



HAL
open science

Conception de peptides présentant un coude β par des acides aminés γ et δ chiraux originaux issus d'un produit naturel

Rodolphe Vatinel

► To cite this version:

Rodolphe Vatinel. Conception de peptides présentant un coude β par des acides aminés γ et δ chiraux originaux issus d'un produit naturel. Chimie organique. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB182 . tel-04267903

HAL Id: tel-04267903

<https://theses.hal.science/tel-04267903>

Submitted on 2 Nov 2023

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 PARIS DESCARTES

FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES DE PARIS
ECOLE DOCTORALE MTCI

Année 2018

N°

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Spécialité : Pharmacognosie et chimie thérapeutique

Rodolphe VATINEL

Conception de peptides présentant un coude β par des acides aminés γ et δ chiraux originaux issus d'un produit naturel

Thèse co-dirigée par le Pr. Brigitte DEGUIN et le Dr. Sylvain BROUSSY

Soutenue publiquement le 30 Novembre 2018

Membres du jury :

Directeurs de thèse : Pr. Brigitte DEGUIN

Dr. Sylvain BROUSSY

Rapporteurs : Pr. Vincent LISOWSKI

Pr. Thierry BESSON

Examineurs : Pr. David AITKEN

Dr. Jean-Claude ORTUNO

A la mémoire de mon père,

Qui me manque et qui nous a quitté bien trop tôt, il y a 15 ans déjà.

J'espère qu'il serait fier de moi, c'est grâce à lui que j'ai fait une thèse dans ce domaine.

Remerciements

Je souhaite dans un premier temps remercier chaleureusement l'ensemble des membres du jury qui ont accepté de lire, d'évaluer et de discuter autour de ce travail de thèse :

Pr. Vincent Lisowski

Pr. Thierry Besson

Pr. David Aitken

Dr. Jean-Claude Ortuno

Je remercie grandement le Pr. Sylvie Michel et le Pr. Michel Vidal pour leurs accueils chaleureux au sein de leurs équipes respectives.

Cette thèse étant une collaboration entre l'équipe de pharmacognosie et l'équipe cancer et angiogénèse, je tiens vivement à remercier mes deux directeurs de thèse, le Pr. Brigitte Deguin et le Dr. Sylvain Broussy pour m'avoir permis de travailler sur ce projet pluridisciplinaire complexe mais très intéressant. Je tiens à les remercier de m'avoir guidé tout au long de ces trois ans, pour les discussions et échanges scientifiques que nous avons eus que ce soit à propos de synthèse ou de RMN, mais également les différents conseils pratiques et théoriques ainsi que pour l'autonomie et la grande liberté que j'ai eue pour faire avancer ce projet.

Un grand merci également à Paul Fisman qui a travaillé avec moi et qui a contribué à faire avancer ce projet de thèse en refaisant de la matière première. Je sais que travailler sur des grosses quantités de produit n'a pas toujours été simple, surtout pour les purifications. Merci pour ta bonne humeur et ton humour. Je suis content de savoir que tu poursuis dans la recherche.

Je tiens à remercier, l'ensemble des membres de l'équipe cancer et angiogénèse, le Dr. Florent Huguenot, Dr. Wang-Quing Liu et le Dr. Nathalie Gagey-Eilstein pour les discussions et échanges scientifiques que nous avons pu avoir, même si je n'ai été que très peu présent au sein de leur laboratoire.

Je remercie également, l'ensemble des enseignants chercheurs de la pharmacognosie, le Pr. Marie-Christine Lallemand, les Dr. Hanh Dufat, Dr. Marina Kritsanida, Dr. Raphaël Grougnet, Dr. Sabrina

Boutefnouchet, Dr. Anne Neudorffer, Dr. Annabelle Dugay pour la vie de tous les jours au laboratoire, votre bonne humeur et pour les différents conseils donnés.

Je remercie énormément Chouaha Bouzidi, Ghislaine N'Da, Alaxandre Zucal, ainsi que Maryse Rouxel et Olivier Hermet « les parents du laboratoire ». Sans vous tous, le laboratoire ne tournerait pas et la vie au quotidien aurait été difficile. Merci pour votre bonne humeur permanente et les discussions autour d'un café. Vous avez toujours eu une parole réconfortante ou encourageante.

Je souhaite remercier plus particulièrement mon compatriote normand, le Dr. Thomas Gaslonde, pour ses conseils et les échanges scientifiques, le Dr. Xavier Cachet pour les différents échanges plus ou moins scientifiques, pour ses blagues et pour les fous rires que j'ai pu avoir grâce à lui, le Dr. François-Hugues Porée pour avoir été mon acolyte de paillasse, pour les échanges enrichissants et bien sûr pour m'avoir proposé de danser avec lui à plusieurs reprises en fin de thèse (la chimie ça rend fou !!!) et pour finir, je remercie, le Dr. Dang Thai pour sa bonne humeur permanente, son soutien et pour son interprétation originale de la Marseillaise.

Merci à Karim Hammad et Pascale Leproux pour leur disponibilité et pour avoir analysé mes produits en RMN et en spectrométrie de masse.

Merci à tous les doctorants de l'équipe de pharmacognosie que j'ai côtoyés pendant mes trois ans de thèse ou seulement pendant quelques mois : Sergio, Alexandros, Yvaylo, Maria, Antoinette, Linh, Tsvetelina, Hui, Kévin, Egor, Abou, Sissoko. Je tiens plus particulièrement à remercier Camille pour son soutien au quotidien, mais également pour m'avoir fait découvrir sa ville d'Orléans, Pauline pour nos parties de cache-affaire de cet été, mais aussi pour les fous rires que nous avons eus, William pour nos références au « Dîner de cons », pour nos échanges dans de vastes domaines et surtout pour nos ateliers bricolages et enfin, Mégane pour sa bonne humeur permanente et son sourire.

Merci pour les bons moments passés tous ensemble, les blagues, les fous rires, pour votre aide au quotidien, votre soutien et surtout pour votre présence de tous les jours.

Un très grand merci à Ludivine, notre Strasbourgeoise préférée, qui même loin a toujours été présente et a toujours su trouver des paroles réconfortantes lors des moments difficiles et des périodes de doutes.

Merci également à tous les stagiaires qui sont passés au laboratoire pour leur enthousiasme et leur bonne humeur, Anastasia, Aggeliki, Eugénia, Efi, Thémis et Lina, les étudiantes grecques, mais aussi

Lise, Sandra, Matthieu, Malaurie, Pauline, William, Kévin, Quentin, Camilla, Julia, Issa, Dominique, Bianca, Maira, Andréa, Mattéo.

Je remercie également les autres étudiants de l'UMR 8638 : Stéphane, Lei, Maxime, Alexis, Youssouf, Luca et surtout Doriane pour les échanges de créneaux RMN.

Merci à Faly et Mahefa, les étudiants malgaches avec qui j'ai pu collaborer, notamment pour l'élucidation structurale de composés.

Merci aux enseignants de chimie thérapeutique : Philippe, Etienne, Geoffroy, Armand et Stéphanie de m'avoir permis de découvrir cette matière et d'enseigner à leurs côtés lors de travaux pratiques. Merci également à Martine pour son soutien technique lors de ces TP.

J'adresse un remerciement tout particulier à Audrey, mon amie depuis l'école d'ingénieur avec qui j'ai partagé de bons moments lors de notre stage dans le sud. Merci pour tout !

Je remercie également l'équipe R&D de la société Galderma, l'équipe du Pr. Grierson de l'Université de Vancouver (Canada) ainsi que mes professeurs de l'école d'ingénieur qui m'ont tous conforté dans mon projet de me diriger vers une thèse.

J'adresse également un merci particulier au Dr. Muriel Travers qui m'a aidé et encouragé à entreprendre cette thèse.

Pour finir, je tiens à remercier ma maman qui a toujours cru en moi et qui m'a soutenu dans tous mes projets. Merci pour ton soutien sans faille, ta présence et tes encouragements au quotidien. Je sais que je n'ai pas toujours été facile à vivre, ni de bonne humeur lors de ces trois ans de thèse et que ça n'a pas toujours été simple à gérer. Merci d'avoir toujours été là pour moi !

Je remercie également ma famille qui m'a toujours soutenu durant ces trois ans (ma grand-mère, mes oncles et tantes, ainsi que mes cousins, cousines). Merci à eux !

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE I : CANCER, ANGIOGENESE ET THERAPIES ANTI-ANGIOGENIQUES	17
I. GENERALITES A PROPOS DU CANCER	19
1. Introduction	19
1.1. Les traitements classiques contre le cancer	19
1.1.1. Les approches « locales »	20
1.1.2. Les approches « générales »	20
1.1.1. Les traitements ciblés contre le cancer	21
II. ANGIOGENESE	21
1. Généralités	21
2. Angiogenèse tumorale	22
III. STRATEGIES ANTI-ANGIOGENIQUES	25
1. Première approche anti-angiogénique	25
2. Seconde approche anti-angiogénique	26
3. Troisième approche anti-angiogénique	26
4. Quatrième approche anti-angiogénique	26
IV. LE SYSTEME VEGF/VEGFR	27
1. La grande famille du VEGF	27
1.1. Le Placental Growth Factor (PlGF)	28
1.2. Le VEGF-B	28
1.3. Les VEGF-C et D	29
1.4. Le VEGF (VEGF-A)	29
1. Les récepteurs VEGFRs	31
1.1. Le récepteur VEGFR-1	32
1.2. Le récepteur VEGFR-2	33
1.3. Le récepteur VEGFR-3	33
V. LES MECANISMES D'ACTION DES ANTI-ANGIOGENIQUES	34
1. Les principaux médicaments anti-angiogéniques	35
1.1. La nature des médicaments anti-angiogéniques	35
1.1.1. Les molécules de nature protéique	36
1.1.2. Les molécules issues de la synthèse organique	36
2. Médicaments utilisés en clinique	36
2.1. Les anticorps monoclonaux	37
2.2. Les protéines de fusion recombinante	37
2.3. Les inhibiteurs de tyrosines kinases (ITK)	37
VI. CONCLUSION	39
VII. THEMATIQUE DE RECHERCHE DE L'EQUIPE HETEROCYCLE ET PEPTIDES : APPROCHE CIBLEE, CANCER ET ANGIOGENESE ...	39
CHAPITRE II : INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE, PEPTIDOMIMETIQUES ET APPLICATIONS	43
I. INTRODUCTION	45
II. RESTRICTION CONFORMATIONNELLE EN UTILISANT DES ACIDES AMINES MODIFIES	49
1. Modifications des chaînes latérales	49
1.1. Substitution en position β	49

1.2.	<i>Analogues de proline</i>	50
1.3.	<i>Les peptidomimétiques minimalistes</i>	51
2.	<i>Modifications du squelette</i>	51
2.1.	<i>Modifications des groupements individuels</i>	52
2.1.1.	Les azapetides	52
2.1.2.	Les azatides	53
2.1.3.	Les peptides N-alkylés.....	52
2.1.4.	Les peptoïdes	60
2.1.5.	Les amino-acides tetrasubstitués sur le carbone alpha	55
2.1.6.	Autres modifications possibles des groupements individuels	56
2.2.	<i>L'extension du squelette</i>	57
2.2.1.	Les β-peptides	58
2.2.2.	Les γ-peptides.....	59
2.2.3.	Les δ-peptides, lactames de Freidinger et dérivés	61
2.2.4.	Autres motifs permettant l'extension du squelette	63
2.3.	<i>Le remplacement de la fonction amide</i>	68
2.3.1.	Les peptidomimétiques rétro-inverses	68
2.3.2.	Autres remplacements de la fonction amide	69
III.	RESTRICTION CONFORMATIONNELLE PAR CYCLISATION	69
IV.	APPLICATIONS DES PEPTIDOMIMÉTIQUES	70
1.	<i>Le développement de nouveaux matériaux et catalyseurs</i>	71
2.	<i>Le développement de nouveaux agents thérapeutiques</i>	72
V.	CONCLUSION	75

CHAPITRE III : ACCES A DE NOUVEAUX SQUELETTES ORIGINAUX A PARTIR DE L'AUCUBOSIDE, UN IRIDOÏDE

NATUREL.....	77	
I.	EQUIPE PHARMACOGNOSIE, CHIMIE DES SUBSTANCES NATURELLES ET ELECTROCHIMIE.....	79
1.	<i>Les iridoïdes</i>	79
1.1.	<i>Modifications au niveau de la génine</i>	80
1.2.	<i>Modifications au niveau de la partie glycosidique</i>	80
II.	L'AUCUBOSIDE	81
1.	<i>Historique</i>	81
1.1.	<i>Structure</i>	81
1.2.	<i>Extraction</i>	82
1.3.	<i>Propriétés biologiques de l'aucuboside</i>	83
1.3.1.	Rôle de l'aucuboside dans l'écologie végétale et animale.....	83
1.3.2.	Les activités pharmacologiques de l'aucuboside.....	84
1.3.3.	Mécanisme d'action de l'aucuboside.....	85
III.	LA CHIMIE ET LA REACTIVITE DE L'AUCUBOSIDE	86
1.	<i>Réactivité des hydroxyles en position C₆ et C₁₀</i>	86
1.1.	<i>Réduction de Birch</i>	86
1.2.	<i>Réduction par le palladium en présence d'acide formique</i>	87
1.3.	<i>Substitution du groupement acétyle en position C₁₀</i>	88
2.	<i>Réactions de protection/déprotection des groupements hydroxyles</i>	88
2.1.	<i>Réaction de benzylation</i>	89
2.2.	<i>Réaction de pivaloylation/dépivaloylation</i>	89
2.3.	<i>Réaction d'acétylation/déacétylation</i>	90
2.4.	<i>Réaction de silylation/désilylation</i>	91
3.	<i>Réactivité des doubles liaisons de l'aucuboside</i>	92
3.1.	<i>Réduction au niveau de la double liaison C₇=C₈</i>	92
3.1.1.	Réduction en présence de palladium et d'hydrogène	92
3.1.2.	Réduction par le palladium en présence d'acide formique	93
4.	<i>Réactions électrophiles au niveau de la double liaison C₃=C₄</i>	93
4.1.	<i>La formylation de Vilsmeier-Haack</i>	94
4.2.	<i>Réactions de métallation</i>	94
4.2.1.	Réaction d'hydroxymercuration/démercuration	94
4.2.2.	Réaction d'oxythallation/déthallation	95

4.3.	<i>Réactions d'halogénéation : halohydrines et halolactones</i>	95
4.3.1.	Formation d'halo-éthers et d'halo-acétates.....	95
4.3.2.	Formation de bromohydrines (bromolactols) et bromolactones.....	97
4.3.3.	Formation de iodohydrines ou iodolactols et iodolactones.....	98
4.4.	<i>Réarrangement des iodolactols/iodolactones : contraction du cycle dihydropyrane</i>	100
4.4.1.	Contraction du cycle dihydropyrane en squelette cyclopenta[1,2-c]furane à partir des iodolactols....	100
4.4.2.	Contraction du cycle dihydropyrane à partir des iodolactones.....	103
IV.	DEVELOPPEMENT DE COMPOSES D'INTERET BIOLOGIQUE A PARTIR DES NOUVEAUX SYNTHONS ORIGINAUX FORMES.....	107
1.	<i>Analogues cytotoxiques d'aucuboside : dérivés de cyclopentènone</i>	108
2.	<i>Analogues contraints d'aminocyclopentitols : analogues de manostatines</i>	108
3.	<i>Analogues contraints de γ-amino-acides</i>	109
3.1.	<i>γ-amino-acides glycosylés contraints</i>	109
3.2.	<i>γ-amino-acides contraints</i>	109
3.3.	<i>Développement de châssis moléculaires chiraux</i>	111
V.	CONCLUSION.....	113
OBJECTIF DE LA THESE		115
CHAPITRE IV : DEVELOPPEMENT D'AMINO-ACIDE INDUCTEUR DE COUDE B ET SYNTHESSES DE PEPTIDES		119
I.	OBTENTION DE L'AUCUBOSIDE.....	121
1.	<i>Extraction de l'aucuboside</i>	121
2.	<i>Purification de l'aucuboside</i>	121
3.	<i>Conclusion</i>	122
II.	MODELISATION MOLECULAIRE.....	122
1.	<i>Les coudes α et β</i>	122
1.1.	<i>Généralités</i>	122
1.2.	<i>Formation de coude β de peptides modèles constitués du squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène</i>	124
2.	<i>Application de la modélisation moléculaire à notre projet</i>	125
2.1.	<i>Introduction</i>	125
2.2.	<i>Procédure pour générer les conformations par dynamique moléculaire</i>	127
3.	<i>Traitement des résultats et analyses</i>	128
3.1.	<i>Mesure des valeurs des angles dièdres</i>	128
3.2.	<i>Formation de cluster</i>	129
3.3.	<i>Etude de la présence ou de l'absence de la liaison hydrogène</i>	131
4.	<i>Conclusion et perspectives</i>	136
III.	MECANIQUE QUANTIQUE.....	137
1.	<i>Introduction</i>	137
2.	<i>Résultats</i>	138
2.1.	<i>Le peptide BocAla₁-δ BCH I-Ala₂OMe (85)</i>	139
2.2.	<i>Le peptide BocAla₁-δ BCH II-Ala₂OMe (88)</i>	139
2.3.	<i>Le peptide BocAla₁-γ BCH I-Ala₂OMe (86)</i>	140
3.	<i>Conclusion</i>	140
IV.	PREPARATION DU SYNTHON 69.....	141
1.	<i>Description de la synthèse</i>	142
1.1.	<i>Première étape : Protection</i>	142
1.2.	<i>Deuxième étape : Oxydation de la double liaison - Formation des iodolactols</i>	142
1.3.	<i>Troisième étape : Oxydation de la double liaison - Formation des iodolactones</i>	143
1.4.	<i>Quatrième étape : formation du bicyclo[3.1.0]hex-2-ène</i>	144
1.5.	<i>Cinquième étape : Alkylation</i>	145
1.6.	<i>Etapes 6 à 8 : réduction de l'aldéhyde en groupement méthylène</i>	145
2.	<i>Optimisation de la voie de synthèse</i>	146
2.1.	<i>Optimisation de l'étape d'alkylation</i>	146
2.2.	<i>Optimisation du passage de 66 à 69</i>	147
2.2.1.	<i>Conditions testées précédemment au laboratoire</i>	148
2.2.2.	<i>Conditions de réduction testées</i>	149
3.	<i>Conclusion</i>	159

V.	SYNTHESES DES DIFFERENTS PEPTIDES MODELES	159
1.	<i>Synthèse du peptide modèle 85</i>	161
1.1.	<i>Déprotection du groupement phtalimide</i>	162
1.2.	<i>Couplage peptidique du côté N-terminal</i>	164
1.3.	<i>Saponification de l'ester méthylique et de l'ester pivalique</i>	165
1.4.	<i>Couplage peptidique du côté C-terminal</i>	166
3.	<i>Synthèse du peptide modèle 86</i>	167
3.1.	<i>Déprotection du groupement phtalimide</i>	167
3.2.	<i>Couplage peptidique du côté N-terminal</i>	167
3.3.	<i>Saponification de l'ester méthylique et de l'ester pivalique</i>	168
3.4.	<i>Couplage peptidique du côté C-terminal</i>	168
4.	<i>Synthèse du peptide modèle réduit 88</i>	168
4.1.	<i>Mise au point de la réduction de la double liaison</i>	168
4.2.	<i>Synthèse de 88 : Première voie de synthèse</i>	173
4.2.1.	<i>Déprotection du phtalimide et réduction de la double liaison allylique</i>	173
4.2.2.	<i>Couplage peptidique du côté N-terminal</i>	174
4.2.3.	<i>Saponification de l'ester méthylique et de l'ester pivalique</i>	175
4.2.4.	<i>Couplage peptidique du côté C-terminal</i>	176
4.3.	<i>Synthèse de 88 : Seconde voie de synthèse</i>	177
4.3.1.	<i>Réduction de la double liaison</i>	177
4.3.2.	<i>Déprotection sélective des esters pivaliques par le méthanolate de sodium</i>	177
4.3.3.	<i>Introduction du groupement phtalimide par une réaction de Mitsunobu</i>	179
4.3.4.	<i>Déprotection du phtalimide</i>	179
4.3.5.	<i>Couplage peptidique du côté N-terminal</i>	179
4.3.6.	<i>Saponification des deux esters</i>	179
4.3.7.	<i>Second couplage peptidique du côté C-terminal</i>	180
5.	<i>Conclusion</i>	180
VI.	SYNTHESES DES PEPTIDES D'INTERET BIOLOGIQUE	180
1.	<i>Généralités à propos de la synthèse peptidique</i>	180
1.1.	<i>Introduction</i>	180
1.2.	<i>La formation de l'ester activé</i>	181
1.2.1.	<i>Le couple carbodiimide/bon nucléophile</i>	182
1.2.2.	<i>Les dérivés uroniens</i>	183
1.2.3.	<i>Les dérivés phosphoniens</i>	184
1.3.	<i>Mécanisme d'un couplage peptidique</i>	184
2.	<i>Le principe de la synthèse peptidique sur support solide</i>	185
2.1.	<i>Fixation du premier acide aminé sur la résine</i>	185
2.2.	<i>La construction du peptide</i>	186
2.3.	<i>Déprotection des groupements protecteurs et clivage de la résine</i>	187
3.	<i>Préparation des amino-acides bicycliques pour leurs incorporations dans le peptide d'intérêt biologique</i>	187
3.1.	<i>Introduction</i>	187
3.2.	<i>Stratégie Fmoc</i>	189
3.2.1.	<i>Déprotection du phtalimide</i>	189
3.2.2.	<i>Saponification de l'ester méthylique</i>	189
3.2.3.	<i>Formation du composé 115</i>	190
4.	<i>Conclusion</i>	190
VII.	ANALYSES SPECTROSCOPIQUES DES PEPTIDES SYNTHETISES	190
1.	<i>Ajouts de DMSO-d₆ dans CDCl₃</i>	191
1.1.	<i>Peptide BocAla₁-δ BCH I-Ala₂OMe 85</i>	192
1.2.	<i>Peptide BocAla₁-δ BCH II (OPiv)-Ala₂OMe 113</i>	193
2.	<i>Variations de température</i>	193
2.1.	<i>Peptide BocAla₁-δ BCH I-Ala₂OMe 85</i>	194
3.	<i>Couplages spaciaux H-H</i>	195
3.1.	<i>Peptide BocAla₁-δ BCH II (OPiv)-Ala₂OMe 113</i>	195
4.	<i>Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)</i>	196
4.1.	<i>Peptide BocAla₁-δ BCH I-Ala₂OMe 85</i>	196

4.2.	<i>Peptide BocAla₁-γ BCH I-Ala₂OMe</i>	86	196
4.3.	<i>Peptide BocAla₁-δ BCH II (OPiv)-Ala₂OMe</i>	113	196
CONCLUSION GENERALE			197
PERSPECTIVES			199
EXPERIMENTAL PART			201
I.	MATERIALS AND METHODS		203
II.	PROTOCOLS AND CHARACTERIZATIONS		204
1.	<i>Preparation of reagents</i>		204
2.	<i>Synthesis of starting material</i>		206
3.	<i>Synthesis of tripeptides</i>		230
III.	MOLECULAR MODELLING		268
1.	<i>Molecular Dynamics</i>		268
2.	<i>DFT calculations</i>		268
2.1.	<i>Selection of starting conformations</i>		268
2.2.	<i>DFT geometry optimization and energy calculations</i>		269
BIBLIOGRAPHIE			270
LISTE DES FIGURES			287
LISTE DES TABLEAUX			293

Liste des abréviations

4-DMAP : 4-diméthylaminopyridine

Å : ångström

ACN : acétonitrile

AcOH : Acide acétique

AcOEt : Acétate d'éthyle

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

APTS : acide *para*-toluènesulfonique

ATP : Adénosine Triphosphate

$B(C_6F_5)_3$: tris(pentafluorophényl)borane

BDDC : bis[[4-(2,2-diméthyl-1,3-dioxolyl)]méthyl]-carbodiimide

BEC : *N*-tert-butyl-*N'*-éthylcarbodiimide

$BF_3 \cdot Et_2O$: trifluoroborane étherate

$BH_3 \cdot THF$: complexe borane-tetrahydrofurane

BMC : *N*-tert-butyl-*N'*-méthylcarbodiimide

BOP : (benzotriazol-1-yloxy)-tris(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate

Bro-P : bromotris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate

BTFFH : *N,N,N',N'*-bis(tetraméthylène)formamidinium fluoride hexafluorophosphate

