-12). Les carbanions ainsi formés sont stabilisés et peuvent être impliqués dans des réactions d'alkylation et d'arylation. [281,282] L'idée pour la voie C3 est donc de partir du composé **C** comportant un halogène en *ortho* sur l'aromatique pour réaliser une α-arylation intramoléculaire de la sulfone et ainsi obtenir le cycle aromatique accolé au cycle à sept chaînons (schéma 74). Le composé **B** formé subirait ensuite une désulfonylation et des déprotections pour conduire au produit final désiré.

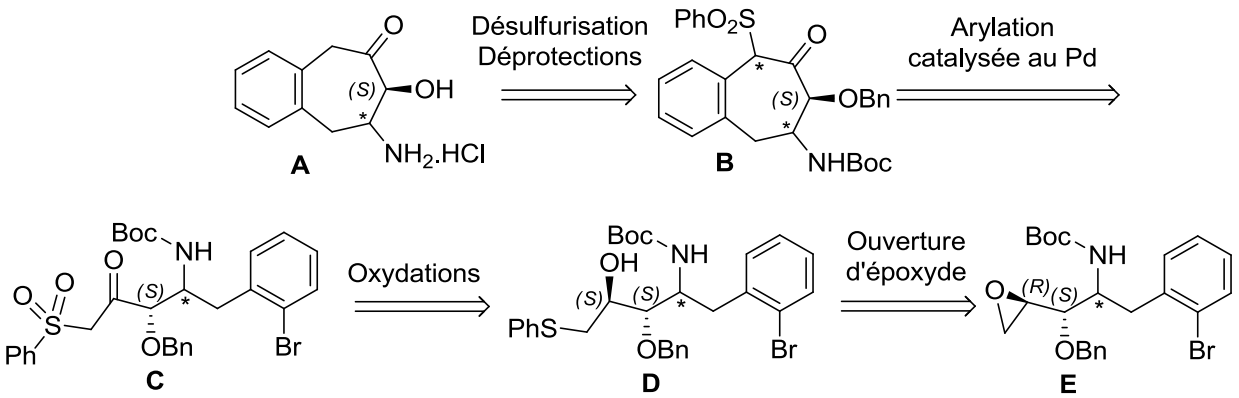


Schéma 74 : rétrosynthèse voie C3

Ouverture des époxydes et oxydations

L'ouverture des époxydes *anti*-**95** et *syn*-**96** par le thiophénol en présence de triéthylamine donne les thioéthers *anti*-**147** et *syn*-**148** avec de bons rendements (schéma 75). Les thioéthers sont ensuite oxydés en sulfones avec deux équivalents de *m*CPBA, conduisant aux composés *anti*-**149** et *syn*-**150**, dont les alcools sont enfin oxydés en cétone avec le périodinane de Dess-Martin. Le composé *syn*-**152** est obtenu avec un rendement satisfaisant tandis qu'une erreur de manipulation explique le faible rendement de 16% pour le composé *anti*-**151**.

[281] A. N. Kashin *et al.*, *Tet. Lett.* **2002**, *43*, 2539-2542.
[282] A. V. Mitin *et al.*, *Russ. J. Org. Chem.* **2004**, *40*, 802-812.

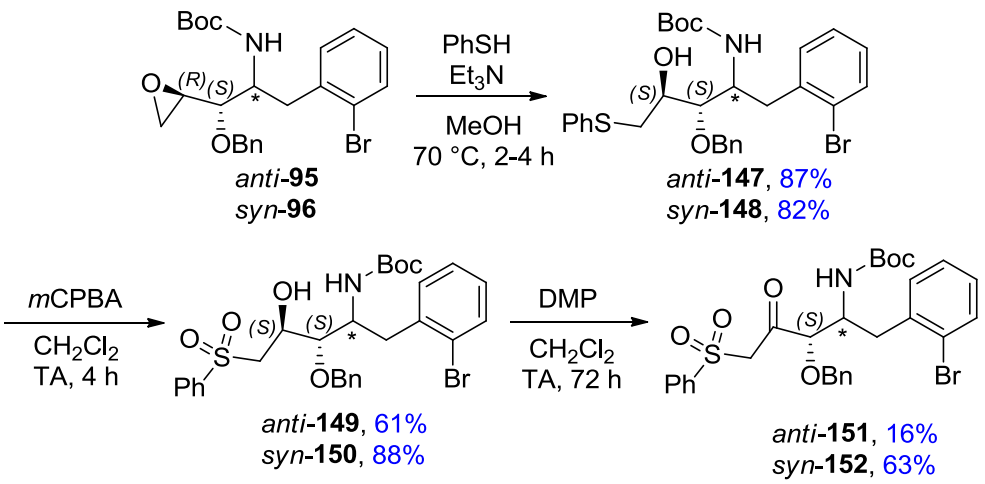


Schéma 75 : séquence ouverture des époxydes *anti*-95 et *syn*-96 par le thiophénol et oxydations

α-arylation pallado-catalysée des sulfones

Beletskaya *et al.* ont développé une procédure pour la mono-arylation de sulfones avec des aryles halogénés en présence de complexe de palladium (schéma 76). [281,282] Ils ont obtenus les meilleurs rendements en présence du catalyseur $Pd_2(dba)_3/3PPh_3$ et de NaH comme base.

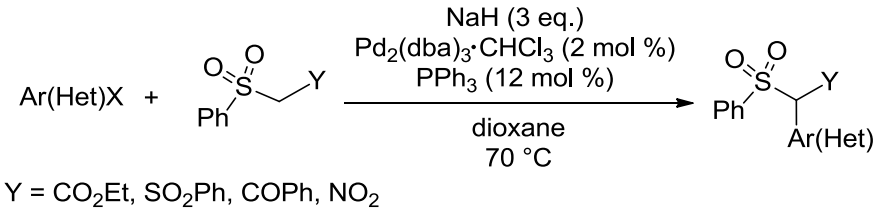


Schéma 76 : arylation pallado-catalysée de sulfone

Le cycle catalytique proposé par Beletskaya *et al.* est présenté schéma 77. [281,282,283] La première étape consisterait en l'addition oxydante de l'aryle halogéné sur le complexe de palladium (0), conduisant à l'intermédiaire $ArPdL_2Br$. L'étape suivante de substitution de l'halogène par le carbanion $[CH(SO_2Ph)Y]^-$ serait réversible. L'étape cinétiquement déterminante est l'élimination réductrice, qui n'a pas lieu à partir du complexe neutre $ArPdL_2CH(SO_2Ph)Y$, mais à partir du complexe anionique de palladium $[ArPdL_2C(SO_2Ph)Y]^-$. La base doit donc être introduite en excès car son rôle consiste en la déprotonation du substrat de départ $CH_2(SO_2Ph)Y$ et en l'activation de l'élimination réductrice par déprotonation de $ArPdL_2CH(SO_2Ph)Y$. [283]

[283] A. V. Mitin *et al.*, *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689*, 1085-1090.

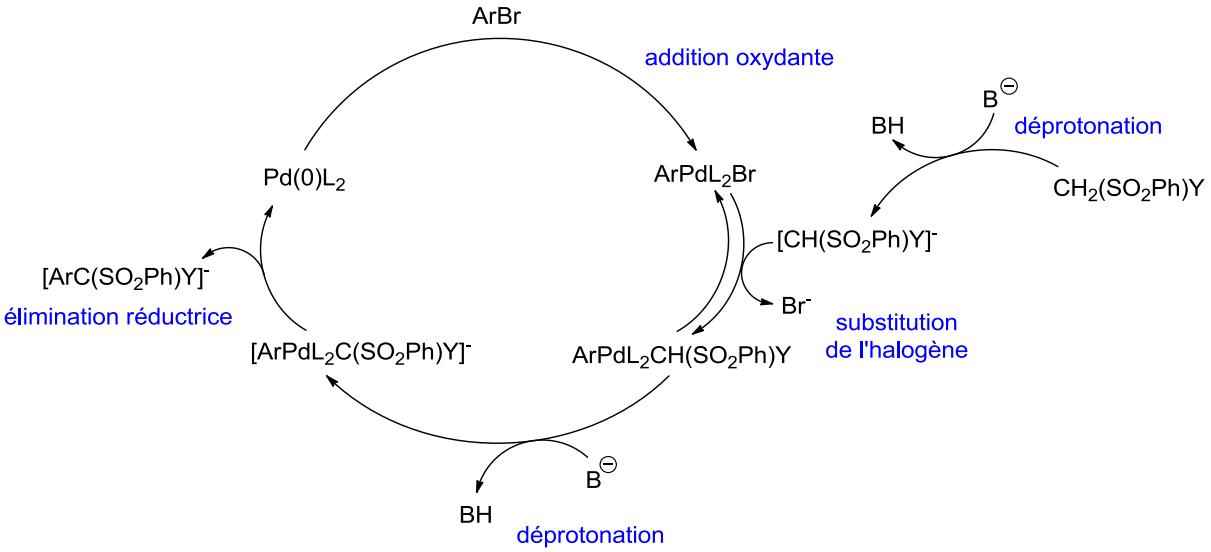
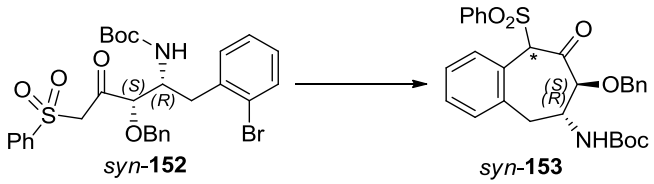


Schéma 77 : mécanisme proposé pour l'arylation pallado-catalysée de sulfones

Les différents essais réalisés pour l'arylation pallado-catalysée de la sulfone *syn*-**152** sont reportés dans le tableau 31. Avec les catalyseurs $Pd_2(dba)_3$ et $Pd(PPh_3)_4$ et les bases NaH ou *t*BuOK, nous n'observons aucune conversion (entrées 1, 2 et 3).



Entrée	Catalyseur		Base	Solvant, T °C	Produit
1	$Pd_2(dba)_3$(10 mol %)	PPh_3 (40 mol %)	NaH	dioxane, 70 °C, 7 h	***syn*-152**
2	$Pd_2(dba)_3$ (10 mol %)	PPh_3 (40 mol %)	*t*BuOK	dioxane, MW, 120 °C, 2 h	***syn*-152**
3	$Pd(PPh_3)_4$ (10 mol %)	-	NaH	dioxane, 110 °C, 7 h	***syn*-152**
4	*t*BuXPhos-Pd-G3 (5 mol %)	-	P_2Et	*tert*-amyl alcool, 120 °C, 16h	***syn*-152**
5	BrettPhos-Pd-G3 (5 mol %)	-	P_2Et	*tert*-amyl alcool, 120 °C, 16h	***syn*-152**
6	BrettPhos-Pd-G3 (5 mol %)	-	P_2Et	DMSO, 180 °C, 7 h	dégradation

Tableau 31 : arylation pallado-catalysée de la sulfone *syn*-152

Nous nous sommes alors tournés vers des conditions décrites récemment par Dreher *et al.*, à savoir l'utilisation d'une superbase organique, le phosphazène P_2Et et d'un catalyseur au palladium de type *t*BuXPhos ou BrettPhos dans le *tert*-amyl alcool (fig. 65). [284]

[284] A. Buitrago Santanilla *et al.*, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3370-3373.

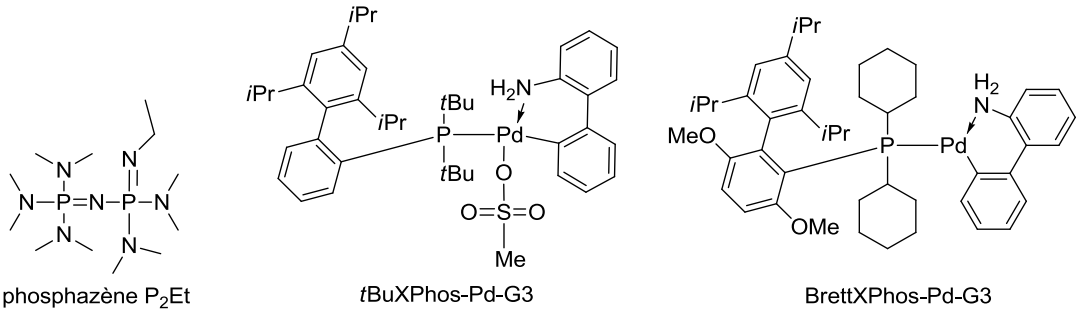


Figure 2 : structures du phosphazène P_2Et et des catalyseurs au palladium *t*BuXPhos/BrettPhos

Le phosphazène P_2Et est une base forte (pK_{BH+} 32.9, MeCN) très encombrée, résultant en une forte réactivité et un caractère non-nucléophile. Il est soluble dans de nombreux solvants organiques et permet le couplage C-C pallado-catalysé d'aryles halogénés à température ambiante.

A 120 °C dans le *tert*-amyl alcool, avec le phosphazène P_2Et et le catalyseur au palladium *t*BuXPhos ou BrettPhos, aucune conversion n'a été observée (entrées 4 et 5). A 180 °C dans le DMSO, nous obtenons des produits de dégradation (entrée 6). Dans tous les cas, nous n'observons même pas de réduction du brome sur l'aromatique, ce qui montre que la première étape d'addition oxydante n'a pas lieu. Le catalyseur au palladium serait-il empoisonné par les diverses fonctionnalités du substrat ?

Par manque de matière et de temps, nous n'avons pas pu tester d'autres conditions pour cette réaction d'arylation pallado-catalysée, mais cette voie mériterait d'être approfondie.

7) Synthèse d'un analogue 1,2,3-triazole

Nous nous sommes intéressés à la synthèse de l'analogue hétéro-aromatique de type 1,2,3-triazole (5*R*,6*S*)-**162** (schéma 78) dans le but de rigidifier la structure de la molécule. L'étape clé de cette rétrosynthèse est une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire intramoléculaire entre l'alcyne et l'azoture du composé *syn*-**154**. La réaction de cycloaddition peut également être réalisée en « one pot » à partir de l'époxyde *syn*-**97** et de l'azoture de sodium. Le produit final peut être obtenu par oxydation de l'alcool et deux étapes de déprotection.

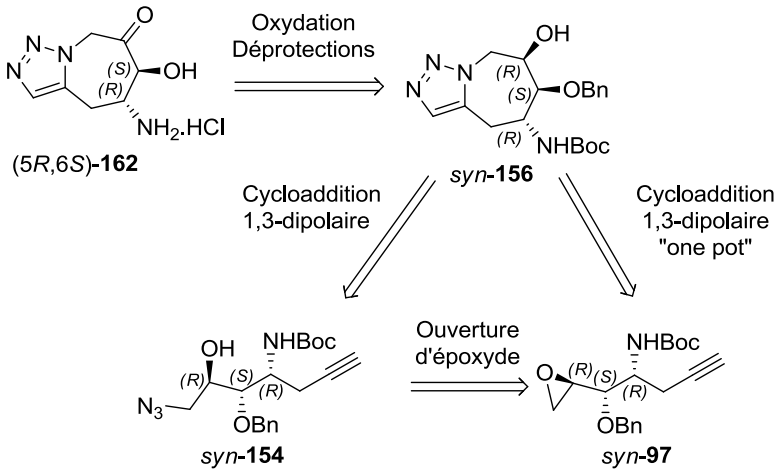


Schéma 78 : rétrosynthèse pour l'analogue 1,2,3-triazole (5*R*,6*S*)-162

Cycloaddition alcyne/azoture

La construction de triazoles par cycloaddition alcyne/azoture a été d'abord étudiée par Huisgen, qui s'est plus généralement intéressé aux réactions entre un dipolarophile et un composé 1,3-dipolaire conduisant à un hétérocycle à cinq chaînons. [285] Il s'agit d'une réaction concertée suprafaciale dans laquelle participent deux électrons π du dipolarophile et quatre électrons π du composé dipolaire (schéma 79). Meldal [286] et Sharpless [287] ont ensuite montré que le cuivre (I) catalyse la réaction de cycloaddition alcyne/azoture et améliore considérablement la régiosélectivité pour le produit 1,4-disusbtitué (introduction du concept de « click-chemistry »). Le produit 1,5-disubstitué peut lui être obtenu sélectivement par catalyse au ruthénium (cf annexe, page 224-225). [288]

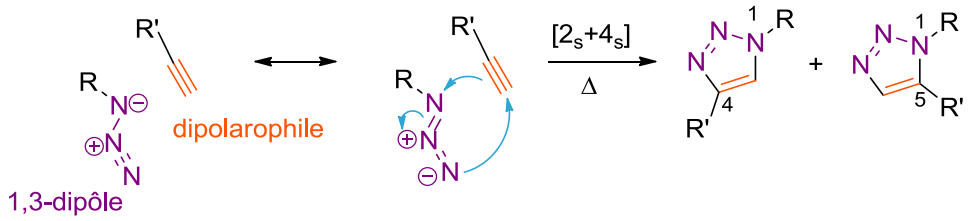


Schéma 79 : cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen

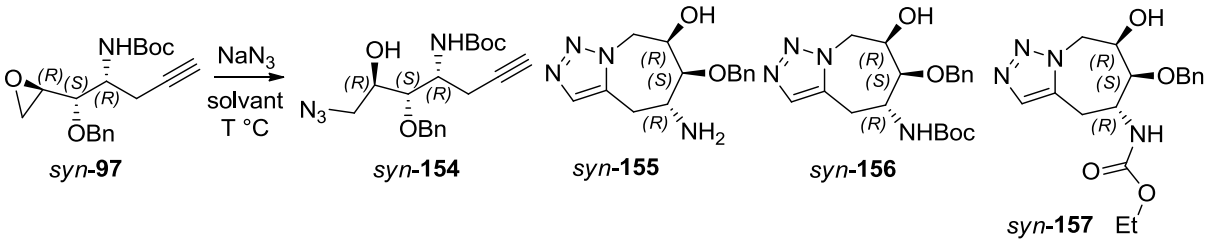
Pericás *et al.* ont étudié des réactions en « one-pot » comportant une étape d'ouverture d'un époxyde par un azoture et une étape de cycloaddition alcyne/azoture intramoléculaire. [289,290] Ces cycloadditions intramoléculaires peuvent avoir lieu dans des conditions douces et en absence de cuivre, par voie thermique ou sous irradiation micro-onde.

La synthèse du 1,2,3-triazole *syn*-**156** à partir de l'époxyde *syn*-**97** a été réalisée dans plusieurs conditions rassemblées dans le tableau 32. [289,291] Nous avons dans un premier temps entrepris la réaction en « one-pot » à partir de l'époxyde *syn*-**97** et de l'azoture de sodium.

En thermique à 100 °C, la réaction est lente et nous obtenons, après 30 h, un mélange du produit désiré *syn*-**156** et du produit d'ouverture de l'époxyde par l'azoture de sodium *syn*-**154** (entrée 1). Au micro-onde, à 160 °C ou 100 °C (entrées 2 et 3), la réaction dans un mélange acétonitrile/H_2O conduit au 1,2,3-triazole avec l'amine déprotégée *syn*-**155**. Celle-ci peut être facilement reprotégée par un Boc avec Boc_2O en présence de K_2CO_3 pour conduire au produit *syn*-**156**. La réaction dans EtOH à 150 °C au micro-onde donne un mélange de *syn*-**155** et *syn*-**156** (entrée 4). Après reprotection de l'amine, un rendement modeste de 35% est obtenu pour le produit *syn*-**156**. Dans ces conditions, nous avons aussi parfois observé la formation minoritaire du sous-produit *syn*-**157** par réaction de EtOH sur le carbamate. Afin d'éviter la formation de ce sous-produit,

[285] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604-637.
[286] M. Meldal *et al.*, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
[287] V. V. Rostovtsev *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
[288] L. Zhang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998-15999.
[289] M. Sau *et al.*, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5044-5047.
[290] A. I. Oliva *et al.*, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1617-1619.
[291] Y. Xia *et al.*, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 9818–9825.

un mélange *t*BuOH/H_2O est utilisé comme solvant ; cependant dans ces conditions, la réaction n'est pas complète et donne un mélange des trois produits *syn*-**154**, *syn*-**155** et *syn*-**156** (entrée 5).



Entrée	NaN_3	Solvant	T °C	Temps	Produit
1	2 eq.	MeCN/H_2O (4:1)	100 °C	30 h	*syn*-**154** + *syn*-**156** (28:72)[a]
2	2 eq.	MeCN/H_2O (4 :1)	160 °C, MW	1 h	*syn*-**155**
3	2 eq.	MeCN/H_2O (4 :1)	100 °C, MW	1 h	*syn*-**155**
4	1.1 eq.	EtOH	150 °C, MW	1 h	*syn*-**155** + *syn*-**156** (23:77) (+ *syn*-**157**)
5	3 eq.	*t*BuOH/H_2O (1:1)	140 °C, MW	1 h	*syn*-**154** + *syn*-**155** + *syn*-**156** (34:26:40)[a]

Tableau 32 : optimisation de la cycloaddition alcyne/azoture en « one pot » sur l'époxyde *syn*-97 ; (a) ratio déterminé par RMN du brut

La synthèse du 1,2,3-triazole a également été réalisée en deux étapes (schéma 80). Dans un premier temps, l'époxyde *syn*-**97** est ouvert par l'azoture de sodium dans EtOH à 60 °C pendant 48 h et donne le composé *syn*-**154** avec un bon rendement. Puis ce dernier est engagé dans la réaction de cycloaddition alcyne/azoture intramoléculaire au micro-onde. Dans EtOH et pour des températures de 150-170 °C, la réaction n'est pas complète même au bout de 3 h. Les conditions optimales sont alors EtOH, 185 °C pendant 1 h. Nous obtenons un mélange 20:80 des produits *syn*-**155** et *syn*-**156**. Après reprotection de l'amine, le produit *syn*-**156** est obtenu avec un rendement de 74% depuis l'époxyde *syn*-**97**. La réaction en deux étapes donne donc, dans notre cas, de meilleurs rendements que la réaction en « one-pot » (35%).

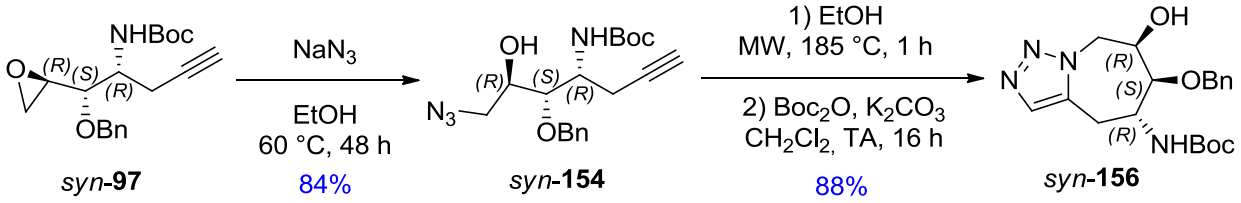
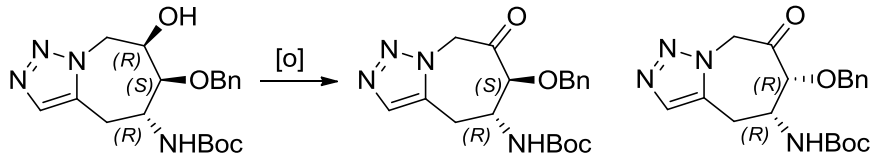


Schéma 80 : obtention du composé *syn*-156 en deux étapes

L'alcool du composé *syn*-**156** est ensuite oxydé en cétone (tabl. 33). Dans les conditions de Parikh-Doering, aucune conversion n'est observée (entrée 1), tandis qu'avec le périodinane de Dess-Martin, la réaction est lente (entrée 2). Le substrat de départ étant peu soluble dans CH_2Cl_2, un mélange CH_2Cl_2/MeCN est utilisé pour cette réaction. La réaction d'oxydation avec IBX est lente dans le DMSO à TA (entrée 3), mais elle est complète en 7 h au reflux de AcOEt (entrée 4). Cette réaction s'accompagne cependant d'une épimérisation au niveau du carbone portant l'alcool (équilibre céto-énolique), un mélange 72:28 des deux cétones (5*R*,6*S*)-**158** et (5*R*,6*R*)-**159** est obtenu. Nous avons remarqué que la proportion d'épimère (5*R*,6*R*)-**159** diminue au cours du temps ((5*R*,6*S*)-**158**/(5*R*,6*R*)-**159** 90:10 après cinq jours dans $CDCl_3$).

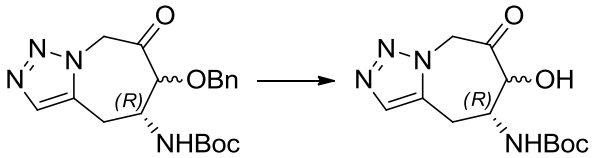


syn-**156** (5*R*,6*S*)-**158** (5*R*,6*R*)-**159**

Entrée	Conditions	Produit (rendement %)
1	SO_3•pyridine, DIPEA, DMSO, CH_2Cl_2, -20 °C, 2 h	*syn*-**156**
2	DMP (2 eq.), MeCN/CH_2Cl_2, TA, 24 h	*syn*-**156** + (5*R*,6*S*)-**158** (74:26)[a]
3	IBX (2 eq.), DMSO, TA, 24 h	*syn*-**156** + (5*R*,6*S*)-**158** (70:30)[a]
4	IBX (3 eq.), AcOEt, 80 °C, 7 h	(5*R*,6*S*)-**158** + (5*R*,6*R*)-**159** (72:28)[a] (67%)

Tableau 33 : oxydation de l'alcool de *syn*-156 ; (a) ratio déterminé par RMN du brut

Pour l'avant dernière étape consistant en la déprotection de l'alcool du mélange (5*R*,6*S*)-**158**/(5*R*,6*R*)-**159**, nous avons testé les diverses conditions décrites tableau 34. La méthode précédemment utilisée pour la déprotection des substrats benzylés, à savoir l'hydrogénolyse catalytique avec $Pd(OH)_2$ (20% w/w) au reflux de AcOEt, n'a donné aucune conversion (entrée 1). De même, la catalyse au Pd/C dans un mélange MeOH/AcOH, utilisée par Wong *et al.* sur un substrat comportant également un hétérocycle 1,2,3-triazole, a redonné les substrats de départ (entrée 2). [292] Il est possible que l'hétérocycle 1,2,3-triazole empoisonne une partie du catalyseur, nous avons donc augmenté sa quantité, mais cela n'a pas abouti au produit désiré : il n'y a aucune conversion (entrée 3) ou dégradation du substrat (entrée 4). L'hydrogénolyse par transfert avec le formiate d'ammonium comme donneur d'hydrogène donne un résultat similaire (entrée 5). [293]



(5*R*,6*S*)-**158** + (5*R*,6*R*)-**159** (5*R*,6*S*)-**160** + (5*R*,6*R*)-**161**

Entrée	Conditions	Produit
1	H_2, $Pd(OH)_2$ (2*20% w/w), AcOEt, 80 °C, 16 h	(5*R*,6*S*)-**158**/(5*R*,6*R*)-**159**
2	H_2, Pd/C (2*10% w/w), MeOH/AcOH (1/1), TA, 24 h	(5*R*,6*S*)-**158**/(5*R*,6*R*)-**159**
3	H_2, $Pd(OH)_2$ (100% w/w), AcOEt, 80 °C, 16 h	(5*R*,6*S*)-**158**/(5*R*,6*R*)-**159**
4	H_2, $Pd(OH)_2$ (200% w/w), AcOEt, 80 °C, 16 h	dégradation
5	NH_4HCO_2 (5 eq.), Pd/C (80% w/w), MeOH, 70 °C, 16 h	(5*R*,6*S*)-**158**/(5*R*,6*R*)-**159**
6	BCl_3, CH_2Cl_2, -20 °C, 5 h	dégradation
7	TMSI généré *in situ*, MeCN, TA	dégradation

Tableau 34 : déprotection du benzyléther

Le clivage des éthers de benzyle est également décrit par réaction avec un acide de Lewis tel que BCl_3 et avec le réactif TMSI selon le mécanisme présenté schéma 81. [207,294] L'éther de benzyle se lie à l'acide de Lewis ou

[292] T. Flessner, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7805-7808.
[293] S. Ram, R. E. Ehrenkaufer, *Synthesis* **1988**, 91-95.
[294] G. A. Olah, S. C. Narang, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 2225-2277.

au TMSI via son oxygène, libérant un ion halogénure qui par réaction de type SN_2 sur la position benzylique, puis hydrolyse, conduit à l'alcool déprotégé.

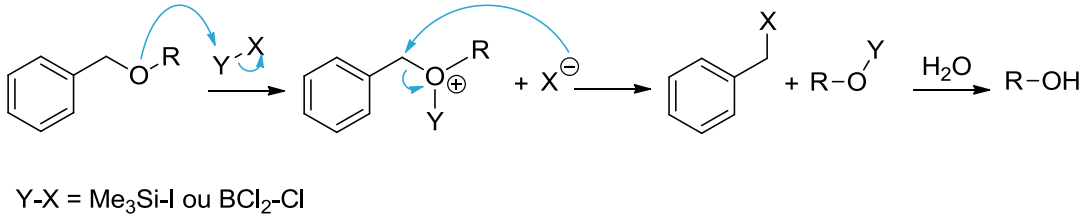


Schéma 81 : déprotection d'un éther benzylique avec un acide de Lewis

Malheureusement, dans notre cas, l'utilisation de BCl_3 ou de TMSI, généré *in situ* par réaction entre le TMSCl et NaI dans MeCN [295], a conduit à des produits de dégradation (tabl. 34, entrées 6 et 7).

Nous avons alors inversé les étapes de déprotection et débuté par la déprotection de l'amine avec du TFA (schéma 82). Le produit obtenu est directement engagé après concentration à l'évaporateur rotatif dans la réaction de déprotection de l'éther benzylique. Les conditions d'hydrogénolyse catalytique (H_2, $Pd(OH)_2$) n'ont pas donné le produit attendu (5*R*,6*S*)-**162**, mais le produit (6*S*)-**163** issu d'une réaction d'élimination d'ammonium, suivie de la réduction de la double liaison formée.

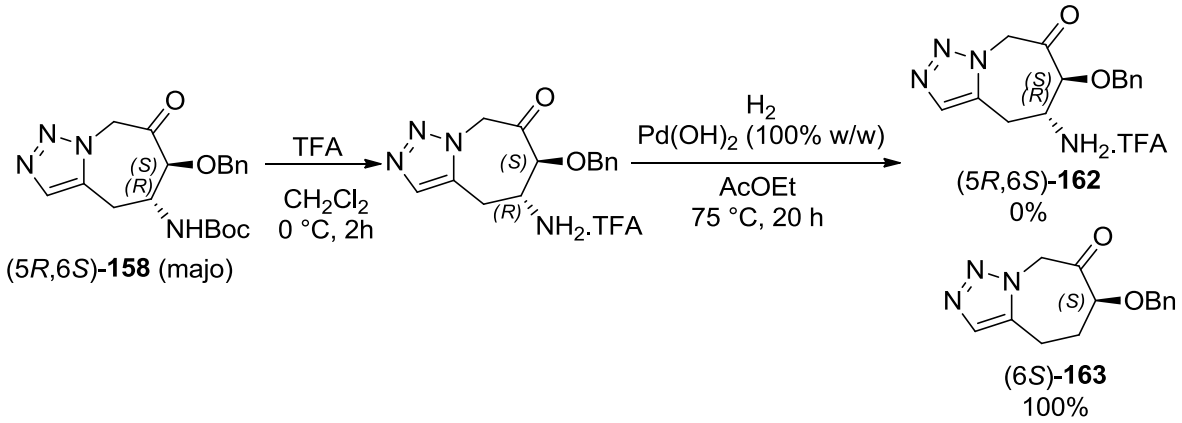


Schéma 82 : déprotection de l'amine

La séquence déprotection de l'amine/déprotection de l'alcool ne fonctionnant pas, nous devons envisager d'autres méthodes de déprotection de l'éther benzylique du composé (5*R*,6*S*)-**158**. Par manque de matière et de temps, nous n'avons pas pu réaliser d'autres essais, mais il faudrait tester des méthodes oxydantes avec les réactifs DDQ ou $RuO_2/NaIO_4$ ou 1-(*tert*-butylperoxy)-1,2-benziodoxol-3(1*H*)-one. [207]

[295] A. Kamal *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6945-6948.

III- Evaluation biologique des composés finaux

1) Essais enzymatiques *in vitro* et *in cellulo* sur parasites en cultures

La production et la purification de l'enzyme recombinante de *Pf*A-M17 (notée de *rPf*A-M17), ainsi que les tests enzymatiques ont été réalisés au laboratoire par le Dr Marjorie Schmitt (CR). Les tests d'inhibition de croissance sur cultures de parasites ont été entrepris par nos collaborateurs, les Pr Isabelle Florent et Dr Lotfi Bounaadja (post doctorant) au Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris) dans le cadre de la collaboration ANR.

a) Production de *rPf*A-M17

La méthode utilisée pour produire l'enzyme recombinante de *Pf*A-M17 est l'expression de la protéine par les bactéries *E. coli* (organisme hôte) (cf annexe, page 225). L'ADN vecteur (ou plasmide) est préparé par insertion dans un ADN circulaire d'un gène de synthèse codant pour la quasi-totalité du monomère de *Pf*A-M17. Dans le but de faciliter la purification finale de *rPf*A-M17, l'ADN vecteur a été construit de manière à ce que la protéine d'intérêt soit fusionnée à une étiquette Histidine. D'autre part, le plasmide contient dans sa séquence plusieurs caractéristiques importantes dont une origine de réplication, des sites de restriction, un gène de résistance à l'antibiotique ampicilline, un opéron lactose et un gène répresseur de cet opéron.

Le plasmide est ensuite introduit dans les bactéries par choc thermique (transformation des bactéries). La sélection des bactéries transformées se fait par culture dans un milieu contenant les antibiotiques ampicilline et chloramphénicol. L'expression de la protéine d'intérêt dans les bactéries sélectionnées est induite par addition d'IPTG au milieu de culture (cf annexe, page 226). Cet analogue de l'allolactose se lie au répresseur de l'opéron lactose, empêchant ainsi la liaison du répresseur à l'opérateur. Il y a alors transcription des gènes de l'opéron lactose et du gène d'intérêt situé après l'opéron lactose.

Les protéines produites par les bactéries (dont *rPf*A-M17) sont récupérées par centrifugation après lyse des cellules. La protéine d'intérêt est purifiée par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC). Les ions nickel chargés sur la colonne sont chélatés par l'étiquette histidine de la protéine d'intérêt, qui est donc plus retenue que les autres protéines au passage sur la colonne. La protéine d'intérêt est ensuite éluée avec l'imidazole. L'étape finale de dialyse ou de filtration sur gel permet d'éliminer l'imidazole restant et d'enrichir la protéine en ions zinc. *rPf*A-M17 est enfin conservée au congélateur (-80 °C) dans du glycérol. Son activité est vérifiée par mesure de la constante d'inhibition K_i de la bestatine, inhibiteur de référence.

b) Potentiel inhibiteur des composés

Les produits finaux (1*R*,2*S*,3*S*)-**119**, (2*S*,3*S*)-**120**, (2*S*,3*R*)-**121** et (2*S*,3*S*)-**124** ont été évalués sur *rPf*A-M17 et sur l'aminopeptidase bimétallique de référence *AP*aero commerciale (tabl. 35). Les pourcentages d'inhibition obtenus s'étendent de 9 à 32% sur *rPf*A-M17 pour une concentration en inhibiteur de 1 mM et de 18 à 42%

sur *AP*aero pour des concentrations en inhibiteur de 50 et 200 µM. Les composés synthétisés s'avèrent être des inhibiteurs peu puissants des deux aminopeptidases.

L'activité de ces composés a également été mesurée sur des cultures de parasites *P. falciparum* sensibles (3D7) ou résistantes (FcB1) à la chloroquine. Les composés (1*R*,2*S*,3*S*)-**119** et (2*S*,3*S*)-**120** n'inhibent pas la croissance des parasites (IC_{50} > 100 µM) (tabl. 35).

	K_i (nM) ou % d'inhibition		IC_{50} (µM)	
	*rPf*A-M17	*AP*aero	*P. falciparum* 3D7	*P. falciparum* FcB1
1 (+/-)	nd	K_i 10 nM	nd	nd
(1*R*,2*S*,3*S*)-**119**	9% d'inhibition à 1 mM	37% d'inhibition à 200 µM	> 100	> 100
(2*S*,3*S*)-**120**	30% d'inhibition à 1 mM	18% d'inhibition à 50 µM	> 100	> 100
(2*S*,3*R*)-**121**	27% d'inhibition à 1 mM	nd	nd	nd
(2*S*,3*S*)-**124**	32% d'inhibition à 1 mM	42% d'inhibition à 50 µM	nd	nd

Tableau 35 : résultats des essais enzymatiques et essais *in cellulo* des composés (1*R*,2*S*,3*S*)-119, (2*S*,3*S*)-120, (2*S*,3*R*)-121 et (2*S*,3*S*)-124 et rappel du composé 1 sur *AP*aero ; 3D7 : souche de *P. falciparum* sensible à la chloroquine ; FcB1 : souche de *P. falciparum* résistante à la chloroquine ; nd : non déterminé

2) Discussion

La comparaison du pourcentage d'inhibition du composé (2*S*,3*S*)-**120** sur *AP*aero (18% d'inhibition à 50 µM) avec le K_i du composé **1** sur *AP*aero (10 nM) nous permet de conclure que l'absence du cycle phényle a un effet néfaste sur l'inhibition d'*AP*aero. Cette conclusion resterait à vérifier pour *Pf*A-M17 sur laquelle le composé **1** n'a pas été évalué.

Les composés (1*R*,2*S*,3*S*)-**119**, (2*S*,3*S*)-**120**, (2*S*,3*R*)-**121** et (2*S*,3*S*)-**124** adoptent certainement une conformation qui empêche le positionnement correct des différentes fonctionnalités dans le site actif, perturbant donc l'établissement d'un réseau de liaisons hydrogènes, d'interactions électrostatiques et hydrophobes entre le ligand et l'enzyme, ainsi que la chélation des deux ions métalliques. De plus, la flexibilité des cycles (plus importante pour le cycle à sept chaînons) élève considérablement le prix entropique à payer lors de la liaison ligand/recepteur. [296]

D'après l'alignement 3D présenté figure 66, les composés (7*S*,8*S*)-**1** et (2*S*,3*S*)-**124** pourraient adopter la même conformation et leurs fonctionnalités pointeraient dans les mêmes directions. Au contraire, (2*S*,3*S*)-**120** adopterait une conformation différente et la fonction cétone (C1) ne pointerait pas dans la même direction que pour (7*S*,8*S*)-**1** et (2*S*,3*S*)-**124**. Cela contribuerait certainement à la faible activité de (2*S*,3*S*)-**120** sur *AP*aero.

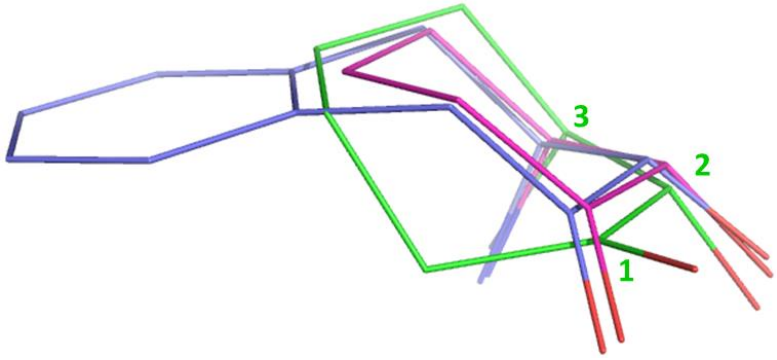


Figure 66 : alignement 3D des composés (7*S*,8*S*)-1 (bleu), (2*S*,3*S*)-120 (vert), (2*S*,3*S*)-124 (magenta) ; logiciel Marvin Sketch

Au contraire, l'alignement 3D des hydrates de (2*S*,3*S*)-**120** et (2*S*,3*S*)-**124** montre que leurs fonctionnalités se superposent parfaitement (fig. 67). Les activités très similaires obtenues pour (2*S*,3*S*)-**120** et (2*S*,3*S*)-**124** sur *rPf*A-M17 pourraient alors s'expliquer par le fait que ces composés sont sous forme hydrates au sein du site actif de *rPf*A-M17.

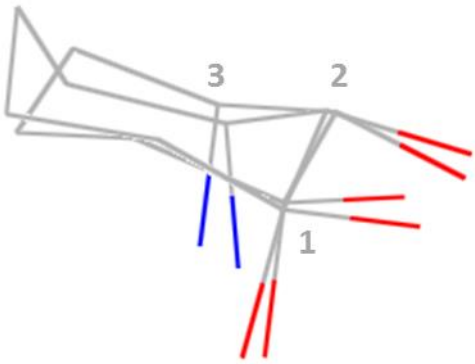


Figure 67 : alignement 3D des hydrates de (2*S*,3*S*)-120 et (2*S*,3*S*)-124 ; logiciel Marvin Sketch

[296] Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists, R. A. Copeland, *John Wiley & Sons* **2013**, 1-572.

Afin d'améliorer l'activité des composés synthétisés, il sera nécessaire de rigidifier leur structure en contraignant le cycle à six ou sept chaînons par fusion avec un cycle aromatique. Le cycle à six chaînons et le cycle à sept chaînons adopteraient respectivement une conformation de type demi-chaise et de type chaise.[166] Par conséquent, les composés (7*S*,8*S*)-**1**, (7*S*,8*R*)-**1** et (5*R*,6*S*)-**162** avec un reste benzène ou 1,2,3-triazole fusionné au cycle à sept chaînons promettent de meilleures activités inhibitrices sur *rPf*A-M17 et *AP*aero.

De plus, la substitution en position 1 ou 2 des dérivés benzène (7*S*,8*S*)-**1 et** (7*S*,8*R*)-**1** (fig. 68) et en position 3 du dérivé triazole (5*R*,6*S*)-**162** par une chaîne carbonée (deux ou trois atomes de carbone) devrait améliorer très certainement l'activité des composés sur *AP*aero et *rPf*A-M17, par interaction de cette chaîne avec le sous-site S1 hydrophobe des protéines.

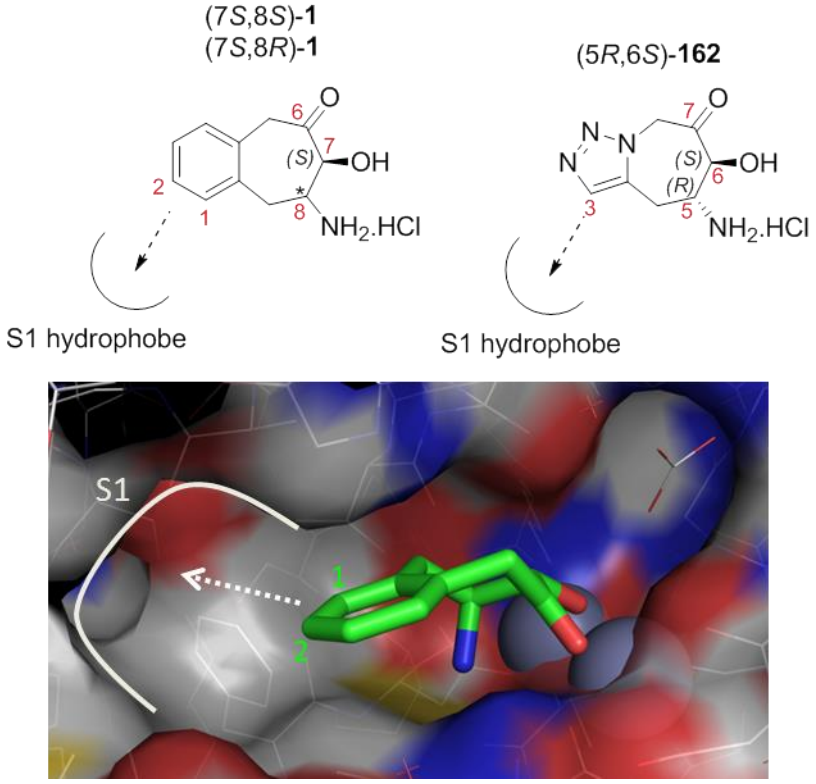


Figure 68 : interactions avec le sous-site S1 de *Pf*A-M17 et *AP*aero par substitution des positions 1 ou 2 du benzène et 3 du triazole ; représentation du complexe (7*S*,8*S*)-1/*Pf*A-M17 (4K3N)

Conclusion et perspectives

L'objectif de ces travaux de thèse était de synthétiser des inhibiteurs puissants et sélectifs de la métallo-aminopeptidase *Pf*A-M17. En se basant sur des travaux précédemment réalisés au laboratoire, des inhibiteurs de type benzocycloheptane trisubstitué ont été conçus. L'étude de modélisation moléculaire a montré qu'il s'agit de composés prometteurs pour l'inhibition des aminopeptidases bimétalliques *AP*aero et *Pf*A-M17.

Nous avons développé une voie de synthèse diastéréosélective permettant d'accéder aux cycloheptanes trisubstitués (1*R*,2*S*,3*S*)-**119**, (2*S*,3*S*)-**120** et (2*S*,3*R*)-**121** et au cyclohexane trisubstitué (2*S*,3*S*)-**124** (schéma 83). La synthèse, constituée de seize étapes à partir de l'acide D-isoascorbique, passe par deux intermédiaires clés, des *N*-*tert*-butanesulfinimines chirales et un époxyde, sur lesquels il est possible d'additionner divers nucléophiles permettant l'accès à d'autres types d'analogues.

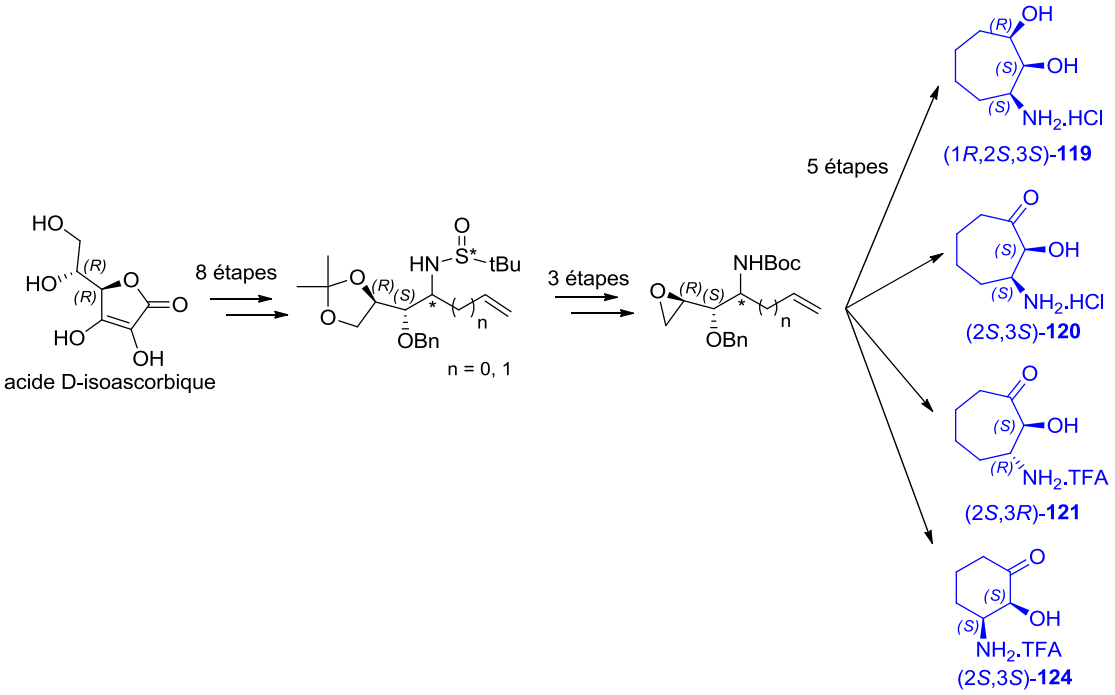


Schéma 83 : voie de synthèse diastéréosélective

Les composés (1*R*,2*S*,3*S*)-**119**, (2*S*,3*S*)-**120**, (2*S*,3*R*)-**121** et (2*S*,3*S*)-**124** ont été évalués sur l'enzyme recombinante *rPf*A-M17, sur l'aminopeptidase modèle d'*Aeromonas proteolytica AP*aero et sur des cultures de parasites de *P. falciparum* et se sont montrés inactifs vis-à-vis de ces cibles. Ces résultats sont très certainement liés à la flexibilité des cycles à six ou sept chaînons, d'où la nécessité de rigidifier la structure en fusionnant le cycle à six ou sept chaînons à un cycle aromatique.

Des essais de co-cristallisation avec *rPf*A-M17 ont été menés en collaboration avec l'équipe de J. Cavarelli à l'IGBMC de Strasbourg.

Trois approches ont été étudiées pour introduire un reste benzène fusionné au cycle à sept chaînons (schéma 84). L'ouverture de l'époxyde avec un acétylénure (voie (A)) n'a pas conduit au produit désiré dans les différentes conditions utilisées. Il faudrait revoir cette étape de synthèse avec d'autres acides de Lewis, par exemple avec le triflate d'ytterbium.

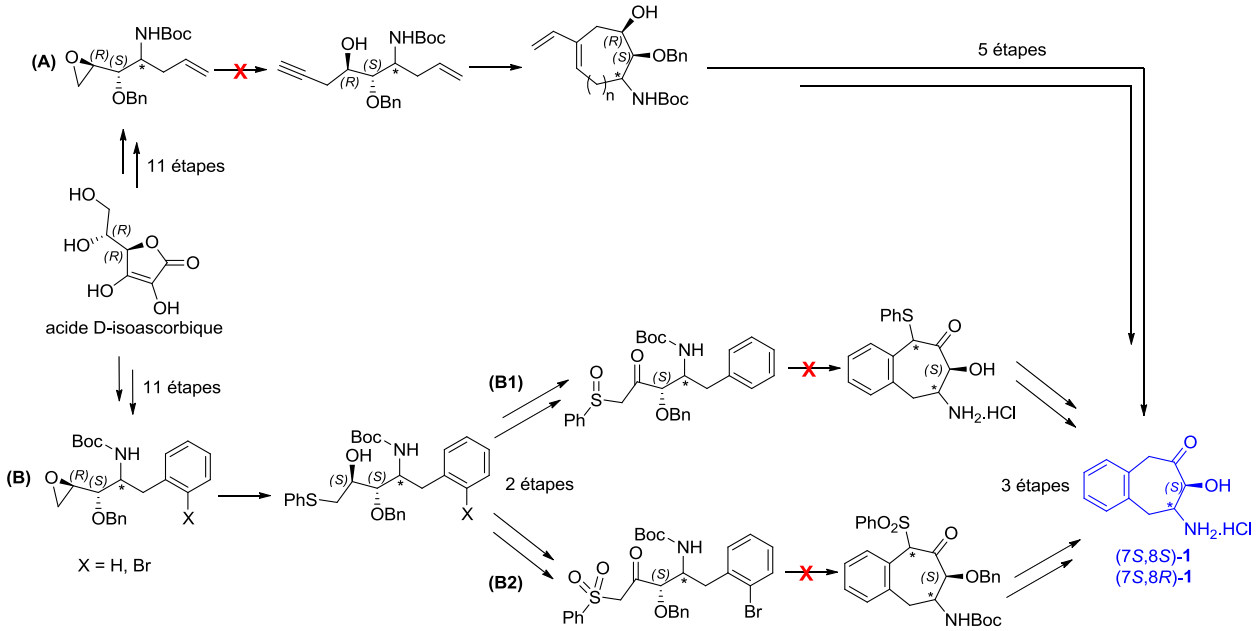


Schéma 84 : introduction du reste benzène

La réaction de type Pummerer (voie B1, schéma 84) a échoué, très certainement à cause du résidu aromatique non-enrichi en électrons. L'étape d'arylation catalysée au palladium (voie B2, schéma 84) n'a pas fonctionné dans les conditions utilisées. Elle mériterait un criblage plus large de différentes conditions.

Le cycle à sept chaînons a également été fusionné à un hétérocycle 1,2,3-triazole via une réaction de cycloaddition alcyne-azoture (schéma 85). Nous avons cependant rencontré des difficultés au niveau de la déprotection de l'éther benzylique. Un autre groupement protecteur plus labile aurait pu être utilisé à la place du benzyle. Par exemple, le *para*-méthoxybenzyle aurait pu convenir mais nous avons observé que les réactions d'introduction de ce groupement présentent de très faibles rendements.

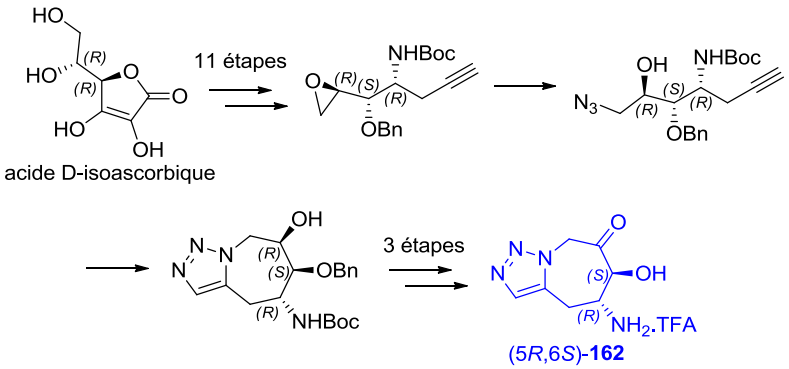


Schéma 85 : introduction du reste 1,2,3-triazole

➢ Pour introduire le reste benzène, nous pourrions envisager d'ouvrir l'époxyde dérivé de *syn*-**97** avec un nucléophile vinylique (schéma 86), puis de passer par une séquence métathèse cyclisante ène-

yne/réaction de Diels-Alder/réaromatisation. L'ouverture de l'époxyde catalysée au cuivre nécessiterait certainement la protection de l'alcyne terminal par un groupement trialkylsilyle. [297]

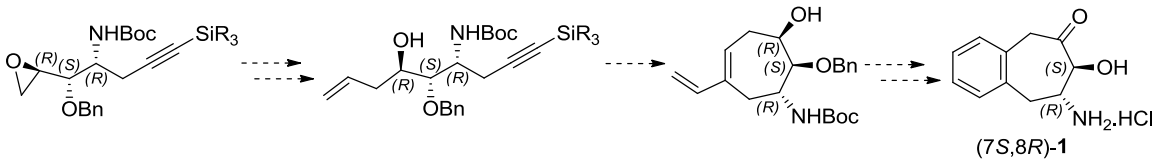


Schéma 86 : alternative pour l'introduction du reste benzène

Des réactions de Diels-Alder à demande électronique inverse sur les substrats diénophiles (4*R*,5*S*,6*S*)-**105** et (4*R*,5*S*,6*R*)-**106** pourraient aussi être étudiées afin de rigidifier le cycle à sept chaînons (schéma 87). Des diènes de type α-pyrone [298], triazine ou tétrazine [299], et thiophène 1,1-oxyde [300] pourraient être utilisés afin d'obtenir après réaromatisation des analogues avec un reste benzène substitué, pyridine ou pyridazine substituées.

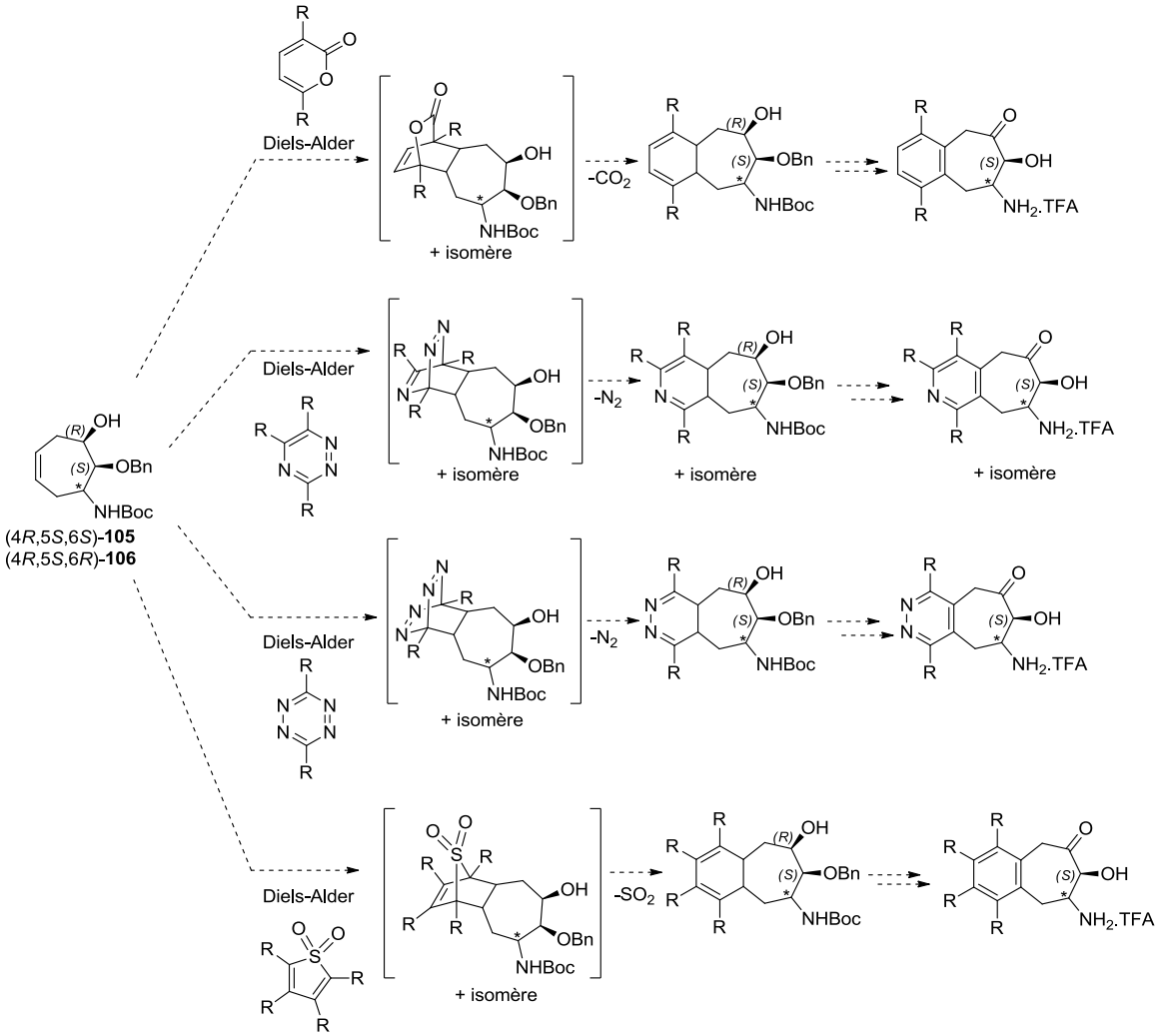


Schéma 87 : alternatives pour introduction d'un reste benzène, pyridine ou pyridazine

[297] Y. Le Huérou *et al.*, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6782-6790.
[298] K. Afarinkia *et al.*, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9111-9171.
[299] A. M. Prokhorov, D. N. Kozhevnikov, *Chem. Heterocycl. Compounds* **2012**, *48*, 1153-1176.
[300] J. Nakayama, Y. Sugihara, *Topics Curr. Chem.* **1999**, *205*, 131-195.

➢ Enfin, l'étude de modélisation moléculaire a montré que la substitution en position 3 du triazole par une chaîne carbonée (deux ou trois atomes de carbone) améliorerait très certainement l'activité des composés sur *AP*aero et *rPf*A-M17, par interaction de cette chaîne avec le sous-site S1 hydrophobe de ces deux protéines.

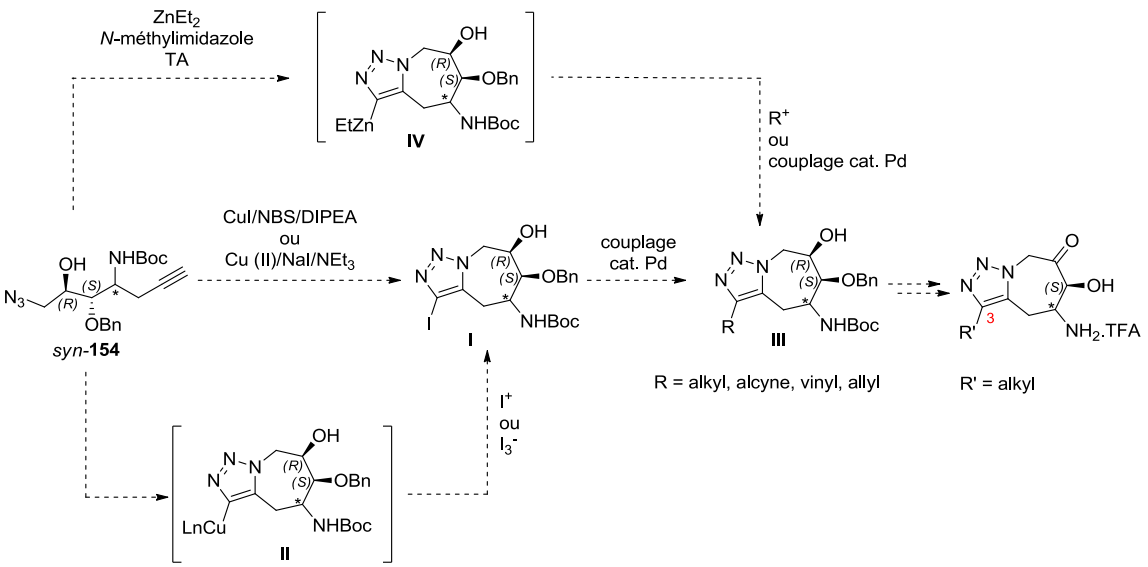


Schéma 88 : substitution de la position du triazole

Le 4-iodo-1,2,3-triazole **I** pourrait être obtenu par une réaction one-pot comprenant la cycloaddition alcyne-azoture en présence de sel de cuivre (I) et le piégeage d'une source d'iode électrophile par l'intermédiaire triazole cuivre (I) **II** (schéma 88). [301,302] Le 4-iodo-1,2,3-triazole **I** pourrait ensuite subir une réaction de couplage catalysée au palladium avec un dérivé acide boronique (Suzuki) ou un acétylure de cuivre (Sonogashira) pour donner le composé substitué **III**.

Le composé **III** pourrait également être obtenu par cycloaddition alcyne-azoture en présence de $ZnEt_2$, suivie du piégeage d'un électrophile par l'intermédiaire triazole zinc **IV** (schéma 88). [303] Ce dernier pourrait aussi subir une réaction de couplage catalysée au palladium avec un dérivé halogéné (Negishi) pour donner le composé substitué **III**.

L'objectif de ce travail était de concevoir et synthétiser de nouveaux antipaludéens, répondant aux exigences de traitement de cette maladie, en termes d'efficacité et de coût pour les pays concernés. Le travail de synthèse réalisé et l'expérience acquise sur les composés de type benzocycloheptane trisbustitué a montré que si la conception semblait aisée, l'obtention de ces châssis moléculaires reste, à ce jour, particulièrement difficile. De ce fait, même si les composés finaux que nous souhaitons réaliser s'avèrent intéressants pour inhiber *Pf*A-M17 et la croissance du parasite, leur développement en tant que traitement antipaludéen dépasserait les coûts raisonnables, imposés par la pauvreté des pays touchés par la maladie. Néanmoins ils peuvent être des outils biologiques importants, puisqu'aucun inhibiteur réellement spécifique de *Pf*A-M17 n'est décrit à ce jour et que le rôle métabolique de cette enzyme chez *P. falciparum* n'est pas sans questionnements.

[301] L. Li *et al.*, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3630-3633.
[302] W. S. Brotherton *et al.*, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 6443-6455.
[303] C. D. Smith, M. F. Greaney, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4826-4829.

Partie expérimentale

I- Solvants

Tous les solvants employés ont été préalablement distillés. Les solvants anhydres sont séchés lorsque nécessaire, juste avant réaction selon les méthodes présentées tableau 36. Les réactions sont réalisées sous atmosphère inerte (N_2).

Solvant	Méthode
THF	Na/benzophénone
CH_2Cl_2	CaH_2
Toluène	CaH_2

Table 36 : méthodes de séchage des solvants

II- Matériels et méthodes

- HPLC

Les analyses HPLC sont réalisées sur un appareil Agilent Technologies 1100 series. Sauf indiqué autrement, les conditions d'analyses sont : colonne C18 Kromasil, 5 µm, 4.6x250 mm, 1 mL/min, 30 °C, 10 µL injecté, 70/30 MeCN/H_2O, détecteur à barrette de diodes.

- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN du proton (^{1}H RMN) et du carbone (^{13}C RMN) sont enregistrés sur des spectromètres Bruker Avance 400 et 300 MHz. Les solvants utilisés ($CDCl_3$, CD_3OD, D_2O) sont indiqués entre parenthèses. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport à une référence interne ($CDCl_3$, CD_3OD, D_2O). Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz (Hz). Les abréviations suivantes sont utilisées : (s), singulet ; (sl), singulet large ; (d), doublet ; (t), triplet ; (q), quadruplet ; (m), multiplet.

- Spectroscopie de masse

Les spectres de masse ont été réalisés sur les appareils de :
- HRMS, Agilent Technologies 6510 series, QTof LC/MS (source dual ESI, mode positif),
- LCMS, Agilent Technologies 1100 series, couplé à une MSD/5L.

- Polarimétrie

Le pouvoir rotatoire a été mesuré à l'aide d'un polarimètre Perkin Elmer Model 341 LC, avec une lampe au sodium (λ = 589.3 nm) et à une température de 20 °C. Les échantillons sont solubilisés dans $CHCl_3$ à une concentration indiquée entre parenthèses en g/mL. Le pouvoir rotatoire spécifique est calculé via la loi de Biot $[\alpha^{20}_{D}] = l*c/\alpha$ (longueur de la cuve l = 1 dm, concentration c en g/mL et pouvoir rotatoire α en degré).

- Appareillage micro-onde

Certaines réactions ont été réalisées dans un micro-onde Discover CEM en monomode.

- Essais enzymatiques

La production de l'enzyme recombinante de *Pf*A-M17 (*rPf*A-M17) et les essais enzymatiques ont été réalisés au laboratoire par le Dr Marjorie Schmitt.

L'activité inhibitrice des composés synthétisés (notés I) est mesurée sur l'enzyme recombinante de *Pf*A-M17 et sur l'enzyme commerciale *AP*aero (notées E). Le substrat utilisé (noté S) est la leucine *para*-nitroanilide (LpNA), dont l'hydrolyse conduit à la *para*-nitroaniline (notée P), composé de couleur jaune absorbant à 405 nm à pH 7.5 (ε = 10800 $mol^{-1}.L.cm^{-1}$) (schéma 89).

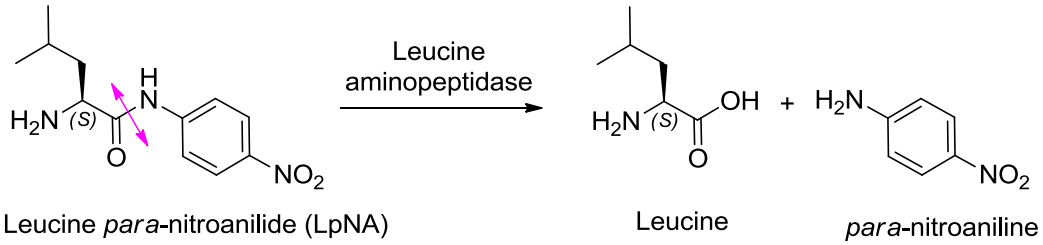


Schéma 89 : hydrolyse de la leucine *para*-nitroanilide par une leucine aminopeptidase

Nous nous plaçons dans les conditions de Michaelis-Menten dont les hypothèses simplificatrices sont (1) il existe un temps suffisamment court pendant lequel la quantité de produit formé est négligeable (mesure des vitesses initiales), (2) la quantité de substrat introduite doit être beaucoup plus grande que la quantité initiale d'enzyme, (3) la concentration du complexe enzyme-substrat ES est constante (hypothèse de l'état stationnaire).

Afin de déterminer le pourcentage d'inhibition de l'enzyme étudiée, la vitesse initiale d'hydrolyse de la LpNA est mesurée en absence et en présence d'inhibiteur (à différentes concentrations) et pour une concentration initiale en LpNA égale au K_m. Pour cela, la densité optique Do d'un mélange E + S ou E + S + I est suivie au cours du temps et par la loi de Beer-Lambert Do = ε.l.c, nous en déduisons les concentrations de produit formé et les vitesses initiales v_0.

E + S :
L'enzyme (20 µg) et le substrat (0.3 mM = K_m pour essai sur *rPf*A-M17 et 0.03 mM = K_m pour essai sur *AP*aero) en solution dans un tampon (Tris-HCl 50 mM, pH 8 pour *rPf*A-M17 ; Tris-HCl 50 mM, $ZnCl_2$ 0.05 mM, pH 8 pour *AP*aero) sont placés dans une cuve de spectromètre (volume total = 1 mL). La densité optique est

mesurée pendant 1 h à l'aide d'un spectromètre UV-visible HP 8453 Agilent Technologies, détecteur à barrette de diodes.

E + S + I :
L'enzyme (20 µg) et l'inhibiteur (50 µM à 1mM) en solution dans un tampon (Tris-HCl 50 mM, pH 8 pour *rPf*A-M17 ; Tris-HCl 50 mM, $ZnCl_2$ 0.05 mM, pH pour *AP*aero 8) sont placés dans une cuve de spectromètre pour une incubation de 20 min à TA. Le substrat (0.3 mM pour test sur *Pf*A-M17 et 0.03 mM pour test sur *AP*aero) est ajouté et la densité optique est mesurée pendant 1 h.

Les inhibitions étant de type compétitif, l'IC_{50} et la constante d'inhibition K_i peuvent être déterminés par la représentation de Dixon $1/v_0 = f([I])$. [304]

- Essais sur cultures de parasites

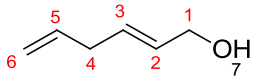
Les cultures de parasites et les essais *in vitro* ont été réalisés au MNHN par le Pr Isabelle Florent et le Dr Lotfi Bounaadja.

Les composés synthétisés ont été évalués sur des cultures de parasites *P. falciparum* sensibles (3D7, Tanzanie) ou résistants (FcB1, Colombie) à la chloroquine. Les parasites sont maintenus en culture avec des érythrocytes humains, dans un milieu RPMI 1640 (Gibco-BRL) complété par 8% (v/v) de sérum humain inactivé à la chaleur, à 37°C sous une atmosphère de 3% CO_2, 6% O_2 et 91% N_2. Les stocks de composés à tester sont préparés à une concentration de 20 mM dans le DMSO et la chloroquine commerciale est préparée à une concentration de 10 mM dans H_2O distillée. Ils sont dilués plusieurs fois avec du milieu de culture et introduits dans des cultures de parasites asynchrones (1% parasitémie et 1% hématocrite finale) dans des plaques 96 puits pendant 24 h à 37 °C (volume total par puits 200 µL) dans un système de jarre à bougie. Après 24 h d'incubation, 0.5 µCi d'hypoxanthine-^{3}H (11.1 mCi/mmol ; Perkin-Elmer) par puits ont été ajoutés et les plaques sont à nouveau incubées à 37 °C dans le système de jarre à bougie. Après 24 h d'incubation, les plaques subissent un cycle de congélation/décongélation et les lysats cellulaires sont collectés sur filtre en fibre de verre pour être comptés à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide. L'inhibition de la croissance est déterminée en comparant la radioactivité incorporée dans les cultures traitées avec la radioactivité incorporée dans les cultures contrôles (sans inhibiteurs, mais avec du DMSO à la même concentration) maintenues sur les mêmes plaques. Les IC_{50} sont calculés à partir des courbes concentration-effet. La concentration en DMSO n'excède pas 0.5%, limite à partir de laquelle la croissance du parasite est affectée par le solvant. La bestatine et la chloroquine ont été utilisés comme contrôles positifs pour ces tests.

[304] Enzyme Kinetics Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-state Enzyme Systems, I. H. Segel, *Wiley-Interscience* **1975**, 1-957.

III- Synthèse

E-hexa-2,5-dièn-1-ol **23**

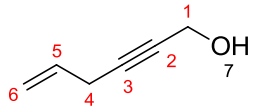


A une solution de bromure d'allyle (13.9 ml, 160 mmol, 8 eq.) dans THF (20 ml) est ajouté l'indium en petits grains (2.31 g, 20 mmol, 1 eq.). Le mélange réactionnel est placé sous N_2 et refroidi à 0 °C, puis l'alcool propargylique (1.2 mL, 20 mmol) est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité 10 min à 0 °C, puis à TA pendant 16 h. Il est ensuite traité avec une sol. 1N HCl et les phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (x2) et la phase organique est lavée avec une sol. sat. NaCl, puis séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (éther de pétrole/AcOEt 4/1).

(578 mg, 51% ; huile incolore)

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : en accord avec la littérature [178], δ 5.83 (ddt, *J* = 16.7 Hz ; 10.2 Hz ; 6.5 Hz, 1H, H5), 5.73-5.68 (m, 2H, H3 + H2), 5.06 (dq, *J* = 16.7 Hz ; 1.7 Hz, 1H, Ha-6), 5.02 (dq, *J* = 10.2 Hz ; 1.7 Hz, 1H, Hb-6), 4.12 (m, 2H, H1), 2.81 (m, 2H, H4), 1.39 (sl, 1H, H7)

Hexa-2-yn-5-èn-1-ol **24**

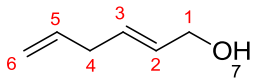


Le chlorure d'allyle (3.0 mL, 37.5 mmol, 1.5 eq.), l'alcool propargylique (1.5 mL, 25 mmol), CuCl (50 mg, 0.5 mmol, 0.02 eq.), Na_2SO_3 (1.6 g, 12.5 mmol, 0.5 eq.) et K_2CO_3 (3.4 g, 25 mmol, 1 eq.) sont solubilisés dans H_2O (30 mL). Le mélange réactionnel est agité à 30 °C pendant 4 h avant d'être traité avec une sol. 1N HCl. La phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (x3) et la phase organique est séchée sur $MgSO_4$, puis concentrée à l'évaporateur rotatif.

(1.56 g, 65% ; huile incolore)

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : en accord avec la littérature [182], δ 5.82 (ddt, *J* = 16.9 Hz ; 10.1 Hz ; 5.3 Hz, 1H, H5), 5.32 (dq, *J* = 16.9 Hz ; 1.8 Hz, 1H, Ha-6), 5.14 (dq, *J* = 10.1 Hz ; 1.8 Hz, 1H, Hb-6), 4.30 (m, 2H, H1), 3.02 (m, 2H, H4), 1.54 (sl, 1H, H7)

E-hexa-2,5-dièn-1-ol **23** (à partir de **24**)

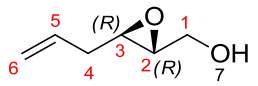


A une solution de $LiAlH_4$ (391 mg, 10.3 mmol, 1.2 eq.) dans THF (15 mL) refroidie à 0 °C, est ajoutée goutte à goutte une solution de **24** (830 mg, 8.6 mmol) dans THF (5 mL). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 30 min, puis à 70 °C pendant 2 h. Il est ensuite refroidi à 0 °C avant d'être traité goutte à goutte par une sol. sat. NH_4Cl. Le résidu obtenu est filtré sur Whatman et rincé avec Et_2O. La phase aqueuse est extraite avec Et_2O (x2), puis la phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif.