$CDCl_3$: chloroforme deutéré

CIC : *N*-Cyclohexyl-*N'*-isopropylcarbodiimide

Clo-P : chlorotris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate

CsF : fluorure de césium

d : doublet

dd : doublet de doublet

dl : doublet large

Da : Dalton

DAST : Diéthylaminosulfur trifluorure

DCC : *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide

DCM : dichlorométhane

DFIH : *N,N'*-diméthyl-2-fluoro-4,5-dihydro-1H-imidazole hexafluorophosphate

DFT : Density Functional Theory

DIAD : Diisopropyl azodicarboxylate

DIC : Diisopropylcarbodiimide
DIPEA : Diisopropyléthylamine
DMAP : *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine
DMF : *N,N*-diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EDC : *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide hydrochloride
éq : équivalent(s)
Et₃SiH : triéthylsilane
FDA : Food and Drug Administration
FeCl₃.6H₂O : trichlorure de fer hexahydraté
FGF : Fibroblast Growth Factor
Fmoc : 9-fluorenylméthoxy-carbonyl
GABA : γ -Amino Butyrique Acid
Glc : glucose
HAMDU : O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,3-diméthyl-1,3-diméthylèneuronium hexafluorophosphate
HAPyU : 1-(1-pyrrolidinyl-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylméthylène)pyrrolidinium hexafluorophosphate N-oxide
HATU : Hexafluorophosphate de 1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo [4,5-b]pyridinium-3-oxyde
HBMDU : O-(benzotriazol-1-yl)-1,3-diméthyl-1,3-diméthylèneuronium hexafluorophosphate
HBPyU : 1-(1-pyrrolidinyl-1H-benzotriazol-1-ylméthylène)-pyrrolidinium hexafluorophosphate N-oxide
HBTU : N-[(1H-benzotriazol-1-yl)(diméthylamino)-méthylène]-N-méthylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide
HCTU : 2-(6-Chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylaminium hexafluorophosphate
HDTU : O-(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate
HMPA : hexaméthylphosphoric triamide
HOAt : 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBT : 1-Hydroxybenzotriazole
HOSu : N-Hydroxysuccinimide
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography
HRMS : High Resolution Mass Spectroscopy
Hz : Hertz
Ig : Immunoglobuline

INCa : Institut National du Cancer
IRTF : Infrarouge à transformée de Fourier
ITC : Isothermal Titration Calorimetry
ITK : Inhibiteurs de Tyrosine Kinase
J : constante de couplage
JMD : Juxtamembrane Domain
K₂CO₃ : carbonate de potassium
LiEt₃BH : triéthylborohydrure de lithium
m : multiplet
MEC : Matrice extracellulaire
M.M : Masse moléculaire
MeOH : Méthanol
NaBH₄ : tetraborohydrure de sodium
NaBH₃CN : cyanoborohydrure de sodium
NBS: *N*-bromosuccinimide
NBSH : nitrobenzènesulfonylhydrazine
NIS : *N*-iodosuccinimide
NOESY : Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NRP : neuropiline
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PDC: Dichromate de pyridinium
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PfpOH: 2,3,4,5,6-Pentafluorophenol
Pht: Groupement phtalimide
Piv: Groupement ester pivaloïque
PIGF : Placental Growth Factor
PMHS : polyméthylhydrosiloxane
PMTA : Pyridine MonoTerpene Alkaloid
PyAOP : 7-azabenzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
PyBOP : Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
PyBro-P : *N,N'*-bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic bromide
PyClo-P: *N,N'*-bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride
Pyr : Pyridine
q : quadruplet
RMSD : Root Mean Square Deviation

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RSA : Relations Structure-Activité
s : singulet
sl : singulet large
SNC : Système Nerveux Central
SPPS : Synthèse Peptidique sur Phase Solide
t: triplet
T.A: Température Ambiante
TBAF : fluorure de tetrabutylammonium
TBDMSCl : *tert*-butyldiméthylsilyle
t-Boc : Groupement *tert*-butoxycarbonyle
TBTU : *N*-[(1H-benzotriazol-1-yl)- (diméthylamino)méthylène]-*N*-méthylmethanaminium
tetrafluoroborate N-oxide
TFA : trifluoroacétique acid
TFFH : *N,N,N',N'*-tetraméthylformamidinium fluoride hexafluorophosphate
THF : Tetrahydrofurane
TIPS : triisopropylsilane
TMD : Transmembrane Domain
TMSCH₂N₂ : (triméthylsilyl)diazométhane
TMSONa : Triméthylsilanolate de sodium
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNT : tri-nitrate de thallium
TNTU : 2-(5-Norborene-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetraméthyluronium tetrafluoroborate
TPS-1 : thrombospondine-1
TSTU : *N,N,N',N'*-Tetraméthyl-O-(N-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate
TTI : tri-trifluoroacétate d'iode
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
sVEGFR : soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Introduction générale

Le cancer étant la deuxième cause de mortalité dans le monde, il reste un enjeu important de santé publique de développer de nouveaux traitements contre ce fléau. Heureusement, les nombreux progrès réalisés dans le domaine médical ainsi qu'en biologie moléculaire et cellulaire ont conduit au développement de nouvelles thérapies «ciblées». Ces thérapies agissent spécifiquement sur des cibles moléculaires identifiées en distinguant les cellules cancéreuses des cellules saines. Elles ont également pour but de limiter les effets secondaires que le patient pourrait subir. Ces nouveaux traitements sont notamment basés sur le ciblage de l'angiogenèse tumorale afin de limiter la croissance et la prolifération des tumeurs cancéreuses.

Dans un premier chapitre, nous définirons l'angiogenèse ainsi que les différents acteurs impliqués dans le dérèglement de ce processus physiologique conduisant au phénomène d'angiogenèse tumorale. Ces acteurs sont entre autres, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) ainsi que ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 (Récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). Nous décrirons par la suite les agents anti-angiogéniques utilisés actuellement comme traitement, mais également les autres stratégies en cours de développement. Pour finir ce premier chapitre, nous détaillerons plus particulièrement l'inhibition du couple VEGF/VEGFR-1, qui est développée par l'équipe de l'UMR CNRS 8638 Hétérocycles et Peptides : Approche Ciblée, Cancer et Angiogenèse. Le peptide V114, possédant déjà une bonne affinité pour le VEGF a été optimisé. Pour augmenter son affinité et sa stabilité en solution vis-à-vis des protéases, il est envisagé de le structurer en modifiant la partie en coude β à l'aide d'un acide aminé contraint original issu d'un iridoïde.

Dans un second chapitre, nous détaillerons le concept des peptidomimétiques, ces peptides modifiés d'un point de vue structural induisant une restriction conformationnelle qui permet de maintenir la conformation bioactive en solution. Ces peptidomimétiques sont utilisés pour leur capacité à mimer les structures secondaires interagissant avec les «hot spots» de la protéine cible. Ils perturbent les interactions protéine-protéine ou protéine-ligand pouvant déclencher une réponse biologique recherchée pour le traitement de nombreuses maladies. Nous présenterons les différentes classes de peptidomimétiques à l'aide de quelques exemples montrant les variations possibles au niveau des chaînes latérales et du squelette. Pour finir, les autres applications possibles des peptidomimétiques dans le domaine des nanobiomatériaux, des catalyseurs et le domaine biologique seront exposées.

Le troisième chapitre présentera une série d'acides aminés obtenus par hémisynthèse à partir de l'aucuboside, un terpénoïde naturel isolé à l'échelle de la centaine de grammes des parties aériennes d'*Aucuba japonica* Thumb. (Cornaceae). Cet iridoïde glycosylé possède une génine monoterpénique de type cyclopenta[c]pyrane. Les transformations chimiques des alcools allyliques et des doubles liaisons ayant conduit à la synthèse de séries de composés aux squelettes variés seront décrites. Les réactions de contraction de cycle permettant l'accès au motif cyclopenta[1,2-c]furane et au motif bicyclo[3.1.0]hex-2-ène, développées par l'équipe de l'UMR CNRS 8638 Pharmacognosie, Chimie des Substances Naturelles et Electrochimie seront particulièrement détaillées. Nous évoquerons également leur utilisation comme synthons, pour le développement de composés bio-actifs, comme des analogues contraints d'aminocyclopentitols et des analogues contraints de GABA (γ -Amino Butyrique Acid).

Le projet de thèse concerne l'étude d'acides aminés γ et δ contraints chiraux, de squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène, et de leur potentiel à induire des structures secondaires peptidiques, en particulier des coudes β . L'objectif recherché est la sélection d'un acide aminé afin de pouvoir l'introduire dans le peptide V114, ligand du VEGF.

Le dernier chapitre sera consacré aux travaux personnels. A partir de l'aucuboside, deux amino acides γ et un amino acide δ ayant un squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène ont été synthétisés en une dizaine d'étapes. Ces acides aminés bicycliques contraints ont été utilisés comme châssis moléculaire central dans la synthèse de trois tripeptides modèles. Leur capacité à induire des coudes β a été étudiée. Deux études *in-silico* utilisant un champ de forces ont été effectuées, l'une par dynamique moléculaire et l'autre par recherche conformationnelle systématique. Pour compléter ces études, les trois conformations de plus basse énergie ont été sélectionnées pour chaque tripeptide modèle, et traitées par DFT (Density Functional Theory). L'ensemble des résultats de ces études a permis de sélectionner l'acide aminé le plus prometteur qui sera engagé dans la synthèse du peptide V114 modifié.

Chapitre I : Cancer, angiogenèse et thérapies anti-angiogéniques

I. Généralités à propos du cancer

1. Introduction

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde. Cette maladie a fait 8,8 millions de morts en 2015. Près d'un décès sur 6 dans le monde est dû au cancer. Selon l'Institut National du Cancer (INCa), on estime à 400 000 le nombre de nouveaux cas de cancer pour l'année 2017 en France. Ce nombre est en constante augmentation en raison du vieillissement de la population, ainsi que du nombre croissant de cas diagnostiqués. Le cancer apparaît donc aujourd'hui comme un enjeu important de santé publique.

Une tumeur se développe à la suite d'une multiplication et d'une prolifération anarchique de certaines cellules. Ces dysfonctionnements résultent d'une accumulation d'erreurs au sein de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) de ces cellules. Lorsqu'une tumeur atteint une certaine taille, le réseau sanguin déjà existant n'est plus suffisant pour l'alimenter en nutriments et en oxygène. La tumeur va alors mettre en place de nouveaux vaisseaux sanguins, pour s'assurer une bonne irrigation et permettre sa survie et sa croissance. Il s'agit de la néo-angiogenèse. Ces nouveaux vaisseaux peuvent également servir de porte d'entrée à la diffusion de métastases vers d'autres organes.

Aujourd'hui, un cancer sur deux est guéri grâce à l'arsenal thérapeutique disponible (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie). Cependant, le développement de nouveaux traitements reste indispensable afin de pouvoir traiter tous les types de cancers, ainsi que les patients présentant des formes avancées de cancers ou ayant rechutés.

Les progrès en biologie moléculaire et cellulaire ainsi que l'amélioration des connaissances en cancérologie ont permis l'émergence de nouveaux traitements comme l'immunothérapie il y a quelques années et plus récemment les thérapies dites « ciblées ».

1.1. Les traitements classiques contre le cancer

Deux grandes catégories de traitement anticancéreux sont employées depuis des années. La première catégorie fait référence à des approches « locales » qui impliquent la chirurgie et la radiothérapie. Seule la partie du corps où est localisée la tumeur est traitée. La seconde catégorie quant à elle fait référence à une approche plus « générale » impliquant la chimiothérapie, hormonothérapie et immunothérapie. Pour cette approche, l'ensemble du corps du patient reçoit le traitement. Ce n'est

pas un traitement localisé. Afin d'améliorer l'efficacité des traitements, il est possible de combiner plusieurs approches.

1.1.1. Les approches « locales »

a. La chirurgie

La chirurgie a pour but d'extraire la tumeur. Cependant, c'est une approche invasive qui nécessite des soins post-opératoires et un temps de convalescence pour le patient. La chirurgie reste efficace, néanmoins, l'ablation d'une partie des tissus sains entourant la tumeur est généralement nécessaire.

b. La radiothérapie

La radiothérapie consiste, quant à elle, à l'irradiation de la tumeur pour la détruire en occasionnant des dommages au niveau de l'ADN pour conduire à l'apoptose de cette dernière.

1.1.2. Les approches « générales »

a. La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à administrer au patient par voie intraveineuse, des agents cytotoxiques qui vont interférer avec le métabolisme des cellules cancéreuses pour freiner ou stopper leur prolifération. Ce type de traitement possède de nombreux effets secondaires indésirables. Il a donc été développé par la suite, des traitements plus spécifiques et sélectifs.

b. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie s'applique à des cancers « hormonosensibles ». Pour ce type de cancer, la présence d'hormones induit une multiplication plus rapide des cellules cancéreuses. Le but de ce traitement est de bloquer la production ou l'activité de ces hormones. L'hormonothérapie ne détruit donc pas directement les cellules cancéreuses à l'instar des autres traitements.

c. L'immunothérapie

L'immunothérapie est un traitement qui vise à « mobiliser » les défenses immunitaires du patient contre le cancer.

Classiquement, les patients sont traités par une association de deux traitements, l'un général comme la chimiothérapie et l'autre local comme la radiothérapie. Ce type de combinaison entraîne de nombreux effets secondaires importants et très désagréables pour le patient. C'est dans ce sens que de nouveaux traitements ont été développés, les thérapies ciblées.

1.1.1. Les traitements ciblés contre le cancer

Ces thérapies ciblées ont pour objectif de bloquer la croissance ou la propagation de la tumeur notamment en empêchant celle-ci de fabriquer de nouveaux vaisseaux sanguins. Des thérapies ciblées, appelées anti-angiogéniques, ont donc été développées dans ce sens.

Ce nouveau type de traitement tranche avec les stratégies classiques de chimiothérapie utilisant des agents cytotoxiques non spécifiques. Les thérapies ciblées comme leurs noms l'indiquent, agissent sur des cibles moléculaires bien définies. Ces traitements ont pour objectif de distinguer les cellules saines des cellules malignes afin de limiter les effets secondaires¹.

II. Angiogenèse

1. Généralités

L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Figure 1). C'est un processus physiologique normal, que l'on retrouve notamment lors du développement embryonnaire², de la cicatrisation³, ou encore lors du cycle reproducteur féminin.

¹ Sawyers, C. *Nature* **2004**, 432, 294-297

² Otani, N.; Minami, S.; Yamoto, M.; Shikone, T.; Otani, H.; Nishiyama, R.; Otani, T.; Nakano, R. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, 84, 3845-3851

³ Tonnesen, M. G.; Feng, X.; Clark, R. A. F. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, 5, 40-46

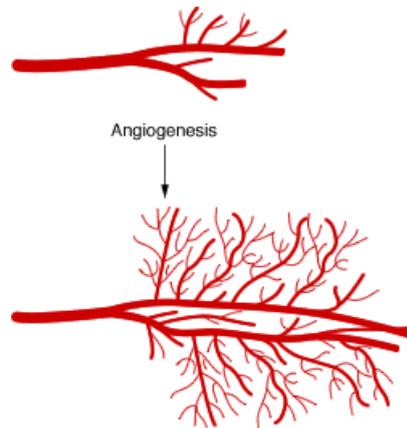


Figure 1: Angiogenèse: développement de nouveaux vaisseaux sanguins⁴

L'activité angiogénique est contrôlée par des facteurs anti-angiogéniques⁵ comme l'angiostatine et l'endostatine et des facteurs pro-angiogéniques⁶ tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor) ainsi que le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor). Cette balance entre les facteurs pro et anti-angiogéniques, lorsqu'elle est dérégulée, peut devenir pathologique et être impliquée dans le développement de nombreuses maladies, comme le développement tumoral.

2. Angiogenèse tumorale

Depuis très longtemps, le lien entre cancer et angiogenèse est connu et établi. Dans les années 1900, il a été mis en évidence que la croissance tumorale était généralement accompagnée d'une augmentation de la vascularisation⁷. Il a été postulé que les cellules cancéreuses pouvaient produire des substances « angiogéniques » qui induisent la création et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.⁸

Il a fallu attendre 1971 pour que le lien entre cancer et angiogenèse soit définitivement confirmé par le Dr. Folkman. Il a émis l'hypothèse que l'inhibition de l'angiogenèse priverait la tumeur en oxygène et nutriments ce qui empêcherait son développement⁹. Il a ainsi créé le concept de thérapie anti-angiogénique ciblée qui est encore en développement de nos jours.

⁴ http://www.utc.fr/~mastermq/public/publications/qualite_et_biomedical/UTC/master_mts/2004-2005/projets/dasilva_hantzo_saillant/dasilva_hantzo_saillant.html consulté le 12/10/2018

⁵ Ribatti, D. *Leuk. Res.* **2009**, *33*, 638-644

⁶ Gacche, R N.; Meshram, R. J. *Bioch. Biophys. Acta* **2014**, *1846*, 161-179

⁷ Goldmann, E. *Proc. Royal Acad. Med.* **1908**, *1*, 1-13

⁸ Ehrmann, R. L.; Knoth, M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1968**, *41*, 1329-1341

⁹ Folkman, J. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-1186

Les cellules tumorales commencent leur croissance dans un environnement non vascularisé. Elles se trouvent dans un état dormant qui se caractérise par un équilibre entre prolifération et apoptose des cellules. Une fois que les tumeurs atteignent une taille de quelques millimètres cube, elles ont besoin d'un apport en nutriment et en oxygène pour continuer leurs croissances. Ce passage d'un état de dormance à un état plus invasif est appelé transition angiogénique¹⁰(ou switch angiogénique). Ce phénomène se traduit par la libération de facteurs pro-angiogéniques qui viennent ainsi déséquilibrer la balance entre facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques¹¹ (Figure 2).

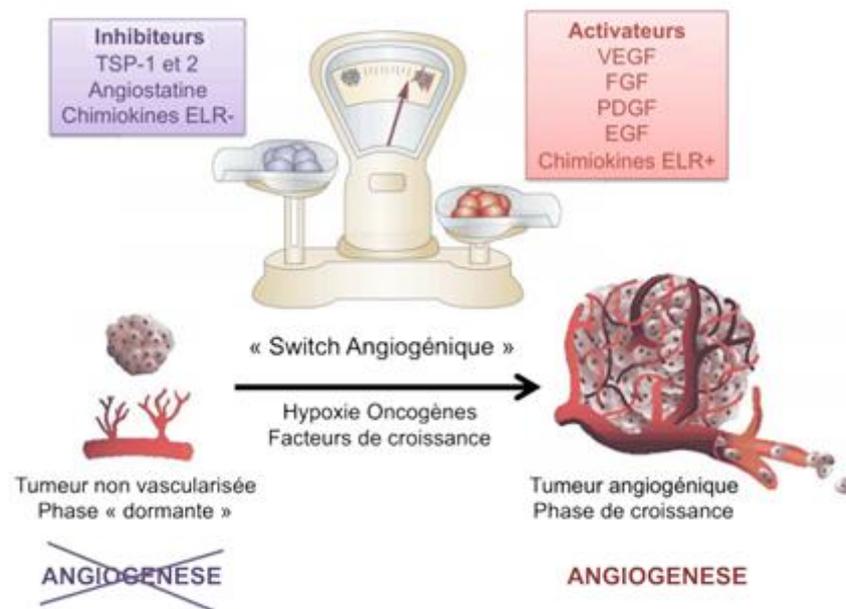


Figure 2: Déséquilibre de la balance angiogénique¹²

L'émission de ces facteurs pro-angiogéniques déclenche ainsi une néo-vascularisation de la tumeur, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui permettent l'apport d'oxygène et de nutriments. La tumeur peut ainsi continuer de se développer et grossir¹² (Figure 3).

¹⁰ Hanahan, D.; Folkman, J. *Cell* **1996**, *86*, 353-6

¹¹ Baeriswyl, V.; Christofori, G. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 329-337

¹² Bergers, G.; Benjamin, L. E. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 401-410

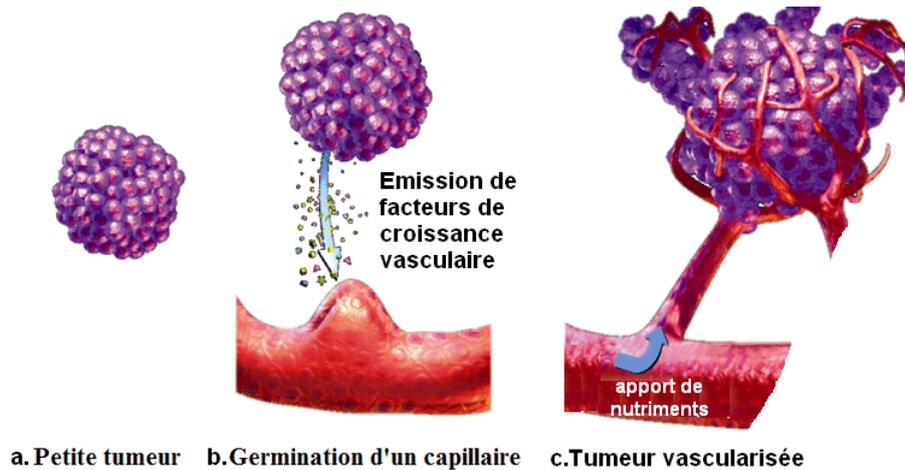


Figure 3: Passage de la tumeur de l'état dormant à un état plus invasif¹³

Les vaisseaux sanguins produits lors de l'angiogenèse tumorale sont anormaux. Ils sont désorganisés, tortueux, gonflés, fragiles et ont un diamètre irrégulier. De plus, ils possèdent des branchements et interconnexions excessifs¹⁴ (Figure 4).

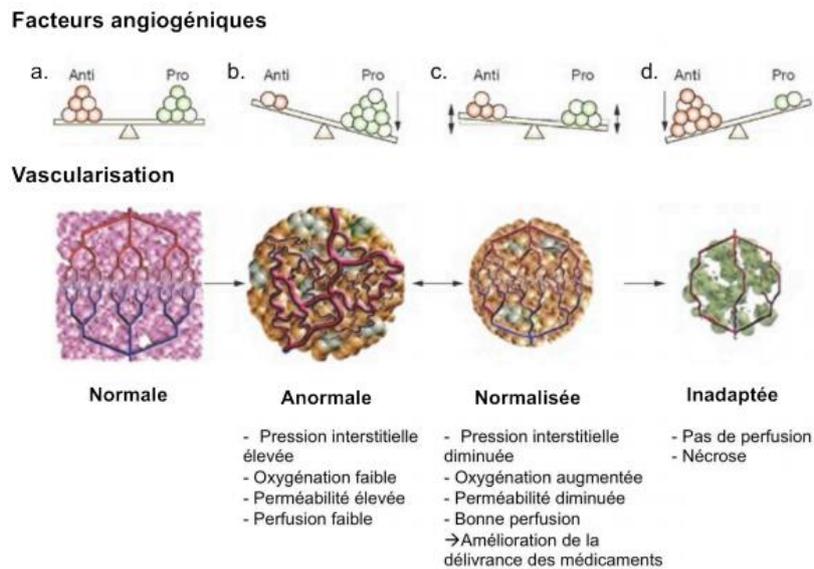


Figure 4: Normalisation vasculaire au cours d'un traitement anti-angiogénique¹⁵

a. De façon physiologique, il existe un état d'équilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques favorisant un réseau vasculaire organisé et fonctionnel. b. La tumeur produit un excès de facteurs angiogéniques favorisant un réseau vasculaire anormal et non fonctionnel. c. L'utilisation d'un traitement anti-angiogénique permet de rétablir un état d'équilibre et d'induire une normalisation partielle du réseau vasculaire favorisant l'efficacité des traitements anti-cancéreux. d. Une inhibition prolongée de l'angiogenèse peut entraîner la destruction du réseau vasculaire ainsi que de la tumeur.

L'angiogenèse normale ainsi que l'angiogenèse tumorale restent des phénomènes extrêmement complexes et régulés par divers activateurs (facteurs pro-angiogéniques) et inhibiteurs (facteurs anti-

¹³ <http://www.angioworld.com> consulté le 12/10/2018

¹⁴ Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature* **2000**, *407*, 249-257

¹⁵ Jain, R. K.; Di Tomaso, E.; Duda, D. G.; Loeffler, J. S.; Sorensen, A. G.; Batchelor, T. T. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 610-622

angiogéniques). Nous avons vu que l'angiogénèse jouait un rôle important dans la croissance tumorale. Un grand nombre de régulateurs ont été identifiés et étudiés. Parmi ces régulateurs, le VEGF comme facteur pro-angiogénique et le TPS-1 (thrombospondine-1) comme facteur anti-angiogénique sont les deux protéines les plus étudiées.

III. Stratégies anti-angiogéniques

Comme déjà discuté précédemment, l'activation de l'angiogénèse résulte d'une modification de l'équilibre entre activateurs et inhibiteurs. Plusieurs stratégies anti-angiogéniques ont ainsi été développées dans les dernières décennies¹⁶.