(625 mg, 74%, huile jaune pâle)

____

(2*R*, 3*R*)-2,3-epoxyhex-5-èn-1-ol **25**



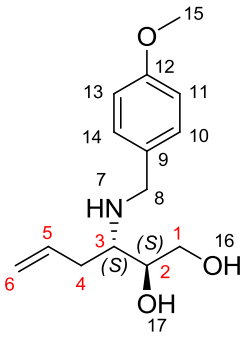
CH_2Cl_2 (20 mL) est ajouté à du tamis moléculaire 4 Å en poudre (préalablement activé au décapeur thermique sous vide), puis refroidi à -20 °C. D(-)DIPT (180 mg, 0.77 mmol, 0.12 eq.), Ti(O*i*Pr)$_4$ (0.189 mL, 0.64 mmol, 0.1 eq.) sont ajoutés. Puis TBHP (1.43 mL, 12.8 mmol, 2 eq.) est ajouté goutte à goutte sur une durée de 5 min. Le mélange réactionnel est agité à -20 °C pendant 30 min, puis une solution de **23** (625 mg, 6.3 mmol) dans CH_2Cl_2 (20 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à -20 °C pendant 24 h, puis traité avec un mélange de sol. 10% NaOH sat. en NaCl et d'Et_2O. Il est ensuite réchauffé à 10 °C et un mélange $MgSO_4$/célite est ajouté. Le mélange réactionnel est agité à 10 °C pendant 15 min avant d'être filtré sur célite et concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2).

(254 mg, 35% ; huile incolore)

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : en accord avec la littérature [184], δ 5.83 (dt, *J* = 17.0 Hz ; 10.2 Hz ; 6.6 Hz, 1H, H5), 5.17 (dq, *J* = 17.0 Hz ; 1.6 Hz, 1H, Ha-6), 5.12 (dq, *J* = 10.2 Hz ; 1.8 Hz, 1H, Hb-6), 3.94 (ddd, *J* = 12.6 Hz ; 5.4 Hz ; 2.4 Hz, 1H, Ha-1), 3.66 (ddd, *J* = 12.6 Hz ; 7.3 Hz ; 4.2 Hz, 1H, Hb-1), 3.07 (td, *J* = 5.4 Hz ; 2.4 Hz, 1H, H3), 2.98 (td, *J* = 4.2 Hz ; 2.4 Hz, 1H, H2), 2.38 (m, 2H, H4), 1.64 (dd, *J* = 7.3 Hz ; 5.4 Hz, 1H, H7)

____

(2*S*, 3*S*)-3-[(4-méthoxybenzyl)amino]-hex-5-èn-1,2-diol **26**

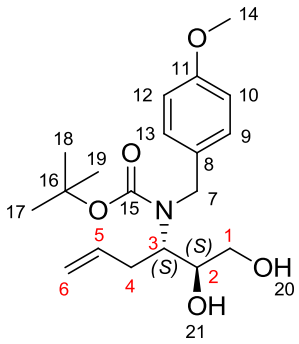


A une solution de **25** (114 mg, 1 mmol) dans CH_2Cl_2 (1.5 mL), est ajouté Ti(O*i*Pr)$_4$ (0.888 mL, 3 mmol, 3 eq.). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 5 min, puis une solution de *para*-méthoxybenzylamine (0.260 mL, 2 mmol, 2 eq.) dans CH_2Cl_2 (1.5 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à 40 °C pendant 48 h, puis traité avec une sol. 10% NaOH sat. en NaCl. Il est ensuite filtré sur célite et rincé avec CH_2Cl_2. La phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (x3). La phase organique est lavée avec une sol. 1N HCl, puis séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Les phases aqueuses sont rassemblées et le pH est amené à 9 avec une sol. 2N NaOH. Puis elles sont extraites avec CH_2Cl_2 (x2). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le résidu est dissous dans Et_2O et de la carboglace est ajoutée pour faire précipiter la *para*-méthoxybenzylamine sous forme de carbonate. Le précipité est filtré et lavé avec Et_2O et le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif.

(145 mg, 58% ; huile incolore)

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.23 (m, 2H, H10 + H14), 6.88 (m, 2H, H11 + H13), 5.74 (ddt, *J* = 16.7 Hz ; 9.5 Hz ; 7.1 Hz, 1H, H5), 5.15-5.09 (m, 2H, H6), 3.79 (s, 3H, H15), 3.77-3.62 (m, 5H, H1-2 + H8), 3.03 (m, 1H, H16 ou H17), 2.95 (m, 1H, H17 ou H16), 2.82 (m, 1H, H3), 2.28 (m, 2H, H4)

(2*S*,3*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonyl-(4-méthoxybenzyl)-amino]-hex-5-èn-1,2-diol **27**

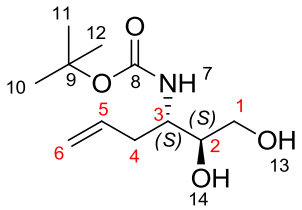


A une solution de **26** (2.7 g, 8.8 mmol) dans MeOH (40 mL), sont ajoutés Boc_2O (5 mL, 22 mmol, 2.5 eq.) et $NaHCO_3$ (2.22 g, 26.4 mmol, 3 eq.). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 4 h, puis filtré sur Whatman et concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1).

(2.22 g, 72% ; huile incolore)

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : en accord avec la littérature [184], δ 7.17 (m, 2H, H9 + H13), 6.86 (m, 2H, H10 + H12), 5.70 (dt, *J* = 16.9 Hz ; 9.9 Hz ; 7.0 Hz, 1H, H5), 5.10-502 (m, 2H, H6), 4.30 (m, 2H, H1), 3.90-3.33 (m, 5H, H2-3 + H7 + H20 ou H21), 3.80 (s, 3H, H14), 2.80 (sl, 1H, H21 ou H20), 2.57 (m, 2H, H4), 1.49 (s, 9H, H17-19)

(2*S*,3*S*)-3-[*tert*-butoxycarbonylamino]-hex-5-èn-1,2-diol **30**



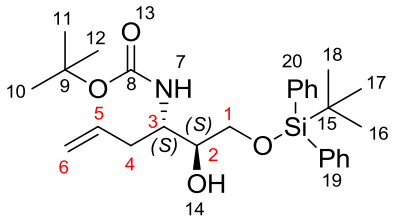
A une solution de Ti(O*i*Pr)$_4$ (0.213 mL, 0.72 mmol, 1 eq.) dans toluène (1.0 mL), est ajouté Me_3SiN_3 (0.190 mL, 1.44 mmol, 2 eq.). Le mélange réactionnel est agité à 110 °C pendant 24 h, puis une solution de **23** (82 mg, 0.72 mmol) dans toluène (1.0 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à 110 °C pendant 2h30, avant d'être refroidi à TA et traité avec une sol. 10% NaOH sat. en NaCl. Le solide est filtré sur Whatman et rincé au CH_2Cl_2. La phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (x2) et la phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel (2*S*, 3*S*)-3-(azido)-hex-5-èn-1,2-diol **28** est engagé tel quel dans l'étape suivante.

A une solution de **28** (0.72 mmol) dans THF (2 mL), sont ajoutés PPh_3 (320 mg, 1.22 mmol, 1.7 eq.) et H_2O (0.103 mL, 5.76 mmol, 8 eq.). Le mélange réactionnel est agité à 45 °C pendant 40 h, puis concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est solubilisé dans dioxane (1 mL) et Boc_2O (0.182 mL, 0.79 mmol, 1.1 eq.) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 16 h, puis concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (CH_2Cl_2/MeOH 95/5).

(61 mg, 37% ; huile incolore)

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 5.83 (ddt, *J* = 16.5 Hz ; 10.6 Hz ; 7.2 Hz, 1H, H5), 5.21-5.15 (m, 2H, H6), 4.59 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H7), 3.74-3.57 (m, 3H, Ha-1 + H3 + H13 ou H14), 3.43-3.30 (m, 2H, Hb-1 + H2), 2.64 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H14 ou H13), 2.55 (m, 1H, Ha-4), 2.34 (m, 1H, Hb-4), 1.45 (s, 9H, H10-12)

(2*S*,3*S*)-1-[*tert*-butyldiphénylsilyloxy]-3-[*tert*-butoxycarbonylamino]-hex-5-èn-2-ol **33**



84

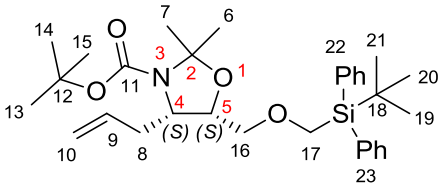
A une solution de **30** (378 mg, 1.63 mmol) dans DMF (9 mL), sont ajoutés l'imidazole (244 mg, 3.6 mmol, 2.2 eq.) et TBDPSCl (0.468 mL, 1.8 mmol, 1.1 eq.). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 16 h, puis traité avec une sol. sat. NH_4Cl et Et_2O. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec Et_2O (x3). La

phase organique est lavée avec H_2O (x4), puis séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1).

(670 mg, 91% ; huile incolore)

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.69-7.66 (m, 4H, H19), 7.46-7.37 (6H, H19 + H20), 5.79 (ddt, *J* = 16.8 Hz ; 9.7 Hz ; 7.2 Hz, 1H, H5), 5.08-5.04 (m, 2H, H6), 4.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H7), 3.74-3.70 (m, 4H, H1-3), 2.87 (sl, 1H, H14), 2.31 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H4), 1.40 (s, 9H, H10-12), 1.08 (s, 9H, H16-18)

(4*S*,5*S*)-4-(allyl)-3-(*tert*-butoxycarbonyl)-5-(*tert*-butyldiphénylsilyoxymethyl)-2,2-(diméthyl)-oxazolidine **34**

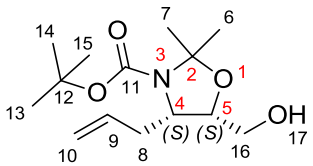


A une solution de **33** (100 mg, 0.23 mmol) dans toluène (3 mL), sont ajoutés APTS (3 mg, 0.014 mmol, 0.06 eq.) et 2,2-diméthoxypropane (0.283 mL, 2.3 mmol, 10 eq.). Le mélange réactionnel est agité à 110 °C pendant 4 h, puis traité avec une sol. sat. $NaHCO_3$. Les phases sont séparées et la phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 95/5).

(95 mg, 82% ; huile jaune)

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.69-7.66 (m, 4H, H22), 7.44-7.37 (m, 6H, H22 + H23), 5.90-5.71 (m, 1H, H9), 4.98-4.92 (m, 2H, H10), 4.18-3.77 (m, 4H, H4-5 + H16), 2.41 (m, 1H, Ha-8), 2.23 (m, 1H, Hb-8), 1.52 (s, 3H, H6), 1.48 (s, 9H, H13-15), 1.44 (s, 3H, H7), 1.07 (s, 9H, H19-21)

(4*S*, 5*S*)-4-(allyl)-3-(*tert*-butoxycarbonyl)-5-(hydroxyméthyl)-2,2-(diméthyl)-oxazolidine **35**

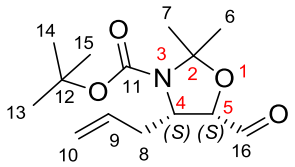


A une solution de **34** (635 mg, 1.24 mmol) dans THF (10 mL), est ajouté goutte à goutte TBAF (2.49 mL, 2.48 mmol, 2 eq.). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 1 h, avant d'être concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu est re-solubilisé dans CH_2Cl_2 et lavé avec une sol. sat. NH_4Cl. La phase organique est séchée avec $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2).

(265 mg, 79% ; huile jaune)

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 5.91-5.73 (m, 1H, H9), 5.15-5.05 (m, 2H, H10), 4.21 (dt, *J* = 7.0 Hz ; 5.1 Hz, 1H, H5), 4.12-3.92 (m, 1H, H4), 3.88-3.73 (m, 2H, H16), 2.45-2.30 (m, 2H, H8), 1.75 (dd, *J* = 7.3 Hz ; 5.2 Hz, 1H, H17), 1.48 (s, 9H, H13-15), 1.43 (s, 6H, H6-7)

(4*S*, 5*S*)-4-(allyl)-3-(*tert*-butoxycarbonyl)-5-(formyl)-2,2-(diméthyl)-oxazolidine **36**

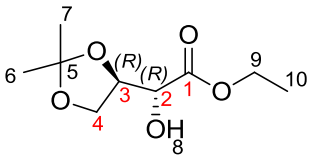


A un mélange DMSO (0.171 mL, 2.4 mmol, 6 eq.)/ CH_2Cl_2 (2 mL) refroidi à -78 °C et placé sous N_2, est ajouté goutte à goutte $(COCl)_2$ (0.102 mL, 1.2 mmol, 3 eq.). Le mélange réactionnel est agité à -78 °C pendant 40 min, puis une solution de **35** (100 mg, 0.4 mmol) dans CH_2Cl_2 (1 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à -78 °C pendant 40 min, puis NEt_3 (0.278 mL, 2.0 mmol, 5 eq.) est ajoutée. Le mélange réactionnel revient lentement à TA et est agité pendant 20 min à TA. Il est ensuite traité avec une sol. sat. NH_4Cl. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (x3). La phase organique est lavée avec une sol. sat. NaCl, puis séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1).

(60 mg, 56% ; huile jaune)

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 9.76 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, H16), 5.73 (dt, *J* = 17.2 Hz ; 10.2 Hz ; 7.0 Hz, 1H, H9), 5.13-5.02 (m, 2H, H10), 4.07-3.80 (m, 2H, H4-5), 2.57-2.34 (m, 2H, H8), 1.48 (s, 15H, H13-15 + H6-7)

Ethyl (2*R*, 3*R*)-3,4-*O*-isopropylidène-2,3,4-trihydroxy-butanoate **37**



A une solution d'acide D-isoascorbique (20 g, 113 mmol) dans de l'acétone (100 mL) préalablement séchée sur tamis moléculaire 3 Å et distillée, est ajouté $CuSO_4$ anhydre (36 g, 226 mmol, 2 eq.). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 24 h, puis $CuSO_4$ anhydre (36 g, 226 mmol, 2 eq.) est à nouveau ajouté. Le mélange réactionnel est agité 24 h avant d'être filtré et concentré à l'évaporateur rotatif. L'acide 3,4-O-isopropylidene-D-isoascorbique est obtenu presque quantitativement. Il est ensuite dissous dans une sol. aqueuse 2.4 M K_2CO_3 (120 mL, 289 mmol). Cette solution est refroidie dans un bain de glace et H_2O_2 (35 mL) est ajouté lentement. Le mélange réactionnel est agité pendant la nuit puis concentrée à l'évaporateur rotatif. Le solide humide est extrait avec EtOH chaud, puis filtré. Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif. Le sel obtenu est solubilisé dans de l'acétonitrile (100 mL) et EtI (12 mL, 150 mmol, 1.3 eq.) est ajouté. Le mélange réactionnel est porté au reflux pendant 24 h, puis filtré et concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éther de pétrole/AcOEt 8/2).

(9.4 g, 40% ; huile orange)

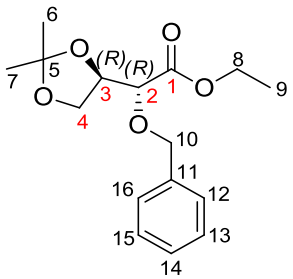
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 4.32 (td, *J* = 6.6 Hz ; 5.3 H, 1H, H3), 4.27 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, H9), 4.25 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H2), 4.05 (dd, *J* = 8.6 Hz ; 5.5 Hz, 1H, Ha-4), 4.0 (dd, *J* = 8.6 Hz ; 6.6 Hz, 1H, Hb-4), 2.92 (sl, 1H, H8), 1.43 (s, 3H, H6), 1.35 (s, 3H, H7), 1.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, H10)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 172.0 (C1), 109.9 (C5), 77.0 (C3), 71.0 (C2), 65.0 (C4), 61.9 (C9), 26.3 (C6), 25.1 (C7), 14.1 (C10)

$[\alpha]^{20}_D$ = -29.8 (c = 0.01, $CHCl_3$) (litt. -29.1 (c = 1.565, MeOH)[203])

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{18}H_{32}NaO_{10}$: 431.1893 $(2M+Na)^+$, masse trouvée 431.1876

Ethyl (2*R*, 3*R*)-2-*O*-benzyl-3,4-*O*-isopropylidène-2,3,4-trihydroxybutanoate **38**



A une solution de **37** (4 g, 19.6 mmol) dans DMF (64 mL) sont ajoutés BnBr (4.66 mL, 39.2 mmol, 2 eq.) et Cs_2CO_3 (11.3 g, 58.8 mmol, 3 eq.) sous N_2. Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 36 h, puis traité avec H_2O et concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu est resolubilisé dans AcOEt et lavé avec une sol. sat. de $NaHCO_3$. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1).

(4.9 g, 85% ; huile orange)

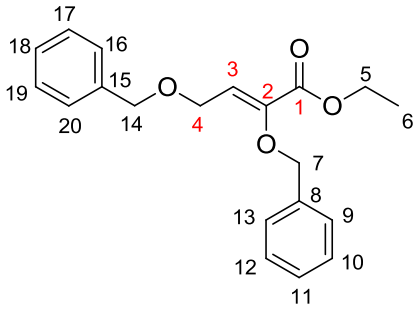
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.38-7.3 (m, 5H, H12-16), 4.69 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-10), 4.51 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-10), 4.35 (td, *J* = 5.9 Hz ; 5.1 Hz, 1H, H3), 4.27 (dq, *J* = 10.8 Hz ; 7.2 Hz, 1H, Ha-8), 4.21 (dq, *J* = 10.8 Hz ; 7.2 Hz, 1H, Hb-8), 4.05 (dd, *J* = 8.7 Hz ; 5.9 Hz, 1H, Ha-4), 4.01 (dd, *J* = 8.7 Hz ; 5.1 Hz, 1H, Hb-4), 3.96 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, H2), 1.43 (s, 3H, H6), 1.35 (s, 3H, H7), 1.3 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H9)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 170.4 (C1), 137.0 (C11), 128.4, 128.1, 128.0 (C12-16), 109.9 (C5), 79.1 (C2), 76.0 (C3), 72.9 (C10), 66.2 (C4), 61.1 (C8), 26.6 (C6), 25.3 (C7), 14.2 (C9)

$[\alpha]^{20}_D$ = +47 (c = 0.01, $CHCl_3$) (litt. +26.5 (c = 2.0, MeOH)[208])

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{16}H_{22}NaO_5$: 317.1365 $(M+Na)^+$, masse trouvée 317.1365

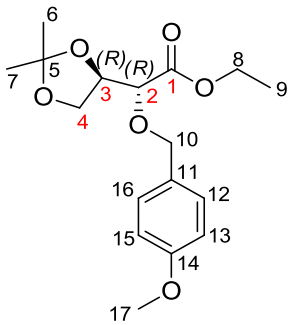
Ethyl 2,4-bis(benzyloxy)but-2-ènoate **39**



^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.41-7.30 (m, 10H, H9-13 + H16-20), 6.41 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H3), 4.90 (s, 2H, H7), 4.42 (s, 2H, H14), 4.29 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H5), 4.13 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, H4), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H6)

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) : δ 163.22 (C1), 145.38 (C2), 137.86 (C8), 136.61 (C15), 128.58, 128.43, 128.37, 128.27, 127.77, 127.68 (C9-13 + C16-20), 125.02 (C3), 74.10 (C7), 72.55 (C14), 64.35 (C4), 61.17 (C5), 14.19 (C6)

Ethyl (2*R*, 3*R*)-2-*O*-(4-methoxybenzyl)-3,4-*O*-isopropylidène-2,3,4-trihydroxybutanoate **40**



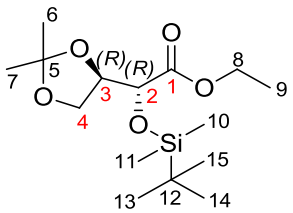
A une solution de **37** (1 g, 4.9 mmol) dans DMF (16 mL), sont ajoutés PMBCl (1 mL, 7.35 mmol, 1.5 eq.), Cs_2CO_3 (2.82 g, 14.7 mmol, 3 eq.), TBAI (90 mg, 0.245 mmol, 0.05 eq.) et du tamis moléculaire 4 Å sous N_2. Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 24 h, puis traité avec H_2O et concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu est resolubilisé dans AcOEt et lavé avec une sol. sat. de $NaHCO_3$. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1).

(683 mg, 43% ; huile jaune)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.28-7.26 (m, 2H, H13+ H15), 6.90-6.87 (m, 2H, H12 + H16), 4.61 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, Ha-10), 4.43 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, Hb-10), 4.32 (dt, *J* = 6.6 Hz ; 4.7 Hz, 1H, H3), 4.24 (2*q, *J* = 7.2 Hz, 2H, H8), 4.03 (dd, *J* = 8.8 Hz ; 6.6 Hz, 1H, Ha-4), 3.99 (dd, *J* = 8.8 Hz ; 4.7 Hz, 1H, Hb-4), 3.92 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H2), 3.31 (s, 3H, H17), 1.42 (s, 3H, H6), 1.34 (s, 3H, H7), 1.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H9),

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 170.56 (C1), 159.50 (C14), 129.84 (C13 + C15), 129.01 (C11), 113.81 (C12 + C16), 109.84 (C5), 78.73 (C2), 75.96 (C3), 72.46 (C10), 66.30 (C4), 61.06 (C8), 55.24 (C17), 26.60 (C6), 25.30 (C7), 14.22 (C9)

Ethyl (2*R*, 3*R*)-2-*O*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)-3,4-*O*-isopropylidène-2,3,4-trihydroxybutanoate **41**

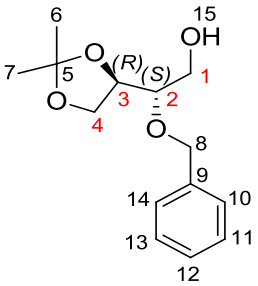


A une solution de **37** (0.484 g, 2.37 mmol) dans DMF (1 mL), sont ajoutés TBSCl (0.375 g, 2.49 mmol, 1.05 eq.) et imidazole (0.194 g, 2.84 mmol, 1.2 eq.) sous N_2. Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 48 h, puis traité avec H_2O et AcOEt. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (x2). La phase organique est lavée avec H_2O (x3), puis séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif.

(754 mg, 100% ; huile jaune)

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : en accord avec la littérature [216], δ 4.31-4.16 (m, 4H, H2-3 + H8), 3.99 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, H4), 1.43 (s, 3H, H6), 1.35 (s, 3H, H7), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H9), 0.91 (s, 9H, H13-15), 0.1 (s, 3H, H10), 0.09 (s, 3H, H11)

(2*S*,3*R*)-2-*O*-Benzyl-3,4-*O*-isopropylidène-2,3,4-trihydroxybutanol **42**



Une solution de **38** (1.68 g, 5.72 mmol) dans THF (3 mL), refroidie à 0°C, est ajoutée goutte à goutte à une suspension de $LiAlH_4$ (0.282 g, 7.43 mmol, 1.3 eq.) dans THF (10 mL). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 2 h, puis au reflux pendant 2 h. Il est ensuite refroidi à 0 °C et H_2O est ajoutée goutte à goutte, puis une sol. aqueuse 15% NaOH, puis H_2O. La pâte blanche est ensuite filtrée sur Whatman et rincée avec AcOEt (3x). Le filtrat est séché sur $MgSO_4$ et concentré à l'évaporateur rotatif.

(1.4 g, 97% ; huile incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.3 (m, 5H, H10-14), 4.69 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-8), 4.65 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-8), 4.19 (td, *J* = 6.5 Hz ; 5.8 Hz, 1H, H3) , 4.09 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 6.5 Hz, 1H, Ha-4), 3.86 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 5.8 Hz, 1H, Hb-4), 3.83 (dt, *J* = 11.8 Hz ; 4.2 Hz, 1H, Ha-1), 3.72 (ddd, *J* = 11.8 Hz ; 7.8 Hz ; 4.2Hz, 1H, Hb-1), 3.54 (dt, *J* = 6.5 Hz ; 4.2 Hz, 1H, H2), 2.05 (m, 1H, H15), 1.43 (s, 3H, H6), 1.36 (s, 3H, H7)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 137.9 (C9), 128.6, 128.0, 127.9 (C10-14), 109.3 (C5), 79.7 (C2), 75.9 (C3), 72.7 (C8), 66.9 (C4), 61.9 (C1), 26.6 (C7), 25.2 (C6)

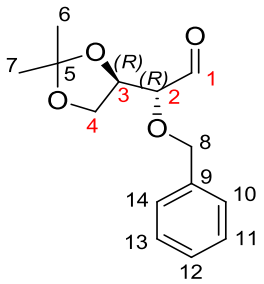
$[\alpha]^{20}_D$ = +24 (c=0.01, $CHCl_3$) (litt. +23.3 (c = 1.1, $CHCl_3$)[305])

---

[305] G. S. Rao *et al.*, *Tet. Asymmetry* **2010**, *21*, 1963-1970.

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{14}H_{20}NaO_4$: 275.1259 $(M+Na)^+$, masse trouvée 275.124

(2*R*,3*R*)-2-*O*-Benzyl-3,4-*O*-isopropylidène-2,3,4-trihydroxybutanal **43**



A une solution de **42** (0.7 g, 2.77 mmol) dans un mélange DMSO (12.6 mL) / CH_2Cl_2 (22.4 mL) refroidie à -20 °C, sont ajoutés DIPEA (2.29 mL, 13.9 mmol, 5 eq.) et le complexe trioxyde de soufre-pyridine (1.77 g, 11.1 mmol, 4 eq.). Le mélange réactionnel est agité à -20 °C pendant 1h30, puis quenché avec H_2O et extrait avec AcOEt (3x). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1).

(550 mg, 79% ; huile incolore)

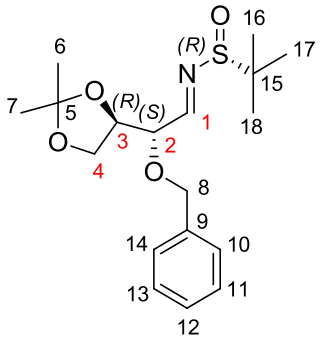
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 9.71 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H1), 7.40-7.31 (m, 5H, H10-14), 4.74 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-8), 4.62 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-8), 4.37 (td, *J* = 6.3 Hz ; 5.5 Hz, 1H, H3), 4.07 (dd, *J* = 8.6 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Ha-4), 3.94 (dd, *J* = 8.6 Hz ; 5.5 Hz, 1H, Hb-4), 3.83 (dd, *J* = 6.3 Hz ; 2.3 Hz, 1H, H2), 1.44 (s, 3H, H6), 1.36 (s, 3H, H7)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 201.3 (C1), 136.8 (C9), 128.6, 128.3, 128.2 (C10-14), 110.1 (C5), 83.1 (C2), 75.0 (C3), 73.4 (C8), 66.2 (C4), 26.5 (C6), 25.1 (C7)

$[\alpha]^{20}_D$ = +36.8 (c = 0.01, $CHCl_3$) (litt. +29.2 (c = 2.747, $CHCl_3$)[306])

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{14}H_{19}O_4$: 251.1283 $(M+H)^+$, masse trouvée 251.1289

(R_S, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-benzyloxy-3,4-isopropylidènedioxy)butylidène-*tert*-butanesulfinamide **45-R_S**



[306] A. Dondoni *et al.*, *Tet. Lett.* **1985**, *26*, 5477-5480.

A une solution de **43** (722 mg, 2.89 mmol) et de (*R*)-2-methylpropane-2-sulfinamide (525 mg, 4.33 mmol, 1.5 eq.) dans CH_2Cl_2 (35 mL) est ajouté Ti(O*i*Pr)$_4$ (4.28 mL, 14.4 mmol, 5 eq.). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant la nuit, puis refroidi à 0 °C avant d'ajouter H_2O. Il est filtré sur Whatman et rincé avec AcOEt. Le filtrat est lavé avec une sol. sat. de NaCl et extrait avec AcOEt (3x). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice préalablement conditionnée avec 1% NEt_3 (cyclohexane/AcOEt 8/2).

(650 mg, 64% ; huile jaune pâle)

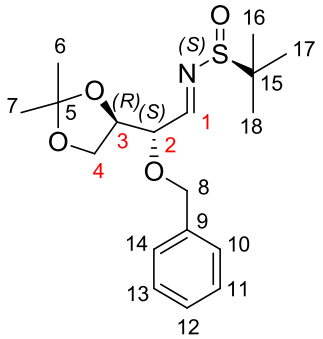
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 8.12 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H1), 7.32-7.39 (m, 5H, H10-14), 4.74 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-8), 4.52 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-8), 4.34 (td, *J* = 6.3 Hz ; 5.5 Hz, 1H, H3), 4.21 (dd, *J* = 6.3 Hz ; 4.8 Hz, 1H, H2), 4.08 (dd, *J* = 8.6 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Ha-4), 3.96 (dd, *J* = 8.6 Hz ; 5.5 Hz, 1H, Hb-4), 1.43 (s, 3H, H6), 1.34 (s, 3H, H7), 1.25 (s, 9H, H16-18)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 167.4 (C1), 137.2 (C9), 128.5, 128.1, 128.0 (C10-14), 110.0 (C5), 80.2 (C2), 76.3 (C3), 72.6 (C8), 66.5 (C4), 57.0 (C15), 26.5 (C6), 25.2 (C7), 22.5 (C16-18)

$[\alpha]^{20}_D$ = -100.8 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{18}H_{28}NO_4S$: 354.1739 $(M+H)^+$, masse trouvée 354.1741

(S_S, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-benzyloxy-3,4-isopropylidènedioxy)butylidène-*tert*-butanesulfinamide **45-S_S**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **45- R_S** en partant de **43** (100 mg, 0.4 mmol) et du (*S*)-(-)-2-méthyl-2-propanesulfinamide (72.6 mg, 0.599 mmol, 1.5 eq.) Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice préalablement conditionnée avec 1% NEt_3 (cyclohexane/AcOEt 8/2).

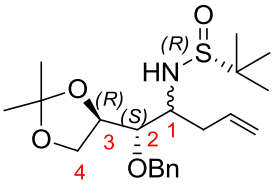
(115 mg, 81% ; huile jaune pâle)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 8.04 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H1), 7.3-7.39 (m, 5H, H10-14), 4.70 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-8), 4.53 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-8), 4.29 (ddd, *J* = 7.3 Hz ; 6.5 Hz ; 4.8 Hz, 1H, H3), 4.16 (dd, *J* = 7.3 Hz ; 5.5 Hz, 1H, H2), 4.10 (dd, *J* = 8.7 Hz ; 6.5 Hz, 1H, Ha-4), 3.96 (dd, *J* = 8.7 Hz ; 4.8 Hz, 1H, Hb-4), 1.42 (s, 3H, H6), 1.32 (s, 3H, H7), 1.24 (s, 9H, H16-18)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 167.1 (C1), 137.1 (C9), 128.5, 128.1, 128.1 (C10-14), 110.0 (C5), 81.0 (C2), 75.6 (C3), 72.6 (C8), 66.8 (C4), 57.3 (C15), 26.7 (C6), 25.1 (C7), 22.5 (C16-18)

$[\alpha]^{20}_D$ = +186.9 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{18}H_{28}NO_4S$: 354.1739 $(M+H)^+$, masse trouvée 354.1729



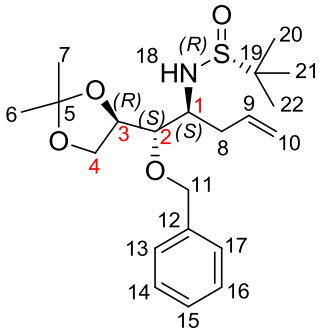
Méthode A

Au bromure d'allyle magnésium (1 M dans Et_2O, 3.39 mL, 3.39 mmol, 3 eq.) refroidi à -20°C et placé sous azote, est ajouté goutte à goutte une solution de R_S-**45** (400 mg, 1.13 mmol) dans le toluène (15 mL). Le mélange réactionnel est agité à -20 °C pendant 2 h, puis quenché avec H_2O. Il est filtré sur Whatman et rincé avec de AcOEt. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (x2). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 7/3). Un mélange 93/7 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **46**/**47** est obtenu (372 mg, 83% ; huile incolore).

46 (R_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 7.657 min, 93% (HPLC)

47 (R_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 11.459 min, 7% (HPLC)

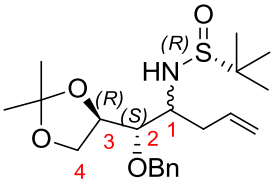
Caractérisation du diastéréoisomère majoritaire **46** :



^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.38-7.30 (m, 5H, H13-17), 5.82 (dddd, *J* = 16.6 Hz ; 12.0 Hz ; 9.3 Hz ; 7.3 Hz, 1H, H9), 5.20 (m, 2H, H10), 4.70 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-11), 4.64 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-11), 4.23 (q, *J* = 6.3 Hz, 1H, H3), 4.06 (dd, *J* = 8.1 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Ha-4), 3.90 (dd, *J* = 8.1 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Hb-4), 3.62 (m, 1H, H2), 3.59 (m, 1H, H1), 3.48 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H18), 2.53 (m, 2H, H8), 1.44 (s, 3H, H6), 1.35 (s, 3H, H7), 1.22 (s, 9H, H20-22)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 138.1 (C12), 134.4 (C9), 128.4, 127.8, 127.7 (C13-17), 119.3 (C10), 109.2 (C5), 81.3 (C2), 75.7 (C3), 73.9 (C11), 66.8 (C4), 56.2 (C1), 56.1 (C19), 36.2 (C8), 26.6 (C6), 25.3 (C7), 22.7 (C20-22)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{21}H_{34}NO_4S$: 396.2209 $(M+H)^+$, masse trouvée 396.2195



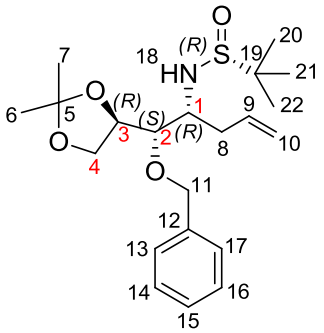
Méthode B

A une solution de R_S-**45** (46 mg, 0.13 mmol) dans THF (0.1 mL) refroidi à -78 °C et placée sous azote, est ajouté un mélange de bromure d'allyle magnésium (1 M dans Et_2O, 0.39 mL, 0.39 mmol, 3 eq.) et de TMEDA (0.039 mL, 0.26 mmol, 2.05 eq.) dans THF (0.1 mL). Le mélange réactionnel est agité à -78 °C pendant 3 h, puis quenché avec une sol. sat. NH_4Cl. La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (x3). La phase organique est lavée avec une sol. sat. NaCl, puis séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2). Un mélange 38/62 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **46**/**47** est obtenu (44 mg, 85% ; huile incolore).

46 (R_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 7.657 min, 38% (HPLC)

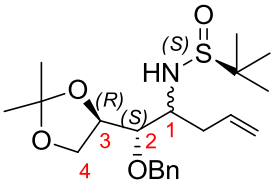
47 (R_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 11.459 min, 62% (HPLC)

Caractérisation du diastéréoisomère majoritaire **47** :



^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.29 (m, 5H, H13-17), 5.82 (m, 1H, H9), 5.09 (m, 2H, H10), 4.67 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-11), 4.59 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-11), 4.40 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H18), 4.23 (dt, *J* = 8.6 Hz ; 6.3 Hz, 1H, H3), 4.12 (dd, *J* = 8.4 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Ha-4), 3.73 (dd, *J* = 8.4 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Hb-4), 3.72 (m, 1H, H2), 3.61 (m, 1H, H1), 2.48 (m, 1H, Ha-8), 2.25 (m, 1H, Hb-8), 1.44 (s, 3H, H6), 1.35 (s, 3H, H7), 1.21 (s, 9H, H20-22)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 137.8 (C12), 135.4 (C9), 128.5, 127.9, 127.8 (C13-17), 117.1 (C10), 109.7 (C5), 81.3 (C2), 75.0 (C4), 73.2 (C11), 68.1 (C4), 58.1 (C1), 56.0 (C19), 36.2 (C8), 26.6 (C6), 25.3 (C7), 22.8 (C20-22)

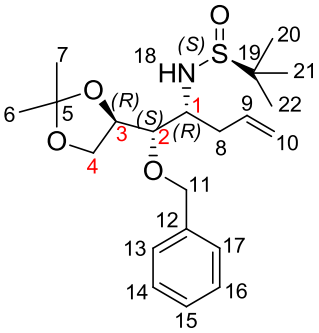


La méthode A est appliquée en partant de S_S-**45** (351 mg, 0.993 mmol). Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle 7/3). Un mélange 13/87 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **48**/**49** est obtenu (307 mg, 78% ; huile incolore).

48 (S_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 10.089 min, 13% (HPLC)

49 (S_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 7.946 min, 87% (HPLC)

Caractérisation du diastéréoisomère majoritaire **49** :

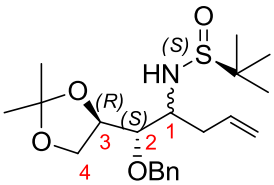


^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.38-7.30 (m, 5H, H13-17), 5.85 (dddd, *J* = 16.6 Hz ; 10.7 Hz ; 8.2 Hz ; 5.8 Hz, 1H, H9), 5.12 (m, 2H, H10), 4.65 (s, 2H, H11), 4.18 (dt, *J* = 8.2 Hz ; 6.3 Hz, 1H, H3), 4.05 (dd, *J* = 8.2 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Ha-4), 3.82 (dd, *J* = 8.2 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Hb-4), 3.65 (dd, *J* = 6.3 Hz ; 1.2 Hz, 1H, H2), 3.55 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, H18), 3.52 (m, 1H, H1), 2.70 (m, 1H, Ha-8), 2.52 (m, 1H, Hb-8), 1.41 (s, 3H, H6), 1.32 (s, 3H, H7), 1.21 (s, 9H, H20-22)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 137.8 (C12), 134.7 (C9), 128.5, 127.9, 127.7 (C13-17), 118.0 (C10), 108.7 (C5), 80.0 (C2), 75.9 (C3), 74.1 (C11), 67.1 (C4), 58.0 (C1), 56.2 (C19), 38.3 (C8), 26.7 (C6), 25.1 (C7), 22.6 (C20-22)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{21}H_{34}NO_4S$: 396.2209 $(M+H)^+$, masse trouvée 396.2207

———

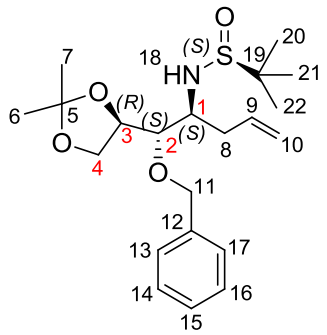


La méthode B est appliquée en partant de de S_S-**45** (58 mg, 0.164 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2). Un mélange 97/3 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **48**/**49** est obtenu (47 mg, 72% ; huile jaune pâle).