1. Première approche anti-angiogénique

La première approche consiste à bloquer les facteurs pro-angiogéniques ou leurs récepteurs. Parmi plus de 40 molécules endogènes actuellement décrites comme des activateurs ou des inhibiteurs de l'angiogénèse, la famille du VEGF a été la première ciblée. En effet, nous avons vu que ce facteur avait un rôle central dans l'angiogénèse.

Expérimentalement, dans des modèles de xénogreffe (donneur et receveur appartiennent à des espèces différentes), les anticorps dirigés contre le VEGF ou ses récepteurs inhibent la croissance de carcinome gastrique¹⁷, colique¹⁸ ou hépatocellulaire¹⁹. Néanmoins, l'inhibition de plusieurs facteurs angiogéniques de façon simultanée semble être une meilleure stratégie. En effet lorsqu'une voie de signalisation est bloquée, d'autres voies peuvent entrer en action pour maintenir la réponse biologique.

Par exemple, il a été démontré dans des modèles de souris présentant un carcinome colique métastatique, que l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ciblant notamment la voie de signalisation du VEGF et du FGF-2 améliorait leur survie¹⁸.

On retrouve ici une similitude avec le principe des poly-chimiothérapies où l'on combine des molécules ayant des mécanismes d'action différents et parfois synergiques.

¹⁶ Bidart, M.; Berger, F.; Pelletier, L. *Ann. Biol. Clin.* **2013**, *71*, 527-535

¹⁷ Kamiya, K.; Konno, H.; Tanaka, T.; Baba, M.; Matsumoto, K.; Sakaguchi, T.; Yukita, A.; Asano, M.; Suzuki, H.; Arai, T.; Nakamura, S. *Jpn. J. Cancer Res.* **1999**, *90*, 794-800

¹⁸ Shaheen, R. M.; Tseng, W. W.; Vellagas, R.; Liu, W.; Ahmad, S. A.; Jung, Y. D.; Reinmuth, N.; Drazan, K. E.; Bucana, C. D.; Hicklin, D. J.; Ellis, L. M. *Int. J. Oncology* **2001**, *18*, 221-226

¹⁹ Liu, Y.; Poon, R. T.; Li, Q.; Kok, T. W.; Lau, C.; Fan, S. T. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 3691-3699

2. Seconde approche anti-angiogénique

La seconde approche consiste en l'utilisation de médicaments ciblant la prolifération ou la survie des cellules endothéliales. Certaines molécules anti-angiogéniques, comme l'endostatine qui est exprimée naturellement par la tumeur, ont fait l'objet de divers travaux. En effet, ces inhibiteurs naturels de facteurs angiogéniques ont montré une inhibition de la croissance tumorale dans des modèles murins²⁰.

3. Troisième approche anti-angiogénique

La troisième approche consiste en l'emploi de molécules qui préviennent la dégradation de la matrice extracellulaire et de la membrane basale²¹. La matrice extracellulaire étant un réservoir potentiel de VEGF, en limitant sa dégradation, il est ainsi possible de restreindre la quantité de facteur pro-angiogénique libéré et donc par conséquent de contrôler le phénomène d'angiogenèse.

4. Quatrième approche anti-angiogénique

Pour finir, la quatrième et dernière approche a pour cible les molécules d'adhérence cellulaire comme les intégrines (protéines transmembranaires). Les cellules endothéliales expriment des intégrines en réponse aux facteurs pro-angiogéniques sécrétés par les cellules tumorales. La liaison de ces intégrines à divers ligands de la matrice extracellulaire permet les phénomènes de prolifération et/ou de migration des cellules endothéliales qui contribuent à la formation et à la maturation de vaisseaux.

Après une brève explication des quatre stratégies anti-angiogéniques, au vue des différents travaux publiés, l'approche la plus utilisée est celle visant les facteurs pro-angiogéniques, notamment le VEGF. Dans la suite de la discussion nous allons nous concentrer sur l'inhibition de l'angiogenèse tumorale au travers du système VEGF/VEGFR.

²⁰ Schmitz, V.; Wang, L.; Barajas, M.; Gomar, C.; Prieto, J.; Qian, C. *Gut* **2004**, *53*, 561-567

²¹ Oba, K.; Konno, H.; Tanaka, T.; Baba, M.; Kamiya, K.; Ohta, M.; Kaneko, T.; Shouji, T.; Igarashi, A.; Nakamura, S. *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 45-51

IV. Le système VEGF/VEGFR

1. La grande famille du VEGF

Le VEGF appartient à une famille de glycoprotéines de 40 kDa comprenant plusieurs membres : le VEGF-A, B, C et D et le PlGF (Placental Growth Factor). Il existe également des formes plus rares : le VEGF-E retrouvé chez le para-poxvirus et le VEGF-F retrouvé uniquement dans le venin de serpent. Le médiateur majeur de l'angiogenèse tumorale est le VEGF-A généralement appelé simplement VEGF. Ce facteur de croissance a été mis en évidence par plusieurs équipes en parallèle^{22,23,24,25}.

L'activité pro-angiogénique de ces différents facteurs de croissance dépend de leur liaison à différents récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFRs). L'activité induite par le VEGF peut être amplifiée par l'activation de deux co-récepteurs, les neuropilines 1 et 2 (NRP-1 et NRP-2)²⁶ qui contrairement aux VEGFRs ne sont pas des récepteurs à activité tyrosine kinase. Le rôle des récepteurs du VEGF dans le phénomène d'angiogenèse est un mécanisme très complexe²⁷ (Figure 5).

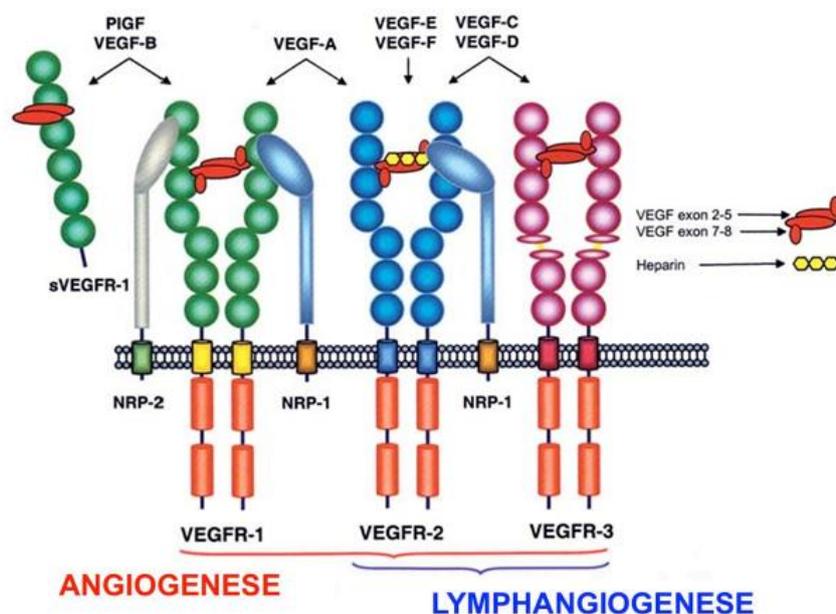


Figure 5: Représentation schématique des ligands de la famille du VEGF et de ses récepteurs²⁷

²² Senger, D. R.; Galli, S. J.; Dvorak, A. M.; Perruzzi, C.A.; Harvey, V. S.; Dvorak, H.F. *Science* **1983**, *219*, 983-985

²³ Brown, L. F.; Berse, B.; Jackman, R. W.; Tognazzi, K.; Manseau, E. J.; Dvorak, H. F.; Senger, D. R. *Am. J. Pathol.* **1993**, *143*, 1255-1262

²⁴ Keck, P. J.; Hauser, S. D.; Krivi, G.; Sanzo, K.; Warren, T.; Feder, J.; Connolly, D. T. *Science* **1989**, *246*, 1309-1312

²⁵ Leung, D. W.; Cachianes, G.; Kuang, W. J.; Goeddel, D. V.; Ferrara, N. *Science* **1989**, *246*, 1306-1309

²⁶ Folkman, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 273-286

²⁷ Cébe-Suarez, S.; Zehnder-Fjällman, A.; Ballmer-Hofer, K. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 601-615

Chaque facteur de croissance active des voies de signalisation différentes, ce qui conduit, à des effets cellulaires diverses et variés^{28,29,30,31}.

1.1. Le Placental Growth Factor (PlGF)

Le Placental Growth Factor ou PlGF ne se lie qu'au récepteur VEGFR-1 et aux neuropilines (NRP)³². Son invalidation chez l'embryon n'entraîne pas d'anomalies dans le développement vasculaire. Néanmoins, le PlGF est impliqué dans l'angiogenèse tumorale³³. Il augmente l'angiogenèse induite par le VEGF en déplaçant la liaison du récepteur VEGFR-1 vers le VEGFR-2³⁴. De plus, dans certaines conditions, il peut agir comme un antagoniste naturel du VEGF³⁵. L'utilisation d'un anticorps spécifique du PlGF réduit efficacement la croissance tumorale³⁶.

1.2. Le VEGF-B

Comme pour le PlGF, le VEGF-B ne se lie pas au récepteur VEGFR-2. Son activité dépend de sa fixation au VEGFR-1. Son invalidation n'entraîne pas de défauts majeurs au cours du développement embryonnaire. Il possède une forte homologie avec le VEGF-A et le PlGF mais il n'est pas indispensable pour l'induction de l'angiogenèse normale et pathologique. En réalité, le VEGF-B serait plutôt impliqué dans la survie et le maintien des vaisseaux sanguins déjà formés³⁷. C'est également un facteur de survie pour des cellules non vasculaires, en particulier les neurones.

²⁸ Koch, S.; Claesson-Welsh, L. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, 1-21

²⁹ Shibuya, M. *Biomol. Ther.* **2014**, *22*, 1-9

³⁰ Koch, S.; Tugues, S.; Li, X.; Gualandi, L.; Claesson-Welsh, L. *Biochem. J.* **2011**, *437*, 169-183

³¹ Hicklin, D. J.; Ellis, L. M. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 1011-1027

³² Park, J. E.; Chen, H. H.; Winer, J.; Houck, K. A.; Ferrara, N. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25646-25654

³³ Luttun, A.; Tjwa, M.; Moons, L.; Wu, Y.; Angelillo-Scherrer, A.; Liao, F.; Nagy, J. A.; Hooper, A.; Priller, J.; De Klerck, B.; Compernelle, V.; Daci, E.; Bohlen, P.; Dewerchin, M.; Herbert, J. M.; Fava, R.; Matthys, P.; Carmeliet, G.; Collen, D.; Dvorak, H. F.; Hicklin, D. J.; Carmeliet, P. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 831-840

³⁴ Carmeliet, P. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 653-660

³⁵ Eriksson, A.; Cao, R.; Pawliuk, R.; Berg, S. M.; Tsang, M.; Zhou, D.; Fleet, C.; Tritsarlis, K.; Dissing, S.; Leboulch, P.; Cao, Y. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 99-108

³⁶ Fischer, C.; Jonckx, B.; Mazzone, M.; Zacchigna, S.; Loges, S.; Pattarini, L.; Chorianopoulos, E.; Liesenborghs, L.; Koch, M.; De Mol, M.; Autiero, M.; Wyns, S.; Plaisance, S.; Moons, L.; van Rooijen, N.; Giacca, M.; Stassen, J. M.; Dewerchin, M.; Collen, D.; Carmeliet, P. *Cell* **2007**, *131*, 463-475

³⁷ Zhang, F.; Tang, Z.; Hou, X.; Lennartsson, J.; Li, Y.; Koch, A. W.; Scotney, P.; Lee, C.; Arjunan, P.; Dong, L.; Kumar, A.; Rissanen, T. T.; Wang, B.; Nagai, N.; Fons, P.; Fariss, R.; Zhang, Y.; Wawrousek, E.; Tansey, G.; Raber, J.; Fong, G. H.; Ding, H.; Greenberg, D. A.; Becker, K. G.; Herbert, J. M.; Nash, A.; Yla-Herttuala, S.; Cao, Y.; Watts, R. J.; Li, X. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2009**, *106*, 6152-6157

1.3. Les VEGF-C et D

Les VEGF-C et D favorisent la croissance et la migration des cellules endothéliales lymphatiques. Leur activité dépend de la fixation au VEGFR-3 exprimé à la surface des cellules endothéliales lymphatiques³⁸. Le VEGFR-3 est nécessaire pour le développement des vaisseaux sanguins au cours de l'embryogenèse précoce. Ce récepteur est également impliqué dans la régulation de la lymphangiogenèse³⁹ mais il régule aussi l'angiogenèse. Le VEGF-C et le VEGF-D se fixent également au co-récepteur NRP-2 pour favoriser et moduler la lymphangiogenèse⁴⁰. De plus, après clivage protéolytique, des formes courtes du VEGF-C et du VEGF-D peuvent se lier au VEGFR-2 et activer l'angiogenèse.

1.4. Le VEGF (VEGF-A)

Le VEGF-A est une glycoprotéine se présentant sous forme d'homo-dimère. Les deux monomères sont reliés par deux ponts disulfures impliquant des cystéines. Chaque monomère est constitué de sept brins β et de deux hélices α . Le domaine central d'un monomère est en feuillet β composé de quatre brins antiparallèles. Le VEGF-A possède un motif particulier commun à de nombreux facteurs de croissance. Ce motif est une région des monomères appelée nœud à cystéines, elle est constituée de six cystéines formant des ponts disulfures. La structure cristalline du VEGF-A a été obtenue en 1997⁴¹ (Figure 6).

³⁸ Mäkinen, T.; Veikkola, T.; Mustjoki, S.; Karpanen, T.; Catimel, B.; Nice, E. C.; Wise, L.; Mercer, A.; Kowalski, H.; Kerjaschki, D.; Stacker, S. A.; Achen, M. G.; Alitalo, K. *EMBO J.* **2001**, *20*, 4762-4773

³⁹ Alitalo, K.; Tammela, T.; Petrova, T. V. *Nature* **2005**, *438*, 946-953

⁴⁰ Kärpänen, T.; Heckman, C. A.; Keskitalo, S.; Jeltsch, M.; Ollila, H.; Neufeld, G.; Tamagnone, L.; Alitalo, K. *FASEB J.* **2006**, *20*, 1462-1472

⁴¹ Muller, Y. A.; Christinger, H. W.; Keyt, B. A.; De Vos A. M. *Structure* **1997**, *5*, 1325-1338

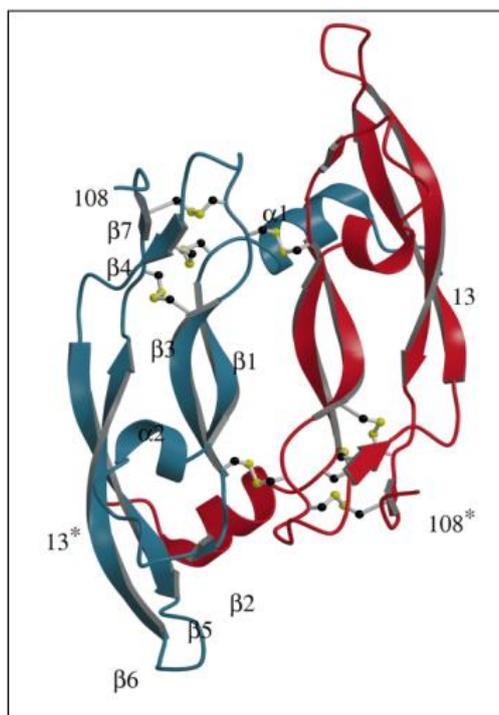


Figure 6: Structure cristalline du VEGF-A⁴¹

Le VEGF-A existe également sous différents isoformes⁴² : VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆. Ces isoformes résultent d'un épissage alternatif. L'ensemble de ces isoformes possèdent les 115 premiers acides aminés en position N-terminale et pour la plupart les 6 amino-acides en position C-terminale. Le VEGF₁₆₅ est la forme prédominante chez l'homme, celle-ci est donc couramment appelée VEGF et reste la forme la plus étudiée.

Le VEGF possède un rôle prépondérant dans la mise en place de la vascularisation normale chez l'embryon. Ce facteur de croissance est également impliqué dans le développement de nombreuses pathologies telles que l'arthrite, les maladies cardiovasculaires, la rétinopathie, le psoriasis ou encore le cancer⁴³. Le VEGF joue un rôle clé dans l'angiogenèse tumorale. En effet, il est surexprimé dans de nombreux cancers⁴⁴. Dans un premier temps, identifié pour ses propriétés de perméabilité des vaisseaux, le VEGF induit également de nombreux autres effets, notamment, la migration, l'invasion, la prolifération ainsi que la survie des cellules endothéliales⁴⁵. Tous les isoformes du VEGF-A peuvent se lier à la fois au VEGFR-1 et au VEGFR-2.

Dans la suite de ce paragraphe, nous discuterons essentiellement du facteur de croissance VEGF-A et de ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2.

⁴² Takahashi, H.; Shibuya, M. *Clin. Sci.* **2005**, *109*, 227-241

⁴³ Ferrara, N. *Endocr. Rev.* **2004**, *25*, 581-611

⁴⁴ Ferrara, N. *Oncologist* **2004**, *9*, 2-10

⁴⁵ Ferrara, N.; Davis-Smyth, T. *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 4-25

En effet, il a été mis en évidence que les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 jouent un rôle primordial dans l'angiogenèse tandis que le VEGFR-3 active des voies de signalisation conduisant à la lymphangiogenèse.

1. Les récepteurs VEGFRs

Les récepteurs VEGFRs sont des récepteurs transmembranaires présents à la surface des cellules endothéliales. Ils sont constitués de deux monomères. Leur activité est initiée lorsqu'ils se trouvent sous forme de dimères. Les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 présentent une grande similitude d'environ 40 % vis-à-vis de leur séquence d'acides aminés. Chaque monomère possède trois zones distinctes. La région extracellulaire qui est constituée de sept domaines de type immunoglobuline (Ig). Cette zone permet la fixation du ligand mais également la dimérisation du récepteur afin d'induire l'activité. La zone centrale du récepteur correspond au domaine transmembranaire (TMD). Les domaines à activité tyrosine kinase se situent dans la région intracellulaire (JMD).

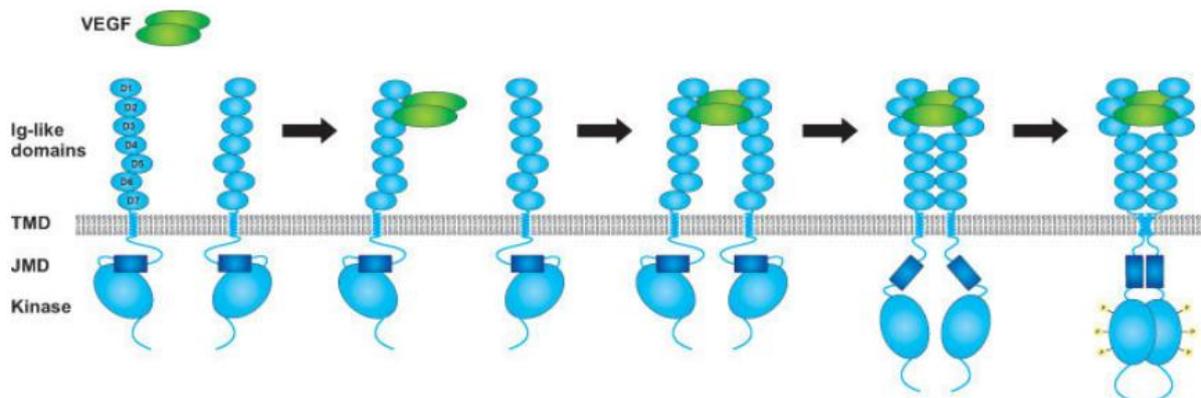


Figure 7: Représentation schématique du mécanisme d'activation des récepteurs VEGFRs
TMD : Transmembrane domain et JMD : Juxtamembrane domain⁴⁶

Le mécanisme d'activation des récepteurs du VEGF est un enchainement de plusieurs étapes (Figure 7). Le principe de fonctionnement de ce mécanisme est identique aux autres récepteurs à activité tyrosine kinase. Les quatre grandes étapes de fonctionnement de ces récepteurs sont les suivantes : la fixation du ligand, la dimérisation des deux monomères, l'activation des domaines intracellulaires par changement conformationnel et enfin la phosphorylation des résidus tyrosines pour activer les différentes voies de signalisation. Néanmoins, diverses interactions supplémentaires entre les monomères des récepteurs sont nécessaires pour stabiliser le complexe formé avec le ligand et induire

l'activation du récepteur. Différentes études⁴⁶ génétiques, biochimiques et structurales ont permis d'avoir une connaissance plus approfondie des interactions nécessaires entre les récepteurs du VEGF et le VEGF lui-même. Ainsi, pour le VEGFR-1, c'est principalement le domaine d2 du récepteur qui fixe le VEGF. Mais, les domaines d1 et d3 peuvent participer à la liaison du ligand et augmenter l'affinité. En revanche pour le VEGFR-2, les domaines d2 et d3 participent directement à la liaison du VEGF.

1.1. Le récepteur VEGFR-1

Le VEGFR-1 existe à la fois sous forme transmembranaire, mais aussi sous une autre forme soluble constituée uniquement de la partie extracellulaire. Ce récepteur soluble du VEGFR-1 (sVEGFR-1) semble réguler le VEGF. L'affinité du VEGF pour le récepteur VEGFR-1 est dix fois supérieure à celle pour le VEGFR-2. Mais la transduction du signal après liaison du VEGF est très faible⁴⁷. Les fonctions et implications de ce récepteur au niveau biologique ne sont pas bien définies. Des études ont pu mettre en évidence que, *in-vitro*, le VEGFR-1 n'était pas indispensable pour la prolifération ou la migration des cellules endothéliales^{48,49}. En revanche, d'autres études ont montré en utilisant des anticorps anti-VEGFR-1, l'implication de ce récepteur dans les processus de migration et de réorganisation du réseau des cellules endothéliales⁵⁰. Le rôle du VEGFR-1 est complexe et n'est aujourd'hui pas encore entièrement élucidé. Une partie importante de l'activité de ce récepteur semble due à sa capacité à moduler celle du VEGFR-2 et donc les réponses biologiques du VEGFR-2^{51,52}. En dehors de ce rôle de régulateur du VEGFR-2, il a été mis en évidence que le VEGFR-1 possédait un rôle de régulateur prépondérant de l'angiogenèse en situation pathologique et notamment lors de cancers⁵³. En effet, le VEGFR-1 est exprimé dans des cellules tumorales et impliqué dans la croissance et la progression des tumeurs⁵⁴. De nombreux travaux témoignent du rôle de ce récepteur dans l'angiogenèse tumorale (Figure 8).

⁴⁶ Stüttfeld, E.; Ballmer-Hofer, K. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 915-922

⁴⁷ Shibuya, M.; Claesson-Welsh, L. *Exp. Cell Res.* **2006**, *312*, 549-560

⁴⁸ Waltenberger, J.; Claesson-Welsh, L.; Siegbahn, A.; Shibuya, M.; Heldin, C. H. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 26988-26995

⁴⁹ Gille, H.; Kowalski, J.; Li, B.; LeCouter, J.; Moffat, B.; Zioncheck, T. F.; Pelletier, N.; Ferrara, N. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3222-3230

⁵⁰ Kanno, S.; Oda, N.; Abe, M.; Terai, Y.; Ito, M.; Shitara, K.; Tabayashi, K.; Shibuya, M.; Sato, Y. *Oncogene* **2000**, *19*, 2138-2146

⁵¹ Rahimi, N.; Dayanir, V.; Lashkari, K. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16986-16992

⁵² Kou, R.; SenBanerjee, S.; Jain, M. K.; Michel, T. *Biochemistry* **2005**, *44*, 15064-15073

⁵³ Hiratsuka, S.; Maru, Y.; Okada, A.; Seiki, M.; Noda, T.; Shibuya, M. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1207-1213

⁵⁴ Fan, F.; Wey, J. S.; McCarty, M. F.; Belcheva, A.; Liu, W.; Bauer, T. W.; Somcio, R. J.; Wu, Y.; Hooper, A.; Hicklin, D. J.; Ellis, L. M. *Oncogene* **2005**, *24*, 2647-2653

1.2. Le récepteur VEGFR-2

Le VEGFR-2 est fortement exprimé à la surface des cellules endothéliales et des progéniteurs endothéliaux circulants. La liaison du VEGF entraîne la dimérisation du récepteur VEGFR-2. Cela permet l'activation de différentes voies de signalisation impliquées dans la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales et favorise la perméabilité vasculaire⁴⁵. Comme pour le VEGFR-1, il existe une forme soluble (sVEGFR-2) qui pourrait avoir un rôle de régulation sur l'angiogenèse⁵⁵. Le VEGFR-2 est fortement exprimé au cours du développement embryonnaire puis son expression diminue chez l'adulte. Il est de nouveau surexprimé lors de l'angiogenèse tumorale. Le VEGFR-2 semble donc être le médiateur principal de l'activité angiogénique (Figure 8).