48 (S_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 10.089 min, 97% (HPLC)

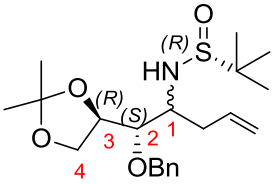
49 (S_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 7.946 min, 3% (HPLC)

Caractérisation du diastéréoisomère majoritaire **48** :



^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.34-7.29 (m, 5H, H13-17), 5.81 (dddd, *J* = 17.1 Hz ; 10.3 Hz ; 7.1 Hz ; 7.0 Hz, 1H, H9), 5.08 (dq, *J* = 17.1 Hz ; 1.6 Hz, 1H, Ha-10), 5.06 (m, 1H, Hb-10), 4.75 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-11), 4.67 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-11), 4.14 (dt, *J* = 7.0 Hz ; 6.3 Hz, 1H, H3), 4.06 (dd, *J* = 8.1 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Ha-4), 3.90 (dd, *J* = 7.0 Hz ; 3.0 Hz, 1H, H2), 3.80 (dd, *J* = 8.1 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Hb-4), 3.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H18), 3.63 (m, 1H, H1), 2.37 (ddd, *J* = 7.1 Hz ; 7.0 Hz ; 1.1 Hz, 2H, H8), 1.43 (s, 3H, H7), 1.35 (s, 3H, H6), 1.19 (s, 9H, H20-22)

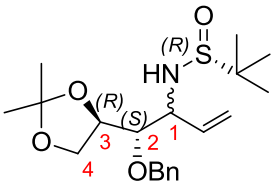
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 138.2 (C12), 135.3 (C9), 128.5, 127.8, 127.8 (C13-17), 117.2 (C10), 109.0 (C5), 82.6 (C2), 75.7 (C3), 74.0 (C11), 67.4 (C4), 57.7 (C1), 56.2 (C19), 34.6 (C8), 26.6 (C7), 25.4 (C6), 22.6 (C20-22)



(*R*)-2-méthylpropane-2-sulfinamide (130 mg, 1.08 mmol, 0.9 eq.) et l'indium en poudre (152 mg, 1.35 mmol, 1.1 eq.) sont introduits dans un ballon et placés sous N_2. Une solution de **43** (300 mg, 1.2 mmol) dans THF (2.2 mL) et Ti(O*i*Pr)$_4$ (0.64 mL, 2.16 mmol, 1.8 eq.) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 1 h, puis le bromure d'allyle (0.145 mL, 1.68 mmol, 1.4 eq.) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité à 60 °C pendant 5 h, puis quenché avec un mélange d'acétate d'éthyle/sol. sat. NaCl (4/1). Il est ensuite filtré sur célite et rincé avec AcOEt. Le filtrat est séché sur $MgSO_4$ et concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2). Un mélange 87/12 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **46**/**47** est obtenu (327 mg, 69% ; huile incolore).

46 (R_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(allyl)-(3,4-isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 7.657 min, 87% (HPLC)

47 (R_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 11.459 min, 12% (HPLC)

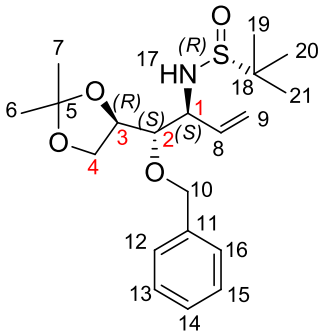


La méthode B est appliquée à partir de de R_S-**45** (30 mg, 0.0849 mmol) et de bromure de vinyle magnésium (1 M dans Et_2O). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 6/4). Un mélange 97/3 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **50**/**51** est obtenu (24 mg, 76% ; huile incolore).

50 (R_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(vinyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 6.151 min ; 97% (HPLC)

51 (R_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(vinyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 8.312 min ; 3% (HPLC)

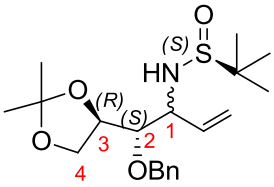
Caractérisation du diastéréoisomère majoritaire **50** :



^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.38-7.28 (m, 5H, H12-16), 5.99 (ddd, *J* = 17.3 Hz ; 10.3 Hz ; 7.9 Hz, 1H, H8), 5.38 (dt, *J* = 17.3 Hz ; 1.1 Hz, 1H, Ha-9), 5.28 (dt, *J* = 10.3 Hz ; 1.1 Hz, 1H, Hb-9), 4.73 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-10), 4.65 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-10), 4.10 (q, *J* = 6.2 Hz, 1H, H3), 4.01 (dd, *J* = 8.2 Hz ; 6.2 Hz, 1H, Ha-4), 3.98 (m, 1H, H1), 3.89 (dd, *J* = 8.2 Hz ; 6.2 Hz, 1H, Hb-4), 3.75 (dd, *J* = 6.2 Hz ; 3.0 Hz, 1H, H2), 3.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H17), 1.44 (s, 3H, H6), 1.33 (s, 3H, H7), 1.16 (s, 9H, H19-21)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 137.91 (C11), 135.78 (C8), 128.54, 127.95, 127.70 (C12-16), 118.6 (C9), 108.83 (C5), 82.70 (C2), 76.18 (C3), 74.40 (C10), 66.36 (C4), 61.27 (C1), 56.00 (C18), 26.65 (C6), 25.10 (C7), 22.49 (C19-21)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{20}H_{32}NO_4S$: 382.2052 $(M+H)^+$, masse trouvée 382.2052

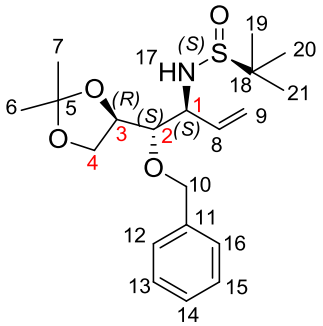


La méthode A est appliquée à partir de S_S-**45** (25 mg, 0.0707 mmol) et de bromure de vinyle magnésium (1 M dans Et_2O). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 6/4). Un mélange 91/9 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **52**/**53** est obtenu (21 mg, 80% ; huile incolore).

52 (S_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(vinyl)-3,4-(isopropylidène))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 7.151 min ; 91% (HPLC)

53 (S_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(vinyl)-3,4-(isopropylidène))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 6.472 min ; 9% (HPLC)

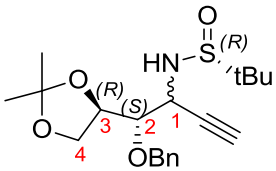
Caractérisation du diastéréoisomère majoritaire **52** :



^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.29-7.38 (m, 5H, H12-16), 5.81 (ddd, *J* = 17.4 Hz ; 10.3 Hz ; 7.8 Hz, 1H, H8), 5.35 (dt, *J* = 17.4 Hz ; 1.2 Hz, 1H, Ha-9), 5.29 (dt, *J* = 10.3 Hz ; 1.2 Hz, 1H, Hb-9), 4.75 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-10), 4.67 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-10), 4.18 (ddd, *J* = 7.8 Hz ; 5.4 Hz ; 4.0 Hz, 1H, H1), 4.16 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H, H3), 4.01 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 6.4 Hz, 1H, Ha-4), 3.87 (d, *J* = 5.4 Hz 1H, H17), 3.86 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 6.4 Hz, 1H, Hb-4), 3.79 (dd, *J* = 6.4 Hz ; 4.0 Hz, 1H, H2), 1.42 (s, 3H, H6), 1.34 (s, 3H, H7), 1.20 (s, 9H, H19-21)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 137.76 (C11), 134.6 (C8), 128.47, 127.91 (C12-16), 119.17 (C9), 108.89 (C5), 82.18 (C2), 75.90 (C3), 73.92 (C10), 66.64 (C4), 59.91 (C1), 55.57 (C18), 26.56 (C6), 25.43 (C7), 22.56 (C19-21)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{20}H_{32}NO_4S$: 382.2052 $(M+H)^+$, masse trouvée 382.2065

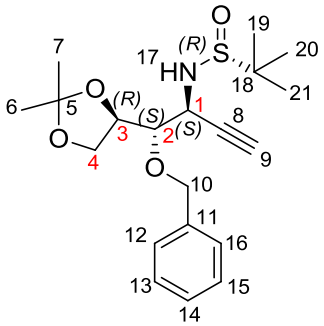


La méthode A est appliquée à partir de R_S-**45** (100 mg, 0.28 mmol) et de bromure d'éthynyle magnésium (0.5 M dans Et_2O). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 1/1). Un mélange 88/12 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **54**/**55** est obtenu (67 mg, 65% ; huile incolore).

54 (R_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(éthynyl)-3,4-(isopropylidène))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 5.363 min, 88% (HPLC)

55 (R_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(éthynyl)-3,4-(isopropylidène))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 5.803 min, 12% (HPLC)

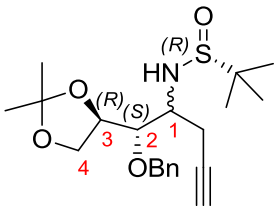
Caractérisation du diastéréoisomère majoritaire **54** :



^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.30 (m, 5H, H12-16), 4.78 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-10), 4.72 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-10), 4.33 (dt, *J* = 8.5 Hz ; 2.6 Hz, 1H, H1), 4.25 (q, *J* = 6.2 Hz, 1H, H3), 4.08 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 6.2 Hz, 1H, Ha-4), 3.96 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 6.2 Hz, 1H, Hb-4), 3.69 (m, 2H, H2 + H17), 2.50 (d, *J* = 2.6 Hz ; 1H, H9), 1.44 (s, 3H, H6), 1.35 (s, 3H, H7), 1.15 (s, 9H, H19-21)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 137.66 (C11), 128.61, 128.07, 127.79 (C12-16), 109.18 (C5), 82.49 (C2), 80.45 (C8), 75.94 (C3), 74.89 (C9), 74.71 (C10), 66.29 (C4), 56.37 (C15), 49.91 (C1), 26.69 (C6), 25.08 (C7), 22.46 (C19-21)

HRMS (ESI-QTOF) : masse calculée pour $C_{20}H_{30}NO_4S$: 380.1896 $(M+H)^+$, masse trouvée 380.1890

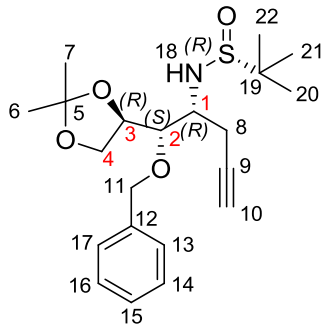


A une solution de R_S-**45** (25 mg, 0.0707 mmol) dans THF anhydre (0.7 mL) placée sous azote, est ajouté l'acide boronique allenyle pinacol ester (0.0191 mL, 0.106 mmol, 1.5 eq.). $ZnEt_2$ (20 %, 1 M, 0.0141 mL, 0.0141 mmol) est ajouté lentement sous la surface de la solution. Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 2 h, puis quenché avec H_2O. La pâte blanche obtenue est ensuite filtrée sur Whatman et rincée avec AcOEt. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (2x). La phase organique est lavée avec une sol. sat. NaCl, puis séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2) et un mélange 3/97 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **62**/**63** est obtenu (20 mg, 72% ; huile incolore).

62 (R_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-benzyloxy-1-propargyl-3,4-isopropylidène)butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 9.848 min, 3% (HPLC 60/40 MeCN/H_2O)

63 (R_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-benzyloxy-1-propargyl-3,4-isopropylidène)butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 11.024 min, 97% (HPLC 60/40 MeCN/H_2O)

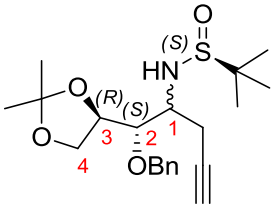
Caractérisation du diastéréoismère majoritaire **63** :



^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.30 (m, 5H, H13-17), 4.69 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, Ha-11), 4.62 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, Hb-11), 4.36 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H18), 4.23 (ddd, *J* = 8.6 Hz ; 6.3 Hz ; 6.0 Hz, 1H, H3), 4.11 (dd, *J* = 8.6 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Ha-4), 3.82 (dd, *J* = 8.6 Hz ; 2.8 Hz, 1H, H2), 3.76 (m, 1H, H1), 3.74 (dd, *J* = 8.6 Hz ; 6.0 Hz, 1H, Hb-4), 2.57 (ddd, *J* = 16.6 Hz ; 5.8 Hz ; 2.6 Hz, 1H, Ha-8), 2.44 (ddd, *J* = 16.6 Hz ; 8.0 Hz ; 2.6 Hz, 1H, Hb-8), 2.00 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H10), 1.45 (s, 3H, H6), 1.35 (s, 3H, H7), 1.23 (s, 9H, H20-22)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 137.52 (C12), 128.53, 128.06, 127.89 (C13-17), 109.71 (C5), 81.41 (C10), 80.38 (C9), 74.89 (C3), 73.70 (C11), 70.33 (C10), 67.77 (C4), 57.12 (C1), 56.11 (C19), 26.66 (C6), 25.22 (C7), 22.75 (C8), 22.75 (C20-22)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{21}H_{32}NO_4S$: 394.2052 $(M+H)^+$, masse trouvée 394.2051

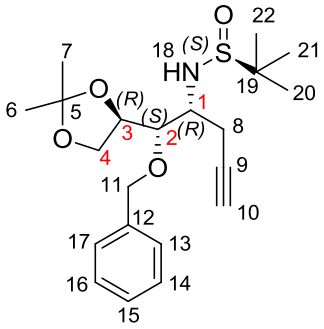


Le mode opératoire est identique à celui utilisé pour **62**/**63** en partant de S_S-**45** (25 mg, 0.0707 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2) et un mélange 18/82 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **64**/**65** (22 mg, 79% ; huile incolore).

64 (S_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-benzyloxy-1-propargyl-3,4-isopropylidène)butyl-*tert*-butanesulfinamide, 18% (RMN)

65 (S_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-benzyloxy-1-propargyl-3,4-isopropylidène)butyl-*tert*-butanesulfinamide, 82% (RMN)

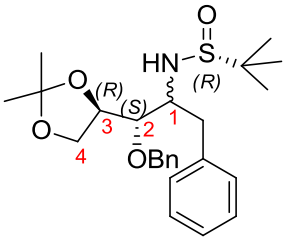
Caractérisation du diastéréoisomère majoritaire **65** :



^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.31 (m, 5H, H13-17), 4.72 (s, 2H, H11), 4.16 (ddd, *J* = 6.3 Hz ; 6.0 Hz ; 1.5 Hz, 1H, H3), 4.03 (dd, *J* = 8.2 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Ha-4), 3.98 (dd, *J* = 7.2 Hz ; 1.5 Hz, 1H, H2), 3.82 (dd, *J* = 8.2 Hz ; 6.0 Hz, 1H, Hb-4), 3.68 (m, 1H, H1), 3.46 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H18), 2.93 (ddd, *J* = 16.8 Hz ; 4.5 Hz ; 2.6 Hz, 1H, Ha-8), 2.58 (ddd, *J* = 16.8 Hz ; 10.6 Hz ; 2.6 Hz, 1H, Hb-8), 2.11 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H10), 1.43 (s, 3H, H6), 1.32 (s, 3H, H7), 1.21 (s, 9H, H20-22)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 137.67 (C12), 128.52, 128.10, 127.93 (C13-17), 108.88 (C5), 80.70 (C9), 79.53 (C2), 75.69 (C3), 75.15 (C11), 71.23 (C10), 66.96 (C4), 57.38 (C1), 56.44 (C19), 26.78 (C6), 25.22 (C7), 24.23 (C8), 22.58 (C20-22)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{21}H_{32}NO_4S$ 394.2052 $(M+H)^+$, masse trouvée 394.2061

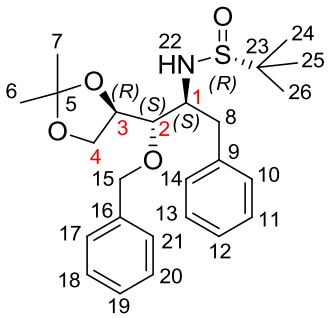


La méthode B est appliquée à partir de R_S-**45** (76 mg, 0.215 mmol) et de bromure de benzyle magnésium (1 M dans Et_2O). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 7/3). Un mélange 96/4 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **66**/**67** est obtenu (71 mg, 74% ; huile incolore).

66 (R_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(benzyl)-3,4-(isopropylidène))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 9.881 min, 96% (HPLC)

67 (R_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(benzyl)-3,4-(isopropylidène))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 13.667 min, 4% (HPLC)

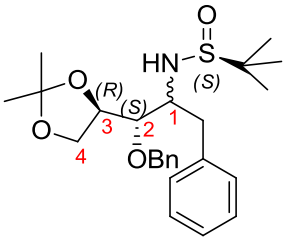
Caractérisation du diastéréoisomère majoritaire **66** :



^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.41-7.15 (m, 10H, H10-14 + H17-21), 4.58 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-15), 4.42 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-15), 4.23 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, H3), 4.04 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Ha-4), 3.83 (ddd, *J* = 10.3 Hz ; 7.3 Hz; 3.3 Hz, 1H, H1), 3.73 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 6.6 Hz, 1H, Hb-4), 3.57 (dd, *J* = 6.6 Hz ; 3.3 Hz, 1H, H2), 3.48 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H22), 3.12 (d, *J* = 7.3 Hz ; 10.3 Hz, 2H, H8), 1.46 (s, 3H, H6), 1.34 (s, 3H, H7), 1.17 (s, 9H, H24-26)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 137.87 (C16), 137.43 (C9), 129.95, 128.65, 128.38, 127.82, 127.9, 126.69 (C10-14 + C17-21), 109.24 (C5), 79.66 (C2), 75.61 (C3), 72.75 (C15), 67.30 (C4), 58.56 (C1), 56.18 (C23), 38.64 (C8), 26.61 (C6), 25.18 (C7), 22.62 (C24-26)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{25}H_{36}NO_4S$: 446.2365 $(M+H)^+$, masse trouvée 446.2367

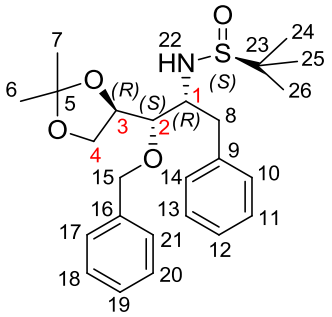


La méthode B est appliquée à partir de S_S-**45** (40 mg, 0.113 mmol) et de bromure de benzyle magnésium (1 M dans Et_2O). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 7/3). Un mélange 53/47 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **68**/**69** est obtenu (42 mg, 85% ; huile incolore).

68 (S_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(benzyl)-3,4-(isopropylidène))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 12.391 min, 53% (HPLC)

69 (S_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(benzyl)-3,4-(isopropylidène))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 10.154 min, 47% (HPLC)

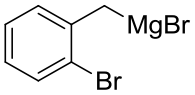
Caractérisation du diastéréoisomère minoritaire **69** :



^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.41-7.16 (m, 10H, H10-14 + H17-21), 4.67 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-15), 4.62 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-15), 4.15 (q, *J* = 6.3 Hz, 1H, H3), 4.01 (dd, *J* = 8.4 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Ha-4), 3.85 (m, 1H, H2), 3.80 (m, 1H, H1), 3.63 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H22), 3.53 (m, 1H, Hb-4), 3.37 (dd, *J* = 14.1 Hz ; 5.1 Hz, 1H, Ha-8), 2.99 (dd, *J* = 14.0 Hz ; 10.3 Hz, 1H, Hb-8), 1.29 (s, 3H, H6), 1.28 (s, 3H, H7), 1.21 (s, 9H, H24-26)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 138.15 (C16), 137.94 (C9), 129.23, 128.60, 128.53, 127.96, 127.66, 126.49 (C10-14 + C17-21), 108.59 (C5), 78.79 (C2), 76.42 (C3), 74.28 (C15), 67.70 (C4), 59.67 (C1), 56.39 (C23), 40.38 (C8), 26.54 (C6), 25.06 (C7), 22.62 (C24-26)

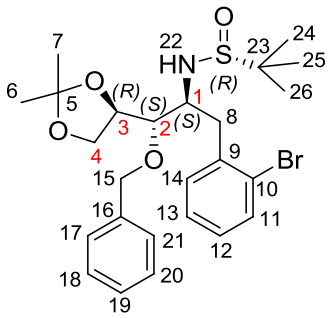
HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{25}H_{36}NO_4S$: 446.2365 $(M+H)^+$, masse trouvée 446.2353



Du magnésium en tournure (89.5 mg, 3.7 mmol, 1.3 eq.) et une bille de diiode sont placés dans un ballon bicol, avant de mettre sous azote. Et_2O anhydre (1 mL) est ajouté et le mélange réactionnel est agité pendant 30 min. Quelques gouttes d'une solution de bromure de benzyle (700 mg, 2.8 mmol) dans Et_2O anhydre (2 mL) sont introduites pour amorcer la réaction, puis une fois la réaction amorcée, la solution de bromure de benzyle est ajoutée en continu goutte à goutte.

La solution de bromure de 2-bromobenzyle magnésium est dosée à l'aide d'une solution 1M EtOH dans Et_2O anhydre et avec l'indicateur coloré 1,10-phénanthroline. 1,10-phénanthroline (1 mg) est d'abord fondue à l'aide d'un décapeur thermique et Et_2O anhydre (2.5 mL) est ajouté. La solution d'organomagnésien (0.250 mL) est ensuite ajoutée et le mélange réactionnel se colore en pourpre. Une solution 1M EtOH dans Et_2O anhydre est ajoutée goutte à goutte jusqu'à décoloration de la solution. La concentration de la solution d'organomagnésien obtenue est de 1 M.

(R_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(2-bromo-benzyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide **70**

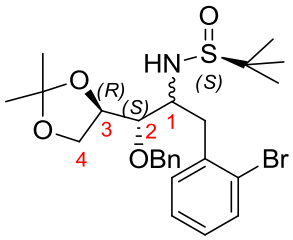


La méthode A est appliquée à partir de R_S-**45** (785 mg, 2.2 mmol) et de bromure de 2-bromobenzyle magnésium (1 M dans Et_2O) fraîchement synthétisé. Un mélange 60/40 des diastéréoisomères *anti*/*syn* **70**/**71** est obtenu. Ce mélange est purifié sur colonne de silice (éther de pétrole/AcOEt 6/4) et le diastéréoisomère **70** est obtenu (380 mg, 33% ; huile jaune).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.60 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H11), 7.33-7.26 (m, 5H, H17-21), 7.18-7.12 (m, 3H, H12-14), 4.62 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, Ha-15), 4.36 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, Hb-15), 4.23 (q, *J* = 7.6 Hz ; 6.3 Hz, 1H, H3), 4.10 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Ha-4), 4.05 (m, 1H, H1), 3.72 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Hb-4), 3.57 (dd, *J* = 7.6 Hz ; 2.0 Hz, 1H, H2), 3.53 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H22), 3.26 (dd, *J* = 14.1 Hz ; 8.3Hz, 1H, Ha-8), 3.15 (dd, *J* = 14.1 Hz ; 6.8 Hz, 1H, Hb-8), 1.47 (s, 3H, H6), 1.36 (s, 3H, H7), 1.17 (s, 9H, H24-26)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 137.72 (C16), 137.48 (C9), 133.09 (C11), 132.12 (C14), 128.54, 128.40, 127.95 (C17-21), 127.87 (C12), 127.61 (C13), 125.13 (C10), 109.32 (C5), 81.00 (C2), 75.33 (C3), 72.63 (C15), 67.92 (C4), 57.79 (C1), 56.24 (C23), 39.05 (C8), 26.69 (C6), 25.22 (C7), 22.63 (C24-26)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{25}H_{35}BrNO_4S$: 524.1470 $(M+H)^+$, masse trouvée 524.1461

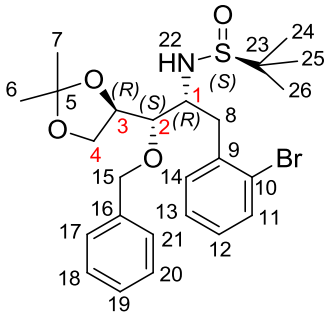


La méthode A est appliquée à partir de S_S-**45** (31mg, 0.0880 mmol) et bromure de 2-bromobenzyle magnésium (0.8 M dans Et_2O) fraîchement synthétisé. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 6/4). Un mélange 2/98 des deux diastéréoisomères *anti*/*syn* **72**/**73** est obtenu (29 mg, 65% ; huile incolore).

72 (S_S, 1*S*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(2-bromo-benzyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 18.579 min, 2% (HPLC)

73 (S_S, 1*R*, 2*S*, 3*R*)-*N*-(2-(benzyloxy)-1-(2-bromo-benzyl)-3,4-(isopropylidènedioxy))butyl-*tert*-butanesulfinamide, tr = 13.156 min, 98% (HPLC)

Caractérisation du diastéréoisomère majoritaire **73** :



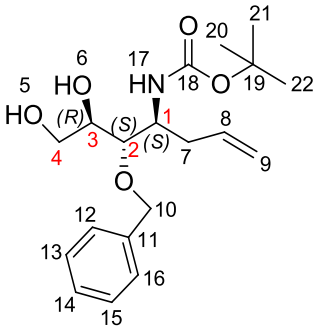
^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.56 (dd, *J* = 7.6 Hz ; 1.0 Hz, 1H, H11), 7.31-7.41 (m, 5H, H17-21), 7.23 (td, *J* = 7.6 Hz ; 1.0 Hz, 1H, H13), 7.14 (dd, *J* = 7.6 Hz ; 1.7 Hz, 1H, H14), 7.10 (td, *J* = 7.6 Hz ; 1.7 Hz, 1H, H12), 4.71 (s, 2H, H15), 4.19 (ddd, *J* = 6.6 Hz ; 6.4 Hz ; 6.3 Hz, 1H, H3), 4.05 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 6.6 Hz, 1H, Ha-4), 4.00 (ddd, *J* = 8.7 Hz ; 6.0 Hz ; 1.9Hz, 1H, H1), 3.87 (dd, *J* = 8.4 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Hb-4), 3.76 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H, H22), 3.58 (dd, *J* = 6.4 Hz ; 1.9 Hz, 1H, H2), 3.35 (dd, *J* = 14.0 Hz ; 8.7 Hz, 1H, Ha-8), 3.20 (dd, *J* = 14.0 Hz ; 6.0 Hz, 1H, Hb-8), 1.33 (s, 3H, H6), 1.31 (s, 3H, H7), 1.18 (s, 9H, H24-26)

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) : δ 137.93 (C9), 137.53 (C16, 133.12 (C11), 131.99 (C14), 128.52, 127.93, 127.68 (C17-21), 128.35 (C12), 127.41 (C13), 124.86 (C10), 108.68 (C5), 79.35 (C2), 76.58 (C3), 73.78 (C15), 66.89 (C4), 57.53 (C1), 56.38 (C23), 40.06 (C8), 26.53 (C6), 24.96 (C7), 22.58 (C24-26)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{25}H_{35}BrNO_4S$: 524.1470 $(M+H)^+$, masse trouvée 524.1465

---

tert-butyl (1*S*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(dihydroxy)-butylcarbamate *anti*-**74**



A un mélange 94/6 des diastéréoisomères **46/47** (3.28 g, 8.29 mmol) solubilisé dans MeOH (25 mL), est ajouté HCl 2N dans Et_2O (12.4 mL, 24.9 mmol, 3 eq.). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 2h30, puis concentré à l'évaporateur rotatif. Le composé (1*S*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(dihydroxy)-butylamine est obtenu.

A une solution de ce composé (2,08 g, 8.29 mmol) dans CH_2Cl_2 (26.5 mL) sont ajoutés DIPEA (1.64 mL, 9.95 mmol, 1.2 eq.) et Boc_2O (1.95 mL, 9.12 mmol, 1.1 eq.). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant la nuit, puis est traité avec une sol. $NaHCO_3$ 1N. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (dichlorométhane/méthanol 95/5) et le diastéréoisomère *anti*-**74** est obtenu (2.47 g, 85% ; solide incolore).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.29 (m, 5H, H12-16), 5.79 (dddd, *J* = 17.0 Hz ; 10.3 Hz ; 7.6 Hz ; 6.5 Hz, 1H, H8), 5.11 (m, 1H, Ha-9), 5.09 (m, 1H, Hb-9), 4.69 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-10), 4.62 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-10), 4.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H17), 3.96 (m, 1H, H1), 3.80 (m, 2H, H4), 3.75 (m, 1H, H3), 3.66 (m, 1H, H2), 3.21 (sl, 1H, H5 ou H6), 2.69 (sl, 1H, H6 ou H5), 2.49 (m, 1H, Ha-7), 2.27 (m, 1H, Hb-7), 1.43 (s, 9H, H20-22)

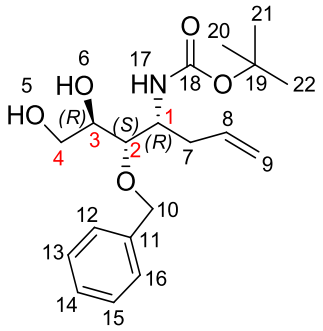
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.9 (C18), 138.0 (C11), 134.9 (C8), 128.5, 127.9, 127.9 (C12-16), 117.7 (C9), 81.1 (C2), 79.7 (C19), 74.3 (C10), 71.8 (C3), 63.6 (C4), 50.9 (C1), 34.2 (C7), 28.3 (C20-22)

$[\alpha]^{20}_{D}$ = -10.9 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{14}H_{22}NO_3$: 252.1600 $(M\text{-}Boc+H)^+$, masse trouvée 252.1592

---

tert-butyl (1*R*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(dihydroxy)-butylcarbamate *syn*-**75**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **74** en partant d'un mélange 13/87 des diastéréoisomères **48**/**49** (627 mg, 1.59 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 6/4) pour conduire au diastéréoisomère *syn*-**75** (395 mg, 71% ; huile jaune).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.41-7.29 (m, 5H, H12-16), 5.82 (dddd, *J* = 16.6 Hz ; 9.7 Hz ; 7.0 Hz ; 6.8 Hz, 1H, H8), 5.12 (m, 2H, H9), 4.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H17), 4.64 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, Ha-10), 4.69 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, Hb-10), 4.52 (d, *J* = 3 Hz, 1H, H5 ou H6), 4.06 (q, *J* = 7.6 Hz, 1H, H1), 3.9 (m, 1H, Ha-4), 3.69 (m, 1H, Hb-4), 3.50 (m, 1H, H3), 3.48 (m, 1H, H2), 2.37 (m, 2H, H7), 2.23 (t, *J* = 5.8 Hz , 1H, H6 ou H5), 1.44 (s, 9H, H20-22)

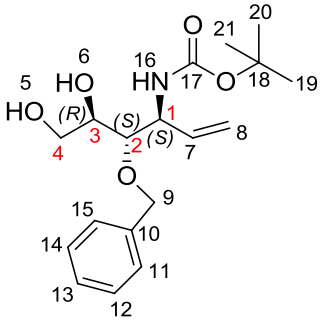
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 157.4 (C18), 137.7 (C11), 134.6 (C8), 128.5, 128.0, 127.9 (C12-16), 117.7 (C9), 80.3 (C19), 80.0 (C2), 75.0 (C10), 71.0 (C3), 63.5 (C4), 50.9 (C1), 36.6 (C7), 28.3 (C20-22)

$[\alpha]^{20}_{D}$ = +76 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{29}NNaO_5$: 374.1943 $(M+Na)^+$, masse trouvée 374.1939

---

tert-butyl(1*S*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(vinyl)-3,4-(dihydroxy)-butylcarbamate *anti*-**76**



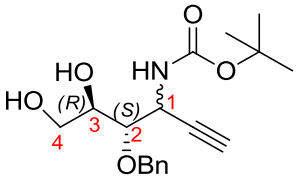
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **74** en partant d'un mélange 97/3 des diastéréoisomères **50/51** (351 mg, 0.92 mmol). Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 1/1) pour donner le diastéréoisomère *anti*-**76** (279 mg, 90% ; huile incolore).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.30 (m, 5H, H11-15), 5.93 (ddd, *J* = 17.2 Hz ; 10.4 Hz ; 6.8 Hz, 1H, H7), 5.30 (dt, *J* = 17.2 Hz ; 1.3 Hz, 1H, Ha-8), 5.23 (dt, *J* = 10.4 Hz ; 1.3 Hz, 1H, Hb-8), 4.83 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H16), 4.69 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-9), 4.63 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-9), 4.51 (m, 1H, H1), 3.79 (m, 2H, H4), 3.72 (m, 1H, H3), 3.68 (m, 1H, H2), 3.09 (sl, 1H, H5 ou H6), 2.59 (sl, 1H, H6 ou H5), 1.43 (s, 9H, H19-21)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.47 (C17), 137.93 (C10), 134.32 (C7), 128.61, 128.05, 128.00 (C11-15), 117.40 (C8), 81.19 (C2), 79.79 (C18), 74.13 (C9), 71.78 (C3), 63.41 (C4), 54.11 (C1), 28.36 (C19-21)

$[\alpha]^{20}_D$ = -25.7 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{18}H_{27}NNaO_5$: 360.1787 $(M+Na)^+$, masse trouvée 360.1773

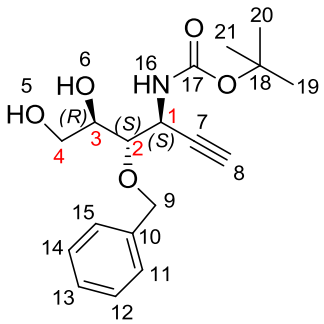


Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **74** en partant d'un mélange 88/12 des diastéréoisomères **54/55** (67 mg, 0.182 mmol). Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 1/1) et un mélange 88/12 des diastéréoisomères *anti*-**77** /*syn*-**78** est obtenu (43 mg, 71% ; huile jaune pâle).

77 *tert*-butyl(1*S*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(éthynyl)-3,4-(dihydroxy)-butylcarbamate, 88% (RMN)

78 *tert*-butyl(1*R*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(éthynyl)-3,4-(dihydroxy)-butylcarbamate, 12% (RMN)

Caractérisation du diastéréoisomère majoritaire **77** :



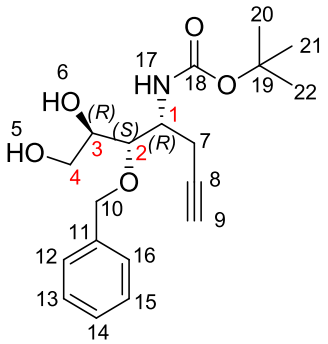
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.30-7.24 (m, 5H, H11-15), 4.90 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H16), 4.82 (m, 1H, H1), 4.65 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, Ha-9), 4.61 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, Hb-9), 3.80 (m, 1H, H3), 3.73 (m, 2H, H4), 3.59 (m, 1H, H2), 2.70 (sl, 2H, H5 + H6), 2.28 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H8), 1.35 (s, 9H, H19-21)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 154.86 (C17), 137.67 (C10), 128.64, 128.25, 128.15 (C11-15), 80.65 (C21), 80.28 (C7), 80.00 (C2), 74.35 (C9), 73.00 (C8), 71.81 (C3), 63.02 (C4), 44.70 (C1), 28.28 (C19-21)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{18}H_{25}NNaO_5$: 358.1630 $(M+Na)^+$, masse trouvée 358.1628

---

tert-butyl(1*R*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(propargyl)-3,4-(dihydroxy)-butylcarbamate *syn*-**79**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **74** en partant d'un mélange 3/97 des diastéréoisomères **62**/**63** (288 mg, 0.732 mmol). Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 6/4) et *syn*-**79** est obtenu (212 mg, 83% ; solide incolore).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.31 (m, 5H, H12-16), 4.87 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H17), 4.67 (s, 2H, H10), 4.32 (sl, 1H, H5 ou H6), 4.2 (ddd, *J* = 9.8 Hz ; 8.6 Hz ; 1.2 Hz, 1H, H1), 3.90 (m, 1H, Ha-4), 3.77 (dd, *J* = 9.2 Hz ; 1.2 Hz, 1H, H2), 3.71 (m, 1H, Hb-4), 3.54 (m, 1H, H3), 2.50 (m, 2H, H7), 2.31 (sl, 1H, H6 ou H5), 2.1 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H, H9), 1.44 (s, 9H, H20-22)

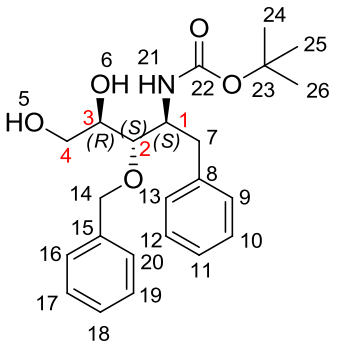
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 157.03 (C18), 137.63 (C11), 128.57, 128.16 (C12-16), 80.60 (C8), 80.31 (C19), 78.88 (C2), 75.25 (C10), 71.12 (C9), 70.91 (C3), 63.46 (C4), 50.17 (C1), 28.24 (C20-22), 22.09 (C7)

$[\alpha]^{20}_D$ = +70.9 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{27}NNaO_5$: 372.1787 $(M+Na)^+$, masse trouvée 372.1780

---

tert-butyl(1*S*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(benzyl)-3,4-(dihydroxy)-butylcarbamate *anti*-**80**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **74** en partant d'un mélange 96/4 des diastéréoisomères **66/67** (88 mg, 0.197 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 1/1) et *anti*-**80** est obtenu (63 mg, 79% ; solide incolore).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.38-7.20 (m, 10H, H9-13 + H16-20), 4.64 (s, 2H, H14), 4.60 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H21), 4.19 (m, 1H, H1), 3.8 (m, 1H, H3), 3.8 (m, 1H, Ha-4), 3.75 (m, 1H, Hb-4), 3.68 (m, 1H, H2), 3.12 (m, 1H, Ha-7), 3.10 (sl, 1H, H5 ou H6), 2.74 (m, 1H, Hb-7), 2.44 (sl, 1H, H6 ou H5), 1.32 (s, 9H, H24-26)

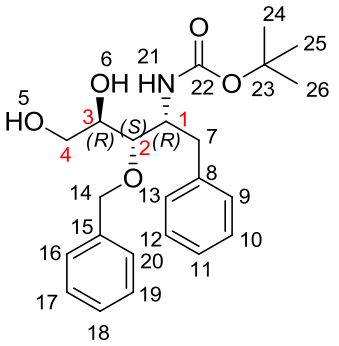
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.83 (C22), 138.39 (C15), 137.96 (C8), 129.24, 128.57, 128.43, 128.07, 128.00, 126.33 (C9-13 + C16-20), 80.73 (C2), 79.61 (C23), 73.87 (C14), 71.89 (C3), 63.68 (C4), 52.86 (C1), 36.32 (C7), 28.25 (C24-26)

$[\alpha]^{20}_D$ = -30.6 (c = 0.010, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{23}H_{31}NNaO_5$: 424.2100 $(M+Na)^+$, masse trouvée 424.21033

---

tert-butyl(1*R*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(benzyl)-3,4-(dihydroxy)-butylcarbamate *syn*-**81**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **74** en partant d'un mélange 52/48 des diastéréoisomères **68/69** (520 mg, 1.17 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 1/1) et *syn*-**81** est obtenu (142 mg, 30% ; solide incolore).