1.3. Le récepteur VEGFR-3

Le système VEGFR-3/VEGF-C/VEGF-D est un des acteurs majeurs dans le développement du système lymphatique⁵⁶. L'inactivation du récepteur ou des ligands entraîne la mort au cours du développement embryonnaire³⁶. La lymphangiogenèse est également impliquée dans la progression tumorale. Le système lymphatique est la route privilégiée pour la dissémination métastatique⁵⁷. Plusieurs études montrent une corrélation entre la lymphangiogenèse tumorale et l'envahissement des ganglions lymphatiques par les cellules tumorales⁵⁸. Cette invasion est souvent la première étape nécessaire à la dissémination métastatique. La voie de signalisation VEGFR-3 contribue également à l'angiogenèse tumorale. L'implication de ce récepteur à la fois dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse en fait une cible thérapeutique intéressante. Bloquer le récepteur VEGFR-3 permettrait d'agir à la fois sur l'angiogenèse et la lymphangiogenèse pour limiter la progression tumorale. De plus, certaines formes de VEGF-C se lient au VEGFR-2 et donc exercent une action pro-angiogénique⁵⁹. Ces résultats suggèrent un lien étroit entre l'angiogenèse et la lymphangiogenèse.

⁵⁵ Ebos, J. M.; Bocci, G.; Man, S.; Thorpe, P. E.; Hicklin, D. J.; Zhou, D.; Jia, X.; Kerbel, R. S. *Mol. Cancer Res.* **2004**, *2*, 315-326

⁵⁶ Karkkainen, M. J.; Haiko, P.; Sainio, K.; Partanen, J.; Taipale, J.; Petrova, T. V.; Jeltsch, M.; Jackson, D. G.; Talikka, M.; Rauvala, H.; Betsholtz, C.; Alitalo, K. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 74-80

⁵⁷ Fukumura, D.; Duda, D. G.; Munn, L. L.; Jain, R. K. *Microcirculation* **2010**, *17*, 206-225

⁵⁸ Achen, M. G.; Mann, G. B.; Stacker, S.A. *Br. J. Cancer* **2006**, *94*, 1355-1360

⁵⁹ Hirakawa, S.; Kodama, S.; Kunstfeld, R.; Kajiyama, K.; Brown, L. F.; Detmar, M. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 1089-1099

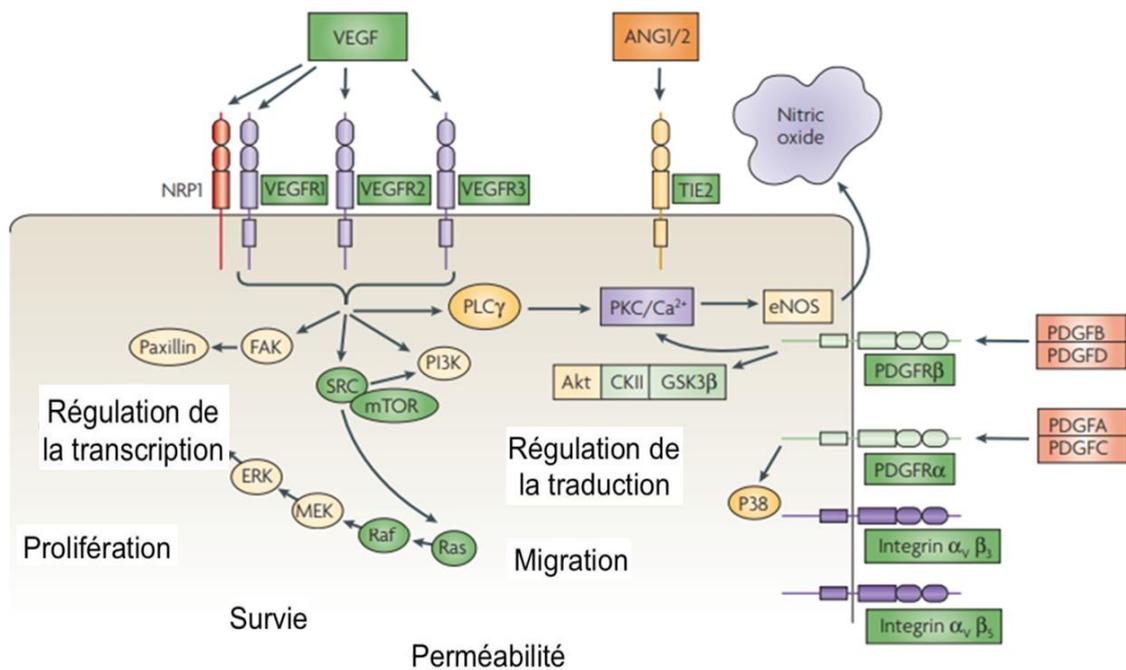


Figure 8: Les récepteurs et les voies de signalisations impliqués dans l'angiogenèse¹⁵

Les récepteurs VEGFRs ont à l'heure actuelle fait l'objet de nombreuses études. Cependant, même si le VEGFR-2 semble posséder un rôle prépondérant dans la signalisation du VEGF, ce récepteur n'est pas spécifique uniquement de l'angiogenèse tumorale. En effet, on le retrouve entre autres dans la régulation de la lymphangiogenèse, ainsi que dans des fonctions physiologiques (pression sanguine, hypertension pulmonaire ...). Il en est de même pour le VEGFR-3. Un lien étroit existe entre l'angiogenèse et la lymphangiogenèse tumorale. Ces deux mécanismes sont indispensables à la croissance tumorale et à la dissémination métastatique. De nombreux facteurs régulateurs sont communs aux deux mécanismes. En revanche, contrairement au VEGFR-2 et VEGFR-3, le VEGFR-1 semble, quant à lui, impliqué uniquement dans des phénomènes pathologiques tels que l'angiogenèse tumorale.

V. Les mécanismes d'action des anti-angiogéniques

Initialement, les médicaments anti-angiogéniques ont été développés dans le but d'inhiber le processus d'angiogenèse tumorale en ciblant les cellules endothéliales. Cependant, il est apparu que la thérapie ciblée du VEGF est de nature complexe et implique de multiples mécanismes d'action. Il a été démontré que la densité vasculaire, après traitement anti-angiogénique, semble souvent inchangée. Cependant, les fonctions vasculaires s'en trouvent modifiées⁶⁰. Les travaux de Jain ont

⁶⁰ Hlatky, L.; Hahnfeldt, P.; Folkman, J. J. *Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 883-893

conduit à l'hypothèse que les traitements anti-angiogéniques permettraient de normaliser la vascularisation tumorale et de faciliter ainsi l'accès des agents chimiothérapeutiques aux tumeurs⁶¹. Cette hypothèse permet d'expliquer pourquoi le bevacizumab, un anticorps anti-VEGF, est inefficace en monothérapie pour des cancers colorectaux. Néanmoins, l'association du bevacizumab avec un traitement de chimiothérapie montre une efficacité accrue. Les thérapies anti-angiogéniques permettraient de re-sensibiliser la tumeur aux traitements cytotoxiques et d'en potentialiser ainsi les effets⁶². De plus, les cellules tumorales exprimant les récepteurs du VEGF⁶³, les traitements anti-angiogéniques, en plus de leurs effets sur la vascularisation tumorale, peuvent avoir des effets directs sur la cellule (souche) tumorale.

1. Les principaux médicaments anti-angiogéniques

1.1. La nature des médicaments anti-angiogéniques

Il est difficile d'établir une liste exhaustive des molécules présentant une activité thérapeutique basée sur un effet anti-angiogénique. La nature et le mécanisme d'action de ces molécules sont divers et complexes. Néanmoins, on peut distinguer deux grandes catégories de molécules, les molécules de nature protéique et les molécules issues de la synthèse organique (Figure 9).

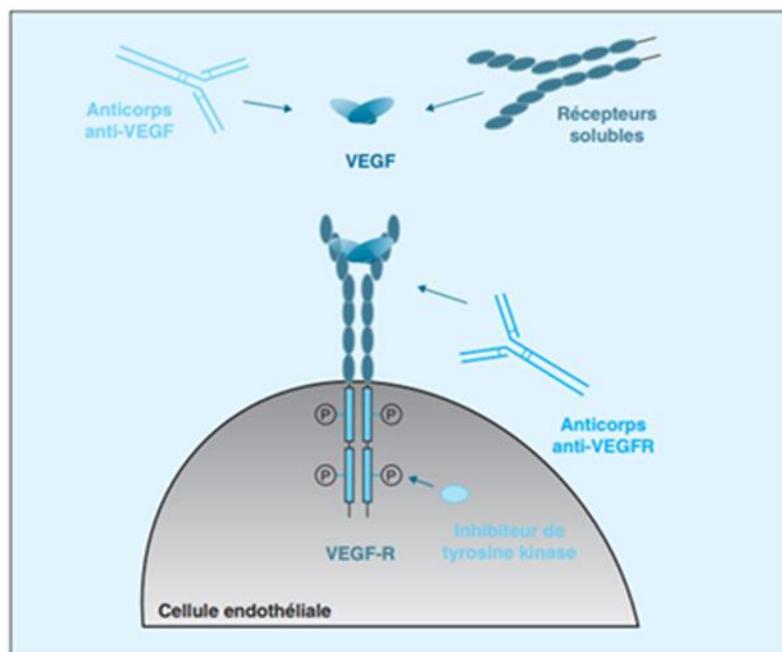


Figure 9 : Principaux mécanismes d'actions des molécules anti-angiogéniques ciblant le VEGF¹⁶

⁶¹ Jain, R. K. *Science* **2005**, *307*, 58-62

⁶² Timke, C.; Zieher, H.; Roth, A.; Hauser, K.; Lipson, K. E.; Weber, K. J.; Debus, J.; Abdollahi, A.; Huber, P. E. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 2210-2219

⁶³ Dallas, N. A.; Fan, F.; Gray, M. J.; Van Buren, G.; Lim, S. J.; Xia, L.; Ellis, L. M. *Cancer Metastasis Rev.* **2007** *26*, 433-441

1.1.1. Les molécules de nature protéique

Le plus souvent ce type de molécule se trouve être des anticorps ou des petits peptides. Les anticorps, sont pour la plupart recombinants et humanisés, pour limiter les problèmes d'immunogénicité. Ils présentent l'avantage d'être spécifiques de leur cible car leur développement repose sur le principe antigène-anticorps.

Les molécules de nature protéique agissent au niveau extracellulaire de la cellule-cible, en inhibant l'interaction entre le ligand et son récepteur, en se liant à l'un ou à l'autre, afin d'empêcher l'activation de ce dernier. Le mécanisme impliqué est un mécanisme du type encombrement stérique.

1.1.2. Les molécules issues de la synthèse organique

Contrairement aux molécules de nature protéique, les molécules issues de la synthèse organique, sont plus petites et liposolubles. Elles ont la capacité de traverser la membrane plasmique et agissent principalement au niveau intracellulaire de la cellule-cible. Leur principe d'action est basé sur l'inhibition de l'activité tyrosine kinase ou sérine/thréonine kinase des récepteurs membranaires. Ces petites molécules organiques sont capables de se substituer à l'ATP (Adénosine Triphosphate), empêchant ainsi l'activité de phosphorylation. Cependant, aucune d'entre elles ne présente une spécificité absolue pour un récepteur donné.

2. Médicaments utilisés en clinique

Même si beaucoup d'études précliniques ont montré des résultats encourageants avec de nombreuses molécules antiangiogéniques, très peu ont été confirmées par des essais cliniques de phase III. Cette observation peut s'expliquer en partie par le défaut de pertinence de certains modèles animaux. De plus, les études menées en clinique concernent des stades tardifs de la maladie cancéreuse, en rechute et/ou métastatiques.

Parmi les molécules ciblant la voie du VEGF⁶⁴, on dénombre trois anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre le VEGF tel que bevacizumab (Avastin®) et ranibizumab (Lucentis®), une protéine de fusion recombinante ciblant également le VEGF (aflibercept, Zaltrap®) et quarante six différents inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase des récepteurs au VEGF comme axitinib (Inlyta®), cabozantinib

⁶⁴ Site internet des essais cliniques menés dans le monde (<http://clinicaltrials.gov>) consulté le 12/10/2018

(Cometriq[®]), pazopanib (Votrient[®]), regorafenib (Stivarga[®]), sorafenib (Nexavar[®]), sunitinib (Sutent[®]), vandetanib (Caprelsa[®]) et everolimus (Afinitor[®]).

2.1. Les anticorps monoclonaux

Le bevacizumab (Avastin[®], Roche/Genentech) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF qui a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) en 2004 pour le traitement du cancer colorectal métastatique. Il bloque la liaison du facteur de croissance sur ses récepteurs et ainsi inhibe les effets biologiques du VEGF. Il est indiqué en association avec des agents dits cytotoxiques dans un grand nombre de cancers. C'est le premier agent anti-angiogénique reconnu pour augmenter la survie des patients.

2.2. Les protéines de fusion recombinante

L'aflibercept (Zaltrap[®], Sanofi/Regeneron) est une protéine de fusion recombinante ciblant également le VEGF. En 2012, la FDA a approuvé son utilisation, notamment dans le cas de cancer colorectal métastatique en association avec d'autres traitements.

2.3. Les inhibiteurs de tyrosines kinases (ITK)

Quarante-six inhibiteurs de l'activité kinase approuvés par la FDA sont actuellement utilisés en clinique et prescrits dans différents types de cancers. Ces agents anti-angiogéniques sont peu spécifiques et ciblent de nombreux récepteurs à activité kinase, comme les tyrosines kinases. Ils ont l'avantage pour le patient, comme tous les inhibiteurs d'activité tyrosine kinase, d'être administrés par voie orale.

Le Tableau 1 regroupe les principales molécules approuvées par la FDA et leurs mécanismes d'action.

Action extracellulaire Ciblant le VEGF		
Agents	Cibles	Indications
Bevacizumab (Avastin®) Genentech	VEGF-A	Anticorps monoclonaux Cancer métastatique du côlon, cancer du poumon non à petites cellules, cancer métastatique du rein, cancer ovarien avancé mais nouvellement détecté
Ramucirumab (Cyramza®) Eli Lilly	VEGF-R2	Anticorps monoclonaux Cancer du poumon non à petites cellules métastatique, cancer colorectal métastatique
Aflibercept (Zaltrap®) Sanofi-Regeneron	VEGF	Protéine de fusion recombinante Cancer colorectal métastatique
Action intracellulaire Inhibiteurs de kinases		
Agents	Cibles	Indications
Axitinib (Inlyta®) Pfizer	VEGF-R	Carcinome avancé des cellules rénales (après échec d'un traitement systémique)
Cabozantinib (Cometriq®) Exelixis	VEGF-R2, c-Met	Cancer métastatique médullaire de la thyroïde
Pazopanib (Votrient®) GlaxoSmithKline	VEGF-R, PDGF-R, c-kit	Carcinome avancé des cellules rénales
Regorafenib (Stivarga®) Bayer	VEGF-R, TIE-2, PDGF-R, FGF-R, KIT	Cancer métastatique du côlon (stade avancé ou lors de récurrence après plusieurs traitements)
Sorafenib (Nexavar®) Bayer, Onyx	VEGF-R, (PDGF-R, Raf-1)	Carcinome avancé des cellules rénales et hépatocytaires Carcinome des cellules de la thyroïde (lors d'échecs à l'iode radioactif)
Sunitinib (Sutent®) Pfizer	VEGF-R, (PDGF-R, RET)	Carcinome avancé des cellules rénales, tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) (après progression de la maladie ou d'intolérance à l'imatinib mésylate), tumeurs cancéreuses du pancréas (lors d'échecs par chirurgie ou métastases)
Vandetanib (Caprelsa®) AstraZeneca	VEGF-R, (EGF-R)	Cancer médullaire de la thyroïde (stade métastatique avancé)
Everolimus (Afinitor®) Novartis	m-Tor	Traitement du carcinome rénal avancé Traitement des tumeurs pancréatiques localement avancées, métastatiques ou non résécables Traitement des astrocytomes sous-épendymaire à cellules géantes associés à une sclérose tubéreuse
Temsirolimus (Torisel®) Wyeth	m-Tor	Carcinome cellulaire rénal avancé Lymphome à cellules du manteau récidivant ou réfractaire Lymphome non-Hodgkinien

Tableau 1: Principales molécules anti-angiogéniques approuvées par la FDA

La recherche de nouveaux agents anti-angiogéniques est en constante évolution. Suite aux résultats obtenus avec le bevacizumab, de nombreux anticorps sont développés^{65,66}, ainsi que de nombreuses molécules dans le but d'obtenir de nouveaux traitements anti-angiogéniques.

VI. Conclusion

Malgré les phénomènes de résistance, les divers effets secondaires et le manque de bio-marqueurs prédictifs et de diagnostics, cibler l'angiogenèse reste tout de même une approche privilégiée et prometteuse. Les recherches actuelles s'orientent vers le développement de nouveaux composés plus spécifiques.

VII. Thématique de recherche de l'équipe Hétérocyle et Peptides : Approche Ciblée, Cancer et Angiogenèse

A l'heure actuelle, seules des macromolécules inhibant l'interaction VEGF/VEGFR sont utilisées en clinique (anticorps, protéines recombinantes). Mais, depuis quelques années, la recherche se tourne vers le développement de molécules plus petites, plus simples à préparer et surtout moins coûteuses. Un autre avantage de l'utilisation de ces petites molécules est le fait de pouvoir les administrer au patient par voie orale.

C'est dans ce contexte que l'équipe Hétérocyles et Peptides : Approche Ciblée, Cancer et Angiogenèse travaille sur le développement et l'optimisation de peptides macrocycliques ou linéaires en tant que nouveaux composés anti-angiogéniques^{67,68,69,70} capable d'interagir avec le VEGF ou son récepteur VEGFR-1. Le laboratoire travaille également sur la compréhension du mécanisme de régulation de l'angiogenèse.

Comme déjà discuté précédemment, nous avons vu que le VEGF (rouge et bleu, Figure 10) se liait à son récepteur VEGFR-1 au niveau du domaine extracellulaire d2 (vert, PDBID 1FLT, Figure 10).

⁶⁵ Fan, F.; Schimming, A.; Jaeger, D.; Podar, K. *J. Oncol.* **2012**, *2012*, 1-16

⁶⁶ Yang, X.; Zhang, X. F.; Lu, X.; Jia, H. L.; Liang, L.; Dong, Q. Z.; Ye, Q. H.; Qin, L. X. *Hepatology* **2014**, *59*, 1874-1885

⁶⁷ Gautier, B.; Goncalves, V.; Diana, D.; Di Stasi, R.; Teillet, F.; Lenoir, C.; Huguenot, F.; Garbay, C.; Fattorusso, R.; D'Andrea, L.D.; Vidal, M.; Inguibert, N. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4428-4440

⁶⁸ Wang, L.; Gagey-Eilstein, N.; Broussy, S.; Reille-Seroussi, M.; Huguenot, F.; Vidal, M.; Liu, W. -Q. *Molecules* **2014**, *19*, 15391-15407

⁶⁹ Reille-Seroussi, M.; Gaucher, J. F.; Desole, C.; Gagey-Eilstein, N.; Brachet, F.; Broutin, I.; Vidal, M.; Broussy, S. *Biochemistry* **2015**, *54*, 5147-5156

⁷⁰ Wang, L.; Zhou, L.; Reille-Seroussi, M.; Gagey-Eilstein, N.; Broussy, S.; Zhang, T.; Ji, L.; Vidal, M.; Liu, W. -Q. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 6598-6606

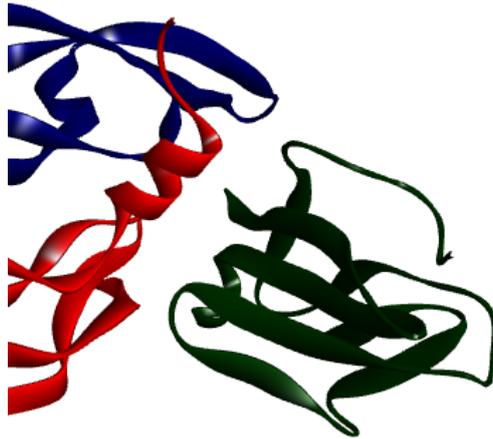


Figure 10: VEGF en interaction avec son récepteur VEGFR-1⁶⁷

Dans les années 2000, plusieurs séries de peptides capables de se lier au VEGF ont été développés. Un peptide, le v107 développé par la société Genentech, a été synthétisé. La séquence du peptide est la suivante : GGNECDIARMWEWECFERL (un pont disulfure est formé entre deux cystéines). Il présente une bonne affinité vis-à-vis du VEGF. Après plusieurs optimisations, un peptide cyclique de 19 acides aminés, le v114 (VEPNCDIHVMWEWECFERL-NH₂) a été obtenu⁷¹. Celui-ci possède une affinité sub-micromolaire pour le VEGF et des propriétés biologiques intéressantes. Le peptide v114, ainsi que son peptide parent le v107 ont fait l'objet de plusieurs études structurales et biologiques. Il a été démontré par des études RMN que le peptide v107 (vert) interagissait avec le VEGF au même niveau que le domaine d2 de son récepteur VEGFR-1. La structure du peptide v107 en complexe avec le VEGF a notamment été résolue par RMN⁷² (Figure 11).

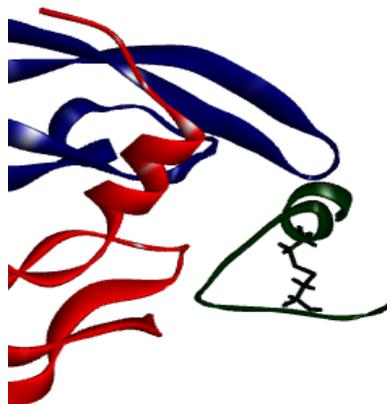


Figure 11: Peptide v107 en interaction avec le VEGF⁷²

⁷¹ Fairbrother, W. J.; Christinger, H. W.; Cochran, A. G.; Fuh, G.; Keenan, C. J.; Quan, C.; Shriver, S. K.; Tom, J. Y. K.; Wells, J. A.; Cunningham, B. C. *Biochemistry* **1998**, *37*, 17754-17764

⁷² Pan, B.; Li, B.; Russell, S. J.; Tom, J. Y. K.; Cochran, A. G.; Fairbrother, W. J. *J. Mol. Biol.* **2002**, *316*, 769-787

Ce peptide en se liant au VEGF inhibe la phosphorylation du récepteur induite par la fixation du VEGF et par conséquent la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

Lorsqu'il est en interaction avec le VEGF, le peptide cyclique v107 présente deux structures secondaires bien définies. Ces structures secondaires sont une hélice α impliquant les acides aminés WECFERL (dans la partie C-terminale) et un coude β (dans la partie N-terminale) impliquant les acides aminés DIAR. Ce sont les deux structures secondaires qui apportent une conformation bien spécifique au peptide, et qui interagissent avec le VEGF. Lorsqu'il est seul en solution, les structures secondaires du v107 sont moins bien définies et il présente une plus grande flexibilité.

Les précédentes recherches menées par l'équipe se sont concentrées sur l'optimisation de l'affinité du v114 pour sa cible au niveau de l'hélice α . L'idée étant de maintenir cette structure lorsque le peptide était mis en solution. Ceci doit théoriquement améliorer l'affinité pour la cible protéique, pour des raisons énergétiques (l'entropie de liaison devient plus favorable). Il a donc été envisagé de remplacer différents acides aminés impliqués dans la formation de l'hélice α afin de créer un linker entre des chaînes latérales au sein même de l'hélice pour maintenir cette structure ordonnée. C'est ainsi qu'en plus du pont disulfure présent dans le peptide un pont lactame a été introduit au niveau de l'hélice α . Plusieurs peptides comportant ces modifications ont été synthétisés et évalués. Certains présentent une affinité accrue par rapport au peptide de référence non contraint⁷³.

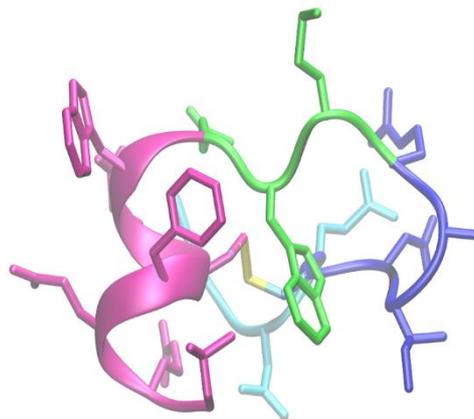


Figure 12: Peptide v114 modifié⁷²

Par exemple, l'un de ces peptides constitué des acides aminés suivants CDIHVⁿLWEWECFEKL (ⁿL=norleucine) possède une constante de dissociation (K_d) avec le VEGF de l'ordre de 40 nM par ITC («Isothermal Titration Calorimetry»), contre 200 nM pour l'équivalent non contraint (Figure 12).