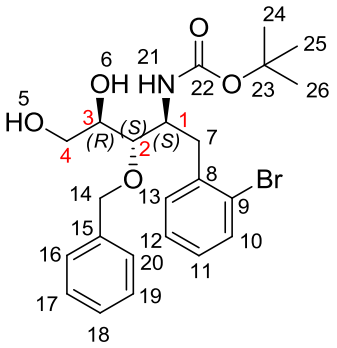
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.41-7.18 (m, 10H, H9-13 + H16-20), 4.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H21), 4.65 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, Ha-14), 4.60 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, Hb-14), 4.41 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H5 ou H6), 4.35 (q, *J* = 8.3 Hz, 1H, H1), 3.89 (m, 1H, Ha-4), 3.68 (m, 1H, Hb-4), 3.57 (m, 1H, H3), 3.48 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H2), 2.89 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H7), 2.20 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H6 ou H5), 1.36 (s, 9H, H24-26)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 157.35 (C22), 137.79 (C15 + C8), 128.80, 128.58, 128.00, 126.53 (C9-13 + C16-20), 80.29 (C23), 79.99 (C2), 74.99 (C14), 71.12 (C3), 63.53 (C4), 52.01 (C1), 38.28 (C7), 28.20 (C24-26)

[α] $^{20}_{D}$ = +67.1 (c = 0.010, $CHCl_3$)

---

tert-butyl(1*S*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(2-bromo-benzyl)-3,4-(dihydroxy)-butylcarbamate *anti*-**82**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **74** en partant du diastéréoisomère **70** (383 mg, 0.73 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 1/1) et *anti*-**82** est obtenu (177 mg, 50% ; solide blanc).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.43 (m, 1H, H10), 7.31-7.10 (m, 7H, H16-20 + H12-13), 6.96 (m, 1H, H11), 4.74 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H21), 4.62 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, Ha-14), 4.57 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, Hb-14), 4.23 (m, 1H, H1), 3.75 (m, 1H, H3), 3.73 (m, 2H, H4), 3.65 (m, 1H, H2), 3.17 (sl, 1H, H5 ou H6), 3.07 (dd, *J* = 13.5 Hz ; 3.3 Hz, 1H, Ha-7), 2.92 (dd, *J* = 13.5 Hz ; 11.6 Hz, 1H, Hb-7), 2.34 (sl, 1H, H6 ou H5), 1.18 (s, 9H, H24-26)

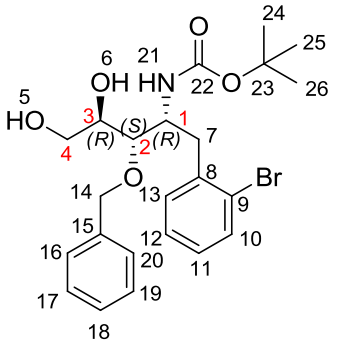
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.77 (C22), 138.11 (C15), 138.11 (C8), 132.59 (C10), 131.34 (C13), 128.50, 127.98, 127.88 (C16-20), 127.98 (C11), 127.37 (C12), 125.09 (C9), 81.04 (C2), 79.46 (C23), 74.03 (C14), 71.83 (C3), 63.61 (C4), 52.31 (C1), 35.73 (C7), 28.18 (C24-26)

[α] $^{20}_{D}$= -36.7 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{18}H_{23}BrNO_3$: 380.0861 $(M\text{-}Boc+H)^+$, masse trouvée 380.0855

---

tert-butyl(1*R*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(2-bromo-benzyl)-3,4-(dihydroxy)-butylcarbamate *syn*-**83**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **74** en partant d'un mélange 2/98 des diastéréoisomères **72**/**73** (645 mg, 1.23 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 1/1) et *syn*-**83** est obtenu (430 mg, 73% ; solide blanc).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.56 (dd, *J* = 8.1 Hz ; 1.0 Hz, 1H, H10), 7.41-7.34 (m, 5H, H16-20), 7.25 (m, 2H, H12-13), 7.10 (ddd, *J* = 8.1 Hz ; 6.4 Hz ; 2.8 Hz, 1H, H11), 4.91 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, H21), 4.69 (s, 2H, H14), 4.40 (m, 1H, H1), 4.35 (m, 1H, H5 ou H6), 3.93 (m, 1H, Ha-4), 3.74 (m, 1H, Hb-4), 3.59 (m, 1H, H2), 3.59 (m, 1H, H3), 3.03 (m, 2H, H7), 2.23 (sl, 1H, H6 ou H5), 1.33 (s, 9H, H24-26)

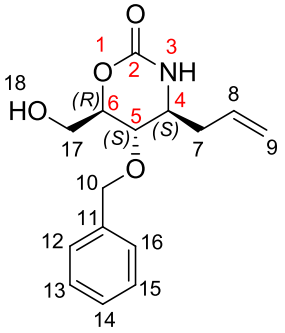
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 157.26 (C22), 137.65 (C15), 137.49 (C8), 132.87 (C10), 130.48 (C13), 128.61, 128.27, 128.19 (C16-20 + C11), 127.49 (C12), 125.14 (C9), 80.71 (C2), 80.23 (C23), 75.20 (C14), 71.12 (C3), 63.54 (C4), 51.40 (C1), 38.22 (C7), 28.18 (C24-26)

$[\alpha]^{20}_D$ = +79.1 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{18}H_{23}BrNO_3$: 380.0861 $(M\text{-}Boc+H)^+$, masse trouvée 380.0855

____

(4*S*,5*S*,6*R*)-5-(benzyloxy)-6-(hydroxyméthyl)-4-(allyl)-1,3-oxazinan-2-one *anti*-**84**



A une solution de **74** (15 mg, 0.043 mmol) dans THF (0.950 mL) placée sous azote, est ajouté KHMDS (0.5 M, 180 µL, 0.0903 mmol, 2.1 eq.). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 2h30, puis dilué dans Et_2O. Il est ensuite traité avec une sol. 1N HCl, H_2O, une sol. sat. $NaHCO_3$ et enfin une sol. sat. NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif.

(6 mg ; huile jaune pâle)

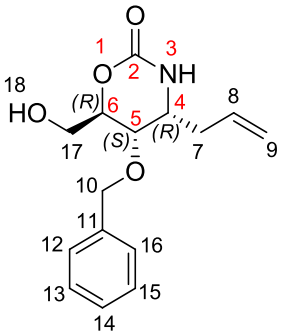
^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) : δ 7.38-7.29 (m, 5H, H12-16), 5.77 (m, 1H, H8), 5.14 (m, 2H, H9), 4.77 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-10), 4.68 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-10), 4.14 (ddd, *J* = 9.0 Hz ; 3.3 Hz ; 2.3 Hz, 1H, H6), 3.90 (dd, *J* = 12.6 Hz ; 2.3 Hz, 1H, Ha-17), 3.83 (dd, *J* = 12.6 Hz ; 3.3 Hz, 1H, Hb-17), 3.73 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, H5), 3.45 (m, 1H, H4), 2.46 (m, 1H, Ha-7), 2.28 (m, 1H, Hb-7)

^{13}C RMN (100 MHz, MeOD) : δ 156.8 (C2), 139.2 (C11), 133.8 (C8), 129.5, 129.2, 129.1 (C12-16), 119.7 (C9), 81.3 (C6), 75.0 (C10), 72.0 (C5), 60.9 (C17), 56.0 (C4), 37.5 (C7)

LCMS (m/z) : masse calculée pour $C_{15}H_{20}NO_4$: 278.1 $(M+H)^+$, masse trouvée 277.9
[colonne Eclipse XDB-C18, 2.1x30 mm, 3.5 µm, 0.25 mL/min, 30 °C, gradient H_2O (+ 0.1% acide formique)/MeCN (+ 0.1% acide formique) 90/10 à 0/100 en 10 min]

____

(4*R*, 5*S*, 6*R*)-5-(benzyloxy)-6-(hydroxymethyl)-4-(allyl)-1,3-oxazinan-2-one *syn*-**85**



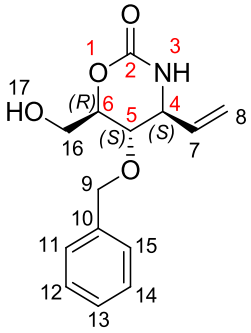
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **84** en partant de *syn*-**75** (22 mg, 0.0626 mmol).

(5 mg ; huile jaune)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.41-7.31 (m, 5H, H12-16), 5.71 (m, 1H, H8), 5.34 (sl, 1H, H3), 5.20 (m, 2H, H9), 4.69 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-10), 4.58 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-10), 4.45 (m, 1H, H6), 3.88 (m, 1H, H5), 3.84 (m, 2H, H17), 3.56 (m, 1H, H4), 2.51 (m, 1H, Ha-7), 2.24 (m, 1H, Hb-7)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 152.74 (C2), 136.96 (C11), 132.99 (C8), 128.65, 128.29, 128.01 (C12-16), 119.74 (C9), 76.92 (C6), 72.16 (C10), 69.58 (C5), 61.81 (C17), 51.00 (C4), 35.23 (C7)

(4*S*, 5*S*, 6*R*)-5-(benzyloxy)-6-(hydroxyméthyl)-4-(vinyl)-1,3-oxazinan-2-one *anti*-**86**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **84** en partant de *anti*-**76** (30 mg, 0.0889 mmol).

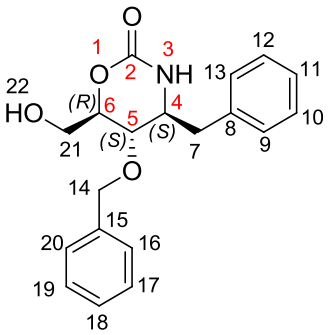
(17 mg ; solide jaune)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.38-7.3 (m, 5H, H11-15), 5.81 (ddd, *J* = 17.4 Hz ; 10.3 Hz ; 7.8 Hz, 1H, H7), 5.65 (sl, 1H, H3), 5.45 (dt, *J* = 17.4 Hz ; 1Hz, 1H, Ha-8), 5.35 (dt, *J* = 10.3 Hz ; 1.0 Hz, 1H, Hb-8), 4.69 (s, 2H, H9), 4.18 (dt, *J* = 9.3 Hz ; 2.5 Hz, 1H, H6), 3.97 (dd, *J* = 12.8 Hz ; 2.5 Hz, 1H, Ha-16), 3.93 (dd, *J* = 9.3Hz ; 7.8 Hz, 1H, H4), 3.85 (dd, *J* = 12.8 Hz ; 2.5 Hz, 1H, Hb-16), 3.72 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H, H5)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 153.3 (C2), 136.98 (C10), 135.32 (C7), 128.51, 128.26, 128.22 (C11-15), 120.09 (C8), 79.39 (C6), 74.62 (C9), 71.86 (C5), 60.42 (C16), 58.96 (C4)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{14}H_{18}NO_4$: 264.1236 $(M+H)^+$, masse trouvée 264.1228

(4*S*,5*S*,6*R*)-5-(benzyloxy)-6-(hydroxyméthyl)-4-(benzyl)-1,3-oxazinan-2-one *anti*-**87**

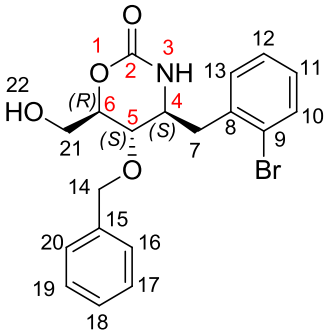


Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **84** en partant de *anti*-**80** (15 mg, 0.0374 mmol). Deux autres ajouts de KHMDS ont été effectués après 2h30 et 5 h de réaction. Un mélange 42/58 du substrat de départ *anti*-**80** et du produit désiré *anti*-**87** est obtenu (huile jaune ; ratio RMN).

RMN du produit *anti*-**87** :

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.16 (m, 10H, H9-13 + H16-20), 4.92 (m, 1H, H3), 4.86 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, Ha-14), 4.72 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, Hb-14), 4.17 (ddd, *J* = 9.4 Hz ; 3.3 Hz ; 2.6 Hz, 1H, H6), 4.05 (dd, *J* = 13.0 Hz ; 2.6 Hz, 1H, Ha-21), 3.91 (dd, *J* = 13.0 Hz ; 3.3 Hz, 1H, Hb-21), 3.76 (dd, *J* = 9.4 Hz ; 9.3 Hz, 1H, H5), 3.61 (m, 1H, H4), 2.36 (m, 2H, H7)

(4*R*,5*S*,6*R*)-5-(benzyloxy)-6-(hydroxyméthyl)-4-(2-bromo-benzyl)-1,3-oxazinan-2-one *syn*-**88**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **84** en partant de *syn*-**83** (32 mg, 0.0667 mmol).

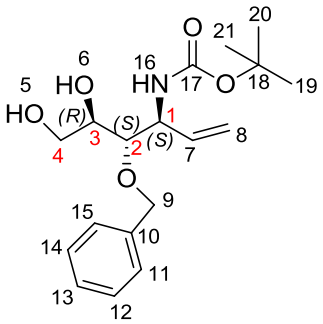
(15 mg ; huile jaune)

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.55 (m, 1H, H10), 7.41-7.35 (m, 5H, H16-20), 7.25 (m, 1H, H13), 7.20 (m, 1H, H12), 7.12 (m, 1H, H11), 5.92 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H3), 4.75 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, Ha-14), 4.69 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, Hb-14), 4.52 (m, 1H, H6), 4.02 (dd, *J* = 7.5 Hz ; 5.1 Hz, 1H, H5), 3.97 (m, 1H, H4), 3.94 (dd, *J* = 12.8 Hz ; 3.4 Hz, 1H, Ha-21), 3.84 (dd, *J* = 12.8 Hz ; 3.5 Hz, 1H, Hb-21), 3.35 (dd, *J* = 13.6 Hz ; 3.8 Hz, 1H, Ha-7), 3.05 (m, 1H, H22), 2.82 (dd, *J* = 13.6 Hz ; 10.2 Hz, 1H, Hb-7)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{21}BrNO_4$: 406.0654 $(M+H)^+$, masse trouvée 406.0638

---

tert-butyl(1*S*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(vinyl)-3,4-(dihydroxy)-butylcarbamate *anti*-**76**
(à partir de *anti*-**77**/*syn*-**78**)

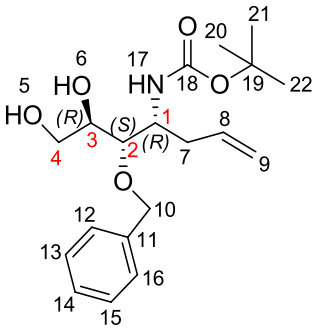


A un mélange 88:12 des diastéréoisomères *anti*-**77**/*syn*-**78** (43 mg, 0.12 mmol) solubilisé dans AcOEt (0.5 mL) est ajouté Pd Lindlar (5%Pd/$CaCO_3$, empoisonné avec $Pb(OAc)_2$) (20% w/w, 8 mg). Le mélange réactionnel est placé sous H_2 et agité à TA pendant 8 h, puis Pd Lindlar (5%Pd/$CaCO_3$, empoisonné avec $Pb(OAc)_2$) (20% w/w, 8 mg) est à nouveau ajouté. Le mélange réactionnel est placé sous H_2 et agité à TA pendant 8 h, avant d'être filtré sur célite et rincé avec AcOEt. Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif.

(33 mg, 81% ; huile incolore)

---

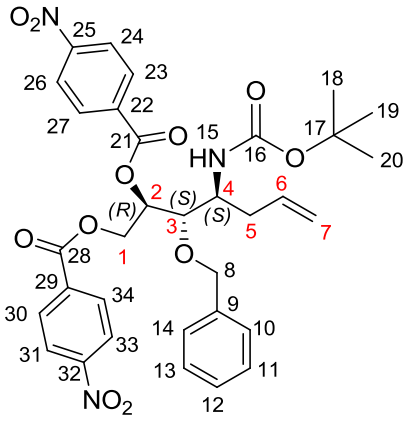
tert-butyl (1*R*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(dihydroxy)-butylcarbamate *syn*-**75**
(à partir de *syn*-**79**)



Le mode opératoire d'hydrogénation catalytique au palladium de Lindlar est identique à celui décrit pour *anti*-**76** à partir de *syn*-**79** (11 mg, 0.031 mmol).

(9 mg, 81% ; huile incolore)

3-(benzyloxy)-4-[(*tert*-butoxy)carbonyl]amino-1-[(4-nitrophényl)carbonyloxy]hept-6-èn-2-yl 4-nitrobenzoate *anti*-**89**



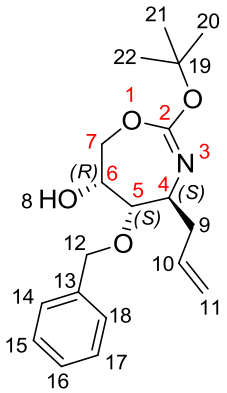
A une solution de *anti*-**74** (9 mg, 0.02561 mmol) dans CH_2Cl_2 (0.320 mL) refroidie à 0 °C, sont ajoutés un mélange DIPEA (0.042 mL, 0.2561 mmol, 10 eq.)/DMAP (0.3 mg, 0.002561 mmol, 0.1 eq.) et le chlorure de *para*-nitrobenzoyle (23.7 mg, 0.128 mmol, 5 eq.). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 24 h. Le brut réactionnel est directement purifié sur plaque préparative de silice (éther de pétrole/AcOEt 9/1).

(16 mg, 96% ; huile incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 8.31-8.12 (m, 8H, H23-24 + H26-27 + H30-31 + H33-34), 7.38-7.29 (m, 5H, H10-14), 5.78-5.68 (m, 2H, H6 + H2), 5.14-5.10 (m, 2H, H7), 4.88 (dd, *J* = 12.4 Hz ; 2.5 Hz, 1H, Ha-1), 4.81 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-8), 4.77 (dd, *J* = 12.4 Hz ; 7.3 Hz, 1H, Hb-1), 4.68 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-8), 4.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H15), 3.98 (m, 1H, H4), 3.91 (m, 1H, H3), 2.54-2.48 (m, 1H, Ha-5), 2.35-2.27 (m, 1H, Hb-5), 1.46 (s, 8H, H18-20)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 164.40 (C21), 164.01 (C28), 155.50 (C16), 150.79 (C25), 150.62 (C32), 137.20 (C9), 134.97 (C22), 134.74 (C29), 133.58 (C6), 130.89, 130.76 (C23 + C27 + C30 + C34), 128.63, 128.22, 127.95 (C10-14), 123.74, 123.57 (C24 + C26 + C31 + C33), 118.69 (C7), 80.11 (C3), 79.90 (C17), 74.62 (C8), 73.50 (C2), 64.23 (C1), 50.75 (C4), 34.75 (C5), 28.33 (C18-20)

(4*S*, 5*S*,6*R*)-5-(benzyloxy)-2-(*tert*-butoxy)-4-(allyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-oxazepin-6-ol *anti*-**99**



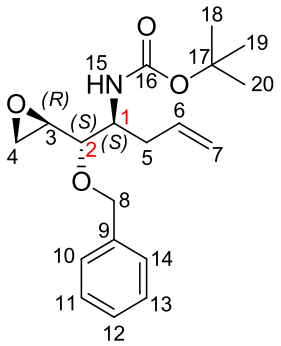
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.30 (m, 5H, H14-18), 7.53 (dddd, J = 17.4 Hz ; 10.3 Hz ; 7.3 Hz ; 7.0 Hz, 1H, H10), 5.10-5.03 (m, 2H, H11), 4.65 (d, J = 11.8 Hz, 1H, Ha-12), 4.56 (d, J = 11.8 Hz, 1H, Hb-12), 4.24 (m, 1H, H6), 3.88 (m, 1H, H4), 3.79 (dd, J = 4.5 Hz ; 3.3 Hz, 1H, H5), 3.49 (dd, J = 11.2 Hz ; 5.9 Hz, 1H, Ha-7), 3.46 (m, 1H, Hb-7), 2.48 (m, 1H, Ha-9), 2.48 (m, 1H, H8), 2.30 (dddt, *J* = 14.3 Hz ; 8.4 Hz ; 7.4 Hz ; 1.0 Hz, 1H, Hb-9), 1.49 (s, 9H, H20-22)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 169.00 (C2), 137.52 (C13), 134.06 (C10), 128.64, 128.19, 128.00 (C14-18), 117.93 (C11), 81.99 (C19), 79.66 (C5), 72.04 (C12), 68.86 (C6), 60.07 (C7), 51.85 (C4), 36.49 (C9), 28.56 (C20-22)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{38}H_{54}N_2NaO_8$: 689.3778 $(2M+Na)^+$, masse trouvée 689.3779

---

tert-butyl (1*S*, 2*S*)-2-(benzyloxy)-2-[(2*R*)oxiran-2-yl]-1-(allyl)-éthylcarbamate *anti*-**90**



anti-**74** (200 mg, 0.569 mmol), PPh_3 (432 mg, 1.65 mmol, 2.9 eq.) et DIAD (0.293 mL, 1.48 mmol, 2.6 eq.) sont solubilisés dans toluène sec (0.86 mL) dans un vial micro-onde. Le mélange réactionnel est agité au micro-onde à 150 °C pendant 5 min (puissance 200 W, pression max 17.2 bar), puis concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1). Le produit *anti*-**90** est en mélange avec le dérivé hydrazine du DIAD (26%).

(151 mg total ; soit 124 mg de produit désiré, 65% ; huile jaune pâle)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.38-7.29 (m, 5H, H10-14), 5.79 (dddd, *J* = 17.1 Hz ; 10.3 Hz ; 7.3 Hz ; 6.9 Hz, 1H, H6), 5.08 (m, 2H, H7), 4.71 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, Ha-8), 4.65 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H15), 4.49 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, Hb-8), 3.93 (m, 1H, H1), 3.50 (m, 1H, H2), 3.03 (m, 1H, H3), 2.78 (m, 2H, H4), 2.44 (m, 1H, Ha-5), 2.29 (m, 1H, Hb-5), 1.43 (s, 9H, H18-20)

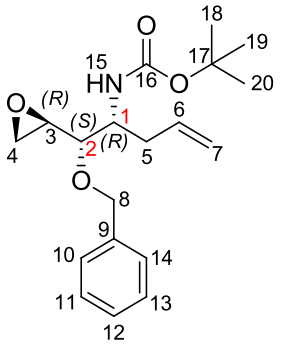
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.41 (C16), 138.19 (C9), 134.60 (C6), 128.45, 127.82, 127.75 (C10-14), 117.61 (C7), 79.29 (C17), 79.18 (C2), 73.47 (C8), 51.7 (C1), 51.66 (C3), 45.11 (C4), 34.48 (C5), 28.35 (C18-20)

$[\alpha]^{20}_{D}$ = -21.3 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{27}NNaO_4$: 356.1838 $(M+Na)^+$, masse trouvée 356.1819

---

tert-butyl (1*R*, 2*S*)-2-(benzyloxy)-2-[(2*R*)oxiran-2-yl]-1-(allyl)-éthylcarbamate *syn*-**91**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **90** en partant de *syn*-**75** (115 mg, 0.327 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1). Le produit *syn*-**91** est obtenu en mélange avec le dérivé hydrazine du DIAD (17%).

(83 mg total ; soit 72 mg de produit désiré, 66% ; huile jaune pâle)

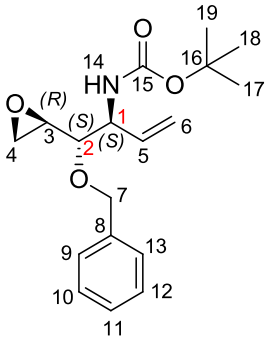
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.41-7.31 (m, 5H, H10-14), 5.76 (dddd, *J* = 17.2 Hz ; 10.4 Hz ; 7.3 Hz ; 7.0 Hz, 1H, H6), 5.04 (m, 2H, H7), 4.81 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H15), 4.71 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, Ha-8), 4.47 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, Hb-8), 3.94 (dt, *J* = 9.0 Hz ; 7.0 Hz, 1H, H1), 3.47 (dd, *J* = 4.6 Hz ; 1.8 Hz, 1H, H2), 3.07 (td, *J* = 4.6 Hz ; 3.5 Hz, 1H, H3), 2.78 (m, 2H, H4), 2.34 (m, 2H, H5), 1.43 (s, 9H, H18-20)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.59 (C16), 137.96 (C9), 134.62 (C6), 128.43, 127.96, 127.74 (C10-14), 117.69 (C7), 79.25 (C2), 79.13 (C17), 73.51 (C8), 51.89 (C1), 51.63 (C3), 45.10 (C4), 37.14 (C5), 28.35 (C18-20)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{27}NNaO_4$: 356.1838 $(M+Na)^+$, masse trouvée 356.1831

---

tert-butyl (1*S*, 2*S*)-2-(benzyloxy)-2-[(2*R*)oxiran-2-yl]-1-(vinyl)-éthylcarbamate *anti*-**92**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **90** en partant de *anti*-**76** (108 mg, 0.32 mmol). Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1). Le produit *anti*-**92** est obtenu en mélange avec le dérivé hydrazinedicarboxylate du DIAD (20%).

(75 mg total ; soit 63 mg de produit désiré, 62% ; solide incolore)

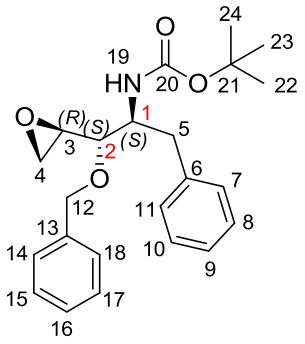
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.29 (m, 5H, H9-13), 5.89 (ddd, *J* = 17.2 Hz ; 10.4 Hz ; 6.8 Hz, 1H, H5), 5.31 (dt, *J* = 17.2 Hz ; 1.2 Hz, 1H, Ha-6), 5.23 (dt, *J* = 10.4 Hz ; 1.2 Hz, 1H, Hb-6), 4.88 (sl, 1H, H14), 4.71 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-7), 4.51 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-7), 4.39 (m, 1H, H1), 3.48 (m, 1H, H2), 2.98 (m, 1H, H3), 2.76 (m, 2H, H4), 1.43 (s, 9H, H17-19)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.03 (C15), 137.97 (C8), 133.96 (C5), 128.47, 127.88, 127.71 (C9-13), 117.50 (C6), 79.42 (C2), 79.42 (C16), 73.10 (C7), 54.82 (C1), 51.26 (C3), 45.56 (C4), 28.33 (C17-19)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{18}H_{25}NNaO_4$: 342.1681 $(M+Na)^+$, masse trouvée 342.1665

____

tert-butyl (1*S*, 2*S*)-2-(benzyloxy)-2-[(2*R*)oxiran-2-yl]-1-(benzyl)-éthylcarbamate *anti*-**93**



anti-**80** (18 mg, 0.0448 mmol), PPh_3 (23.5 mg, 0.0897 mmol, 2 eq.) et DMEAD (21.8 mg, 0.0897 mmol, 2 eq.) sont solubilisés dans toluène sec (0.4 mL) dans un vial micro-onde. Le mélange réactionnel est agité au micro-onde à 150 °C pendant 15 min (puissance 200 W, pression max 17.2 bar). Il est ensuite traité avec H_2O et les phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite avec Et_2O (2x). La phase organique est lavée avec une sol. sat. de NaCl, séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2).

(13 mg, 78% ; solide incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.20 (m, 10H, H7-11 + H14-18), 4.73 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-12), 4.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H19), 4.52 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-12), 4.17 (m, 1H, H1), 3.52 (m, 1H, H2), 3.04 (dd, *J* = 5.0 Hz ; 4.8Hz, 1H, Ha-5), 3.02 (m, 1H, H3), 2.79 (m, 1H, Hb-5), 2.76 (m, 2H, H4), 1.33 (s, 9H, H22-24)

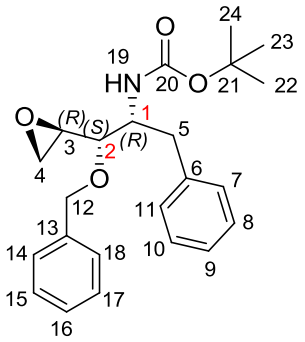
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.16 (C20), 138.15 (C6), 137.93 (C13), 129.31, 128.45, 128.28, 127.82, 127.74, 126.27 (C7-11 + C14-18), 81.88 (C21), 79.13 (C2), 73.29 (C12), 53.22 (C1), 51.66 (C3), 45.11 (C4), 36.01 (C5), 28.23 (C22-24)

$[\alpha]^{20}_D$ = -42.5 (c = 0.010, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{23}H_{29}NNaO_4$: 406.1994 $(M+Na)^+$, masse trouvée 406.1992

____

tert-butyl (1*R*, 2*S*)-2-(benzyloxy)-2-[(2*R*)oxiran-2-yl]-1-(benzyl)-éthylcarbamate *syn*-**94**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **93** en partant de *syn*-**81** (50 mg, 0.125 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2).

(38 mg, 81% ; solide incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.43-7.10 (m, 10H, H7-11 + H14-18), 4.93 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H19), 4.71 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-12), 4.44 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-12), 4.15 (m, 1H, H1), 3.36 (m, 1H, H2), 3.05 (m, 1H, H3), 2.93 (dd, *J* = 13.6 Hz ; 6.6 Hz, 1H, Ha-5), 2.84 (dd, *J* = 13.6 Hz ; 8.8 Hz, 1H, Hb-5), 2.77 (m, 2H, H4), 1.41 (s, 9H, H22-24)

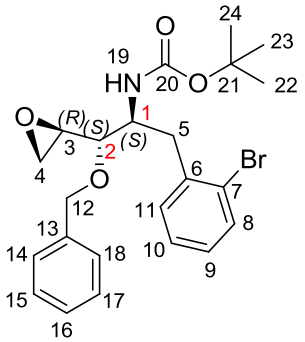
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.43 (C20), 138.03 (C6), 137.97 (C13), 129.24, 128.47, 128.03, 127.98, 126.38 (C7-11 + C14-18), 79.28 (C21), 76.38 (C2), 73.37 (C12), 53.38 (C1), 52.02 (C3), 45.02 (C4), 38.67 (C5), 28.33 (C22-24)

$[\alpha]^{20}_{D}$ = +11.9 (c = 0.010, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{23}H_{29}NNaO_4$: 406.1994 $(M+Na)^+$, masse trouvée 406.1993

---

tert-butyl (1*S*, 2*S*)-2-(benzyloxy)-2-[(2*R*)oxiran-2-yl]-1-(2-bromo-benzyl)-éthylcarbamate *anti*-**95**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **93** en partant de *anti*-**82** (163 mg, 0.34 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2).

(95 mg, 60% ; solide incolore)

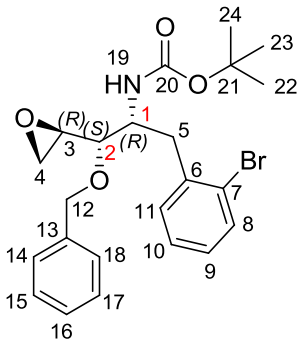
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H8), 7.41-7.31 (m, 5H, H14-18), 7.22 (m, 2H, H10-11), 7.07 (m, 1H, H9), 4.77 (m, 1H, H19), 4.77 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-12), 4.55 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-12), 4.26 (m, 1H, H1), 3.67 (m, 1H, H2), 3.18 (m, 1H, Ha-5), 3.16 (m, 1H, H3), 2.87 (m, 1H, Hb-5), 2.85 (m, 2H, H4), 1.28 (s, 9H, H22-24)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 154.97 (C20), 138.16 (C13), 137.66 (C6), 132.65 (C8), 131.35 (C11), 128.45, 127.79, 127.73 (C14-18), 127.99 (C9), 127.18 (C10), 125.12 (C7), 79.38 (C2), 79.09 (C21), 73.56 (C12), 52.20 (C1), 51.79 (C3), 44.94 (C4), 36.26 (C5), 28.15 (C22-24)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{23}H_{28}BrNNaO_4$: 484.1099 $(M+Na)^+$, masse trouvée 484.1093

____

tert-butyl (1*R*, 2*S*)-2-(benzyloxy)-2-[(2*R*)oxiran-2-yl]-1-(2-bromo-benzyl)-éthylcarbamate *syn*-**96**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **93** en partant de *syn*-**83** (383 mg, 0.8 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (éluant cyclohexane/AcOEt 8/2).

(253 mg, 69% ; solide incolore)

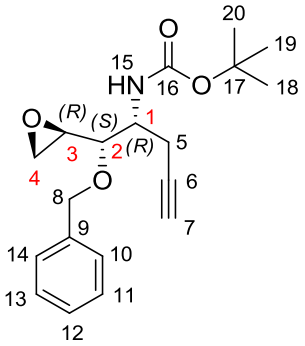
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H8), 7.40-7.32 (m, 5H, H14-18), 7.22 (m, 2H, H10-11), 7.08 (m, 1H, H9), 4.98 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H19), 4.75 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-12), 4.55 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-12), 4.34 (m, 1H, H1), 3.42 (dd, *J* = 4.8 Hz ; 1.5 Hz, 1H, H2), 3.10 (m, 1H, H3), 3.06 (m, 2H, H5), 2.79 (m, 2H, H4), 1.36 (s, 9H, H22-24)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.12 (C20), 137.88 (C13), 137.45 (C6), 132.66 (C8), 131.13 (C11), 128.30, 127.95, 127.82 (C14-18), 127.78 (C9), 127.21 (C10), 124.91 (C7), 78.96 (C21), 77.76 (C2), 73.16 (C12), 51.91 (C1), 51.64 (C3), 45.02 (C4), 38.53 (C5), 28.13 (C22-24)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{23}H_{28}BrNNaO_4$: 484.1099 $(M+Na)^+$, masse trouvée 484.1078

____

tert-butyl (1*R*, 2*S*)-2-(benzyloxy)-2-[(2*R*)oxiran-2-yl]-1-(propargyl)-éthylcarbamate *syn*-**97**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour **93** en partant de *syn*-**79** (450 mg, 1.28 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (éluant cyclohexane/AcOEt 8/2).

(307 mg, 72% ; huile incolore)

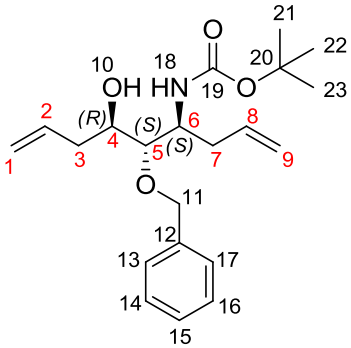
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.38-7.30 (m, 5H, H10-14), 4.88 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H15), 4.72 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, Ha-8), 4.53 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, Hb-8), 4.06 (m, 1H, H1), 3.79 (dd, J = 4.2 Hz ; 1.7 Hz, 1H, H2), 3.09 (m, 1H, H3), 2.79 (m, 2H, H4), 2.50 (m, 2H, H5), 2.01 (t, *J* = 2.8 Hz ; 2.5 Hz, 1H, H7), 1.43 (s, 9H, H18-20)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.31 (C16), 137.1 (C9), 128.45, 128.14, 128.01 (C10-14), 80.49 (C6), 79.60 (C17), 76.63 (C2), 74.04 (C8), 70.66 (C7), 51.75 (C3), 51.09 (C1), 44.94 (C4), 28.31 (C18-20), 21.57 (C5)

$[\alpha]^{20}_{D}$ = +5.8 (c = 0.010, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{25}NNaO_4$: 354.1681 $(M+Na)^+$, masse trouvée 354.1681

(4*R*, 5*S*, 6*S*)-6-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-5-(benzyloxy)-4-(hydroxyl)-1,8-nonadiène *anti*-**101**



A une solution de *anti*-**90** (101 mg, 0.303 mmol) dans Et_2O (3.43 mL) refroidie à 0°C, sont ajoutés CuCN (50 %, 13.6 mg, 0.151 mmol), puis le bromure de vinyle magnésium (1 M dans Et_2O, 1.21 mL, 1.21 mmol, 4 eq.) goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 1 h, puis traité avec une sol. sat. NH_4Cl et dilué dans AcOEt. Les phases sont séparées et la phase organique est lavée avec une sol. aq. 1N $NaHCO_3$, puis une sol. sat. NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2).