⁷³ Reille-Seroussi, M. Thèse de doctorat, Université de Pharmacie, Paris Descartes 2014

Afin d'augmenter l'affinité et rendre ce peptide le plus affiné possible vis-à-vis de sa cible, une dernière optimisation a été envisagée. Cette optimisation concerne le coude β (bleu). Il a été démontré que les deux acides aminés formant le coude n'interagissent pas avec le VEGF (structure RMN et cristallographique du VEGF en interaction avec le VEGFR-1).

Chapitre II : Interactions protéine- protéine, peptidomimétiques et applications

I. Introduction

Les systèmes biologiques sont hautement compliqués et sophistiqués. Ils sont régulés par les interactions protéine-protéine qui interagissent ensemble en formant des complexes. La plupart des processus biologiques importants comme les cascades de signalisation cellulaire, l'infection des virus, la communication intercellulaire, les réactions enzymatiques, la réponse immunitaire ou encore la mort programmée des cellules sont régis par ce type d'interaction. Un dysfonctionnement au niveau des interactions protéine-protéine peut conduire à des maladies. Cibler ces interactions protéine-protéine semble une stratégie prometteuse vers le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Cependant, il y a encore quelques années, le système protéine-protéine était considéré comme une cible à haut risque. En effet, perturber les interactions protéine-protéine est relativement difficile du fait que les zones d'interactions sont importantes. La zone d'interface protéine-protéine ou protéine-récepteur peut être de l'ordre de 800 à 2000 \AA^2 et est appelée épitope^{74,75}. Cet épitope est généralement une zone plate et étendue. L'interaction protéine-protéine repose principalement sur des interactions de type hydrophobe qui peuvent être additionnées de liaisons faibles de type Van der Waals, ainsi que de liaisons hydrogènes et de liaisons électrostatiques. Il a été démontré qu'au final, tous les résidus qui sont présents au niveau de l'épitope ne participent pas aux interactions et à la formation du complexe protéine-protéine. En effet, seuls de petits segments de l'épitope contribuent à cette interaction. Ces résidus sont appelés « hot spots » et sont répartis sur l'ensemble de la surface de l'épitope. Il est donc crucial d'identifier les « hot spots » sur une protéine. Cette notion est très importante dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. De plus, il a également été démontré que la plupart de ces « hot spots » contenait un motif secondaire de type hélice α , feuillet β ou coude β . Afin de réguler ou perturber ces interactions protéine-protéine, il a été envisagé de mimer ces structures secondaires. Plusieurs stratégies ont été envisagées (Figure 13).

⁷⁴ Wang, Z. A.; Ding, X. Z.; Tian, C.-L.; Zheng, J.-S. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 61599-61609

⁷⁵ Pelay-Gimeno, M.; Glas, A.; Koch, O.; Grossmann, T. N. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 8896-8927

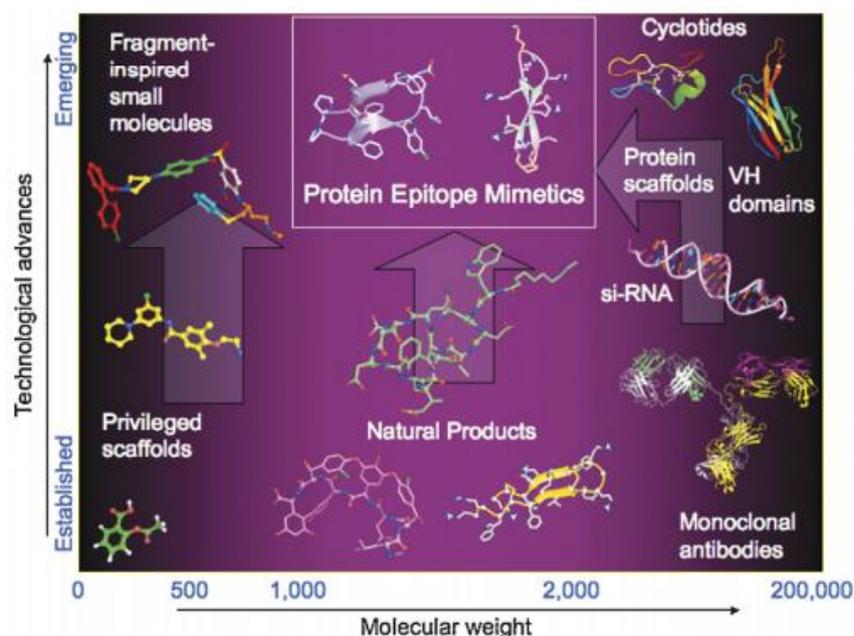


Figure 13 : Schéma représentant les différentes stratégies⁷⁶

La première stratégie utilise des petites molécules ayant une masse molaire inférieure à 500 Da présentant une restriction conformationnelle qui permet de mimer les structures secondaires. Ces petites molécules sont facilement synthétisables et peuvent être prises par voie orale. Elles ont une grande perméabilité au niveau des membranes et une grande stabilité métabolique. Cependant, ces petites molécules ont des inconvénients majeurs, comme le manque de sélectivité pour la cible biologique visée entraînant des effets secondaires possibles. Un manque d'affinité peut également apparaître si l'épitope est constitué de plusieurs «hot spots» qui ne sont pas contigus. Dans ce cas, une petite molécule ne pourra pas mimer efficacement l'ensemble de ces «hot spots».

Une seconde stratégie est actuellement étudiée, elle s'intéresse à des molécules biologiques (protéines recombinantes ou anticorps monoclonaux) ayant une masse molaire supérieure à 5000 Da. Ces molécules ont l'avantage de révéler une grande sélectivité vis-à-vis de la cible biologique car elles sont capables de mimer l'ensemble des «hot spots» présents au niveau de l'épitope d'une protéine. Ce sont des composés naturels à fort potentiel présentant toutefois des inconvénients. En effet, leur stabilité est faible, ils sont doués d'une importante immunogénicité et leur voie d'administration doit se faire par injection (sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse). Enfin, le coût de leur synthèse est très élevé.

⁷⁶ Robinson, J. A.; DeMarco, S.; Gombert, F.; Moehle, K.; Obrecht, D. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 944-951

L'analyse des deux stratégies précédentes montre que des molécules ayant des masses molaires entre 500 Da et 5000 Da n'ont pas été considérées. Ce manque peut être comblé par l'utilisation de peptides⁷⁷. Les peptides sont facilement synthétisables notamment par synthèse peptidique sur support solide. Ils combinent un grand nombre d'avantages des deux stratégies évoquées précédemment comme le faible coût de production, de bonnes activités et sélectivités, et la capacité de mimer l'ensemble des «hot spots». De plus, ils sont issus de composés naturels, les acides aminés. Néanmoins, les peptides présentent quelques inconvénients comme la stabilité vis-à-vis des protéases et une faible perméabilité des membranes. Pour pallier à ces problèmes, les peptidomimétiques ont vu le jour⁷⁸. Cette nouvelle classe de composés représente des peptides modifiés à différents endroits : au niveau des chaînes latérales, au niveau du squelette, et de façon générale au niveau de leur restriction conformationnelle. Ces peptidomimétiques miment les peptides naturels ou les protéines en induisant les mêmes effets biologiques que les composés naturels. De plus, ils ont souvent des meilleures affinités ou sélectivités, une meilleure stabilité vis-à-vis des protéases, et/ou une meilleure pénétration cellulaire.

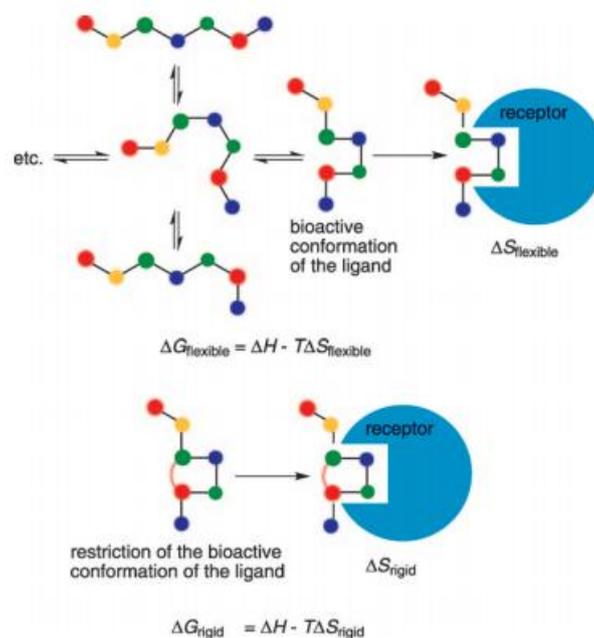


Figure 14: Comparaison ligand flexible et ligand rigide⁷⁹

Contrairement aux peptides qui sont très flexibles et peuvent exister sous de nombreuses conformations, les peptidomimétiques sont plus rigides. L'incorporation d'une contrainte conformationnelle bloque le peptidomimétique dans la conformation bioactive pour ainsi mimer au

⁷⁷ Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 136-147

⁷⁸ Groß, A.; Hashimoto, C.; Sticht, H.; Eichler, J. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2016**, *3*, 211-226

⁷⁹ Liskamp, R. M.; Rijkers, D. T.; Kruitzer, J. A.; Kemmink, J. *ChemBioChem.* **2011**, *12*, 1626-1653

maximum les structures secondaires présentes au niveau de l'épitope et permettre une très haute interaction avec la protéine cible. Ces restrictions conformationnelles dans le ligand permettent de réduire la contribution du facteur entropique. Ainsi, le ligand flexible perdra plus en entropie que le ligand rigide, donc $-T\Delta S_{\text{flexible}}$ sera plus positif que $-T\Delta S_{\text{rigide}}$ et par conséquent $\Delta G_{\text{flexible}}$ sera moins négatif que ΔG_{rigide} . Le ligand rigide devrait donc être plus affiné pour la cible (Figure 14). Il faut toutefois noter que cette analyse théorique ne tient pas compte des éventuels effets que les contraintes conformationnelles peuvent avoir sur l'enthalpie de liaison.

De plus, les différentes modifications présentes sur les peptidomimétiques augmentent généralement la stabilité métabolique de ces derniers.

Les fortes interactions entre le peptide et sa protéine correspondante reposent principalement sur les interactions entre chaînes latérales et non sur le squelette principal qui n'est pas nécessaire pour avoir une affinité importante. Ainsi, le squelette constitué d'un enchaînement de fonctions amides peut être remplacé partiellement ou complètement par d'autres structures. Le plus important est que le squelette soit capable de positionner les chaînes latérales des différents acides aminés dans la bonne direction spatiale pour permettre les interactions avec la protéine ciblée. Pour qu'un peptidomimétique soit actif, il doit avoir dans un premier temps une bonne corrélation avec le site d'encrage de la protéine et dans un second temps, les divers groupements fonctionnels, ainsi que les régions polaires et hydrophobes doivent être situés aux endroits adéquats pour conduire à une interaction optimale avec la cible.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous focaliser uniquement sur la structuration des peptides en coude β . Ce type de structure secondaire représente environ 20 % de l'ensemble des structures secondaires retrouvées dans les protéines naturelles.

La restriction conformationnelle d'un coude β peut être réalisée de deux manières distinctes^{80,74}, soit par l'incorporation d'acides aminés modifiés qui possèdent un nombre de degrés de liberté limité, soit par cyclisation (Figure 15).

⁸⁰ Grauer, A.; König, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *30*, 5099-5111

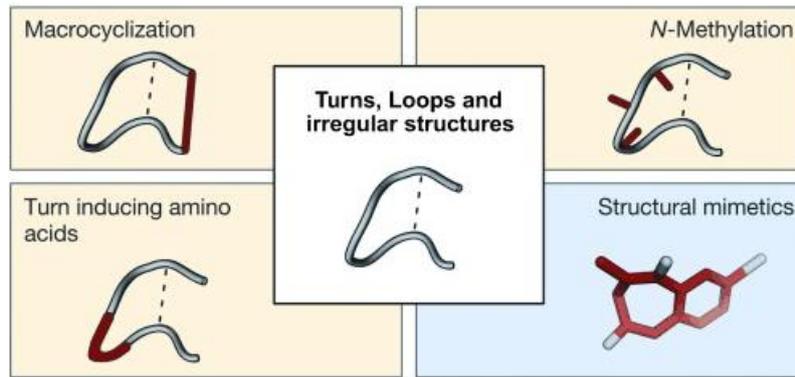


Figure 15 : Représentation de contraintes induisant un coude β ⁷⁵

II. Restriction conformationnelle en utilisant des acides aminés modifiés

Deux stratégies existent pour la modification du peptide au niveau des acides aminés. La première stratégie consiste à réaliser une modification au niveau des chaînes latérales et la seconde stratégie consiste à modifier directement le squelette du peptide.

1. Modifications des chaînes latérales

Comme discuté, les chaînes latérales des amino-acides naturels possèdent une grande importance pour l'activité de la protéine. Ceci est dû au fait qu'elles possèdent divers groupements fonctionnels qui permettent l'interaction avec les autres peptides ou protéines. Le problème est que ces chaînes latérales possèdent une très grande flexibilité conformationnelle avec une barrière d'énergie de rotation autour de leurs angles de torsion relativement faible (environ 8 kcal/mol)⁸⁰. Donc, elles peuvent tourner librement à la température physiologique.

1.1. Substitution en position β

La substitution en position β des acides aminés naturels est un exemple de rigidification des chaînes latérales. Trois des vingt amino-acides naturels possèdent même une β -disubstitution (Figure 16).

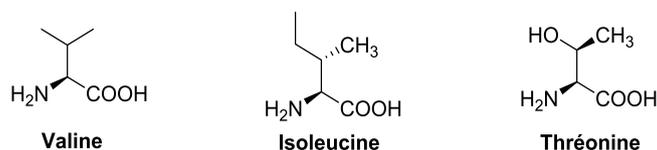


Figure 16: Amino-acides naturels bi-substitués en β

La valine porte deux substituants méthyles en β , l'isoleucine a quant à elle un groupement méthyle et un groupement éthyle et enfin la thréonine porte un groupement méthyle ainsi qu'un groupement hydroxyle. L'isoleucine et la thréonine possèdent grâce à leurs substituants un nouveau centre chiral en position β . A partir de ces observations de nombreux analogues d'acides aminés naturels ont donc été alkylés en position β .

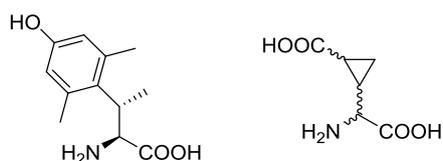


Figure 17: Amino-acides non naturels substitués en β

De plus, de nombreux autres amino-acides non naturels substitués en position β ont été synthétisés^{81,82} (Figure 17).

1.2. Analogues de proline

Un autre groupe très étudié d'acides aminés modifiés au niveau des chaînes latérales sont les analogues de proline. La proline possède une place spéciale dans la catégorie des amino-acides protéinogènes. Sa structure cyclique restreint drastiquement l'espace conformationnel des chaînes latérales du peptide. De plus, quand une proline est présente dans un peptide, la fonction amide peut se trouver à la fois sous la configuration *cis* et *trans*. Ceci est dû au fait que la différence d'énergie entre ces deux rotamères est plus faible que pour une fonction amide secondaire. En plus de la proline elle-même, d'autres dérivés de proline ont été découverts dans des protéines (Figure 18).

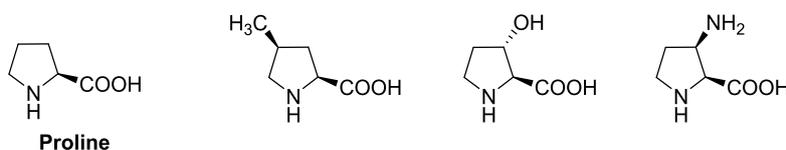


Figure 18: Proline et dérivés

⁸¹ Jiao, D.; Russell, K. C.; Hruby, V. J. *Tetrahedron* **1993**, *17*, 3511–3520

⁸² Shimamoto, K.; Ishida, M.; Shinozaki, H.; Ohfuné, Y. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4167–4176

Par ailleurs, de nombreux autres analogues de proline ont été synthétisés en introduisant des substituants (alkyles ou aromatiques) sur les positions 3, 4 ou 5. De même, des dérivés possédant des hétéroatomes supplémentaires ou des groupements halogénés ont également été synthétisés et étudiés.

1.3. Les peptidomimétiques minimalistes⁸³

Nous avons déjà discuté préalablement de l'importance des chaînes latérales des peptides dans l'interaction protéine-protéine. En effet, environ 80 % des chaînes latérales d'un peptide contribuent aux interactions avec la cible biologique. En partant de ce postulat, il a alors été envisagé de développer des peptidomimétiques ne possédant seulement que les chaînes latérales sans la présence du squelette polyamide. Ce type de peptidomimétiques est appelé peptidomimétique minimaliste. Les premiers exemples de peptidomimétiques minimalistes datent des années 90. Hirschmann et Smith ont conçu des analogues de coude β à partir de saccharides⁸⁴, de stéroïdes⁸⁵ ou de catéchols⁸⁶. Les squelettes servent seulement à maintenir les chaînes latérales à la distance appropriée pour induire l'interaction. Il n'est pas nécessaire que la conformation la plus stable d'un peptidomimétique minimaliste corresponde à la structure secondaire à mimer. En effet, le principe des peptides minimalistes est de pouvoir atteindre la conformation bioactive c'est-à-dire que les barrières énergétiques entre les conformations ne soient pas insurmontables. Le facteur entropique dicte que les squelettes de ces peptides minimalistes possèdent tout de même des degrés de liberté limités afin d'avoir l'orientation convenable des chaînes latérales.

2. Modifications du squelette

A part les modifications qui peuvent être réalisées au niveau des chaînes latérales, le squelette des peptides peut aussi être modifié de différentes façons par un échange isostérique ou isoélectronique⁸⁷. Les changements les plus importants seront décrits en détails dans les paragraphes qui vont suivre (Figure 19). Trois groupes principaux de modifications du squelette sont connus. Le premier consiste à échanger des groupements individuels (azote, carbonyle ou carbone α). Le second groupe de

⁸³ Ko, E.; Liu, J.; Burgess, K. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4411-4421

⁸⁴ Hirschmann, R.; Nicolaou, K. C.; Pietranico, S.; Leahy, E. M.; Salvino, J.; Arison, B.; Cichy, M. A.; Spoons, P. G.; Shakespeare, W. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 12550-12568

⁸⁵ Hirschmann, R.; Sprengeler, R. A.; Kawasaki, T.; Leahy, J. W.; Shakespeare, W. C.; Smith, A. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9699-9701

⁸⁶ Mowery, B. P.; Prasad, V.; Kenesky, C. S.; Angeles, A. R.; Taylor, L. L.; Feng, J. -J.; Chen, W. -L.; Lin, A.; Cheng, F. -C.; Smith, A. B.; Hirschmann, R. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4397-4400.

⁸⁷ Hill, D. J. Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893-4011

modifications du squelette correspond à réaliser l'extension du squelette lui-même en ajoutant un ou plusieurs groupements méthyle en plus. Pour finir, la troisième possibilité de modification du squelette repose sur le remplacement dans son ensemble de la fonction amide.

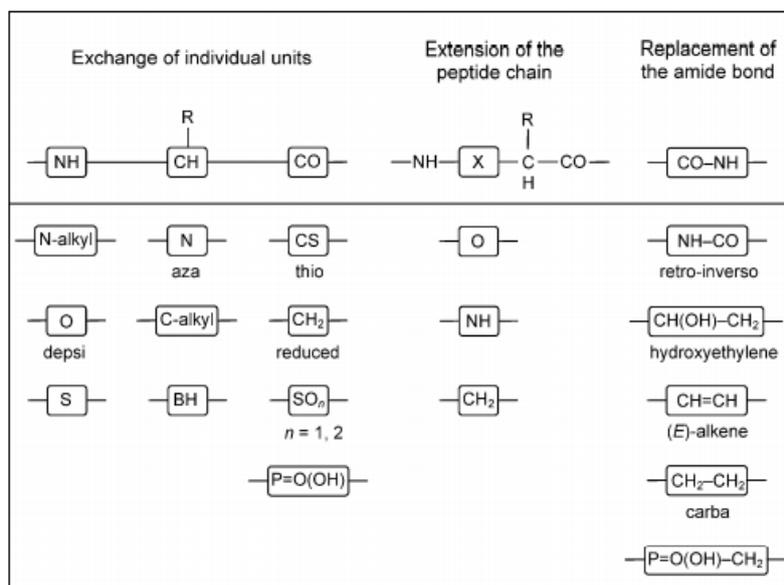


Figure 19: Représentation des modifications les plus communes du squelette des peptides

2.1. Modifications des groupements individuels

2.1.1. Les azapeptides

La formation d'azapeptides consiste à remplacer électriquement le carbone α du squelette par un atome d'azote en laissant les chaînes latérales inchangées (Figure 20). Cette approche est intéressante et facile à mettre en place d'un point de vue synthétique. Ces azapeptides sont obtenus de façon très simple par substitution de dérivés hydrazines ou hydrazides.

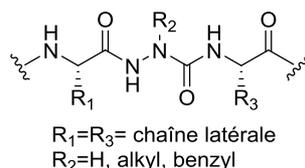


Figure 20: Représentation d'un azapeptide

Jamart-Grégoire et al.⁸⁸ ont développé un oligomère constitué d'une séquence α /aza/ α . L'introduction de l'aza amino-acide induit la formation d'un coude (Figure 21).

⁸⁸ Zhou, Z.; Deng, C.; Abbas, C.; Didierjean, C.; Averlant-Petit, M. -C.; Bodiguel, J.; Vanderesse, R.; Jamart-Gregoire, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2014, 7643-7650

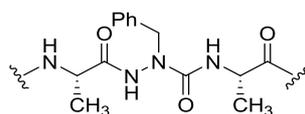


Figure 21: Oligomère α /aza/ α

Lubell et al.⁸⁹ ont développé des analogues de semi-carbazole qui renforcent la conformation en coude β à l'aide de contrainte électronique et stérique. La contrainte électronique est due à la répulsion des doublets non liants des deux atomes d'azotes du motif hydrazine. La contrainte stérique est due à la planéarité de la fonction urée. Ils ont ainsi mis au point différents motifs semi-carbazoles (Figure 22).



Figure 22: Analogue de semi-carbazole

2.1.2. Les azatides

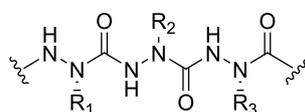


Figure 23: Représentation d'un azatide

Les azatides⁸⁷ sont des peptides très similaires aux azapeptides (Figure 23). Dans le cas des azapeptides seul, quelques $C\alpha$ sont remplacés par un atome d'azote. En revanche, dans le cas des azatides, tous les $C\alpha$ sont remplacés par un atome d'azote. Ce type de peptide n'est constitué que de motifs hydrazine et urée. Ils n'ont pas encore été très étudiés, mais ils devraient être capables d'adopter des conformations en coudes.

2.1.3. Les peptides N-alkylés

Une autre modification très importante au niveau de la fonction peptidique est la N-alkylation, comme par exemple la N-méthylation⁹⁰ qui est largement utilisée mais qui peut aussi apparaître dans des séquences naturelles de peptides (Figure 24).

⁸⁹ Chingle, R.; Proulx, C.; Lubell, W. D. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 1541-1556

⁹⁰ Chatterjee, J.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H. *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 1331-1342

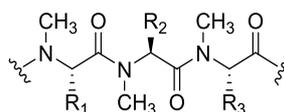


Figure 24: Représentation de N-méthyl peptide

De nombreux peptides qui présentent une activité ont été modifiés par l'utilisation de N-méthyl amino-acides. Ces analogues possèdent des propriétés pharmacologiques améliorées comme une meilleure stabilité métabolique, une plus grande lipophilie, ainsi qu'une plus grande sélectivité. Avec l'introduction d'un groupement alkyle sur l'atome d'azote, les propriétés du peptide s'en trouvent modifiées. Tout d'abord, l'introduction d'un N-alkyl induit une contrainte stérique qui a un effet non seulement au niveau des degrés de liberté du squelette mais aussi au niveau des chaînes latérales des amino-acides avoisinants. Deuxièmement, le nombre de liaisons hydrogènes inter et intra-moléculaires diminue du fait de la disparition du groupement NH. Et enfin, le carbonyle de la fonction amide présente un caractère basique augmenté et une diminution de polarité.

Dans les protéines naturelles, seuls des N-méthylations et N-benzylations ont été découverts et observés.

Dans un cas de N-alkylation par un substituant très volumineux, un groupe de recherche,⁹¹ afin d'augmenter la lipophilie des peptides, a couplé un amino-stéroïde avec deux peptides par une réaction multi-composant (Figure 25). Le peptidomimétique résultant possédait une lipophilie accrue, une augmentation significative de sa rigidité conformationnelle, ainsi qu'une structuration en coude β .

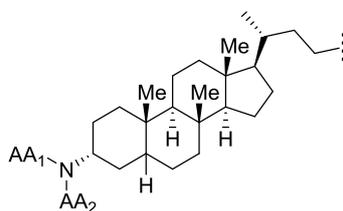


Figure 25: Peptido-stéroïde

2.1.4. Les peptoïdes

Un intéressant sous-groupe des amino-acides N-alkylés sont les peptoïdes, qui contiennent uniquement des glycines N-alkylées (Figure 26). Les principales différences par rapport à une séquence

⁹¹ Rivera, D. G.; Vasco, A. V. Echemendia, R.; Concepcion, O.; Perez, C. S.; Gavin, J. A.; Wessjohann, L. A. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 13150-13161

peptidique naturelle sont la perte du centre asymétrique présent initialement sur le carbone α et le fait que la chaîne latérale soit désormais attachée à l'atome d'azote. Les peptoïdes présentent une stabilité augmentée face aux enzymes protéolytiques, ainsi qu'une flexibilité conformationnelle accrue par rapport aux peptides naturels.

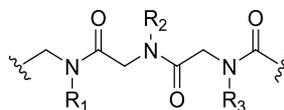


Figure 26: Représentation d'un peptoïde

2.1.5. Les amino-acides tetrasubstitués sur le carbone alpha

Une autre modification du squelette qui a été très largement investiguée dans les dernières années est l'utilisation d'acides aminés tétrasubstitués au niveau du carbone α (Figure 27). Ce type d'acides aminés apparaît dans des séquences naturelles d'acides aminés comme par exemple dans les protéines issues des champignons. Ce sont principalement des dérivés d'acide α -aminoisobutyrique ou des isovalines.

En plus des peptidomimétiques synthétisés à partir de ces deux motifs, les chercheurs ont développé de nouveaux acides aminés non naturels tétrasubstitués en α par différents substituants.

Les α -acides aminés tétrasubstitués sont utilisés couramment pour introduire une contrainte dans le squelette du peptide. Cette contrainte est issue de la formation d'un carbone α quaternaire.

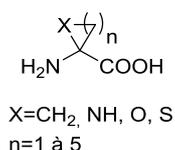


Figure 27: Représentation d' α -amino acide tétrasubstitué cyclique

Afin d'accroître le phénomène de restriction conformationnelle, la création d'une liaison covalente entre les substituants du carbone α peut être réalisée pour conduire ainsi à des peptidomimétiques dérivés d' α -acides aminés tétrasubstitués cycliques^{92,93}. Cette cyclisation conduit à une modification de la réactivité chimique des groupements fonctionnels environnants comme par exemple l'hydrolyse de la fonction amide.

⁹² Zukauskaitė, A.; Moretto, A.; Peggion, C.; De Zotti, M.; Sackus, A.; Formaggio, F.; De Kimpe, N.; Manginckx, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *11*, 2312-2321

⁹³ Cativiela, C.; Ordonez, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1-63

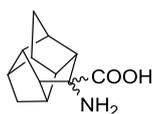


Figure 28: Trishomocubane amino acide

En se basant sur ce principe, une équipe⁹⁴ a développé un acide aminé racémique à partir du trishomocubane (Figure 28). Cet acide aminé est une sorte de cage qui induit une contrainte stérique extrêmement importante. L'incorporation de cet α amino-acide dans un peptide conduit à une structuration de ce dernier en coude β .

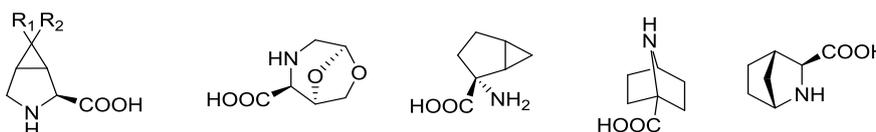


Figure 29: α amino acides bicycliques

De nombreuses équipes de recherche⁹⁵ ont travaillé sur des α amino-acides de motif bicyclique, comme des dérivés bicyclique de proline, de bicyclo[3.1.0]hexane, d'azabicyclo[2.2.1]heptane, d'azabicyclo[2.2.2]octane, de 6,8-dioxa-azabicyclo[3.2.1]octane et d'autres motifs bicycliques (Figure 29).

2.1.6. Autres modifications possibles des groupements individuels⁸⁰

Au sujet des modifications possibles au niveau du carbone α , nous avons discuté de la possibilité de le remplacer par un atome d'azote ou encore d'avoir une di-substitution. Mais, il est également possible de remplacer ce carbone α par un atome de bore.

De même, nous avons détaillé l'alkylation de l'atome d'azote qui reste l'une des modifications les plus importantes, mais il est possible de remplacer l'atome d'azote de la fonction amide par un oxygène conduisant ainsi à une fonction ester. Ces peptides sont nommés depsipeptides⁹⁶. Il est possible encore de remplacer l'atome d'azote par un atome de soufre pour conduire à l'obtention de thioester.

Enfin, le carbonyle de la fonction amide peut être lui-même modifié. Il peut, entre autre, être remplacé par un atome de soufre pour conduire à des thionoesters (C=S). Le carbonyle peut être réduit en groupement méthylène (CH₂), ou être remplacé par une fonction sulfoxyde (S=O) pour conduire à des

⁹⁴ Albericio, F.; Arvidson, Per I.; Bisetty, K.; Giralt, E.; Govender, T.; Jali, S.; Kongsaree, P.; Kruger, H. G.; Prabpai, S. *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *71*, 125-130

⁹⁵ Trabocchi, A. ; Scarpi, D.; Guarna, A. *Amino Acids* **2008**, *34*, 1-24

⁹⁶ Kitagaki, J.; Shi, G.; Miyauchi, S.; Murakami, S.; Yang, Y. *Anticancer Drugs*. **2015**, *26*, 259-271

sulfinopeptides ou par une fonction sulfone (S(=O)₂) pour conduire à des sulfonopeptides. Enfin, pour finir, le carbonyle peut même être substitué par un acide phosphinique (P=O(OH)) pour donner des phosphinopeptides.

L'ensemble de ces modifications n'est pas le plus couramment appliqué pour développer de nouveaux peptidomimétiques.

2.2. L'extension du squelette

Ce type de modification consiste à allonger le squelette du peptide en ajoutant un ou plusieurs atomes supplémentaires. Il est ainsi possible de former des β -peptides, des γ -peptides et des δ -peptides à partir respectivement de β -amino acides, de γ -amino acides et de δ -amino acides. L'ajout d'un motif plus complexe comme des acides aminés cycliques/bicycliques peut également être envisagé.

Les β -amino acides diffèrent des acides aminés α par la présence d'un groupement méthylène en plus dans le squelette. Les deux régioisomères de l'acide aminé β basés sur la localisation du groupement méthylène en supplément sont nommés β^2 et β^3 .

Par analogie, les γ -amino acides possèdent deux carbones en supplément, ce qui conduit à trois régioisomères nommés γ^2 , γ^3 et γ^4 . De même, un acide aminé δ , a quant à lui, trois groupements méthylènes en plus sur son squelette. Il possède donc quatre régioisomères nommés δ^2 , δ^3 , δ^4 et δ^5 (Figure 30).

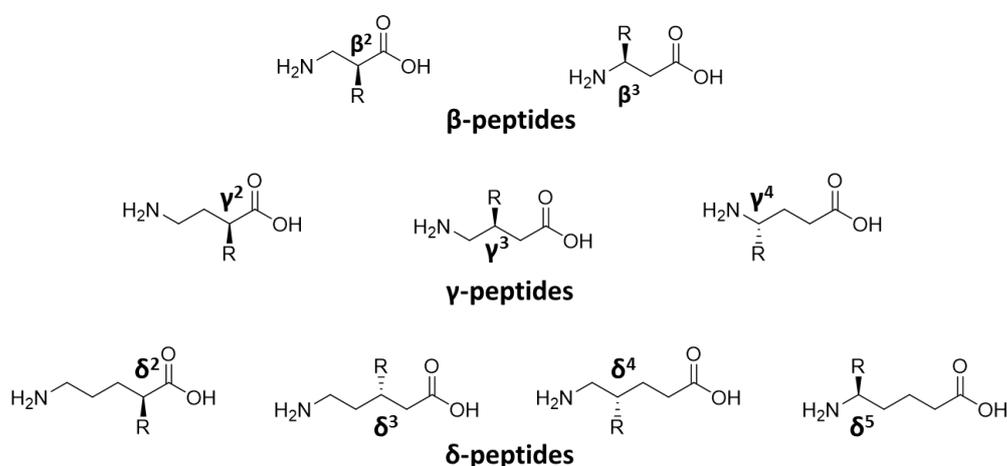


Figure 30: Représentation d'acides aminés β , γ et δ

2.2.1. Les β -peptides

Depuis les 25 dernières années, les β acides aminés conduisant à la formation de β peptides ont connu un intérêt très important du fait de leur unique caractéristique chimique et structurale. Les β peptides forment des structures secondaires bien définies qui possèdent des géométries bien différentes de leurs analogues les α peptides. Les β peptides peuvent être facilement fonctionnalisés et possèdent une importante stabilité métabolique. Les travaux présentés ici ne sont pas exhaustifs.

Dans la littérature, de nombreuses revues sur le développement et la synthèse d'amino acides β cycliques^{97,98,99} ont été rédigées. Ces amino-acides peuvent également être trouvés dans des séries azotées ou oxygénées. Aitken et al. ont grandement travaillé sur le développement et l'utilisation d'amino acides β cycliques énantiopurs. Ils ont, par ailleurs, utilisé ces amino-acides dans le développement d'acides nucléiques peptidiques¹⁰⁰, mais également pour la structuration de peptides^{101,102} en hélice α . Quelques-unes de ces structures sont illustrées ci-dessous (Figure 31).

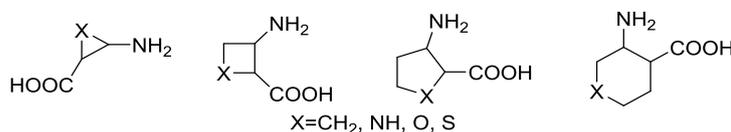


Figure 31: Amino acides β cycliques

Par analogie, des acides aminés β énantiopurs basés sur des cycles plus grands, allant du cycloheptane au cyclononane ont également été développés par Yamanaka et al.¹⁰³ (Figure 32).

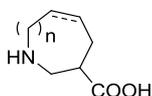


Figure 32: Amino acide cyclique allant du cycloheptane au cyclononane

Des amino acides β bicycliques énantiopurs¹³ ont également été synthétisés pour être utilisés comme motif pour contraindre les peptides dans une certaine structure secondaire. Comme pour les amino acides β cycliques, ils peuvent exister sous des séries contenant des hétéroatomes. On peut ainsi

⁹⁷ Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219-3232

⁹⁸ Park, K. -H.; Kurth, M. J. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8629-8659

⁹⁹ Kiss, L.; Fülöp, F. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1116-1169

¹⁰⁰ Mansawat, W.; Vilaivan, C.; Balazs, A.; Aitken, D. J. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1440-1443

¹⁰¹ Declerck, V.; Aitken, D. J. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 8793-8800

¹⁰² Alauddin, M.; Gloaguen, E.; Brenner, V.; Tardivel, B.; Mons, M.; Zehnacker-Rentien, A.; Declerck, V.; Aitken, D. J. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 16479-16493

¹⁰³ Yamanaka, T.; Ohkubo, M.; Kato, M.; Kawamura, Y.; Nishi, A.; Hosokawa, T. *Synlett* **2005**, *4*, 631-634

retrouver des dérivés de pinane¹⁰⁴, de norbornène^{105,106}, de tetrahydroisoquinoline¹⁰⁷, de bicyclo[2.2.1]heptane¹⁰⁸, d'azabicyclo[3.3.0]alkane, d'azabicyclo[4.3.0]alkane, d'azabicyclo[2.2.1]heptane et bien d'autres dérivés (Figure 33).

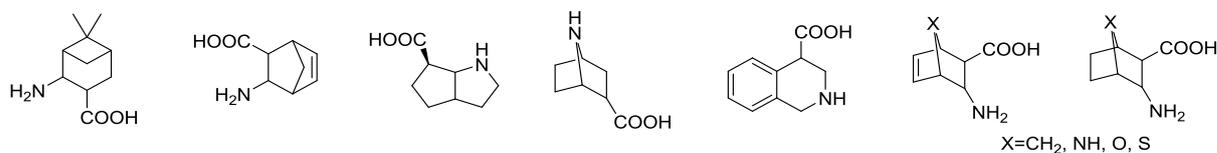


Figure 33: Amino acides bicycliques β

La plupart des amino acides β bicycliques fait parti de la famille des bicycles fusionnés ou des bicycles pontés. Mais il est également possible de trouver des spirocycliques¹⁰⁹ comme ceux développés par Grygorenko (Figure 34).

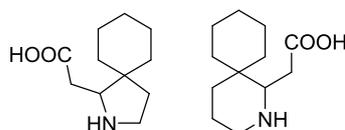


Figure 34: Amino acides spirocycliques

De nombreux travaux de recherche ont porté sur la création de β -amino acides comme outils pour la chimie médicinale mais également dans le champ des foldamers étant donné que ces amino acides possèdent une forte capacité à générer des structures secondaires stables comme par exemple des coudes. Plus récemment, les acides aminés γ ont connu ce même intérêt.

2.2.2. Les γ -peptides

Les γ -amino acides ont été initialement développés dans le but de créer des analogues d'acide γ aminobutyrique (GABA). Mais au vu des possibilités de ce squelette, ils ont également été employés dans le développement de γ -peptides. En effet, en partant du squelette d'un GABA, il est possible de le fonctionnaliser à différents endroits, ce qui limite ainsi la flexibilité du composé et qui induit un agencement spatial plus ordonné. Les γ -amino acides possèdent trois carbones entre la fonction acide et la fonction amine, il est donc possible de les substituer en position γ^2 , γ^3 ou γ^4 voire même les poly-

¹⁰⁴ Fülöp, F.; Martinek, T.; Toth, G. K. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 323-334

¹⁰⁵ Memeo, M. G.; Bovio, B.; Quadrelli, P. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 1907-1914

¹⁰⁶ North, M. J. *Peptide Sci.* **2000**, *6*, 301-313

¹⁰⁷ Bucci, R.; Bonetti, A.; Clerici, F.; Contini, A.; Nava, D.; Pellegrino, S.; Tessaro, D.; Gelmi, M. L. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 10822-10831

¹⁰⁸ Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Rodriguez, F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4241-4249

¹⁰⁹ Grygorenko, O. O. *Tetrahedron* **2015**, *33*, 5169-5216

substituer. Comme pour les peptides β , ils peuvent être substitués par des groupements cycliques carbonés ou des groupements cycliques contenant un hétéroatome¹¹⁰ (Figure 35).

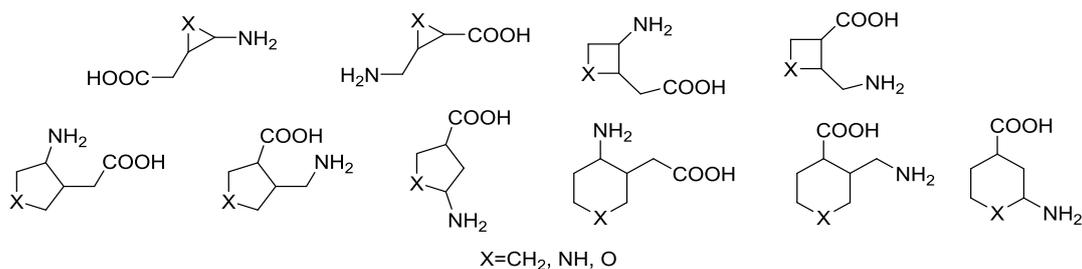


Figure 35: Amino acides γ cycliques

Des amino acides γ énantiopurs plus complexes d'un point de vue structural ont par la suite été développés par de nombreuses équipes. Les travaux présentés dans les paragraphes suivants ne sont pas exhaustifs.

Guarna et al.¹¹¹ ont développé des acides aminés bicycliques γ en partant d'acide tartrique et de céto-amine. Ils ont ainsi eu accès à des dérivés aza-dioxo-bicyclo[3.2.1]octane. Ces dérivés existent également en version oxydée, dans ce cas Y=O. Il est également possible d'obtenir des aza-dioxo-bicyclo[4.2.1]nonane et aza-dioxo-bicyclo[5.2.1]décane. Ce type de composé possédant un squelette extrêmement rigide peut être considéré comme isostère d'un dipeptide. Pour finir, ils ont également réussi à générer de nouveaux squelettes polycycliques aza-dioxo-bicyclo[3.2.1]octane (Figure 36).

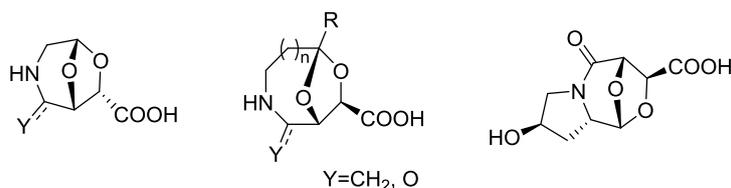


Figure 36: Aza-dioxo-bicyclo[3.2.1]octane (à gauche), bicyclo[4.2.1] et [5.2.1] (au centre) et polycyclique aza-dioxo-bicyclo[3.2.1]octane (à droite)

Une autre équipe a travaillé sur la synthèse et l'utilisation d'un bicyclic isostère de dipeptide basé sur un squelette pyrrolizidinone énantiopur¹¹². Ce type de motif peut être apparenté à un mime rigide de glycine-proline. Il est obtenu par une cyclo-addition 1,3-dipolaire. Ce nouveau squelette est un bon inducteur de coude β (Figure 37).

¹¹⁰ Ordonez, M.; Cativiela, C.; Romero-Estudillo, I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2016**, *27*, 999-1055

¹¹¹ Trabocchi, A.; Menchi, G.; Guarna, F.; Machetti, F.; Scarpi, D.; Guarna, A. *Synlett* **2006**, *3*, 331-353

¹¹² Cordero, F. M.; Pisaneschi, F.; Batista, K. M.; Valenza, S.; Machetti, F.; Brandi, A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 856-867

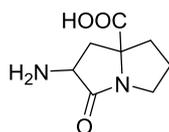


Figure 37: Squelette pyrrolizidinone

Legrand et al.¹¹³ ont développé une nouvelle classe d'hétérocycle contenant un amino-acide γ . Il s'agit de celle des acides 4-amino méthyl-1,3-thiazole-5-carboxylique. L'hétérocycle ci-après, lorsqu'il est incorporé dans un tetrapeptide induit la formation de coude (Figure 38).

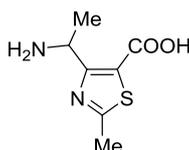


Figure 38: Hétérocycle de la série 4-amino(méthyl)-1,3-thiazole-5-carboxylique (ATCs)

Pour finir, Grison et al.¹¹⁴ ont travaillé sur la synthèse d'un résidu vinylogue original. En partant d'une pyrrolidine, un groupement éthylénique a été inséré entre le carbone α et la fonction acide. La configuration de la double liaison est très importante. En effet, l'isomère trans conduit à une conformation étendue du peptide, tandis que l'isomère cis encourage la formation d'un pseudo-cycle à 9 centres conduisant à la stabilisation d'un coude (Figure 39).

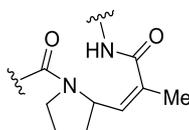


Figure 39: Résidu vinylogue cis

2.2.3. Les δ -peptides, lactames de Freidinger et dérivés

Comme pour les acides aminés γ qui ont suscité depuis le début des années 2000 un développement important, il en est de même pour les acides aminés δ .

Les δ -amino acides possèdent quatre carbones entre la fonction acide et la fonction amine, il est donc possible de les substituer en position δ^2 , δ^3 , δ^4 ou δ^5 voire même les poly-substituer. Sur le même principe que pour les acides aminés γ , ils peuvent être substitués par des groupements cycliques carbonés ou des groupements cycliques contenant un hétéroatome (Figure 40).

¹¹³ Legrand, B.; Mathieu, L.; Lebrun, A.; Andriamanarivo, S.; Lisowski, V.; Masurier, N.; Zirah, S.; Kang, Y. K. Martinez, J.; Maillard, L. T. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6713-6720

¹¹⁴ Grison, C.; Coutrot, P.; Genève, S.; Didierjean, C.; Marraud, M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10753-10764

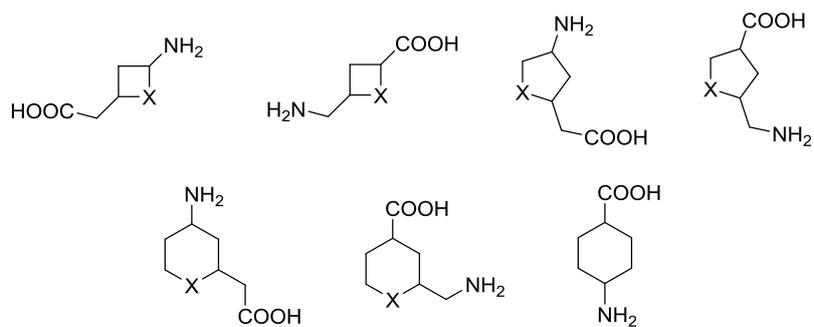


Figure 40: Amino acides δ cycliques énantiopurs

Des amino acides δ plus complexes structurellement ont été développés par la suite par diverses équipes de recherche dans le domaine. Les travaux présentés ici ne sont pas exhaustifs.

L'une des premières stratégies développées pour obtenir un acide aminé δ contraint a été basée sur l'utilisation d'un lactame γ ou δ . Ce type de résidu, appelé lactame de Freidinger¹¹⁵ (Figure 41), a été très largement employé dans la synthèse peptidique pour obtenir des peptides bien agencés en structure secondaire.

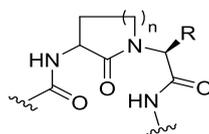


Figure 41: Lactame de Freidinger

Par la suite, de nombreuses équipes de recherche ont développé des squelettes contraints contenant un lactame. C'est le cas de Lubell et al. qui ont développé un résidu azabicyclo[4.3.0]nonanone¹¹⁶, un résidu azabicyclo[5.3.0]décane¹¹⁷, ainsi qu'un résidu azabicyclo[3.3.0]octanone¹¹⁸ (Figure 42).

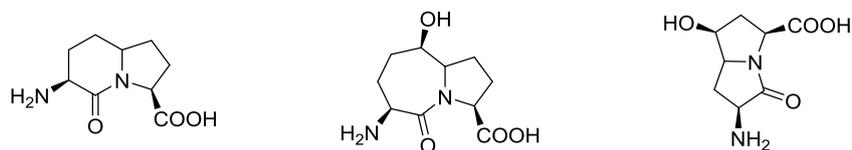


Figure 42: Azabicyclo[4.3.0]nonanone (à gauche), azabicyclo[5.3.0]décane et azabicyclo[3.3.0]octanone (à droite)

¹¹⁵ Freidinger, R. M, Veber, D.F, Hirschmann, R, Paegle, L. M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, *16*, 464-470

¹¹⁶ Bourguet, C. B.; Claing, A.; Laporte, S. A.; Hébert, T. E.; Chemtob, S.; Lubell, W. D. *Can. J. Chem.* **2014**, *92*, 1031-1040

¹¹⁷ Godina, T. A.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5846-5849

¹¹⁸ Ramana Rao, M. H. V.; Pinyol, E.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 736-743

En partant du postulat que le lactame de Freidinger permet d'induire aux peptides une structuration secondaire bien spécifique, d'autres équipes de recherche ont développé des motifs contenant toujours un résidu lactame mais sous forme spiro cyclique¹¹⁹ et spiro bicyclique^{120,121} (Figure 43).