(61 mg, 55% ; huile orange)

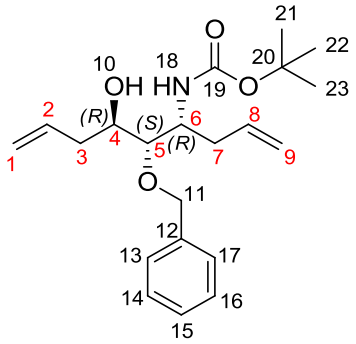
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.30 (m, 5H, H13-17), 5.82 (m, 1H, H8), 5.82 (m, 1H, H2), 5.18 (m, 2H, H9) 5.09 (m, 2H, H1), 4.70 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-11), 4.62 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-11), 4.58 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H18), 4.00 (m, 1H, H6), 3.8 (m, 1H, H4), 3.49 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H5), 2.54 (m, 1H, Ha-3), 2.51 (m, 1H, Ha-7), 2.29 (m, 1H, Hb-7), 2.24 (m, 1H, Hb-3), 2.16 (sl, 1H, H10), 1.43 (s, 9H, H21-23)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.58 (C19), 138.16 (C12), 135.00 (C8), 134.78 (C2), 128.48, 127.84 (C13-17), 118.50 (C9), 117.50 (C1), 83.11 (C5), 79.31 (C20), 73.91 (C11), 70.70 (C4), 50.68 (C6), 37.92 (C3), 34.88 (C7), 28.37 (C21-23)

$[\alpha]^{20}_{D}$ = -12.4 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{21}H_{31}NNaO_4$: 384.2151 $(M+Na)^+$, masse trouvée 384.2143

(4*R*, 5*S*, 6*R*)-6-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-5-(benzyloxy)-4-(hydroxyl)-1,8-nonadiène *syn*-**102**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour *anti*-**101** en partant de *syn*-**91** (113 mg, 0.339 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1). Le produit *syn*-**102** est obtenu en mélange avec le sous-produit bromhydrine *syn*-**103** (20%).

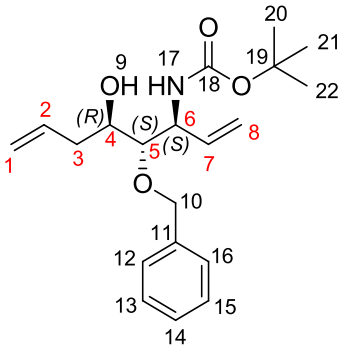
(140 mg total ; soit 109 mg de produit désiré, 53% ; huile incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.40-7.31 (m, 5H, H13-17), 5.95 (dddd, *J* = 16.8 Hz ; 10.0 Hz ; 7.3 Hz ; 6.8 Hz, 1H, H8), 5.82 (dddd, J = 16.6 Hz ; 9.6 Hz ; 6.9 Hz ; 6.8 Hz, 1H, H2), 5.13 (m, 2H, H9), 5.13 (m, 2H, H1), 4.81 (d, *J* = 10.1Hz, 1H, H18), 4.67 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, Ha-11), 4.61 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, Hb-11), 4.12 (m, 1H, H6), 3.80 (sl, 1H, H10), 3.63 (m, 1H, H4), 3.29 (dd, *J* = 8.6 Hz ; 1.1 Hz, 1H, H5), 2.59 (m, 1H, Ha-3), 2.36 (m, 2H, H7), 2.27 (m, 1H, Hb-3), 1.44 (s, 9H, H21-23)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 157.01 (C19), 137.86 (C12), 135.33 (C8), 134.77 (C2), 128.50, 127.98, 127.84 (C13-17), 117.53 (C9), 117.27 (C1), 83.26 (C5), 79.97 (C20), 74.78 (C11), 70.13 (C4), 50.69 (C6), 37.57 (C3), 36.81 (C7), 28.27 (C20-23)

LCMS (m/z) : masse calculée pour $C_{21}H_{31}NNaO_4$: 384.2 $(M+Na)^+$, masse trouvée 384.2
[colonne Eclipse XDB-C18, 2.1x30 mm, 3.5 µm, 0.3 mL/min, 30 °C, gradient H_2O (+ 0.1% acide formique)/MeCN (+ 0.1% acide formique) 40/60 à 0/100 en 10 min]

(4*R*, 5*S*, 6*S*)-6-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-5-(benzyloxy)-4-(hydroxyl)-1,7-octadiène *anti*-**104**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour *anti*-**101** en partant de *anti*-**92** (113 mg, 0.354 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1).

(82 mg, 69% ; huile incolore)

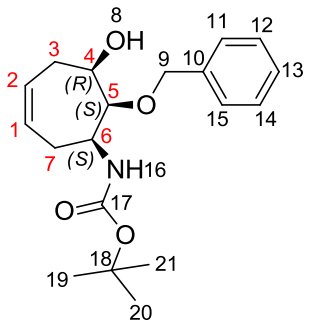
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.40-7.30 (m, 5H, H12-16), 5.97 (ddd, *J* = 17.1 Hz ; 10.4 Hz ; 6.5 Hz, 1H, H7), 5.84 (m, 1H, H2), 5.27 (dt, *J* = 17.1 Hz ; 1.2 Hz, 1H, Ha-8), 5.21 (dt, *J* = 10.4 Hz ; 1.2 Hz, 1H, Hb-8), 5.17 (m, 2H, H1), 4.84 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H17), 4.69 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-10), 4.62 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-10), 4.55 (m, 1H, H6), 3.76 (m, 1H, H4), 3.49 (dd, *J* = 6.4 Hz ; 3.6 Hz, 1H, H5), 2.54 (m, 1H, Ha-3), 2.25 (m, 1H, Hb-3), 2.05 (sl, 1H, H9), 1.44 (s, 9H, H20-22)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.24 (C18), 137.94 (C11), 135.12 (C7), 134.51 (C2), 128.55, 127.96, 127.89 (C12-16), 118.59 (C8), 116.65 (C1), 83.51 (C5), 79.45 (C19), 73.82 (C10), 70.75 (C4), 53.83 (C6), 38.01 (C3), 28.36 (C20-22)

$[\alpha]^{20}_D$ = -28.3 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{20}H_{29}NNaO_4$: 370.1994 $(M+Na)^+$, masse trouvée 370.1996

(4*R*, 5*S*, 6*S*)-6-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-5-(benzyloxy)-4-(hydroxyl)-cycloheptène (4*R*,5*S*,6*S*)-**105**



A une solution de *anti*-**101** (120 mg, 0.332 mmol) dans toluène (3.32 mL), est ajouté le catalyseur de Grubbs II (3 %, 8.46 mg, 0.00996 mmol). Le mélange réactionnel est agité 10 min à TA, puis 4 h à 60 °C, avant d'être concentré à l'évaporateur rotatif. Le produit brut est filtré sur silice (cyclohexane/AcOEt 8/2).

(105 mg, 95% ; huile jaune)

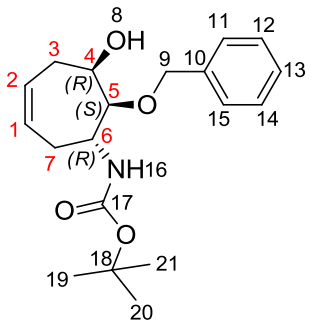
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.40-7.30 (m, 5H, H11-15), 5.77 (m, 1H, H2), 5.77 (m, 1H, H1), 5.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H16), 4.77 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-9), 4.73 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-9), 4.04 (m, 1H, H6), 3.98 (m, 1H, H4), 3.66 (m, 1H, H5), 2.70 (m, 1H, Ha-3), 2.61 (m, 1H, Ha-7), 2.22 (sl, 1H, H8), 2.10 (m, 1H, Hb-7), 1.97 (m, 1H, Hb-3) 1.44 (s, 9H, H19-21)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.43 (C17), 138.42 (C10), 129.19 (C1), 128.50, 127.83 (C11-15), 127.91 (C2), 83.40 (C5), 79.06 (C18), 72.90 (C9), 71.25 (C4), 49.08 (C6), 30.03 (C3), 28.40 (C19-21), 28.35 (C7)

$[\alpha]^{20}_{D}$ = -2.4 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{27}NaNO_4$: 356.1838 $(M+Na)^+$, masse trouvée 356.1829

(4*R*, 5*S*, 6*R*)-6-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-5-(benzyloxy)-4-(hydroxyl)-cycloheptène (4*R*,5*S*,6*R*)-**106**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour (4*R*,5*S*,6*S*)-**105** en partant de *syn*-**102** (117 mg, 0.324 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2).

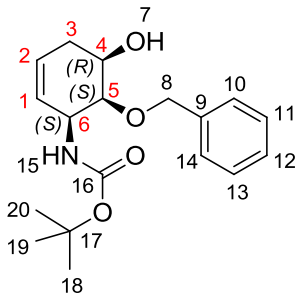
(47 mg, 44% ; huile jaune)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.30 (m, 5H, H11-15), 5.85 (m, 1H, H1), 5.71 (m, 1H, H2), 4.83 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-9), 4.69 (m, 1H, H16), 4.60 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-9), 4.13 (m, 1H, H6), 3.84 (m, 1H, H5), 3.73 (m, 1H, H4), 2.75 (m, 1H, Ha-7), 2.77 (m, 1H, Ha-3), 2.33 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H8), 2.12 (m, 1H, Hb-7), 2.11 (m, 1H, Hb-3), 1.47 (s, 9H, H19-21)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.10 (C17), 138.18 (C10), 129.93 (C1), 128.54 (C2), 128.54, 127.86, 127.72 (C11-15), 83.26 (C5), 79.67 (C18), 72.20 (C9), 67.30 (C4), 48.05 (C6), 30.93 (C3), 28.40 (C19-21), 26.07 (C7)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{27}NNaO_4$: 356.1838 $(M+Na)^+$, masse trouvée 356.1832

(4*R*, 5*S*, 6*S*)-6-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-5-(benzyloxy)-4-(hydroxyl)-cyclohexène (4*R*,5*S*,6*S*)-**107**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour (4*R*,5*S*,6*S*)-**105** en partant de *anti*-**104** (128 mg, 0.368 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2).

(98 mg, 83% ; huile marron pâle)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.40-7.29 (m, 5H, H10-14), 5.68 (m, 1H, H1), 5.64 (m, 1H, H2), 5.27 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H15), 4.80 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-8), 4.64 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-8), 4.55 (m, 1H, H6), 4.09 (m, 1H, H4), 3.72 (dd, *J* = 5.0 Hz ; 1.8 Hz, 1H, H5), 2.31 (m, 2H, H3), 2.15 (sl, 1H, H7), 1.46 (s, 9H, H18-20)

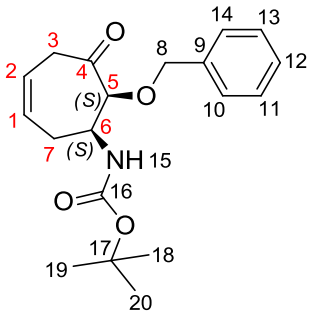
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.70 (C16), 138.25 (C9), 128.46, 128.00, 127.81 (C10-14), 126.33 (C2), 125.43 (C1), 79.23 (C17), 76.68 (C5), 72.42 (C8), 68.82 (C4), 46.89 (C6), 31.61 (C3), 28.40 (C18-20)

$[\alpha]^{20}_D$ = +117 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{18}H_{25}NNaO_4$: 342.1681 $(M+Na)^+$, masse trouvée 342.1679

——

(5*S*, 6*S*)-6-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-5-(benzyloxy)-4-oxo-cycloheptène (5*S*,6*S*)-**108**



A une solution de (4*R*,5*S*,6*S*)-**105** (82 mg, 0.246 mmol) dans DMSO (1.12 mL) et CH_2Cl_2 (1.97 mL), sont ajoutés DIPEA (0.203 mL, 1.23 mmol, 5 eq.) et le complexe trioxyde de soufre-pyridine (159 mg, 0.984 mmol, 4 eq.). Le mélange réactionnel est agité à -20 °C pendant 1 h, puis traité avec H_2O. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3x). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2).

(67 mg, 83% ; solide incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.40-7.33 (m, 5H, H10-14), 5.84 (m, 1H, H1), 5.72 (m, 1H, H2), 4.99 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H15), 4.69 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, Ha-8), 4.48 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, Hb-8), 4.14 (m, 1H, H6), 4.10 (m, 1H, H5),

3.50 (dd, *J* = 13.1 Hz ; 5.0 Hz, 1H, Ha-3), 2.93 (dd, *J* = 13.1 Hz ; 6.3 Hz, 1H, Hb-3), 2.75 (m, 1H, Ha-7), 2.21 (m, 1H, Hb-7), 1.43 (s, 9H, H18-20)

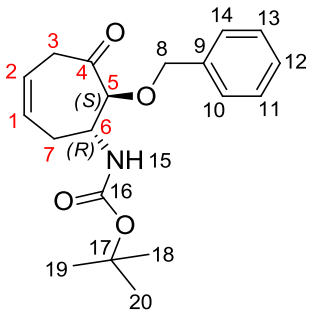
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 204.87 (C4), 154.86 (C16), 137.00 (C9), 130.09 (C1), 128.55, 128.14, 128.01 (C10-14), 123.61 (C2), 86.43 (C5), 79.62 (C17), 72.81 (C8), 51.73 (C6), 38.92 (C3), 29.35 (C7), 28.31 (C18-20)

$[\alpha]^{20}_D$ = -9.5 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{25}NNaO_4$: 354.1681 $(M+Na)^+$, masse trouvée 354.1675

——

(5*S*, 6*R*)-6-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-5-(benzyloxy)-4-oxo-cycloheptène (5*S*,6*R*)-**109**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour (5*S*,6*S*)-**108** en partant de (4*R*,5*S*,6*R*)-**106** (48 mg, 0.144 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 9/1).

(28 mg, 59% ; solide blanc)

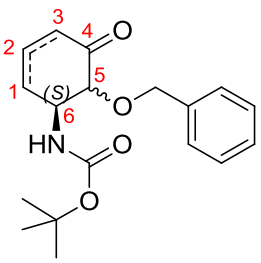
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.40-7.29 (m, 5H, H10-14), 5.80 (m, 1H, H2), 5.80 (m, 1H, H1), 4.64 (sl, 1H, H15), 4.60 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, Ha-8), 4.54 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, Hb-8), 4.14 (m, 1H, H6), 4.00 (m, 1H, H5), 3.71 (m, 1H, Ha-3), 2.82 (m, 1H, Hb-3), 2.82 (m, 1H, Ha-7), 2.36 (m, 1H, Hb-7), 1.44 (s, 9H, H18-20)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 205.43 (C6), 155.00 (C16), 137.11 (C9), 128.73 (C1), 128.46, 128.01, 127.90 (C10-14), 124.99 (C2), 87.03 (C5), 79.87 (C17), 72.40 (C8), 52.28 (C6), 39.46 (C3), 28.31 (C18-20), 27.50 (C7)

$[\alpha]^{20}_D$ = +52 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{25}NNaO_4$: 354.1681 $(M+Na)^+$, masse trouvée 354.1686

——



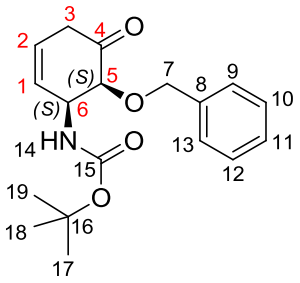
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour (5*S*,6*S*)-**108** en partant de (4*R*,5*S*,6*S*)-**107** (70 mg, 0.219 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2). Un mélange 75/19/6 des produits (5*S*,6*S*)-**110**/(5*S*,6*S*)-**111**/(5*R*,6*S*)-**112** est obtenu (62 mg, 89% ; solide beige).

(5*S*,6*S*)-**110** (5*S*, 6*S*)-6-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-5-(benzyloxy)-4-oxo-cyclohex-1-ène, 75% (RMN)

(5*S*,6*S*)-**111** (5*S*, 6*S*)-6-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-5-(benzyloxy)-4-oxo-cyclohex-2-ène, 19% (RMN)

(5*R*,6*S*)-**112** (5*R*, 6*S*)-6-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-5-(benzyloxy)-4-oxo-cyclohex-1-ène, 6% (RMN)

Caractérisation de l'isomère majoritaire (5*S*,6*S*)-**110** :

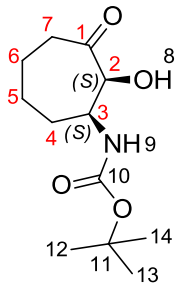


^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.38-7.28 (m, 5H, H9-13), 5.81 (m, 2H, H1-2), 4.82 (m, 1H, H14), 4.79 (m, 1H, H6), 4.67 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, Ha-7), 4.59 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, Hb-7), 4.14 (m, 1H, H5), 3.09 (d, *J* = 20.2 Hz, 1H, Ha-3), 2.90 (d, *J* = 20.2 Hz, 1H, Hb-3), 1.44 (s, 9H, H17-19)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 205.61 (C4), 148.89 (C15), 137.00 (C8), 128.50, 128.03, 127.91 (C9-13), 127.11 (C1), 125.26 (C2), 80.73 (C5), 79.41 (C16), 71.78 (C7), 51.63 (C6), 39.31 (C3), 28.28 (C17-19)

LCMS (m/z) : masse calculée pour $C_{18}H_{23}NNaO_4$: 340.2 $(M+Na)^+$, masse trouvée 340.2
[colonne Eclipse XDB-C18, 2.1x30 mm, 3.5 µm, 0.25 mL/min, 30 °C, H_2O (+ 0.1% acide formique)/MeCN (+ 0.1% acide formique) 20/80]

(2*S*, 3*S*)-3-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-2-(hydroxyl)-cycloheptanone (2*S*,3*S*)-**114**



A une solution de (5*S*,6*S*)-**108** (45 mg, 0.136 mmol) dans MeOH (1.13 mL), est ajouté $Pd(OH)_2/C$ (20% Pd) (20%w/w, 9 mg, 0.0128 mmol). Le mélange réactionnel est placé sous H_2 et agité à 60 °C pendant 5 h. $Pd(OH)_2/C$ (20%) (20%w/w, 9 mg, 0.0128 mmol) est alors à nouveau ajouté et le mélange réactionnel est placé sous H_2 et agité à 60 °C pendant 5 h. Il est ensuite filtré sur Whatman, rincé avec MeOH et concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 7/3).

(26 mg, 79% ; huile incolore)

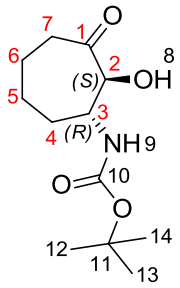
^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 4.95 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H9), 4.39 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H2), 4.15 (m, 1H, H3), 3.96 (sl, 1H, H8), 2.68 (m, 1H, Ha-7), 2.48 (m, 1H, Hb-7), 1.91-1.58 (m, 6H, H4-6), 1.43 (s, 9H, H12-14)

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) : δ 212.02 (C1), 155.52 (C10), 79.71 (C11), 77.62 (C2), 52.63 (C3), 39.72 (C7), 31.79 (C4), 28.30 (C12-14), 26.41, 25.50 (C1-2)

[α]$^{20}_{D}$ = +6.7 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{12}H_{21}NNaO_4$: 266.1368 $(M+Na)^+$, masse trouvée 266.1362

(2*S*, 3*R*)-3-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-2-(hydroxyl)-cycloheptanone (2*S*,3*R*)-**115**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour (2*S*,3*S*)-**114** en partant de (5*S*,6*R*)-**109** (36 mg, 0.109 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 7/3).

(16 mg, 61% ; solide incolore)

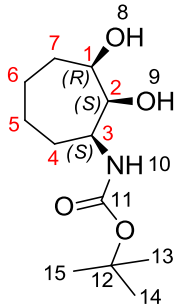
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 4.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H8), 4.19 (dd, *J* = 9.6 Hz ; 5.8 Hz, 1H, H2), 3.78 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, H9), 3.35 (m, 1H, H3), 2.71 (m, 1H, Ha-7), 2.50 (ddd, *J* = 18.1 Hz ; 11.6 Hz ; 4.3 Hz, 1H Hb-7), 2.28 (m, 1H, Ha-4), 1.93 (m, 1H, Ha-6), 1.93 (m, 1H, Ha-5), 1.72 (m, 1H, Hb-6), 1.61 (m, 1H, Hb-4), 1.35 (m, 1H, Hb-5)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 211.37 (C1), 156.03 (C10), 79.63 (C11), 78.76 (C2), 53.97 (C3), 40.15 (C7), 34.81 (C4), 28.32 (C12-14), 25.50 (C5), 22.48 (C6)

[α]$^{20}_{D}$ = +39.4 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{12}H_{21}NNaO_4$: 266.1368 $(M+Na)^+$, masse trouvée 266.1361

(1*R*, 2*S*, 3*S*)-3-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-1,2-(dihydroxy)-cycloheptane (1*R*,2*S*,3*S*)-**113**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour (2*S*,3*S*)-**114** en partant de (4*R*,5*S*,6*S*)-**105** (80 mg, 0.24 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 1/1).

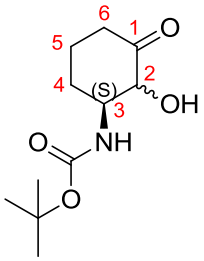
(42 mg, 71% ; huile incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 5.34 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H10), 3.96 (m, 1H, H2), 3.84 (m, 1H, H1), 3.67 (m, 1H, H3), 3.61 (sl, 1H, H8), 3.21 (sl, 1H, H9), 1.85 (m, 1H, Ha-4), 1.85 (m, 1H, Ha-7), 1.67-1.46 (m, 6H, Hb-4 + Hb-7 + H5-6), 1.43 (s, 9H, H13-15)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.76 (C11), 79.42 (C12), 76.33 (C2), 73.22 (C1), 52.46 (C3), 29.75 (C4), 28.40 (C13-15), 27.72 (C7), 23.43, 21.58 (C5-6)

$[\alpha]^{20}_{D}$ = -21 (c = 0.01, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{12}H_{23}NNaO_4$: 268.1525 $(M+Na)^+$, masse trouvée 268.1530

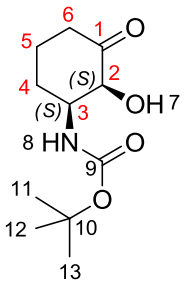


Le mode opératoire est identique à celui décrit pour (2*S*,3*S*)-**114** en partant du mélange 75/19/6 de (5*S*,6*S*)-**110**/(5*S*,6*S*)-**111**/(5*R*,6*S*)-**112** (88 mg, 0.277 mmol) et en remplaçant MeOH par AcOEt. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 1/1). Un mélange 73/27 des deux épimères (2*S*,3*S*)-**116**/(2*R*,3*S*)-**117** est obtenu (38 mg, 60% ; huile incolore).

(2*S*,3*S*)-**116** (2*S*, 3*S*)-3-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-2-(hydroxy)-cyclohexanone, 73% (RMN)

(2*R*,3*S*)-**117** (2*R*, 3*S*)-3-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-2-(hydroxyl)-cyclohexanone, 27% (RMN)

RMN de l'épimère majoritaire (2*S*,3*S*)-**116** :

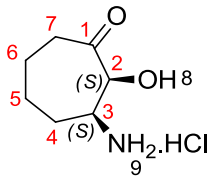


^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 4.51 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H8), 4.31 (m, 1H, H3), 4.26 (m, 1H, H2), 3.77 (m, 1H, H7), 2.54 (m, 1H, Ha-6), 2.37 (m, 1H, Hb-6), 2.36 (m, 1H, Ha-4), 1.88 (m, 2H, H5), 1.79 (m, 1H, Hb-4), 1.41 (s, 9H, H11-13)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 210.32 (C1), 155.81 (C9), 78.57 (C10), 75.92 (C2), 55.12 (C3), 38.99 (C6), 28.30 (C4), 28.25 (C11-13), 21.31 (C5)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{11}H_{19}NNaO_4$: 252.1212 $(M+Na)^+$, masse trouvée 252.1216

Chlorhydrate de (2*S*, 3*S*)-3-(amino)-2-(hydroxy)-cycloheptanone (2*S*,3*S*)-**120**



A une solution de (2*S*,3*S*)-**114** (42 mg, 0.173 mmol) dans Et_2O (1 mL), est ajouté HCl (2 M dans Et_2O, 2 mL, 4 mmol). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant la nuit. Le solide formé est centrifugé et lavé avec Et_2O froid.

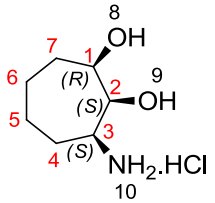
(30 mg, 97% ; solide beige)

^{1}H RMN (400 MHz, D_2O) : δ 4.62 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H2), 3.89 (m, 1H, H3), 2.69 (m, 1H, Ha-7), 2.54 (m, 1H, Hb-7), 1.94-1.54 (m, 6H, H4-6)

^{13}C RMN (100 MHz, D_2O) : δ 214.35 (C1), 75.59 (C2), 52.84 (C3), 40.13 (C7), 28.76 (C4), 25.48 (C5), 24.74 (C6)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_7H_{14}NO_2$: 144.1025 $(M+H)^+$, masse trouvée 144.1019

Chlorhydrate de (1*R*, 2*S*, 3*S*)-3-(amino)-1,2-(dihydroxy)-cycloheptane (1*R*,2*S*,3*S*)-**119**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour (2*S*,3*S*)-**120** en partant de (1*R*,2*S*,3*S*)-**113** (40 mg, 0.163 mmol).

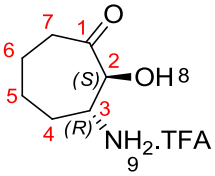
(20 mg, 68% ; solide incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD) : δ 3.98 (dd, *J* = 3.3 Hz ; 1.3 Hz, 1H, H2), 3.87 (ddd, *J* = 9.0 Hz ; 2.8 Hz ; 1.3 Hz, 1H, H1), 3.38 (ddd, *J* = 9.3 Hz ; 5.6 Hz ; 3.3 Hz, 1H, H3), 2.01-1.46 (m, 8H, H4-7)

^{13}C RMN (100 MHz, MeOD) : δ 74.90 (C1), 74.02 (C2), 54.78 (C3), 31.07 (C7), 28.23 (C4), 23.99, 23.59 (C5-6)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_7H_{16}NO_2$: 146.1181 $(M+H)^+$, masse trouvée 146.1174

Trifluoroacétate de (2*S*, 3*R*)-3-(amino)-2-(hydroxy)-cycloheptanone (2*S*,3*R*)-**121**



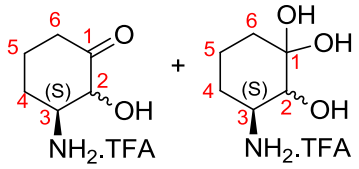
A une solution de (2*S*,3*R*)-**115** (10 mg, 0.0411 mmol) dans CH_2Cl_2 (0.0377 mL) refroidie à 0 °C, est ajouté TFA (11.9 eq., 55.8 mg, 0.0377 mL, 0.489 mmol). Le mélange réactionnel est agité à 0 °C pendant 30 min, puis concentré à l'évaporateur rotatif.

(6 mg, 56% ; huile incolore)

^{1}H RMN (300 MHz, D_2O) : δ 4.58 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H, H2), 3.18 (td, *J* = 10.7 Hz ; 3.2 Hz, 1H, H3), 2.77 (dt, J = 18.3 Hz ; 4.6 Hz, 1H, Ha-7), 2.50 (ddd, J = 18.3 Hz ; 11.8 Hz ; 4.8 Hz, 1H, Hb-7), 2.21 (m, 1H, Ha-4), 2.07 (m, 4H, Hb-4 + Ha-6 + H5), 1.32 (m, 1H, Hb-6)

^{13}C RMN (75 MHz, D_2O) : δ 212.78 (C1), 75.69 (C2), 52.97 (C3), 39.97 (C7), 31.37 (C4), 24.01 (C5), 20.93 (C6)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_7H_{14}NO_2$: 144.1025 $(M+H)^+$, masse trouvée 144.1018



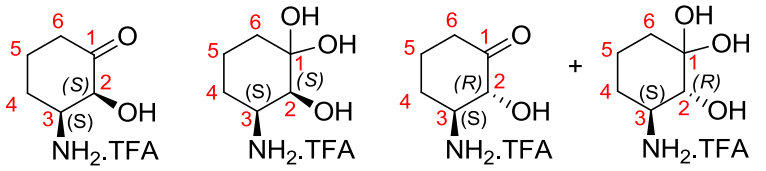
Le mode opératoire est identique à celui décrit pour (2*S*,3*R*)-**121** en partant d'un mélange 73/27 des deux épimères (2*S,3S*)-**116**/(2*R,3S*)-**117** (10 mg, 0.0436 mmol). Un mélange 8/40/30/22 de (2*S*,3*S*)-**124** /(2*S*,3*S*)-**126**/(2*R*,3*S*)-**125**/(2*R*,3*S*)-**127** est obtenu (7 mg, 67% ; huile incolore).

(2*S*,3*S*)-**124** Trifluoroacétate de (2*S*, 3*S*)-3-(amino)-2-(hydroxy)-cyclohexanone, 8% (RMN)

(2*S*,3*S*)-**126** Trifluoroacétate de (2*S*, 3*S*)-3-(amino)-2-(hydroxy)-1,1-(dihydroxy)-cyclohexane, 40% (RMN)

(2*R*,3*S*)-**125** Trifluoroacétate de (2*R*, 3*S*)-3-(amino)-2-(hydroxy)-cyclohexanone, 30% (RMN)

(2*R*,3*S*)-**127** Trifluoroacétate de (2*R*, 3*S*)-3-(amino)-2-(hydroxy)-1,1-(dihydroxy)-cyclohexane, 22% (RMN)



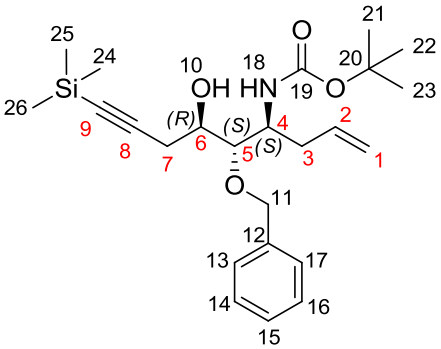
(2*S*,3*S*)-**124** (2*S*,3*S*)-**126** (2*R*,3*S*)-**125** (2*R*,3*S*)-**127**

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 4.54 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H2, (2*S*,3*S*)-**124**), 4.31 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H2, (2*R*,3*S*)-**125**), 4.03 (m, 1H, H3, (2*S*,3*S*)-**124**), 3.68 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H2, (2*S*,3*S*)-**126**), 3.51 (m, 1H, H3, (2*S*)-**126**), 3.46 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, H2, (2*R*,3*S*)-**127**), 3.28 (m, 1H, H3, (2*R*,3*S*)-**125**), 3.15 (m, 1H, H3, (2*R*,3*S*)-**127**), 2.58-1.41 (m, 24H, H4-6, (2*R*,3*S*)-**125**, (2*S*)-**124**, (2*R*,3*S*)-**127**, (2*S*,3*S*)-**126**)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 213.73 (C1, (2*S*,3*S*)-**124**), 210.19 (C1, (2*R*,3*S*)-**125**), 95.38 (C1, (2*S*,3*S*)-**126**), 95.03 (C1, (2*R*,3*S*)-**127**), 76.67 (C2, (2*R*,3*S*)-**125**), 75.48 (C2, (2*R*,3*S*)-**127**), 73.75 (C2, (2*S*,3*S*)-**124**), 71.15 (C2, (2*S*,3*S*)-**126**), 56.31 (C3, (2*R*,3*S*)-**125**), 55.35 (C3, (2*S*,3*S*)-**124**), 53.35 (C3, (2*R*,3*S*)-**127**), 51.38 (C3, (2*S*,3*S*)-**126**), 39.02 (C6, (2*S*,3*S*)-**126**), 38.81 (C6, (2*S*,3*S*)-**124**), 35.90 (C6, (2*R*,3*S*)-**125**), 31.82 (C6, (2*R*,3*S*)-**127**), 28.16 (C4, (2*R*,3*S*)-**125**), 27.82 (C4, (2*S*,3*S*)-**126**), 27.18 (C4, (2*S*,3*S*)-**124**), 23.64(C4, (2*R*,3*S*)-**127**), 21.73 (C5, (2*S*,3*S*)-**126**), 20.53 (C5, (2*S*,3*S*)-**124**), 19.63 (C5, (2*R*,3*S*)-**127**), 18.96 (C5, (2*R*,3*S*)-**125**)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_6H_{12}NO_2$: 130.0868 $(M+H)^+$, masse trouvée 130.0862

(4*S*, 5*S*, 6*R*)-4-[*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]-5-(benzyloxy)-6-(hydroxyl)-9-(triméthylsilyl)-non-1-èn-8-yne *anti*-**128**



A une solution de TMS-acétylène (0.0224 mL, 0.157 mmol, 2.1 eq.) dans THF (0.3 mL) refroidie à -78 °C, est ajouté *n*-BuLi (2.1 eq., 1.54 M, 0.102 mL, 0.157 mmol). Le mélange réactionnel est agité à -78 °C pendant 15 min, puis BF_3•Et_2O (0.0389 mL, 0.157 mmol, 2.1 eq.) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité à -78 °C pendant 15 min, puis une solution de *anti*-**90** (1 eq., 25 mg, 0.075 mmol) dans THF (0.0313 mL) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité à -78 °C pendant 1 h, avant d'être traité avec H_2O et dilué avec Et_2O. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec Et_2O (x2). La phase organique est lavée avec une sol. sat. NaCl, puis séchée sur $MgSO_4$ et et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane /AcOEt 9/1).

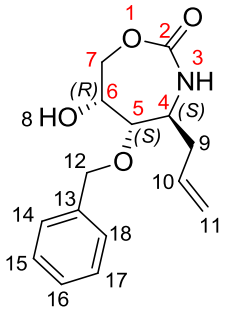
(4 mg, 12% ; huile incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.40-7.31 (m, 5H, H13-17), 5.78 (dddd, *J* = 16.9 Hz ; 10.2 Hz ; 7.4 Hz ; 6.7 Hz, 1H, H2), 5.13-5.06 (m, 2H, H1), 4.70 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-11), 4.63 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-11), 4.57 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H18), 4.03 (m, 1H, H4), 3.84 (m, 1H, H6), 3.62 (m, 1H, H5), 2.62 (ddd, *J* = 16.9 Hz ; 7.7 Hz ; 4.7 Hz, 2H, H7), 2.45 (m, 1H, Ha-3), 2.28 (m, 1H, Hb-3), 1.44 (s, 9H, H21-23), 0.18 (s, 9H, H24-26)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.64 (C19), 138.08 (C12), 134.89 (C2), 128.50, 127.97, 127.89 (C13-17), 117.64 (C1), 102.84 (C9), 88.48 (C8), 82.01 (C5), 79.36 (C20), 74.03 (C11), 69.91 (C6), 50.56 (C4), 34.83 (C3), 28.36 (C21-23), 25.38 (C7), 0.04 (C24-26)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{24}H_{37}NNaO_4Si$: 454.2390 $(M+ Na)^+$, masse trouvée 454.2382

(4*S*,5*S*,6*R*)-5-(benzyloxy)-6-(hydroxyl)-4-(allyl)-1,3-oxazepan-2-one *anti*-**131**

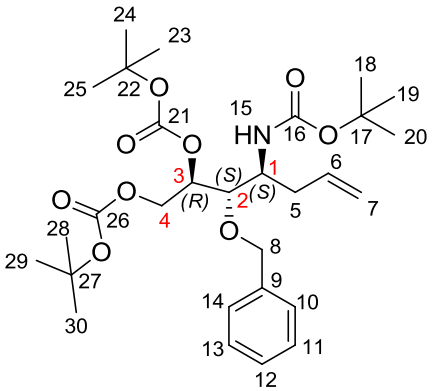


^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.41-7.31 (C14-18), 5.68 (dddd, *J* = 17.1 Hz ; 10.3 Hz ; 7.7 Hz ; 6.9 Hz, 1H, H10), 5.24-5.15 (m, 2H, H11), 4.67 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, Ha-12), 4.51 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, Hb-12), 4.39 (m, 1H, H5), 3.98 (dd, *J* = 11.9 Hz ; 6.9 Hz, 1H, Ha-7), 3.77 (dd, *J* =11.9 Hz ; 4.6 Hz, 1H, Hb-7), 3.62-3.57 (m, 2H, H4 + H6), 2.31 (m, 1H, Ha-9), 2.21 (m, 1H, Hb-9)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 152.89 (C2), 136.76 (C13), 132.10 (C10), 128.71, 128.43, 128.12 (C14-18), 120.12 (C11), 76.00 (C5), 71.75 (C12, 70.63 (C6), 61.48 (C7), 52.58 (C4), 39.40 (C9)

---

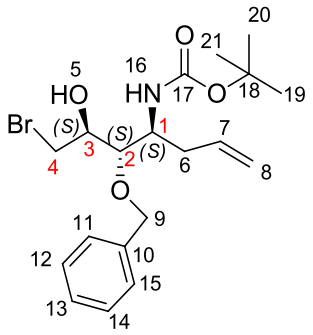
tert-butyl (1*S*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3,4-(*tert*-butoxycarbonyl)-butylcarbamate *anti*-**133**



^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.38-7.30 (m, 5H, H10-14), 5.72 (dddd, *J* = 16.9 Hz ; 10.5 Hz ; 7.1 Hz ; 6.4 Hz, 1H, H6), 5.10-5.00 (m, 2H, H7), 4.74 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, Ha-8), 4.63 (m, 1H, H3), 4.58 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, Hb-8), 4.50 (dd, *J* = 12.7 Hz ; 2.1 Hz, 1H, Ha-4), 4.26 (dd, *J* = 12.7 Hz ; 7.1 Hz, 1H, Hb-4), 3.89 (m, 1H, H1), 3.74 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H2), 2.43 (m, 1H, Ha-5), 2.19 (m, 1H, Hb-5), 1.49 (s, 9H, H23-25), 1.48 (s, 9H, H28-30), 1.43 (s, 9H, H18-20)

---

tert-butyl (1*S*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(allyl)-3-(hydroxyl)-4-(bromo)-butylcarbamate *anti*-**134**



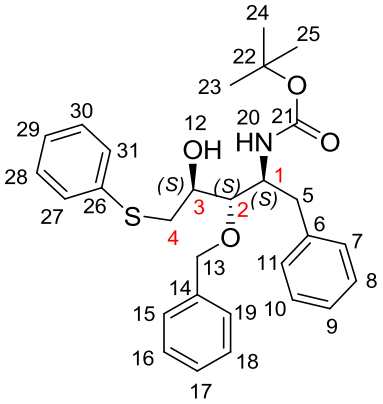
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.40-7.30 (m, 5H, H11-15), 5.77 (dddd, *J* = 16.8 Hz ; 10.3 Hz ; 7.3 Hz ; 6.8 Hz, 1H, H7), 5.13-5.09 (m, 2H, H8), 4.70 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-9), 4.65 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-9), 4.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H16), 4.02 (m, 1H, H2), 3.86 (td, *J* = 6.5 Hz ; 3.0 Hz, 1H, H3), 3.75 (dd, *J* = 10.6 Hz ; 3.0 Hz, 1H, Ha-4), 3.65 (dd, *J* = 10.3 Hz ; 3.0 Hz, 1H, Hb-4), 3.63 (m, 1H, H1), 2.73 (sl, 1H, H5), 2.46 (m, 1H, Ha-6), 2.27 (m, 1H, Hb-6), 1.44 (s, 9H, H19-21)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 158.82 (C17), 137.80 (C10), 134.63 (C7), 128.55, 128.00 (C11-15), 117.93 (C8), 81.43 (C2), 74.23 (C9), 71.35 (C3), 50.73 (C1), 38.53 (C6), 34.69 (C4), 28.34 (C19-21)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{28}BrNNaO_4$: 436.1099 $(M+Na)^+$, masse trouvée 436.1087

---

tert-butyl (1*S*, 2*S*, 3*S*)-1-(benzyl)-2-(benzyloxy)-3-(hydroxyl)-4-(phénylsufanyl)-butylcarbamate *anti*-**135**



A une solution de *anti*-**93** (160 mg, 0.417 mmol) dans MeOH (4,266 mL), sont ajoutés successivement NEt_3 (58 µL, 0.417 mmol, 1 eq.) et PhSH (46.9 µL, 0.459 mmol, 1.1 eq.). Le mélange réactionnel est agité à 65 °C pendant 2 h, puis concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2).

(183 mg, 89% ; solide incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.39-7.19 (m, 15H, H7-11 + H15-19 + H27-31), 4.64 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-13), 4.58 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-13), 4.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H20), 4.22 (m, 1H, H1), 3.88 (m, 1H, H3), 3.60 (m, 1H, H2), 3.41 (dd, *J* = 13.9 Hz ; 3.1 Hz, 1H, Ha-4), 3.12 (m, 1H, Ha-5), 2.99 (dd, *J* = 13.9 Hz ; 8.7 Hz, 1H, Hb-4), 2.87 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H12), 2.71 (dd, *J* = 13.1 Hz ; 9.3 Hz, 1H, Hb-5), 1.33 (s, 9H, H23-25)

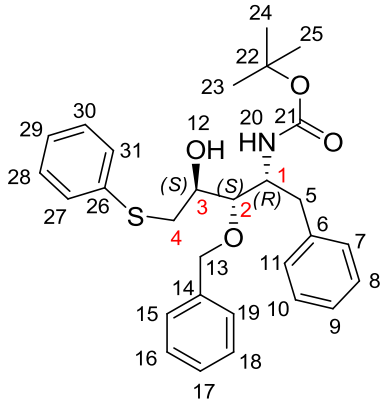
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.51 (C21), 138.28 (C6), 137.92 (C14), 134.99 (C26), 129.65, 129.34, 129.09, 128.47, 128.38, 128.04, 127.88, 126.48, 126.28 (C7-11 + C15-19 + C27-31), 81.84 (C2), 79.37 (C22), 73.62 (C13), 69.72 (C3), 52.62 (C1), 38.55 (C4), 37.14 (C5), 28.26 (C23-25)

$[\alpha]^{20}_D$ = -5.4 (c = 0.010, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{36}NO_4S$: 494.2365 $(M+H)^+$, masse trouvée 494.2352

---

tert-butyl (1*R*, 2*S*, 3*S*)-1-(benzyl)-2-(benzyloxy)-3-(hydroxyl)-4-(phénylsufanyl)-butylcarbamate *syn*-**136**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour *anti*-**135** en partant de *syn*-**94** (122 mg, 0.318 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 8/2).

(152 mg, 97% ; solide incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.41-7.15 (m, 15H, H7-11 + H15-19 + H27-31), 4.90 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H20), 4.67 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-13), 4.62 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-13), 4.38 (m, 1H, H1), 3.96 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H12), 3.78 (m, 1H, H3), 3.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H2), 3.4 (dd, *J* = 13.4 Hz ; 2.8 Hz, 1H, Ha-5), 3.01 (dd, *J* = 13.4 Hz ; 8.1 Hz, 1H, Hb-5), 2.88 (m, 2H, H4), 1.34 (s, 9H, H23-25)

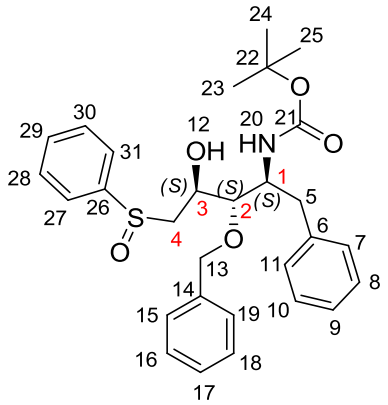
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 156.58 (C21), 137.85 (C6), 137.69 (C14), 136.20 (C26), 129.18, 128.89, 128.85, 128.51, 128.43, 128.03, 127.93, 126.38, 125.95 (C7-11 + C15-19 + C27-31), 82.13 (C2), 79.85 (C22), 74.64 (C13), 69.94 (C3), 51.99 (C1), 38.34 (C4), 37.99 (C5), 28.16 (C23-25)

$[\alpha]^{20}_D$ = + 72.9 (c = 0.010, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{36}NO_4S$: 494.2365 $(M+H)^+$, masse trouvée 494.2356

---

tert-butyl (1*S*, 2*S*, 3*S*)-1-(benzyl)-2-(benzyloxy)-3-(hydroxyl)-4-(phénylsufinyl)-butylcarbamate *anti*-**137**



A une solution de *anti*-**135** (21 mg, 0.0425 mmol) dans CH_2Cl_2 (0.27 mL) refroidie à -20 °C, est ajoutée une solution de *m*-CPBA 75% (9.8 mg, 0.0425 mmol, 1 eq.) dans CH_2Cl_2 (0.135 mL). Le mélange réactionnel est agité à -20 °C pendant 1h30, puis traité avec un mélange d'une sol. sat. $Na_2S_2O_3$ et une sol. sat. $NaHCO_3$ (1:20) sous agitation pendant 15 min. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (x2). La

phase organique est lavée avec une sol. sat. NaCl, puis séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (éluant cyclohexane/AcOEt 1/1). Dû à la création du centre stéréogène au niveau de l'atome de soufre, un mélange 52/48 de deux isomères est obtenu (19 mg, 89% ; huile incolore).

Caractérisation de l'isomère majoritaire (isomérie au niveau de l'atome de soufre) :

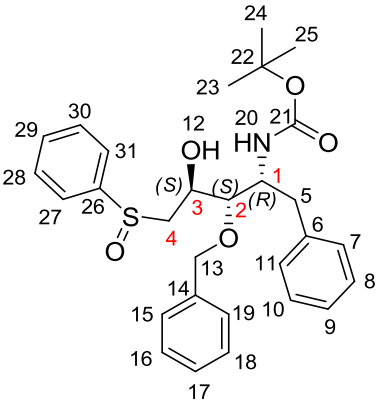
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.64-7.53 (m, 5H, H27-31), 7.32-7.17 (m, 10H, H7-11 + H15-19), 4.70 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, Ha-13), 4.65 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, Hb-13), 4.62 (m, 1H, H20), 4.60 (m, 1H, H1), 4.28 (m, 1H, H12), 4.07 (m, 1H, H3), 3.49 (m, 1H, H2), 3.17 (m, 1H, Ha-5), 3.15 (m, 1H, Ha-4), 2.91 (dd, *J* = 13.1 Hz ; 9.9 Hz, 1H, Hb-5), 2.71 (dd, *J* = 13.8 Hz ; 9.0 Hz, 1H, Hb-4), 1.38 (s, 9H, H23-25)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.59 (C21), 143.74 (C26), 137.94 (C14), 137.91 (C6), 131.26, 129.41, 129.36, 128.47, 128.42, 128.18, 127.84, 126.40, 123.69 (C7-11 + C15-19 + C27-31), 82.41 (C2), 79.62 (C22), 73.67 (C13), 71.09 (C3), 58.52 (C4), 52.12 (C1), 37.87 (C5), 28.31 (C23-25)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{36}NO_5S$: 510.2314 $(M+H)^+$, masse trouvée 510.2308

---

tert-butyl (1*R*, 2*S*, 3*S*)-1-(benzyl)-2-(benzyloxy)-3-(hydroxyl)-4-(phénylsufinyl)-butylcarbamate *syn*-**138**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour *anti*-**137** en partant de *syn*-**136** (120 mg, 0.243 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (cyclohexane/AcOEt 1/1). Dû à la création du centre stéréogène au niveau de l'atome de soufre, un mélange 54/46 de deux isomères est obtenu (117 mg, 95% ; huile incolore).

Caractérisation de l'isomère majoritaire (isomérie au niveau de l'atome de soufre) :

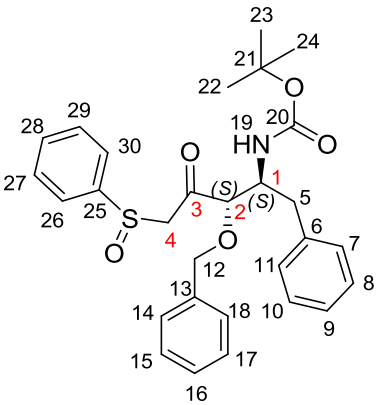
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.66-7.51 (m, 5H, H27-31), 7.37-7.17 (m, 10H, H7-11 + H15-19), 4.94 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H20), 4.62 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-13), 4.55 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-13), 4.60 (m, 1H, H1), 4.31 (m, 1H, H3), 4.18 (m, 1H, H2), 3.55 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H12), 3.12 (dd, *J* = 13.1 Hz ; 8.6 Hz, 1H, Ha-5), 3.04 (dd, *J* = 12.8 Hz ; 3.0 Hz, 1H, Ha-4), 2.85 (m, 2H, Hb-4 + Hb-5), 1.34 (s, 9H, H23-25)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 156.61 (C21), 143.93 (C26), 137.83 (C14), 137.60 (C6), 131.21, 129.30, 128.92, 128.54, 128.49, 128.08, 127.98, 126.46, 124.11 (C7-11 + C15-19 + C27-31), 82.19 (C2), 80.15 (C22), 74.47 (C13), 68.79 (C3), 60.35 (C4), 51.93 (C1), 38.19 (C5), 28.25 (C23-25)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{36}NO_5S$: 510.2314 $(M+H)^+$, masse trouvée 510.2309

---

tert-butyl (1*S*, 2*S*)-1-(benzyl)-2-(benzyloxy)-3-(oxo)-4-(phénylsufinyl)-butylcarbamate *anti*-**141**



A une solution de *anti*-**137** (20 mg, 0.0392 mmol) dans CH_2Cl_2 (0.377 mL), est ajouté le periodinane de Dess-martin (28.3 mg, 0.0667 mmol, 1.7 eq.). Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 4 h, puis du periodinane de Dess-martin (28.3 mg, 0.0667 mmol, 1.7 eq.) est à nouveau ajouté. Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 4 h, puis traité par un mélange AcOEt/sol. aq. 1N $NaHCO_3$/sol. aq. 1N $Na_2S_2O_3$ (1/1/2) sous agitation pendant 1 h. Les phases sont séparées et la phase organique est lavée avec une sol. 1N $NaHCO_3$ et une sol. sat. NaCl. Puis elle est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur plaque préparative de silice (éther de pétrole/AcOEt 1/1). Dû à la présence du centre stéréogène au niveau de l'atome de soufre, un mélange 54/46 de deux isomères est obtenu (15 mg, 75% ; huile incolore).

Caractérisation de l'isomère majoritaire (isomérie au niveau de l'atome de soufre) :

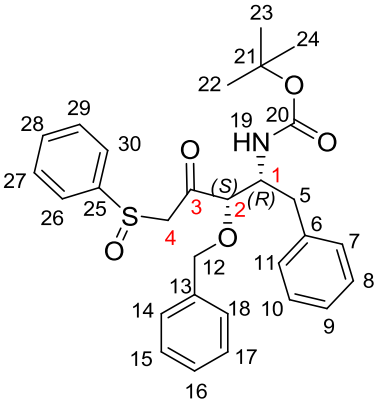
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.69-7.66 (m, 2H, H27 + H29), 7.56-7.51 (m, 3H, H26 + H28 +H30), 7.38-7.06 (m, 10H, H7-11 + H14-18), 5.20 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H19), 4.69 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, Ha-12), 4.47 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, Hb-12), 4.19 (m, 1H, H1), 4.12 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, Ha-4), 4.00 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, Hb-4), 3.75 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H2), 2.95-2.74 (m, 2H, H5), 1.35 (s, 9H, H24-26)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 202.79 (C3), 155.33 (C20), 143.45 (C25), 137.11 (C13), 136.46 (C6), 131.59, 129.49, 129.37, 128.66, 128.54, 128.38, 128.22, 126.83, 124.11 (C7-11 +C14-18 + C26-30), 85.69 (C2), 80.04 (C21), 72.92 (C12), 65.56 (C4), 51.78 (C1), 36.67 (C5), 28.22 (C22-24)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{34}NO_5S$: 508.2158 $(M+H)^+$, masse trouvée 508.2159

---

tert-butyl (1*R*, 2*S*)-1-(benzyl)-2-(benzyloxy)-3-(oxo)-4-(phénylsufinyl)-butylcarbamate *syn*-**142**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour *anti*-**141** en partant de *syn*-**138** (141 mg, 0.279 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur plaque préparative de silice (éther de pétrole/AcOEt 1/1). Dû à la présence du centre stéréogène au niveau de l'atome de soufre, un mélange 57/43 de deux isomères est obtenu (90 mg, 64% ; solide jaune pâle).

Caractérisation de l'isomère majoritaire (isomérie au niveau de l'atome de soufre) :

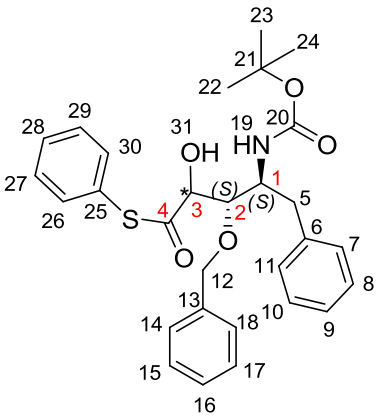
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.63-7.59 (m, 2H, H27 + H29), 7.52-7.49 (m, 3H, H26 + H28 + H30), 7.42-7.05 (m, 10H, H7-11 + H14-18), 4.98 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, H19), 4.72 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, Ha-12), 4.55 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, Hb-12), 4.35 (m, 1H, H1), 3.90-3.87 (m, 3H, H4 + H2), 2.91-2.78 (m, 2H, H5), 1.33 (s, 9H, H22-24)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 200.98 (C3), 155.31 (C20), 143.43 (C25), 137.22 (C13), 136.96 (C6), 131.45, 129.36, 129.09, 128.59, 128.46, 128.35, 128.13, 126.66, 124.17 (C7-11 + C14-18 + C26-30), 84.36 (C2), 79.88 (C21), 72.73 (C12), 65.81 (C4), 52.77 (C1), 38.29 (C5), 28.10 (C22-24)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{34}NO_5S$: 508.2158 $(M+H)^+$, masse trouvée 508.2142

---

tert-butyl N-[(1*S*,2*S*)-2-(benzyloxy)-3-(hydroxyl)-4-(oxo)-1-(benzyl)-4-(phenylsulfanyl)butylcarbamate *anti*-**145**

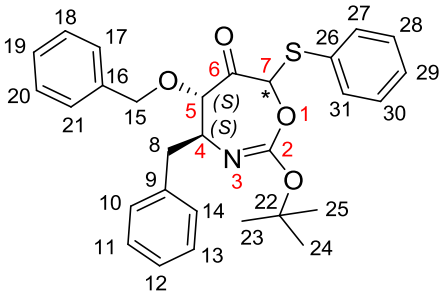


^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.43-7.11 (m, 15H, H7-11 + H14-18 + H26-30), 4.77 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-12), 4.64 (m, 2H, H3 + H31), 4.56 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-12), 4.17 (m, 2H, H1 + H19), 4.01 (m, 1H, H2), 3.32 (m, 1H, Ha-5), 2.39 (m, 1H, Hb-5), 1.28 (s, 9H, H22-24)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 202.48 (C4), 157.20 (C20), 137.41 (C25), 134.88 (C13), 134.69 (C6), 129.35, 129.16, 128.97, 128.57, 128.53, 128.43, 128.11, 126.56 (C7-11 + C14-18 + C26-30), 82.87 (C2), 81.19 (C21), 78.30 (C3), 72.09 (C12), 51.43 (C1), 38.14 (C5), 28.21 (C22-24)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{33}NNaO_5S$: 530.1977 $(M+Na)^+$, masse trouvée 530.1976

4-(benzyl)-5-(benzyloxy)-2-(*tert*-butoxy)-7-(phenylsulfanyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-oxazepin-6-one **146**

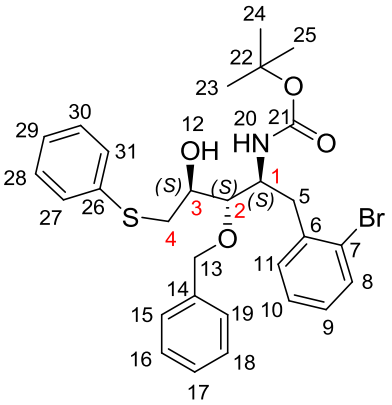


^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.58-6.99 (m, 15H, H10-14 + H17-21 + H27-31), 5.31 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H7), 4.48 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-15), 4.21 (m, 1H, H4), 4.20 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-15), 3.75 (dd, *J* = 3.2 Hz ; 0.9 Hz, 1H, H5), 3.23 (dd, *J* = 13.8 Hz ; 4.3 Hz, 1H, Ha-8), 2.33 (dd, *J* = 13.8 Hz ; 10.4 Hz, 1H, Hb-8), 1.52 (s, 9H, H23-25)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 199.51 (C6), 153.26 (C2), 136.65 (C16), 136.59 (C9), 135.26 (C26), 129.49, 129.25, 129.16, 128.73, 128.34, 128.08, 127.95, 126.88 (C10-14 + C17-21 + C27-31), 81.68 (C5), 79.15 (C22), 72.16 (C15), 67.40 (C7), 29.70 (C8), 28.28 (C23-25)

---

tert-butyl (1*S*, 2*S*, 3*S*)-1-(2-bromo-benzyl)-2-(benzyloxy)-3-(hydroxyl)-4-(phénylsufanyl)-butylcarbamate *anti*-**147**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour *anti*-**135** en partant de *anti*-**95** (75 mg, 0.16 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (éther de pétrole/AcOEt 8/2).

(81 mg, 87% ; solide incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.51 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H8), 7.38-7.17 (m, 12H, H10-11 + H15-19 + H7-31), 7.05 (m, 1H, H9), 4.70 (m, 1H, H20), 4.67 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-13), 4.60 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-13), 4.32 (m, 1H, H1), 3.91 (m, 1H, H3), 3.61(m, 1H, H2), 3.41 (dd, *J* = 13.8 Hz ; 2.5 Hz, 1H, Ha-4), 3.18 (dd, *J* = 13.7 Hz ; 4.2 Hz,

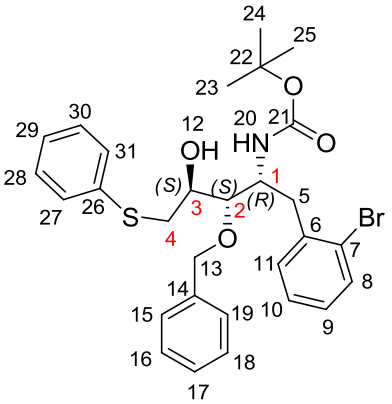
1H, Ha-5), 3.03 (dd, *J* = 13.8 Hz ; 8.8 Hz, 1H, Hb-4), 2.99 (m, 1H, H12), 2.92 (dd, *J* = 13.7 Hz ; 11.1 Hz, 1H, Hb-5), 1.26 (s, 9H, H23-25)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.37 (C21), 138.06 (C14), 137.88 (C6), 135.14 (C26), 132.62 (C8), 131.42, 129.57, 129.04, 128.44, 127.93, 127.85, 127.32, 126.40 (C9-11 + C15-19 + C27-31), 125.10 (C7), 82.64 (C2), 79.20 (C22), 73.67 (C13), 69.72 (C3), 52.04 (C1), 38.51 (C4), 37.12 (C5), 28.18 (C23-25)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{35}BrNO_4S$: 572.1470 $(M+H)^+$, masse trouvée 572.1457

____

tert-butyl (1*R*, 2*S*, 3*S*)-1-(2-bromo-benzyl)-2-(benzyloxy)-3-(hydroxyl)-4-(phénylsufanyl)-butylcarbamate
syn-**148**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour *anti*-**135** en partant de *syn*-**96** (228 mg, 0.5 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (éther de pétrole/AcOEt 8/2).

(232 mg, 82% ; solide incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H8),7.40-7.17 (m, 12H, H10-11 + H15-19 + H27-31), 7.08 (m, 1H, H9), 5.08 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H20), 4.77 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, Ha-13), 4.66 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, Hb-13), 4.48 (tdd, *J* = 10.1 Hz ; 4.3 Hz ; 1.3 Hz, 1H, H1), 3.91 (m, 1H, H12), 3.84 (tdd, *J* = 8.3 Hz ; 8.1 Hz ; 2.5 Hz, 1H, H3), 3.57 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 1.3 Hz, 1H, H2), 3.47 (dd, *J* = 13.6 Hz ; 2.5 Hz, 1H, Ha-4), 3.08 (dd, *J* = 14.1 Hz ; 4.3 Hz, 1H, Ha-5), 3.04 (dd, *J* = 13.6 Hz ; 8.1 Hz, 1H, Hb-4), 3.00 (dd, *J* = 14.1 Hz ; 10.1 Hz, 1H, Hb-5), 1.31 (s, 9H, H23-25)

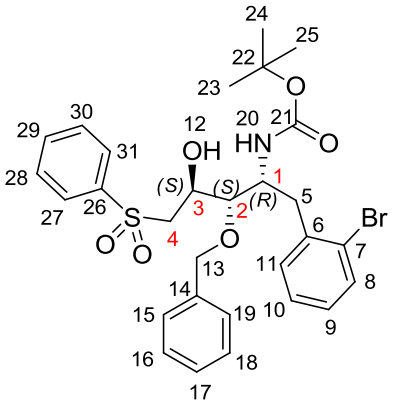
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 156.30 (C21), 137.51 (C14), 137.48 (C6), 136.03 (C26), 132.66 (C8), 130.69 (C11), 129.07, 128.84, 128.44, 128.08, 127.98, 127.28, 125.93 (C9-10 + C15-19 + C27-31), 124.98 (C7), 82.72 (C2), 79.61 (C22), 74.53 (C13), 69.83 (C3), 51.04 (C1), 38.13 (C4), 37.91 (C5), 28.07 (C23-25)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{35}BrNO_4S$: 572.1470 $(M+H)^+$, masse trouvée 572.1461

____

tert-butyl (1*R*, 2*S*, 3*S*)-1-(2-bromo-benzyl)-2-(benzyloxy)-3-(hydroxy)-4-(phénylsufonyl)-butylcarbamate

syn-**150**



A une solution de *syn*-**148** (231 mg, 0.4 mmol) dans CH_2Cl_2 (2.4 mL), est ajoutée une solution de *m*CPBA (70%, 184 g, 0.8 mmol, 2 eq) dans CH_2Cl_2 (1.2 mL). Le mélange réactionnel est agité 4 h à TA, puis traité avec un mélange d'une sol. sat. $Na_2S_2O_3$ et une sol. sat. $NaHCO_3$ (1:20) sous agitation pendant 15 min. La phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (x2). La phase organique est lavée avec une sol. sat. NaCl, puis séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (éther de pétrole/AcOEt 7/3).

(214 mg, 88% ; solide incolore)

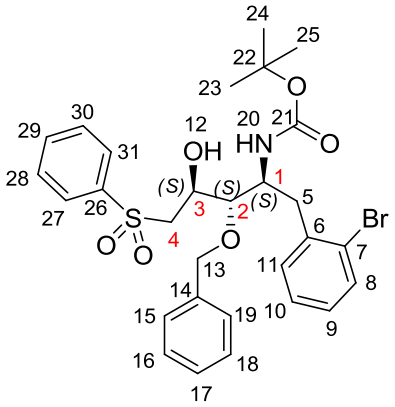
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.92-7.89 (m, 2H, H27 + H31), 7.65 (m, 1H, H29), 7.57-7.52 (m, 3H, H28 + H30 + H8), 7.38-7.3 (m, 5H, H15-19), 7.21 (m, 2H, H10-11), 7.07 (m, 1H, H9), 5.08 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H20), 4.75 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-13), 4.60 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-13), 4.38 (tdd, *J* = 10.1 Hz ; 4.3 Hz ; 1.3 Hz, 1H, H1), 4.18 (m, 2H, H3 + H12), 3.47 (m, 1H, Ha-4), 3.43 (dd, *J* = 8.3 Hz ; 1.3 Hz, 1H, H2), 3.27 (dd, *J* = 14.1 Hz ; 9.6 Hz, 1H, Hb-4), 3.06 (dd, *J* = 14.1 Hz ; 4.3 Hz, 1H, Ha-5), 2.95 (dd, *J* = 14.1 Hz ; 10.1 Hz, 1H, Hb-5), 1.33 (s, 9H, H23-25)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 156.18 (C21), 139.65 (C26), 137.22 (C14), 137.08 (C6), 133.62 (C29), 132.69 (C8), 130.78 (C11), 129.03 (C28 + C30), 128.46, 128.07, 127.95 (C15-19 + C9), 127.89 (C27 + C31), 127.26 (C10), 124.85 (C7), 81.98 (C2), 79.71 (C22), 74.32 (C13), 66.99 (C3), 59.09 (C4), 50.58 (C1), 37.73 (C5), 28.06 (C23-25)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{34}BrNNaO_6S$: 626.1188 $(M+Na)^+$, masse trouvée 626.1187

____

tert-butyl (1*S*, 2*S*, 3*S*)-1-(2-bromo-benzyl)-2-(benzyloxy)-3-(hydroxy)-4-(phénylsufonyl)-butylcarbamate *anti*-**149**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour *syn*-**150** en partant de *anti*-**147** (79 mg, 0.14 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (éther de pétrole/AcOEt 7/3).

(51 mg, 61% ; solide incolore)

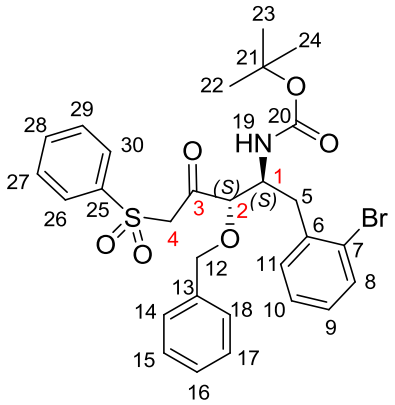
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.94-7.91 (m, 2H, H27 + H31), 7.67 (m, 1H, H29), 7.61-7.51 (m, 3H, H8 + H28 + H30), 7.35-7.29 (m, 5H, H15-19), 7.20 (m, 2H, H10-11), 7.06 (m, 1H, H9), 4.70 (s, 2H, H13), 4.66 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H20), 4.44 (m, 1H, H3), 4.13 (m, 1H, H1), 3.74 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H12), 3.6 (m, 1H, H2), 3.50 (m, 1H, Ha-4), 3.30 (dd, *J* = 14.4 Hz ; 10.1 Hz, 1H, Hb-4),3.19 (dd, *J* = 14.1 Hz ; 4.3 Hz, 1H, Ha-5), 2.84 (dd, *J* = 14.1 Hz ; 10.9 Hz, 1H, Hb-5), 1.26 (s, 9H, H23-25)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 155.32 (C21), 139.24 (C26), 137.72 (C14), 137.61 (C6), 133.93 (C29), 132.67 (C8), 131.34 (C11), 129.35 (C28 + C30), 128.46, 128.09, 127.94 (C15-19 + C9), 127.84 (C27 + C31), 127.37 (C10), 125.00 (C7), 82.69 (C2), 79.44 (C22), 73.87 (C13), 67.06 (C3), 58.50 (C4), 51.78 (C1), 37.43 (C5), 28.16 (C23-25)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{34}BrNNaO_6S$: 626.1188 $(M+Na)^+$, masse trouvée 626.1173

---

tert-butyl (1*S*, 2*S*)-1-(benzyl)-2-(benzyloxy)-3-(oxo)-4-(phénylsufonyl)-butylcarbamate *anti*-**151**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour *anti*-**141** en partant de *anti*-**149** (43 mg, 0.071 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur plaque préparative de silice (éluant éther de pétrole/AcOEt 8/2).

(7 mg, 16% ; solide incolore)

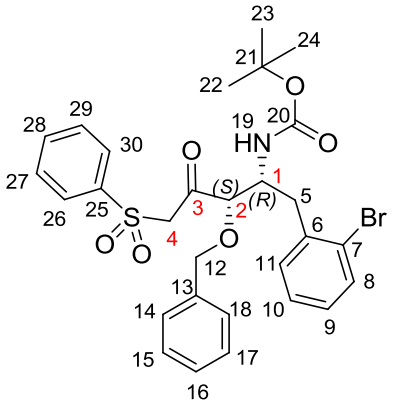
^{1}H RMN (400MHz, $CDCl_3$) : δ 7.95 (m, 2H, H26 + H30), 7.69-7.08 (m, 12H, H8-11 + H14-18 + H27-29), 4.75-4.15 (m, 7H, H1 + H2 +H4 +H12 + H19), 2.96-2.84 (m, 2H, H8), 1.28 (s, 9H, H22-24)

^{13}C RMN (100MHz, $CDCl_3$) : δ 198.23 (C3), 155.13 (C20), 139.32 (C25), 136.73 (C13), 136.64 (C6), 134.17 (C28), 132.82 (C8), 131.61 (C11), 129.33, 128.76, 128.66, 128.62, 128.46, 128.35 (C9 + C14-18 + C26-27 + C29-30), 127.47 (C10), 124.99 (C7), 86.22 (C2), 79.76 (C21), 73.52 (C12), 62.70 (C4), 50.95 (C1), 36.93 (C5), 28.25 (C22-24)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{32}BrNNaO_6S$: 624,1031 $(M+Na)^+$, masse trouvée 624.1006

____

tert-butyl (1*R*, 2*S*)-1-(benzyl)-2-(benzyloxy)-3-(oxo)-4-(phénylsufonyl)-butylcarbamate *syn*-**152**



Le mode opératoire est identique à celui décrit pour *anti*-**141** en partant de *syn*-**150** (195 mg, 0.32 mmol). Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice (éther de pétrole/AcOEt 8/2).

(123 mg, 63% ; solide incolore)

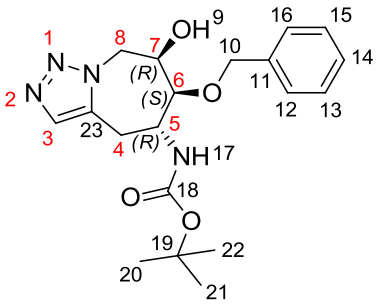
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.90-7.-88 (m, 2H, H26 + H30), 7.67 (m, 1H, H28), 7.58-7.55 (m, 3H, H8 + H27 + H29), 7.47-7.34 (m, 5H, H14-18), 7.19 (td, *J* = 7.6 Hz ; 1.3 Hz, 1H, H10), 7.10 (td, *J* = 7.6 Hz ; 1.5Hz, 1H, H9), 7.06 (dd, *J* = 7.6 Hz ; 1.3 Hz, 1H, H11), 4.94 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H19), 4.79 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-12), 4.56 (tdd, *J* = 8.3 Hz ; 6.6 Hz ; 1.8 Hz, 1H, H1), 4.48 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H, Ha-4), 4.40 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-12), 4.30 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H, Hb-4), 4.29 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H2), 3.00 (dd, *J* = 13.9 Hz ; 8.3 Hz, 1H, Ha-5), 2.95 (dd, *J* = 13.9 Hz ; 6.6 Hz, 1H, Hb-5), 1.26 (s, 9H, H22-24)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 196.65 (C3), 155.21 (C20), 139.08 (C25), 136.87 (C13), 136.67 (C6), 134.14 (C28), 132.90 (C8), 131.27 (C11), 129.24 (C27 + C29), 128.47, 128.14 (C14-18 + C9), 128.11 (C26 + C30), 127.44 (C10), 124.78 (C7), 84.60 (C2), 79.76 (C21), 72.65 (C12), 63.47 (C4), 50.88 (C1), 38.57 (C5), 27.97 (C22-24)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{29}H_{32}BrNNaO_6S$: 624.1031 $(M+Na)^+$, masse trouvée 624.1026

____

tert-butyl *N*-(5*R*, 6*S*, 7*R*)-6-(benzyloxy)-7-(hydroxy)-4H,5H,6H,7H,8H-[1,2,3]triazolo[1,5-α]azepin-5-yl]carbamate *syn*-**156** (à partir de *syn*-**97**)



syn-**97** (25 mg, 0,075 mmol) et NaN_3 (5.39 mg, 0.083 mmol, 1.1 eq.) sont solubilisés dans EtOH (0.7 mL) dans un vial micro-onde. Le mélange réactionnel est agité au micro-onde à 150 °C pendant 1 h (puissance 75 W, pression max 17.2 bar), puis concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est re-solubilisé dans du dichlorométhane et K_2CO_3 (20.8 mg, 0.15 mmol, 2 eq.) et Boc_2O (15 µL, 0.075 mmol, 1 eq.) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité à TA pendant 3 h, puis filtré sur coton et concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur colonne de silice (CH_2Cl_2/MeOH 95/5).

(10 mg, 35% ; solide incolore)

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.55 (s, 1H, H3), 7.44-7.33 (m, 5H, H12-16), 4.90 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-10), 4.69 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-10), 4.69 (dd, *J* = 13.7 Hz ; 3.2 Hz, 1H, Ha-8), 4.57 (d, *J* = 13.7 Hz ; 10.4 Hz, 1H, Hb-8), 4.36 (m, 1H, H5), 4.16 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H17), 4.03 (m, 1H, H6), 3.87 (m, 1H, H7), 3.32 (dd, *J* = 15.3 Hz ; 1.5 Hz, 1H, Ha-4), 2.97 (dd, *J* = 15.3 Hz ; 5.9 Hz, 1H, Hb-4), 2.39 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H9), 1.43 (s, 9H, H20-22)

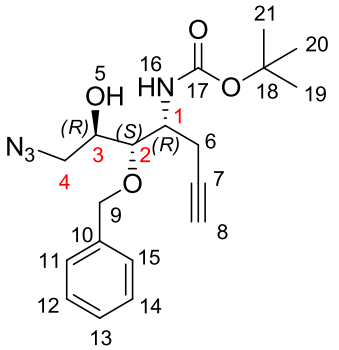
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 154.76 (C18), 137.22 (C11), 134.86 (C3), 132.76 (C23), 128.87, 128.47, 128.04 (C12-16), 80.49 (C6), 79.60 (C19), 72.97 (C10), 66.48 (C7), 48.85 (C8), 46.91 (C5), 28.27 (C20-22), 21.52 (C4)

$[\alpha]^{20}_D$ = -3.0 (c = 0.010, $CHCl_3$)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{27}N_4O_4$: 375.2032 $(M+H)^+$, masse trouvée 375.2029

---

tert-butyl (1*R*, 2*S*, 3*R*)-2-(benzyloxy)-1-(propargyl)-3-(hydroxyl)-4-(azido)-butylcarbamate *syn*-**154**



A une solution de *syn*-**97** (79 mg, 0.238 mmol) dans EtOH (2.37 mL), est ajouté une solution de NaN_3 (46.5 mg, 0.715 mmol, 3 eq.) dans H_2O (0.79 mL). Le mélange réactionnel est agité à 60 °C pendant 48 h, puis concentré à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur plaque préparative de silice (éther de pétrole/AcOEt 8/2).

(74 mg, 84% ; solide incolore)

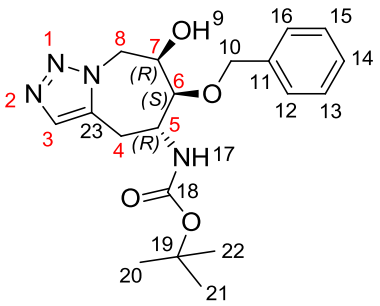
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.42-7.32 (m, 5H, H11-15), 4.82 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H16), 4.70 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, Ha-9), 4.61 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, Hb-9), 4.24 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, H5), 4.23 (dddd, *J* = 9.8 Hz ; 8.6 Hz ; 6.3 Hz ; 1.4 Hz, 1H, H1), 3.76 (dd, *J* = 9.1 Hz ; 1.4 Hz, 1H, H2), 3.66 (dddd, *J* = 9.1 Hz ; 5.3 Hz ; 4.7 Hz ; 2.5Hz, 1H, H3), 3.58 (dd, *J* = 12.6 Hz ; 2.5 Hz, 1H, Ha-4), 3.39 (dd, *J* = 5.3 Hz ; 12.6 Hz, 1H, Hb-4), 2.53 (ddd, *J* = 16.5 Hz ; 6.3 Hz ; 2.6 Hz, 1H, Ha-6), 2.49 (ddd, *J* = 16.5 Hz ; 8.6 Hz ; 2.6Hz, 1H, Hb-6), 2.12 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H8), 1.45 (s, 9H, H19-21)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 156.93 (C17), 137.42 (C10), 128.61, 128.24, 128.06 (C11-15), 80.71 (C7), 80.11 (C18), 79.6 (C2), 75.32 (C9), 71.33 (C8), 70.45 (C3), 53.17 (C4), 49.94 (C1), 28.23 (C19-21), 22.09 (C6)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{26}N_4NaO_4$: 397.1852 $(M+Na)^+$, masse trouvée 397.1847

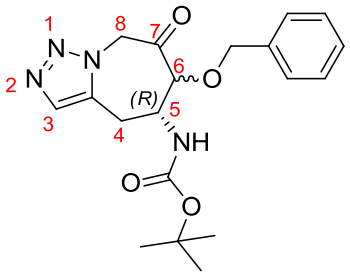
---

tert-butyl *N*-(5*R*, 6*S*, 7*R*)-6-(benzyloxy)-7-(hydroxy)-4H,5H,6H,7H,8H-[1,2,3]triazolo[1,5-α]azepin-5-yl]carbamate *syn*-**156** (à partir de *syn*-**154**)



syn-**154** (15 mg, 0.0401 mmol) est solubilisé dans EtOH (3 mL) dans un vial micro-onde. Le mélange réactionnel est agité au micro-onde à 185 °C pendant 1 h (puissance 75 W, pression max 17.2 bar), puis concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est re-solubilisé dans CH_2Cl_2, puis K_2CO_3 (11 mg, 0.0802 mmol, 2 eq.) et Boc_2O (10µL, 0.0401 mmol, 1 eq.) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité à TA pendant la nuit, puis filtré sur coton et concentré à l'évaporateur rotatif.

(13 mg, 88% ; solide incolore)



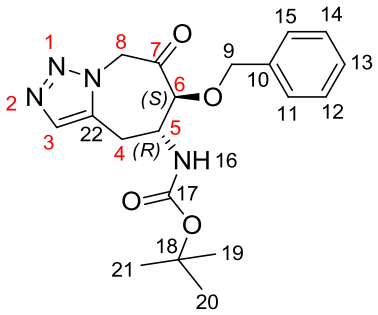
A une solution de *syn*-**156** (83 mg, 0.2217 mmol) dans AcOEt (2.5 mL), est ajouté IBX (186.2 mg, 0.665 mmol, 3 eq.). Le mélange réactionnel est agité à 80 °C pendant 7 h, puis traité avec un mélange de sol. aq. 1N $NaHCO_3$/sol. aq. 1N $Na_2S_2O_3$ (1/2) sous agitation pendant 1 h. Les phases sont ensuite séparées et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (x2). La phase organique est lavée avec une sol. sat. NaCl, puis séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié sur colonne de silice

(CH_2Cl_2/MeOH 98/2). Un mélange 72:28 des diastéréoisomères (5*R*,6*S*)-**158**/(5*R*,6*R*)-**159** est obtenu (55 mg, 67% ; solide incolore).

(5*R*,6*S*)-**158** *tert*-butyl *N*-(5*R*, 6*S*)-6-(benzyloxy)-7-(oxo)-4H,5H,6H,8H-[1,2,3]triazolo[1,5-α]azepin-5-yl]carbamate, 72% (RMN)

(5*R*,6*R*)-**159** *tert*-butyl *N*-(5*R*, 6*R*)-6-(benzyloxy)-7-(oxo)-4H,5H,6H,8H-[1,2,3]triazolo[1,5-α]azepin-5-yl]carbamate, 28% (RMN)

Caractérisation de l'épimère majoritaire (5*R*,6*S*)-**158** :

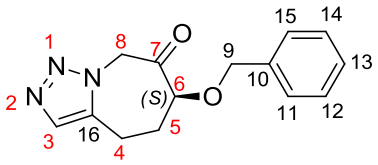


^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.58 (s, 1H, H3), 7.41-7.34 (m, 5H, H11-15), 5.26 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, Ha-8), 4.98 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, Hb-8), 4.61 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Ha-9), 4.57 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, Hb-9), 4.32 (m, 2H, H5 + H16), 4.07 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H6), 3.40 (dd, *J* = 15.8 Hz ; 2.8 Hz, 1H, Ha-4), 3.12 (dd, *J* = 15.8 Hz ; 5.2 Hz, 1H, Hb-4), 1.43 (s, 9H, H19-21)

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 199.75 (C7), 154.62 (C17), 135.98 (C10), 134.67 (C3), 132.74 (C22), 128.76, 128.66, 128.26 (C11-15), 85.37 (C6), 73.44 (C9), 54.18 (C8), 52.53 (C5), 28.22 (C19-21), 23.17 (C4)

HRMS (ESI-QTof) : masse calculée pour $C_{19}H_{25}N_4O_4$: 373.1876 $(M+H)^+$, masse trouvée 373.1877

(6*S*)-6-(benzyloxy)-4H,5H,6H,8H-[1,2,3]triazolo[1,5-α]azepin-7-one (6*S*)-**163**

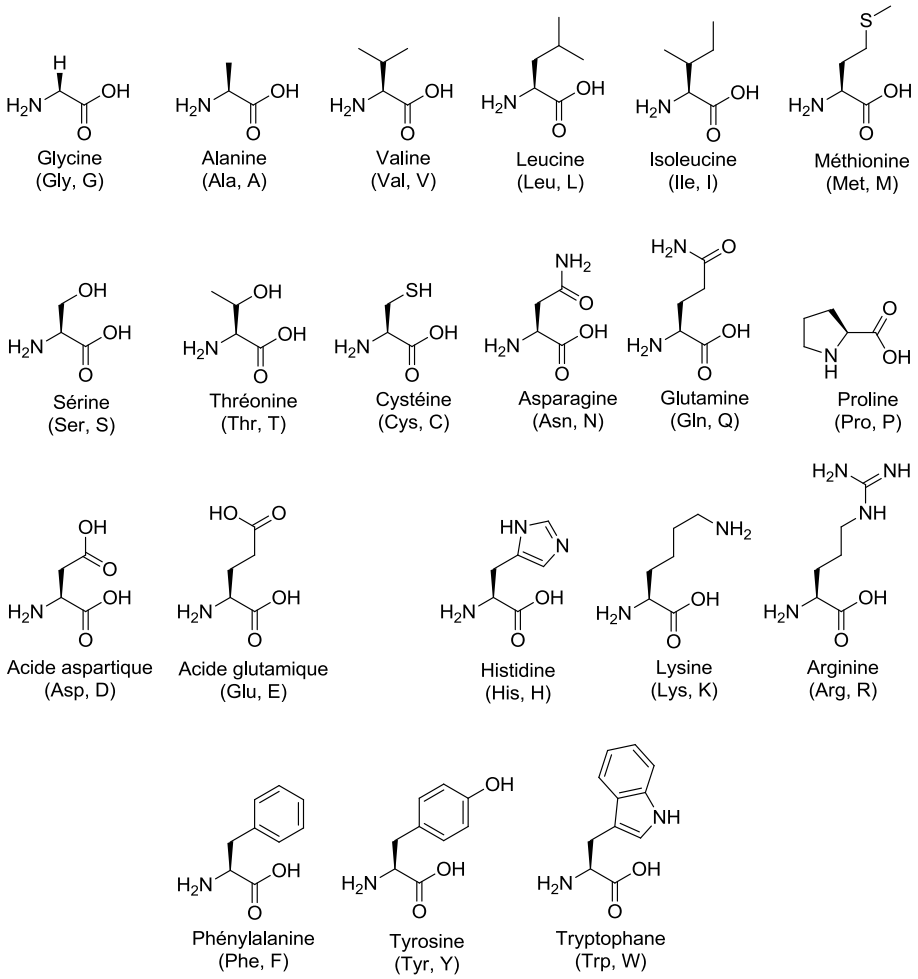


^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.52 (s, 1H, H3), 7.40-7.29 (m, 5H, H11-15), 5.18 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, Ha-8), 5.10 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, Hb-8), 4.59 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Ha-9), 4.45 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, Hb-9), 4.12 (dd, *J* = 6.8 Hz ; 5.4 Hz, 1H, H6), 3.11 (m, 1H, Ha-5), 3.00 (m, 1H, Hb-5), 2.31-2.17 (m, 2H, H4)

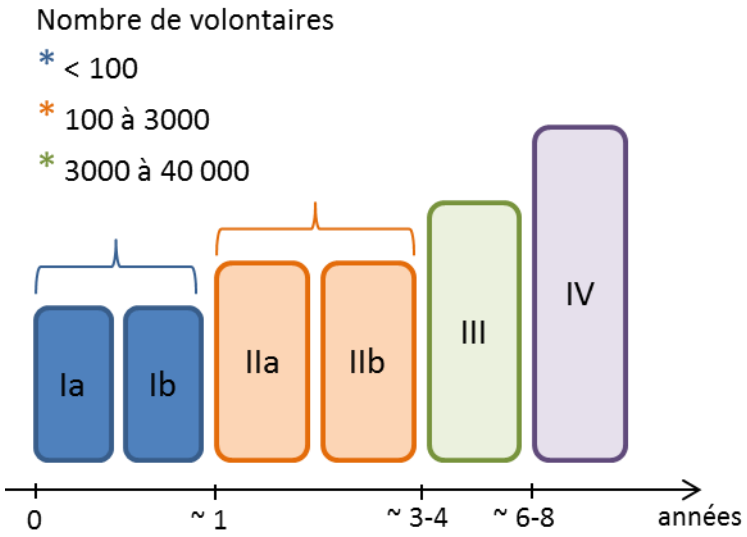
^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 201.84 (C7), 136.43 (C10), 132.59 (C3), 132.39 (C16), 128.67, 128.41, 128.06 (C11-15), 82.10 (C6), 72.68 (C9), 54.96 (C8), 32.17 (C4), 17.03 (C5)

Annexes

Annexe 1 : Liste des acides aminés



Annexe 2 : Essais cliniques – Vaccin contre le paludisme



Essais cliniques - Phase I

- Evaluation de la sécurité d'emploi et de la tolérance
- Evaluation de la capacité à produire une réponse immunitaire (immunogénicité)

Phase Ia : pays non-endémiques

Phase Ib : populations exposées au paludisme dans des pays endémiques

Essais cliniques – Phase II

- Contrôle de la sécurité, des potentiels effets secondaires et de la réponse immunitaire
- Evaluation préliminaire de l'efficacité contre l'infection et le développement de la maladie
- Détermination de la posologie optimale

Phase IIa : vaccination de volontaires sains dans des pays non-endémiques et exposition à des moustiques porteurs du paludisme

- Evaluation de la durée avant infection
- Indication sur l'efficacité du vaccin

Phase IIb : populations exposées au paludisme dans des pays endémiques

Essais cliniques – Phase III

- Contrôle de la sécurité, des potentiels effets secondaires
- Evaluation à grande échelle de l'efficacité (avec par exemple, différents schémas de transmission du paludisme)
- Demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM)

Essais cliniques – Phase IV (après la mise sur le marché)

- Contrôle à très grande échelle de la sécurité, de l'efficacité et de la durée de protection
- Contrôle de possibles effets secondaires tardifs

Annexe 3 : Espèces réactives de l'oxygène

Intermédiaires réduits de l'oxygène :

$$O_2 \xrightarrow{+\,e^-} O_2^{-\bullet} \xrightarrow{+\,e^- + 2H^+} H_2O_2 \xrightarrow{+\,e^-} HO^\bullet + HO^\bullet \xrightarrow{+\,e^- + H^+} H_2O$$

radical superoxyde — peroxyde d'hydrogène — radical hydroxyle

La durée de vie des **radicaux hydroxyles** $HO^\bullet$ est extrêmement faible (inférieure à la microseconde) et les distances qu'ils peuvent parcourir sont également très faibles (inférieures à la dizaine de nanomètres). Ce sont des oxydants puissants qui attaquent tous les matériaux biologiques (ADN, lipides, protéines…). Paradoxalement, les **radicaux superoxydes** $O_2^{\bullet -}$ sont eux-mêmes peu réactifs vis-à-vis de la majorité des substrats bioorganiques. Leur durée de vie est relativement longue (jusqu'à quelques dizaines de secondes)

et ils peuvent diffuser bien au-delà de leur lieu de production. La toxicité des radicaux superoxydes semble s'exercer de manière indirecte : en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène, ils peuvent donner naissance à des radicaux hydroxyles (réaction (3) dite de **Haber-Weiss**, catalysée par Fe^{3+}).

De même, la toxicité du peroxyde d'hydrogène provient principalement de sa capacité à générer le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$ en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} (réaction (1) dite de **Fenton**) ou Cu^{+}.

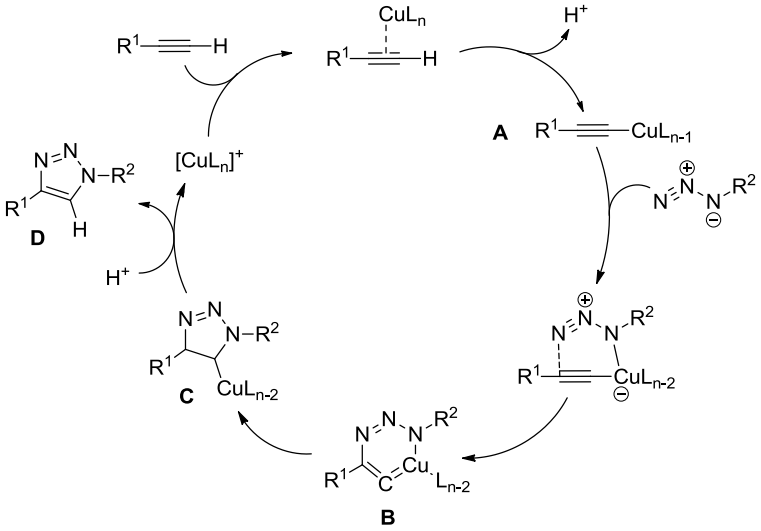
$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow HO^{\bullet} + Fe^{3+} + HO^{-} \quad \text{(1) Fenton}$$

$$Fe^{3+} + O_2^{-\bullet} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2 \quad \text{(2)}$$

$$H_2O_2 + O_2^{-\bullet} \longrightarrow HO^{\bullet} + O_2 + HO^{-} \quad \text{(3) Haber-Weiss}$$

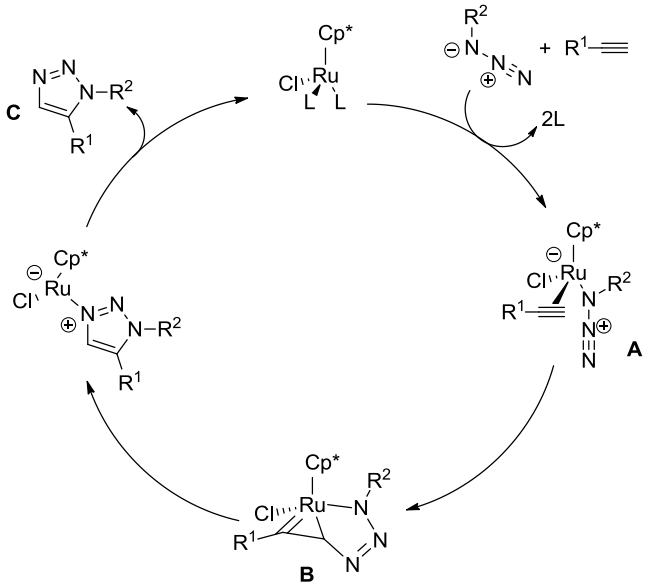
Annexe 4 : Mécanisme de la réaction de cycloaddition alcyne/azoture catalysée au cuivre

Sharpless *et al.* proposent le mécanisme illustré ci-dessous pour la réaction de cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre. [287] Cette réaction a lieu en présence d'une quantité catalytique de sels de cuivre (I) ou cuivre (II) et d'une quantité catalytique d'ascorbate de sodium. Ce dernier permet de réduire le cuivre (II) en cuivre (I) et empêche l'homocouplage oxydant des alcynes (Gläser).
Le cycle catalytique débute par la formation d'un complexe cuivre-acétylure **A**, puis l'azoture déplace un ligand et se lie au cuivre. La réaction ne passe ensuite pas par un mécanisme de cycloaddition [2+3] concerté, mais par un métallacycle à six chaînons cuivre (III) **B** inhabituel. La contraction de ce cycle en dérivé triazolyl-cuivre **C** est suivie d'une protonolyse qui libère le produit triazole **D** et ferme le cycle catalytique.



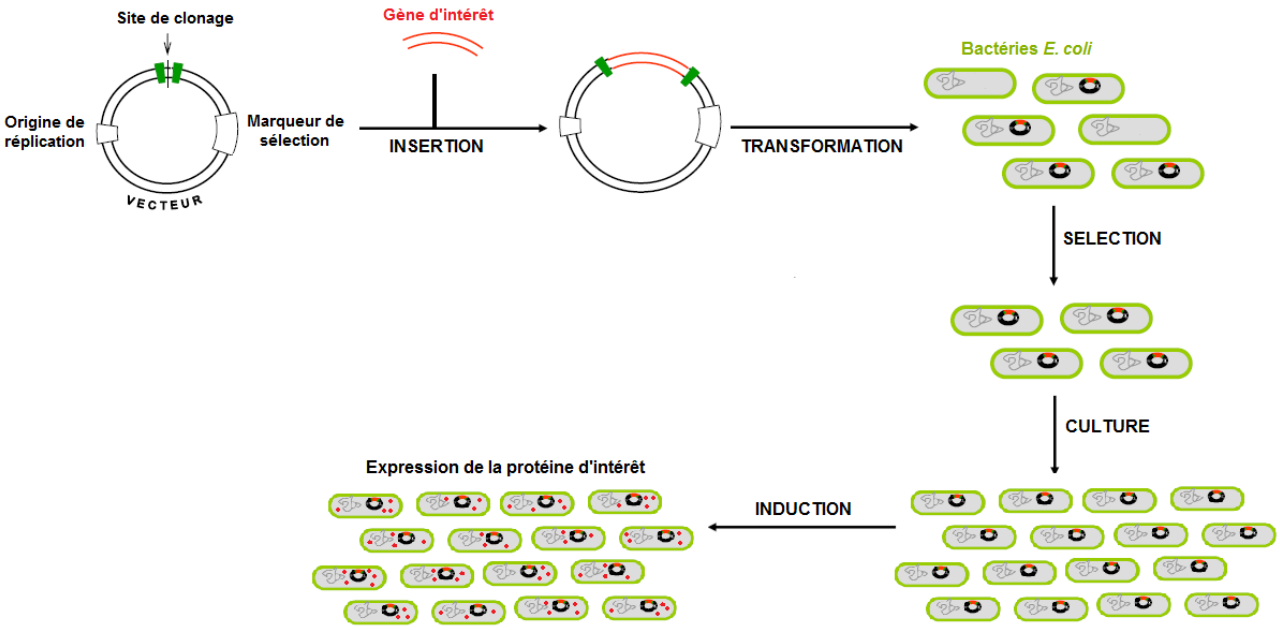
Annexe 5 : Mécanisme de la cycloaddition alcyne/azoture catalysée au ruthénium

Boren *et al.* proposent le mécasnisme illustré ci-dessous pour la réaction de cycloaddition alcyne-azoture catalysée au ruthénium. [307] Le déplacement de ligands par l'alcyne et l'azoture produit un complexe activé **A**, qui est converti en ruthénacycle **B** par couplage oxydant de l'alcyne et de l'azoture. Cette étape contrôle la régiosélectivité de la réaction. La nouvelle liaison C-N est créée entre le carbone le plus électronégatif et le moins encombré de l'alcyne et l'azote terminal de l'azoture. L'intermédiaire métallacycle **B** subit une élimination réductrice libérant le produit triazole **C** et régénérant le catalyseur ou le complexe activé **A**.



Cp* = ligand 1,2,3,4,5-pentamethylcyclopentadienyl

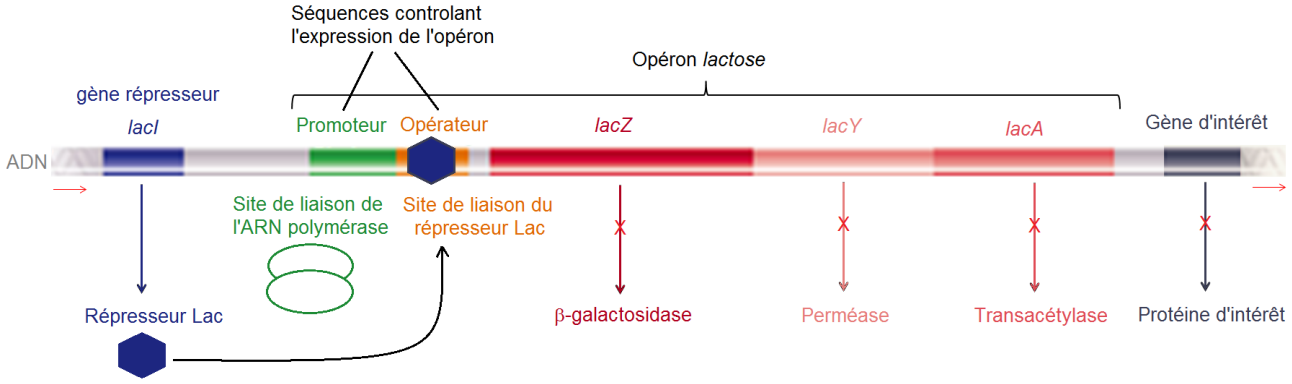
Annexe 6 : production d'une enzyme recombinante par un organisme hôte



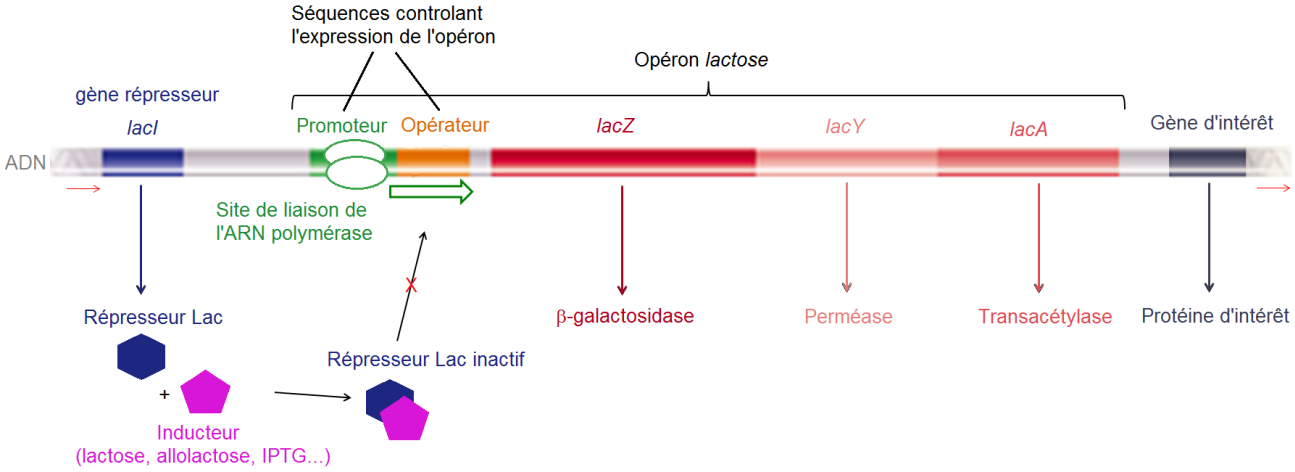
[307] B. C. Boren *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923-8930.

Annexe 7 : induction de l'expression du gène d'intérêt via l'opéron lactose

En absence d'inducteur, le répresseur Lac se lie à l'opérateur de l'opéron lactose et empêche la transcription de l'opéron lactose et du gène d'intérêt situé après.



Un inducteur (lactose, allolactose, IPTG…) se fixe sur le répresseur Lac, ce qui l'empêche de se lier à l'opérateur. Ainsi l'ARN polymérase peut se lier au promoteur et assurer la transcription des gènes de l'opéron lactose et du gène d'intérêt situé après.

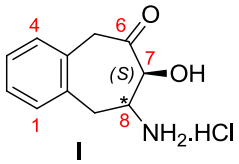


Résumé

Le paludisme est encore aujourd'hui une maladie infectieuse préoccupante et mortelle dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique, d'Asie et d'Amérique. Il est dû à des parasites du genre *Plasmodium* et est transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques femelles du genre *Anopheles*. Depuis une dizaine d'années, la morbidité et la mortalité liées au paludisme ont nettement reculé, notamment grâce à un meilleur diagnostic, à l'utilisation croissante de moustiquaires et à un accès aux soins amélioré. Cependant, les phénomènes de résistance des parasites aux différentes générations de traitements restent un problème majeur, auxquels s'ajoutent le coût des traitements et donc l'accès aux soins pour les populations les plus défavorisées. Il est ainsi urgent de trouver de nouvelles cibles et de développer de nouveaux agents antipaludiques agissant via des mécanismes originaux.

Lors de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la leucyl aminopeptidase bimétallique de *P. falciparum*, notée *Pf*A-M17, qui a récemment émergé comme potentielle cible antipaludéenne. *Pf*A-M17 jouerait un rôle essentiel à la croissance et à la survie du parasite en étant impliquée dans la dernière étape du catabolisme de l'hémoglobine lors de la phase de développement intra-érythrocytaire du parasite. Les inhibiteurs de *Pf*A-M17 développés jusqu'à présent sont peu sélectifs de cette enzyme par rapport à d'autres métallo-enzymes du parasite ou présentent une faible pénétration cellulaire. Notre travail s'est alors porté sur la conception, la synthèse et l'évaluation de composés pour l'inhibition sélective de *Pf*A-M17. Ces inhibiteurs pourraient être utilisés comme outils moléculaires pour une meilleure compréhension du rôle biologique de cette protéine chez le parasite ou comme potentiels traitements antipaludéens.

En s'inspirant du mode de liaison dans *Pf*A-M17 de la bestatine (inhibiteur puissant des métallo-protéases bimétalliques) et en se basant sur des travaux précédents réalisés au laboratoire, nous avons conçu des analogues non peptidiques de type benzocycloheptane trisubstitué **I** pour l'inhibition sélective de *Pf*A-M17. Des expériences de modélisation moléculaire prédisent des activités inhibitrices intéressantes pour les analogues du composé **I** avec un mode de liaison dans *Pf*A-M17 similaire à la bestatine.

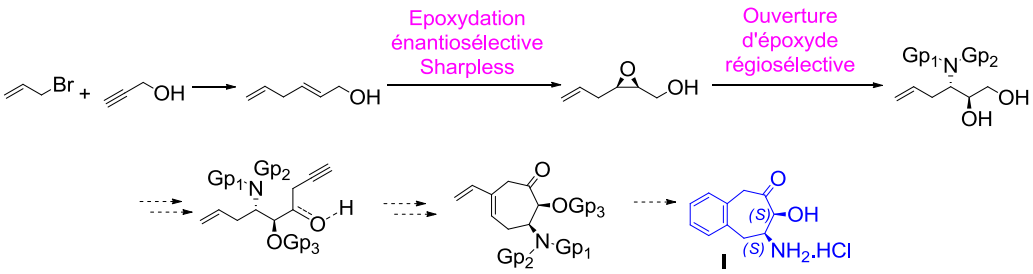


I

La première voie de synthèse développée au laboratoire pour le composé **I** (voie A) présente plusieurs inconvénients : seul le composé *cis* en mélange racémique est accessible par cette voie, et aucune diversité chimique ne semble exploitable. Par ailleurs, la quantité de produit final obtenue est très faible, et la reproductibilité est aléatoire.

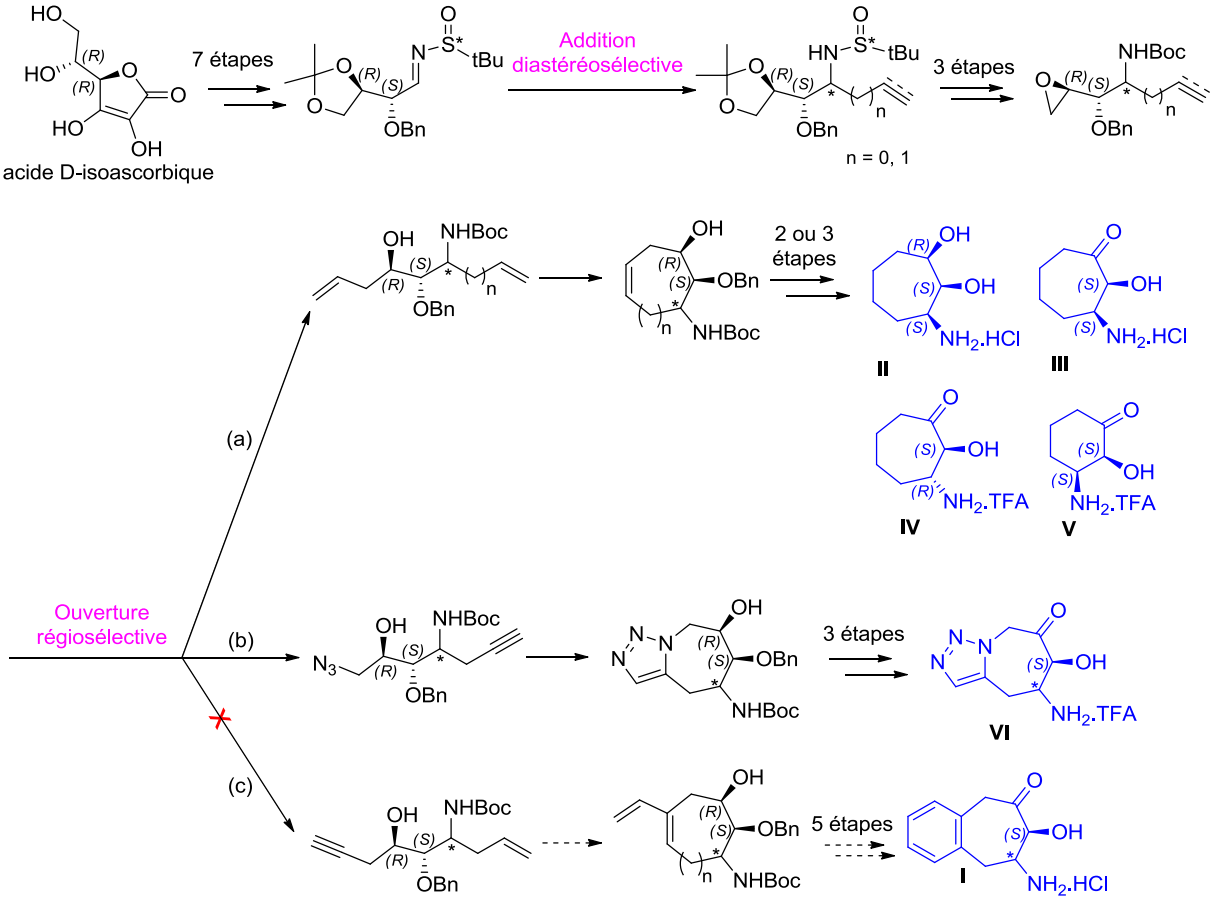
Nous avons conçu une autre voie de synthèse (voie B) dans laquelle la construction de la stéréodyade (C7-C8) est assurée par une séquence époxydation stéréosélective de Sharpless et ouverture régiosélective de l'époxyde par un nucléophile azoté. Cependant, de faibles rendements ont été obtenus sur plusieurs étapes, ne permettant pas d'accéder aux quantités voulues pour poursuivre cette voie.

Voie B



Nous avons alors développé une voie de synthèse diastéréosélective (voie C) permettant d'accéder à une plus grande diversité chimique. La construction de la stéréodyade (C7-C8) des composés est assurée par une réaction clé d'addition nucléophile stéréosélective sur des *N*-sulfinimines chirales, obtenues en sept étapes à partir de l'acide D-isoascorbique. L'addition stéréosélective d'un nucléophile (allyle, vinyle ou propargyle) sur la *N*-sulfinimine chirale permet d'obtenir sélectivement l'un ou l'autre des deux diastéréoisomères selon les conditions utilisées.

Voie C

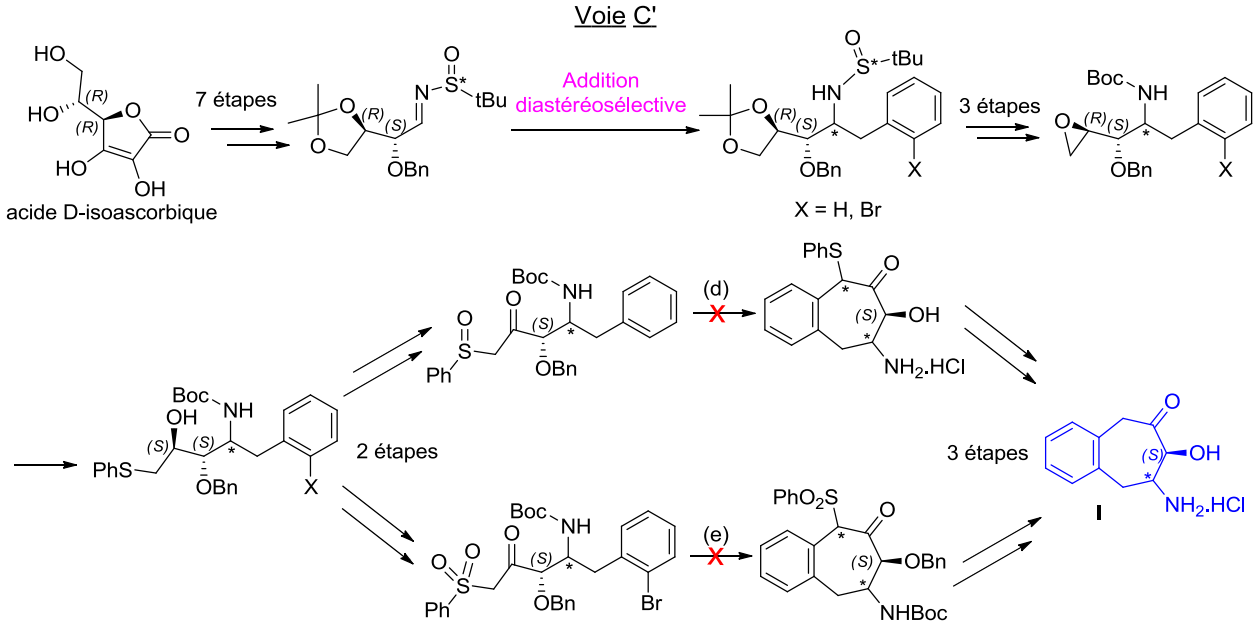


Par ouverture régiosélective de l'époxyde avec un nucléophile vinylique (a), nous avons pu accéder aux analogues cycloheptanes et cyclohexanes trisusbtitués **II**, **III**, **IV** et **V**. Ces composés ont été évalués sur l'enzyme recombinante *rPf*A-M17 produite au laboratoire et sur une aminopeptidase bimétallique de référence, l'aminopeptidase d'*Aeromonas proteolytica* (*AP*aero). Les pourcentages d'inhibition obtenus se situent entre 9 et 32% pour *rPf*A-M17 pour une concentration en inhibiteur de 1 mM et entre 18 et 42%

pour *AP*aero pour des concentrations en inhibiteur de 50 et 200 µM. **II**, **III**, **IV** et **V** s'avèrent être de faibles inhibiteurs de *rPf*A-M17 et d'*AP*aero et n'ont aucune action notable sur la croissance des cultures de parasites *P. falciparum* sensibles ou résistantes à la chloroquine (IC_{50} > 100 µM). Afin d'améliorer l'activité de ces composés, il est probablement nécessaire de rigidifier leur structure en contraignant le cycle à six ou sept chaînons par fusion avec un cycle aromatique. Ainsi, les composés **I** et **VI** avec un reste benzène ou 1,2,3-triazole fusionné au cycle à sept chaînons promettent de meilleures activités inhibitrices sur *rPf*A-M17 et *AP*aero.

Nous avons pensé obtenir le composé **VI** par ouverture régiosélective de l'époxyde par un azoture (b), suivie d'une réaction de cycloaddition alcyne/azoture. Mais nous avons rencontré des difficultés dans l'une des étapes finales de déprotection de l'éther benzylique. D'autres méthodes de déprotection doivent être considérées.

Pour la synthèse du composé **I**, l'ouverture de l'époxyde avec un réactif acétylènique (c) s'est montrée difficile et nous avons dû développer une voie alternative (voie C'). Nous ne passons plus par une étape de construction du reste benzène (voie C : Diels-Alder + réaromatisation), ce cycle est directement introduit lors de l'étape d'addition nucléophile sur les *N*-sulfinimines chirales. Nous avions envisagé de fermer le cycle à sept chaînons par une réaction de Pummerer (d) ou par une réaction d'arylation catalysée au palladium (e), mais ces deux étapes n'ont pas permis d'obtenir le produit **I** désiré.



Il faut, à ce stade des travaux de synthèse, considérer d'autres approches pour obtenir les composés désirés.