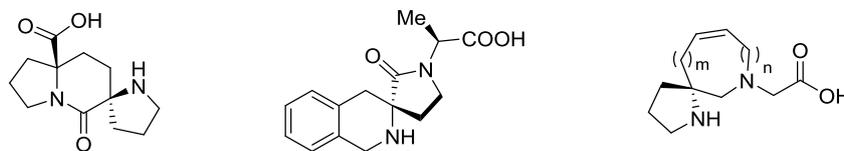


Figure 43: Spiro-lactames

Breuning et al.¹²² ont développé un amino-acide tricyclique chiral comme inducteur de coude β . Ce squelette azatricyclo[5.2.1.0]décanone contient un motif central norbornane auquel est lié un motif pyrrolidine (Figure 44)

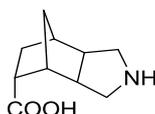


Figure 44: Azatricyclo[5.2.1.0]décanone

2.2.4. Autres motifs permettant l'extension du squelette

Pour permettre une extension du squelette du peptide, le plus souvent des peptides β , γ et δ sont utilisés, mais d'autres motifs peuvent également permettre ce type d'extension, comme par exemple les aminoxy acides, les amino acides dérivés de sucres ou encore des motifs plus « exotiques ».

a. Les aminoxy acides¹²³

Il a été démontré que les peptides contenant des aminoxy acides pouvaient adopter des structures secondaires bien définies, impliquant des coudes α N-O (qui correspondent à la formation d'une liaison hydrogène à huit centres), des coudes β N-O (qui correspondent à la formation d'une liaison hydrogène à neuf centres) ou encore à des coudes γ N-O (qui correspondent à la formation d'une liaison hydrogène à dix centres).

¹¹⁹ Bittermann, H.; Böcker, F.; Einsiedel, J.; Gmeiner, P. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6315-6322

¹²⁰ Vartak, A. P.; Johnson, R. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 983-986

¹²¹ Sacchetti, A.; Silvani, A.; Lesma, G.; Pilati, T. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 833-839

¹²² Breuning, M.; Häuser, T.; Mehler, C.; Däschlein, C.; Strohmam, C.; Oechsner, A.; Braunschweig, H. *Beilstein J. Org. Chem.* **2009**, *5*, 1-5

¹²³ Li, X.; Yang, D. *Chem. Commun.* **2006**, *0*, 3367-3379

Les α -aminoxy acides sont des analogues de β -amino acides dans lesquels le carbone C_β a été remplacé par un atome d'oxygène. Du fait de la répulsion des doublets non liants entre l'atome d'oxygène et l'atome d'azote adjacent, le squelette des α -aminoxy acides est beaucoup plus rigide. De plus, la liaison aminoxy amide est plus résistante vis-à-vis de la dégradation enzymatique. Par analogie, les β -aminoxy acides sont des analogues de γ -amino acides, et les γ -aminoxy acides sont quant à eux des analogues de δ -amino acides (Figure 45).

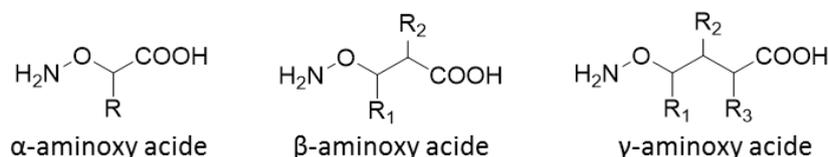


Figure 45: Représentation d'aminoxy acides α , β et γ

b. Les saccharides amino acides

Dans la nature, on trouve d'une part les peptides et protéines et d'autre part les sucres (saccharides, oligosaccharides et polysaccharides). Néanmoins, ils sont souvent trouvés combinés ensemble comme dans les glycopeptides et les glycoprotéines. Il a donc été envisagé par différentes équipes de recherche^{124,125} d'incorporer un dérivé de saccharide amino acide (SAA) dans une séquence peptidique afin de contraindre la structure secondaire de ce dernier. Pour cela, deux grandes séries d'amino acides ont été développées. La première série est issue de dérivés furanoïdes (Figure 46). Fleet et al.¹²⁶ ont travaillé sur le développement d'une nouvelle famille de foldamère constituée de tetrahydrofurane disubstitué en position α .

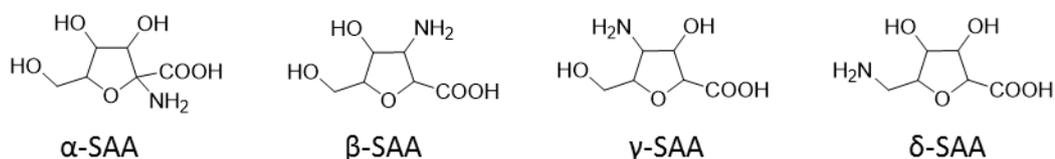


Figure 46: Saccharides amino acides à partir de dérivé furanoïde

La seconde série est issue de dérivés pyranoïdes (Figure 47). Hirschmann et al.¹²⁷ ont développé et synthétisé un mime de coude β en utilisant un β -D-glucose. L'utilisation de ce motif D-glucose permet

¹²⁴ Gruner, S. A.; Locardi, E.; Lohof, E.; Kessler, H. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 491-514

¹²⁵ Jensen, K. J.; Brask, J. *Biopolymers* **2005**, *80*, 747-761

¹²⁶ Simone, M. I.; Soengas, R.; Newton, C. R.; Watkin, D. J.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 5761-5765

¹²⁷ Hirschmann, R. F.; Nicolaou, K. C.; Angeles, A. R.; Chen, J. S.; Smith, A. B. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1511-1520

de moduler la position des substituants. Ils ont ainsi obtenu des ligands qui se lient spécifiquement au récepteur hNK1 ou au récepteur SRIF.

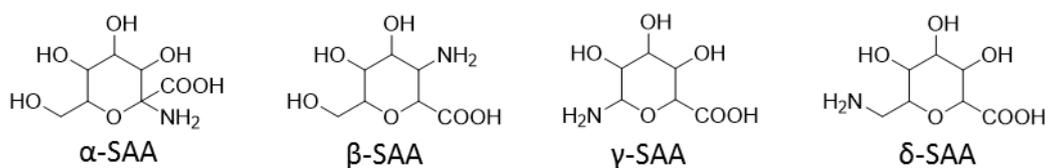


Figure 47: Saccharides amino acides à partir de dérivé pyranoïde

c. Les motifs « exotiques »

Nous avons vu que de nombreuses équipes de recherche ont travaillé sur le développement de peptidomimétiques en réalisant une élongation du squelette principal. Cette élongation est le plus souvent réalisée en utilisant des analogues d'α amino acides. Toutefois, dans la littérature, nous pouvons également trouver des motifs plus exotiques qui permettent de contraindre le peptide pour qu'il adopte une structure secondaire bien définie. Certains de ces motifs exotiques seront détaillés dans ce paragraphe.

Ongéri et al.¹²⁸ ont développé des mimes de coude β en utilisant des motifs pipéridine-pyrrolidine. Ce type de motif permet une structuration du peptide en épingle β, c'est-à-dire deux feuillet β reliés par un coude β (Figure 48). Ces mimes d'épingles β permettent de moduler l'agrégation, et donc la toxicité du peptide β-amyloïde Aβ₁₋₄₂, impliqué dans la maladie d'Alzheimer.

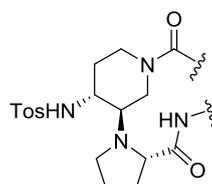


Figure 48: Squelette pipéridine-pyrrolidine

Hirao et al.¹²⁹ ont par exemple utilisé des espaceurs basés sur des dérivés aromatiques comme les composés présentés ci-dessous (Figure 49).

¹²⁸ Pellegrino, S.; Tonali, N.; Kaffy, J.; Taverna, M.; Contini, A.; Taylor, M.; Allsop, D.; Gelmi, M. L.; Ongeri, S. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1295-1302

¹²⁹ Moriuchi, T.; Hirao, T. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 294-301

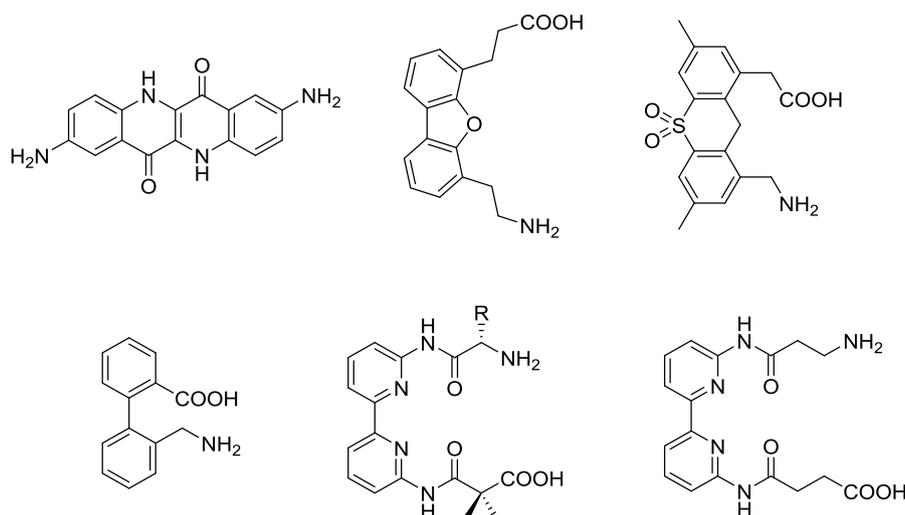


Figure 49: Espaceurs aromatiques

Bag¹³⁰ et al. ont développé des motifs originaux basés sur des triazolo-amino acides. Ils ont développé une série aromatique et une série aliphatique (Figure 50).

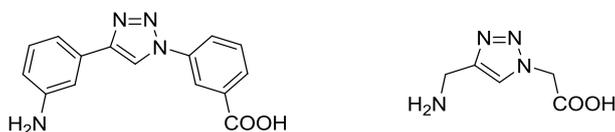


Figure 50: Série triazolo-amino acide aromatique (à gauche) et série triazolo-amino acide aliphatique (à droite)

Piarulli et al. et Parrot et al. ont développé des inducteurs de coude β à partir d'un motif dicétopipérazine¹³¹ ou oxa-dicétopipérazine¹³². Et Kahn et al. ont proposé un motif tetrahydro pyrazino[1,2-a]pyrimidine-dione¹³³ (Figure 51).

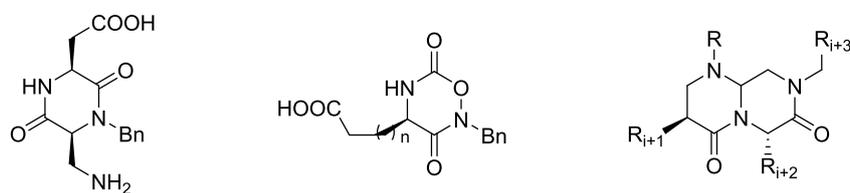


Figure 51: Dicétopipérazine (à gauche), oxa-dicétopipérazine (au centre) et tetrahydro pyrazino[1,2-a]pyrimidine-dione (à droite)

¹³⁰ Bag, S. S.; Jana, S.; Yashmeen, A.; De, S. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 5242-5245

¹³¹ Vahdati, L.; Fanelli, R.; Bernadat, G.; Correia, I.; Lequin, O.; Ongeri, S.; Piarulli, U. *New J. Chem.* **2015**, 39, 3250-3258

¹³² Berthet, M.; Lebrun, A.; Martel, A.; Cheviet, T.; Martinez, J. *ChemistrySelect*, **2017**, 2, 5824-5827

¹³³ Eguchi, M.; Lee, M. S.; Nakanishi, H.; Stasiak, M.; Lovell, S.; Kahn, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 12204-12205

D'autres équipes de recherche ont choisi l'emploi de motifs pyrrolinone¹³⁴ et oxazolidi-2-one¹³⁵ comme mimes de coude (Figure 52).



Figure 52: Motif pyrrolinone (à gauche) et motif oxazolide-2-one (à droite)

Burgess et al.¹³⁶ ont conçu des mimes de coudes à partir d'une structure dérivée d'un pyrrole (Figure 53).

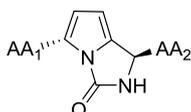


Figure 53: Dérivé pyrrole

Par analogie, le motif pyrrolidine, utilisé par Boger et al.¹³⁷, a été inséré au sein d'une séquence peptidique, il permet de mimer un coude β tout en introduisant une chaîne latérale au niveau de l'azote (Figure 54). Certains composés ont présenté de très fortes affinités et spécificités pour les récepteurs opioïdes humains.

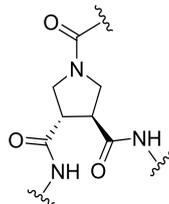


Figure 54: Dérivé pyrrolidine

Pour finir, Kirin et al.¹³⁸ ont réalisé la synthèse d'un mime de coude β en vue de le greffer sur des triphénylphosphanes. Par ailleurs, Kraatz et al.¹³⁹ ont synthétisé des peptido-ferrocènes pour développer des sondes. Les ferrocènes permettent la formation de pseudo-cycles à 7, 10 ou 13 centres afin de conduire à la formation de coudes (Figure 55).

¹³⁴ Smith, A. B.; Charnley, A. K.; Hirschmann, R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 180-193

¹³⁵ Greco, A.; Tani, S.; De Marco, R.; Gentilucci, L. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 13390-13404

¹³⁶ Ko, E.; Burgess, K. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 980-983

¹³⁷ Whitby, L.; Ando, Y.; Setola, V.; Vogt, P. K.; Roth, B. L.; Boger, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10184-10194

¹³⁸ Kokan, Z.; Glasovac, Z.; Elenkov, M. M.; Gredicak, M.; Jeric, I.; Kirin, S. I. *Organometallics* **2014**, *33*, 4005-4015

¹³⁹ Martie, S.; Labib, M.; Shipman, P. O.; Kraatz, H. -B, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7264-7290

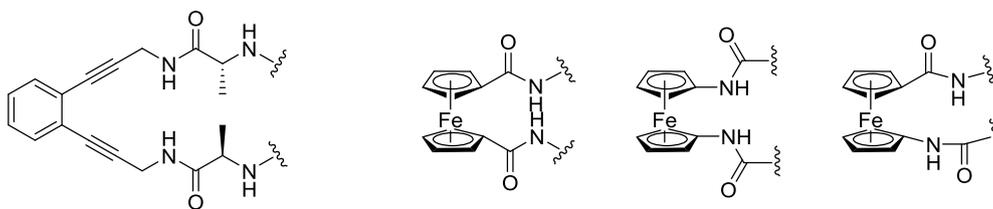


Figure 55: Mime de coude β développé par Kirin (à gauche) et peptido-ferrocène (à droite)

2.3. Le remplacement de la fonction amide

2.3.1. Les peptidomimétiques rétro-inverses

Une autre approche pour obtenir des peptidomimétiques consiste à effectuer des modifications du type rétro-inverse. Ces peptidomimétiques peuvent être synthétisés d'après le même enchainement d'acides aminés juste en échangeant les L-amino acides naturels par des D-amino acides et en renversant simultanément la séquence du N-terminal vers le C-terminal (Figure 56).

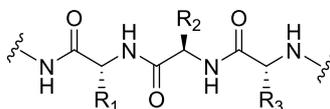


Figure 56: Représentation d'une séquence rétro-inverse

La topologie des chaînes latérales du peptide naturel et du peptide rétro-inverse sont les mêmes. Evidemment, la modification rétro-inverse ne conduit pas à une plus grande contrainte du peptide. L'avantage majeur du peptidomimétique par rapport au peptide naturel est qu'il n'est plus désormais reconnu par les protéases, ce qui par conséquent conduit à une plus grande stabilité *in-vivo*. L'un des désavantages majeurs de ces peptidomimétiques est qu'avec l'inversion de la séquence, le N-terminal et C-terminal s'en trouvent également échangés. Par conséquent la charge positive portée par le N-terminal dans la séquence du peptide naturel est remplacée par une charge négative dans la séquence du peptidomimétique. De même, la charge négative portée par le C-terminal est remplacée par une charge positive. Afin d'éviter cela, il est possible d'introduire des acides aminés terminaux modifiés ou alors d'incorporer la séquence rétro-inverse dans un plus grand peptide. Malheureusement, ces peptidomimétiques rétro-inverses montrent rarement une activité comparable à la séquence naturelle.

2.3.2. Autres remplacements de la fonction amide⁸⁰

Au sujet des remplacements possibles de la fonction amide, nous avons discuté de la formation des peptidomimétiques rétro-inverses qui est la stratégie la plus utilisée. Mais, il est également possible de remplacer la fonction amide par des dérivés hydroxyéthylènes (CH(OH)-CH₂), des dérivés alcènes (CH=CH), des dérivés carbonés saturés (CH₂-CH₂) ou encore des dérivés d'acides phosphiniques (P=O(OH)-CH₂).

III. Restriction conformationnelle par cyclisation

En plus des modifications directes des amino-acides, de nombreuses autres méthodes existent pour la préparation de peptidomimétiques contraints. L'une de ces méthodes est l'introduction d'une restriction globale *via* une cyclisation. Cette cyclisation conduit à une très grande stabilité *in-vivo*. Du fait de la diminution de la flexibilité conformationnelle, ces peptidomimétiques peuvent présenter des repliements en structure secondaire. Différentes techniques ont été développées pour la synthèse de peptidomimétiques cycliques. Trois grandes voies existent pour la formation d'analogues cycliques de peptides naturels, la cyclisation tête à queue, la cyclisation squelette/chaîne latérale ou la cyclisation chaîne latérale/chaîne latérale.

- La cyclisation tête à queue consiste à connecter le N-terminal avec le C-terminal en formant un lactame.
- La cyclisation squelette/chaîne latérale consiste à coupler soit le N-terminal ou le C-terminal du squelette avec un groupement fonctionnel d'une chaîne latérale. On peut ainsi former un lactame, une lactone ou encore un thioester.
- Pour finir, la cyclisation chaîne latérale/chaîne latérale consiste à réaliser la connexion de deux chaînes latérales qui ne sont pas impliquées dans le phénomène d'interaction avec la cible biologique.

Classiquement, on retrouve la formation d'un lactame ou alors la formation d'un pont disulfure¹⁴⁰ *via* l'oxydation de deux résidus cystéines. L'un des facteurs limitants de ce type de cyclisation est que la formation d'une seule liaison covalente ne suffit pas à contraindre l'ensemble du peptide. La formation d'un pont covalent ne contraint qu'une section limitée du peptide. Il faut donc envisager de former

¹⁴⁰ Li, F.; Rodriguez, K. B.; Phillips, C.; Seidel, R. W.; Garcia, E. S.; Sander, W. J. *Phys. Chem. B.* **2013**, *117*, 3560-3571

plusieurs ponts covalents. Un autre inconvénient de ce type de cyclisation est la stabilité du pont disulfure étant donné qu'ils existent dans des séquences peptidiques naturelles, ils ne présentent qu'une stabilité limitée vis-à-vis des protéases et des réducteurs présents en milieu biologique.

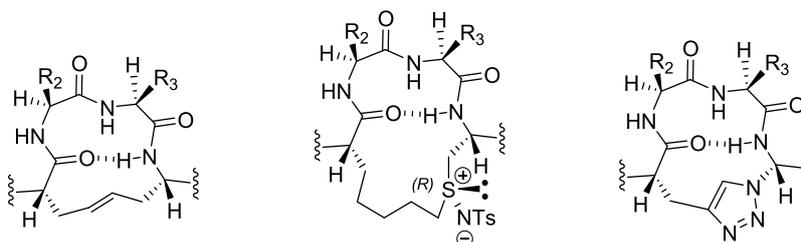


Figure 57: Travaux de Grubbs (à gauche), de Li (au centre) et de Lavielle (à droite)

Pour surmonter ces différents problèmes, d'autres méthodologies ont été développées (Figure 57).

Grubbs¹⁴¹ et al., pour stabiliser une structure en coude β , reportent la formation d'un linker par une métathèse qui permet la fermeture de cycle carboné obtenu.

Li et son équipe¹⁴² utilisent une sulfinimine chirale comme lien dans des peptides courts pour induire et maintenir la formation d'un coude β . Ils ont démontré que la chiralité absolue de la sulfinimine était très importante. En effet, dans le cas de la sulfinimine *R*, ils ont observé une structuration en coude β du peptide. En revanche, dans le cas de la sulfinimine *S*, le peptide ne se structure pas et reste dans une conformation aléatoire.

Lavielle¹⁴³ et al. ont utilisé la chimie click afin de créer un dérivé triazole comme linker. Il s'est avéré que l'introduction dans un peptide du linker triazole stabilisait peu la structuration en coude β . Néanmoins, il est à noter que le motif triazole semble toutefois induire un coude β lors d'une interaction avec l' α -amylase.

IV. Applications des peptidomimétiques

Maintenant que nous avons détaillé différentes façons et possibilités de créer des peptidomimétiques afin de les contraindre et de les maintenir dans des structures secondaires organisées, nous allons voir des différentes applications possibles de ces peptidomimétiques. Ces applications peuvent être regroupées en deux catégories. La première catégorie consiste au développement de nouveaux matériaux en utilisant les propriétés d'auto-assemblage de ces peptidomimétiques permettant la formation de structure tertiaire. Ils peuvent également servir dans le développement de nouveaux

¹⁴¹ Miller, S. J.; Blackwell, H. E.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9606-9614

¹⁴² Lin, H.; Jiang, Y.; Hu, K.; Zhang, Q.; He, C.; Wang, T.; Li, Z. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *14*, 9993-9999

¹⁴³ Larregola, M.; Lequin, O.; Karoyan, P.; Guianvarc'h D.; Lavielle, S. *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 632-643

catalyseurs. La seconde catégorie regroupe l'utilisation des peptidomimétiques dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Les paragraphes qui suivent ne vont détailler que quelques exemples d'applications des peptidomimétiques.

1. Le développement de nouveaux matériaux et catalyseurs

Nous avons déjà brièvement évoqué ci-dessus que Kirin¹³⁸ et al. avaient développé un mime de coude β . L'objectif de ce mime était d'être greffé à des triphénylphosphanes afin de créer un nouveau catalyseur chiral, ce catalyseur servant d'inducteur de chiralité pour l'hydrogénation asymétrique en utilisant un complexe au rhodium.

Les propriétés d'auto-assemblage représentent un nouveau domaine de recherche dans le développement des bionanotechnologies. L'équipe d'Ortuno¹⁴⁴, en utilisant un enchaînement de β -cyclobutane amino acide, a développé des nanofibres ainsi que des gels.

Par analogie, Mondal et Gazit¹⁴⁵ ont développé également des nanofibres, mais également des nanotubes en employant des peptides basés sur l'enchaînement de β et γ -amino acides.

¹⁴⁴ Rua, F.; Bousert, S.; Parella, T.; Diez-Perez, V. B.; Giral, E.; Ortuno, R. M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3643-3645

¹⁴⁵ Mondal, S.; Gazit, E. *ChemNanoMat.* **2016**, *2*, 323, 332

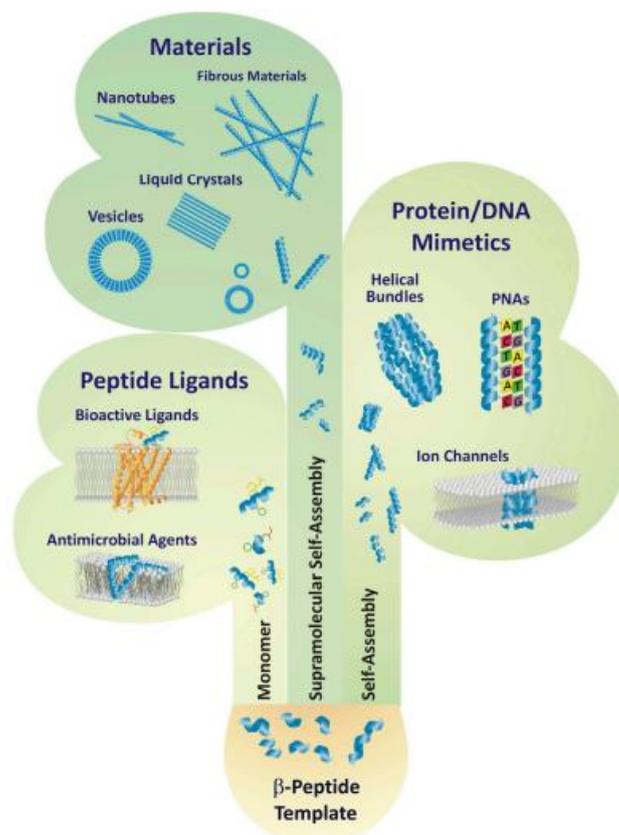


Figure 58: Différentes application basés sur les β -peptides¹⁴⁶

Aguilar et al.¹⁴⁶ ont rassemblé dans une mini-revue, l'ensemble des applications dans lesquelles les β -peptides peuvent être employés (Figure 58). En utilisant leurs propriétés d'auto-assemblage, ils peuvent être utilisés dans la formation de paquet hélicoïdal, mais également dans le développement de canal ionique ou encore en les associant avec des nucléobases. En employant ces mêmes β -peptides, mais cette fois-ci en utilisant leurs propriétés d'auto-assemblage supramoléculaire, il est alors possible d'obtenir la formation de nanotubes, de nanofibres, de cristaux liquides ou encore de vésicules. Enfin, l'emploi de ces peptides uniquement sous forme de monomère peut servir dans le développement d'agents antimicrobiens ainsi que dans la formation de ligands bioactifs.

2. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques

Les peptidomimétiques pouvant se structurer et maintenir leurs conformations en solution peuvent permettre le développement et l'accès à de nouveaux agents thérapeutiques plus actifs et plus stables. En effet, nous avons déjà mentionné à plusieurs reprises que le fait de modifier la structure des peptides naturels pour conduire à l'obtention de peptidomimétiques permet non seulement une meilleure

¹⁴⁶ Gopalan, R. D.; Del Borgo, M. P.; Mechler, A. I.; Perlmutter, P.; Aguilar, M. -I. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 1417-1423

activité (du fait de leur structuration permettant de mimer l'épitope des protéines), mais également une stabilité accrue face à la dégradation enzymatique.

De nouveaux agents thérapeutiques basés sur l'utilisation de peptidomimétiques ont ainsi vu le jour depuis les deux dernières décennies. Ces nouveaux agents peuvent agir et trouvent leur intérêt dans de nombreux domaines médicaux qui peuvent aller des anti-infectieux et des vaccins synthétiques, à la modulation des interactions protéine-protéine et au développement d'inhibiteur d'enzyme (Figure 59).

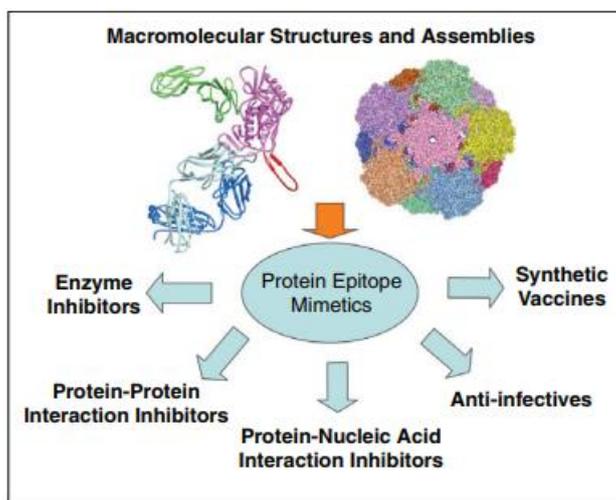


Figure 59: Les domaines d'applications des peptidomimétiques¹⁴⁷

Fairlie et al.¹⁴⁸ rapportent dans une revue que plus de cent récepteurs connus couplés aux protéines G sont activés par des peptides. Les récepteurs couplés aux protéines G sont impliqués dans les cascades de signalisation cellulaire qui conduisent à l'initiation de différents processus physiologiques. A ce jour, seulement l'angiotensine, l'endothéline, l'oxytocine, la neurokinine et la somastatine ont été ciblés par des petites molécules. Il est évident que l'utilisation de peptidomimétique permettrait de cibler beaucoup plus de récepteurs couplés aux protéines G et de traiter les maladies qui en découlent.

Pour répondre à l'augmentation de la résistance des pathogènes (*S. aureus* et *E. coli* entre autres) face aux différents médicaments, une nouvelle génération de peptides et de peptidomimétiques antibiotimicrobiens est actuellement en phase d'études cliniques^{147,149}. Cette classe de composés interagît avec la membrane procaryote des bactéries en formant une conformation bien particulière qui conduit à une réponse du système immunitaire et ainsi à la destruction totale de la membrane et donc de la bactérie.

¹⁴⁷ Robinson, J. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 379-386

¹⁴⁸ Ruiz-Gomez, G.; Tyndall, J. D. A.; Pfeiffer, B.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, PR1-41

¹⁴⁹ Mendez-Samperio, P. *Infect. Drug. Resist.* **2014**, *7*, 229-237

Vendrell et al.¹⁵⁰ décrivent l'utilisation de β -peptides contenant des β -amino acides cyclobutane comme inhibiteur de métallocarboxypeptidase. Les métallocarboxypeptides jouent un rôle important dans diverses pathologies comme la pancréatite, le diabète, les maladies inflammatoires ou encore le cancer.

Le laboratoire Eli Lilly¹⁵¹ relate un travail réalisé sur les récepteurs métabotropiques du glutamate (Figure 60). Ce type de récepteur est un acteur majeur dans le système nerveux central. Il est responsable à la fois de la transmission neuronale rapide et de sa modulation. L'équipe d'Eli Lilly reporte l'utilisation d'un amino acide bicyclo[3.1.0]hexane comme inhibiteur du récepteur mGlu_{2/3}. Des études *in-vitro* sur des rats sont actuellement en cours d'investigation.

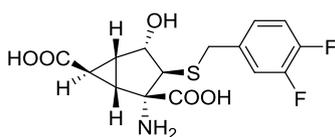


Figure 60: Amino-acide bicyclo[3.1.0]hexane développé par Eli Lilly

Satyanarayanajois et al.¹⁵² ont travaillé sur l'utilisation d'un peptidomimétique afin de mimer un brin β de la protéine d'adhésion cellulaire CD2 qui se lie à son ligand CD58. Cette interaction protéine-ligand participe à la réponse du système immunitaire. Afin de mimer ce brin β , ils ont utilisé un inducteur de coude β , le dérivé dibenzofurane.

Lubell et al.¹¹⁶ ont travaillé sur la régulation du récepteur de la prostaglandine F₂ α en utilisant un peptidomimétique. Ce récepteur se retrouve impliqué lors des naissances prématurées. Les naissances prématurées sont la cause majeure de mortalité périnatale à travers le monde. Afin d'inhiber les contractions utérines et de prolonger la gestation dans un modèle murin, Lubell a utilisé un azapeptide comme modulateur du récepteur de la prostaglandine F₂ α afin de perturber le mécanisme de signalisation.

Seebach¹⁵³ et al. décrivent de nombreuses autres applications biologiques où des β -peptidomimétiques peuvent être utilisés en tant qu'agonistes ou antagonistes. Comme par exemple les protéines impliquées dans le complexe majeur d'histocompatibilité, les protéines de transport lipidique (SR-B1), les oncoprotéines (RDM2), les protéines de fusion (HIVgp41) ou encore le récepteur CD40 de réponse immunitaire au TNF et bien d'autres pathologies.

¹⁵⁰ Fernandez, D.; Torres, E.; Aviles, F. X.; Ortuno, R. M.; Vendrell, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3824-3828

¹⁵¹ Witkin, J. M.; Ornstein, P. L.; Mitch, C. H.; Li, R.; Smith, S. C.; Heinz, B. A.; Wang, X. -S.; Xiang, C.; Carter, J. H.; Anderson, W. H.; Li, X.; Broad, L. M.; Pasqui, F.; Fitzjohn, S. M.; Sanger, H. E.; Smith, J. K.; Catlow, J.; Swanson, S.; Monn, J. A. *Neuropharmacology* **2017**, *115*, 100-114

¹⁵² Gokhale, A.; Weldeghiorghis, T. K.; Taneja, V.; Satyanarayanajois, S. D. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5307-5319

¹⁵³ Seebach, D.; Gardiner, J. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1366-1375

V. Conclusion

Il est à noter, que la plupart des modifications structurelles décrites dans les paragraphes précédents influencent les structures secondaires du peptide en agissant sur les interactions intramoléculaires, comme la formation de liaison hydrogène. De plus, ces modifications structurelles conduisent à une meilleure stabilité vis-à-vis de la protéolyse.

Nous avons vu que les peptidomimétiques pouvaient avoir des débouchés à la fois dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques mais également dans le développement de nouveaux nanobiomatériaux. La frontière entre ces deux domaines est extrêmement faible. Il est possible d'envisager dans les années à venir une combinaison de ces deux technologies, comme par exemple l'utilisation de nanobiomatériaux (nanotubes ou nanofibres) comme vecteurs de distribution de petites molécules ou peptides comme agents thérapeutiques.

Chapitre III : Accès à de nouveaux
squelettes originaux à partir de
l'aucuboside, un iridoïde naturel

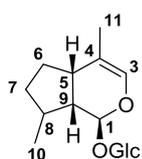
I. Equipe Pharmacognosie, Chimie des Substances Naturelles et Electrochimie

La pharmacognosie¹⁵⁴ (du grec *pharmakon* signifiant drogue, venin, poison et *gnosis* signifiant connaissance) est une science pharmaceutique dont le champ d'étude et de recherche concerne l'ensemble des substances d'origine naturelle et les matières premières dont elles sont issues, présentant une activité biologique à l'origine d'applications thérapeutiques ; ces substances naturelles, le plus souvent des métabolites secondaires, proviennent de sources variées : végétaux, animaux, produits de fermentation de micro-organismes et, depuis peu, organismes marins. Science appliquée interdisciplinaire et collaborative, à l'interface des domaines physico-chimiques et biologiques, dont la finalité est double : connaissance approfondie des substances naturelles déjà connues et exploitées ; recherche de nouvelles substances naturelles à potentialité thérapeutique par elles-mêmes ou après transformation hémisynthétique, ou pouvant servir de modèle structural pour préparer par synthèse de nouvelles substances biologiquement actives.

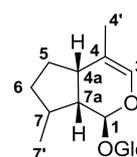
Le laboratoire de Pharmacognosie se consacre notamment à l'étude et à la valorisation des métabolites secondaires naturels présents dans le règne végétal, comme la famille des iridoïdes.

1. Les iridoïdes

La structure générale des iridoïdes est la suivante :



(1S)-1-(O-β-D-glucopyranosyl)-
1,5,6,7,8,9-hexalhydrocyclopentano[c]pyrane



(1S)-1-(O-β-D-glucopyranosyl)-
1,4a,5,6,7,7a-hexalhydrocyclopentano[c]pyrane

Figure 61: Nomenclature usuelle (à gauche) et nomenclature IUPAC (à droite)

¹⁵⁴ Dictionnaire de l'Académie de Pharmacie

Par la suite, nous nous référerons à la nomenclature usuelle (Figure 61). La famille des iridoïdes peut être classée en deux catégories, comme le propose A. Bianco¹⁵⁵ : les alcaloïdes et les composés neutres. Les premiers sont peu nombreux et les seconds se divisent en quatre groupes : les iridoïdes simples, les sécoiridoïdes, les bisiridoïdes et les glycosides d'iridoïdes. Nous allons nous intéresser sur le dernier groupe.

Les glycosides d'iridoïdes sont des monoterpénoïdes glycosylés possédant une génine de squelette cyclopenta[c]pyrane chiral stabilisée par une liaison O-glycosidique au niveau du carbone C₁. Les variations structurales se trouvent au niveau de la génine et au niveau de la partie glycosidique.

1.1. Modifications au niveau de la génine

Les glycosides d'iridoïdes peuvent être classés en fonction de la présence ou de l'absence du carbone C₁₁ ainsi que de son état d'oxydation (Figure 61). Le carbone C₁₀ peut être également absent. Dans la plupart des cas la jonction de cycle entre le cyclopentane et le noyau pyrane est *cis*. Les groupements fonctionnels portés par la génine peuvent être de stéréochimie, de position ou de nature différente. Cependant, les substituants les plus observés sont des hydroxyles. Ces derniers peuvent également être trouvés sous forme d'ester (acétyle, benzoyle, cinnamoyle ...). D'autres fonctions peuvent également être observées comme des insaturations, des carbonyles, des carboxyles, des halogènes, des époxydes...

1.2. Modifications au niveau de la partie glycosidique

Les glycosides d'iridoïdes portent une ou plusieurs unité(s) osidiques, le plus souvent un motif glucose. Les unités osidiques sont portées soit sur le carbone C₁, soit sur un carbone portant une autre fonction hydroxyle. Les sucres portés peuvent être de nature différente que celui portant sur le carbone C₁^{156,157,158}.

Les glycosides d'iridoïdes sont fortement fonctionnalisés et largement répandus dans de nombreuses familles végétales (Apocynaceae, Scrophilariaceae, Verbenaceae, ...). Il n'est pas rare pour les plus communs d'entre eux d'être biosynthétisés abondamment par certaines espèces végétales. C'est par exemple le cas de l'aucuboside.

¹⁵⁵ Bianco, A. *Elsevier Science* **1990**, 7, 439-497

¹⁵⁶ Boros, C. A.; Stermitz, F. R. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 1055-1147

¹⁵⁷ Dinda, B.; Debnath, S.; Harigaya, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, 55, 159-222

¹⁵⁸ Dinda, B.; Debnath, S.; Banik, R. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, 59, 803-833

II. L'aucuboside

1. Historique

Nous avons vu précédemment que l'aucuboside **1** appartenait au groupe des glycosides d'iridoïdes. Sa formule développée est donnée ci-dessous (Figure 62).

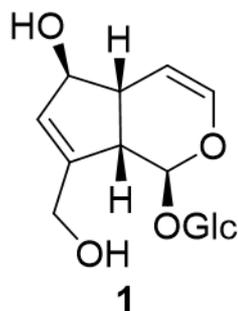


Figure 62: Aucuboside **1** (à gauche) et *Aucuba japonica* Thumb. (à droite)

Cet iridoïde a été isolé pour la première fois par H. Ludwig¹⁵⁹ en 1856 à partir des graines de *Rhinanthus crista galli* Linn et nommé rhinantine. En 1902, E. Bourquelot et H. Hérissey¹⁶⁰ extraient un composé d'abord nommé aucubine puis finalement aucuboside. Ce composé est extrait des fruits de l'*Aucuba japonica* Thumb., une Cornaceae. C'est quelques années plus tard, que la rhinantine et l'aucuboside sont comparés et s'avèrent être un seul et même composé. La structure de **1** sera totalement connue et déterminée dans les années 1960 grâce à plusieurs équipes de recherche (Fujise¹⁶³, Grimshaw, Juneja¹⁶¹ et Schmid¹⁶²) par des études de dégradations et de réactions chimiques caractéristiques des différents groupements fonctionnels ainsi que des méthodes spectroscopiques (IR et RMN). Finalement, c'est en 1964, que les quatre centres asymétriques de la génine seront définis par Uda et al.¹⁶³.

1.1. Structure

Pour des raisons de simplicité de langage, nous utiliserons la nomenclature usuelle, ainsi que le nom d'aucuboside (aucubin en anglais) pour se référer au composé **1**. Le β -D-glucose sera abrégé en Glc.

¹⁵⁹ Ludwig, H. *Arch. Pharm.* **1868**, 186, 64

¹⁶⁰ Bourquelot, E.; Hérissey, C. *R. Acad. Sc.* **1902**, 134, 1441-1443

¹⁶¹ Grimshaw, J.; Juneja, H. R. *Chem. And. Ind.* **1960**, 656-657

¹⁶² Karrer, P.; Schmid, H. *Helv. Chim. Acta* **1976**, 29, 525-552

¹⁶³ Uda, H.; Murayama, M.; Kabuki, K.; Fujise, S. *Nippon Kagaku Zasshi* **1960**, 81, 677-678

La génine de l'aucuboside appelée aucubogénine est fortement fonctionnalisée. Elle possède des groupements hydroxyles allyliques (un primaire en C₇ et un secondaire en C₅), ainsi que deux insaturations (double liaison entre C₃=C₄ et C₇=C₈). La double liaison en C₃=C₄ peut être assimilée à un éther d'énol. Ces deux fonctions hydroxyles et les deux insaturations ont une réactivité chimiosélective bien différente.

Les carbones C₁ et C₃ sont des aldéhydes masqués.

Enfin, l'aucubogénine possède quatre centres asymétriques au niveau des carbones C₁, C₅, C₆ et C₉.

1.2. Extraction

L'aucuboside **1** peut être obtenu en large quantité par extraction aqueuse à partir des feuilles d'*Aucuba japonica* Thumb. (Figure 62) puis purifié sur colonne chromatographique avec gel de silice ou par chromatographie par partage centrifuge¹⁶⁴. L'aucuboside se trouve être le plus répandu des iridoïdes et il est également présent dans de nombreuses familles de plantes. C'est à partir de l'*Aucuba japonica* Thumb. qu'il peut être extrait à grande échelle.

L'*Aucuba japonica* est un arbuste touffu ornemental à feuillage persistant de la famille des *Cornaceae*. Il est originaire d'Asie du Sud-Est et se trouve désormais dans toutes les zones tempérées où il orne de nombreux parcs et jardins. Il peut faire jusque deux mètres de haut et quatre mètres de large. Ses feuilles sont de taille moyenne (20 cm par 12), dentées et persistantes. Elles sont de couleur verte, panachées de jaune. Les feuilles noircissent très vite lors du séchage. Les fleurs sont en forme d'étoiles violettes et apparaissent au mois d'avril. Les fruits de taille moyenne également (2 cm par 1,5 cm) sont ovoïdes. Ils se présentent d'abord de couleur verte, puis deviennent rouge vif en février, lorsqu'ils arrivent à maturité et peuvent persister jusqu'à la saison suivante.

La composition chimique détaillée de toutes les parties de l'*Aucuba japonica* n'a pas été effectuée. L'aucuboside est le métabolite secondaire le plus abondant dans la plante. Il peut être isolé dans toutes les parties de la plante (feuilles, fruits, graines).

Mois	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier
Teneur (%)	2,8	3,7	/	4.0	4.1	3.2	2.8

Tableau 2: Teneur en aucuboside en fonction du mois de collecte à partir des parties aériennes fraîches

¹⁶⁴ Markovic, D.; Barboux, C.; Salle de Chou, Y.; Bettach, J.; Grougnet, R.; Deguin, B. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 63254-63259

Il a été démontré par Chaslot¹⁶⁵ que selon la période de collecte de la plante, le rendement d'extraction varie (Tableau 2). En fonction de la période de récolte, de la partie de la plante utilisée, ainsi que de la technique d'extraction employée, les rendements d'extraction peuvent varier. De nombreuses techniques d'extraction plus ou moins sophistiquées peuvent être utilisées pour extraire l'aucuboside.

1.3. Propriétés biologiques de l'aucuboside

Nous traiterons les propriétés biologiques de l'aucuboside dans trois parties distinctes. La première traitera du rôle de l'aucuboside dans l'écologie végétale et animale. Dans la seconde, nous détaillerons les activités pharmacologiques de l'aucuboside. Et pour finir dans une troisième partie, nous développerons son mécanisme d'action.

1.3.1. Rôle de l'aucuboside dans l'écologie végétale et animale

Les iridoïdes et l'aucuboside sont des métabolites secondaires très actifs et possèdent un rôle majeur dans les relations hôte-prédateur (comme les végétaux et leurs prédateurs insectes herbivores mais aussi comme les insectes et leurs prédateurs oiseaux)^{166,167}.

L'aucuboside présent chez certaines espèces de plantes nommées plantes-hôtes joue un rôle important au niveau de la spécialisation des insectes herbivores.

Il a été démontré que dans certains cas, la plante produit de l'aucuboside pour son mécanisme de défense (substance toxique ou dissuasive), pour se protéger de certains insectes phytophages comme les larves de papillons et les chenilles.

Dans d'autres cas, l'aucuboside va au contraire stimuler l'appétit et l'oviposition (action de déposer des œufs) de certaines espèces de papillons^{168,169}. Il a même été observé parfois que des insectes étaient capables de séquestrer l'aucuboside au cours du développement de la larve et de le conserver tout au long de leur vie dans leur organisme afin d'assurer une protection face à leurs prédateurs^{170,171}. Certains insectes sont même capables de modifier l'aucuboside.

¹⁶⁵ Chaslot, M. Thèse de doctorat, Université de Pharmacie, Paris Descartes **1955**

¹⁶⁶ Darrow, K.; Deane Bowers, M. *Biochem. System. Ecol.* **1997**, *25*, 1-11

¹⁶⁷ Morgan, E.; Wilson, I.; Meth-Cohn, O.; Barton, D.; Koji, N. *In Comprehensive Natural Products Chemistry*; Pergamon: Oxford **1999**, 263-375

¹⁶⁸ Barton, D.; Meth-Cohn, O.; Mori, K.; Nakanishi K. *In Comprehensive Natural Products Chemistry*; Ed. Elsevier: Amsterdam **1999**, *8*, 302-307

¹⁶⁹ Reudler Talsma, J. H.; Biere, A.; Harvey, J. A.; van Nouhuys, S. *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 1202-1212

¹⁷⁰ Hirayama, C.; Konno, K.; Nakamura, M.; Yasui, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, *96*, 9159-9164

¹⁷¹ Opitz, S. E. W.; Jensen, S. R.; Müller, C. *J. Chem. Ecol.* **2010**, *36*, 148-157

1.3.2. Les activités pharmacologiques de l'aucuboside

Parmi les plantes utilisées couramment en médecine traditionnelle, il n'est pas rare de trouver des plantes produisant des iridoïdes. Les drogues à iridoïdes sont employées en phytothérapie pour leurs propriétés : tonique amer, neurosédative, antipyrétique, antitussive, hypotensive et dans le traitement des douleurs rhumatismales, et de diverses affections et plaies cutanées. Ainsi, l'utilisation de ces plantes ou de leurs extraits a conduit à étudier les activités pharmacologiques de ces terpénoïdes et à prouver qu'ils pouvaient être le principe bioactif.

Un nombre important de revues^{157,157,172} a fait le point sur les activités biologiques et pharmacologiques de cette classe de métabolites. Elles montrent qu'ils peuvent présenter des activités antiallergique, anti-hépatotoxique, anti-inflammatoire, antispasmodique, antivirale, anti-tumorale, anti-protazoaire et antibiotique. Malgré cette grande palette d'activités pharmacologiques et biologiques, ces iridoïdes présentent un manque cruel de spécificité et ne sont donc pas utilisés comme principe actif pur.

En ce qui concerne l'aucuboside **1** à proprement parler, des activités *in-vivo* ont été révélées chez l'animal. Les principales activités pharmacologiques sont d'être : anti-inflammatoire et la propriété d'augmenter la synthèse du collagène¹⁷³. L'aucuboside présente également des propriétés hépatoprotectives très intéressantes par rapport aux intoxications par le tetrachlorure de carbone (CCl₄) ainsi que par l' α -amanitine¹⁷⁴. Dernièrement, l'aucuboside a également été évalué comme un neuroprotecteur potentiel. Cette activité a été mise en évidence de deux manières. La première consistait à étudier la promotion d'activité d'antioxydants endogènes enzymatiques chez des modèles de rats diabétiques présentant une encéphalopathie^{175,176}. La seconde manière était d'étudier l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans les cellules PC12¹⁷⁷. L'aucuboside possède également un effet photoprotecteur¹⁷⁸. En effet, il réagit avec les espèces réactives de l'oxygène générées par les UVB, ce qui permet la protection des cellules et de la peau.

In-vitro, l'aucuboside possède des activités inhibitrices face à l'hépatite B par inhibition de la réplication de l'ADN du virus¹⁷⁹. Cette activité est observée uniquement lorsque le composé **1** est mis en présence

¹⁷² Ghisalberti, E. L. *Phytomedicine* **1998**, *5*, 147-163

¹⁷³ Che, Q. M.; Koike, K.; Li, Y.; Metori, K.; Sato, T.; Takahashi, S. *Biol. Pharm. Bull.* **1998**, *21*, 1306-1310

¹⁷⁴ Chang, I. M.; Ryu, J. C.; Park, Y. C.; Yun, H. S.; Yang, K. H. *Drug Chem. Toxicol.* **1983**, *6*, 443-453

¹⁷⁵ Xue, H.-Y.; Jin, L.; Jin, L.-J.; Li, X.-Y.; Zhang, P.; Ma, Y.-S.; Lu, Y.-N.; Xia, Y.-Q.; Xu, Y.-P. *Phytotherapy Res.* **2009**, *23*, 980-986

¹⁷⁶ Xue, H. Y.; Lu, Y. N.; Fang, X. M.; Xu, Y. P.; Gao, G. Z.; Jin, L. J. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 9311-9318

¹⁷⁷ Xue, H.-Y.; Gao, G.-Z.; Lin, Q.-Y.; Jin, L.-J.; Xu, Y.-P. *Phytotherapy Res.* **2012**, *26*, 369-374

¹⁷⁸ Ho, J. N.; Lee, Y. H.; Park, J. S.; Jun, W. J.; Kim, H. K.; Hong, B. S.; Shin, D. H.; Cho, H. Y. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1244-1248

¹⁷⁹ Chang, I.-M. *Phytotherapy Res.* **1997**, *11*, 189-192

de β -glucosidase. Il a été également observé que l'aucubogénine seule présente *in-vitro* une activité antibactérienne¹⁸⁰, mais aussi cytotoxique sur des cellules de leucémie P388¹⁸¹.

1.3.3. Mécanisme d'action de l'aucuboside

Les mécanismes d'action sur lesquels reposent les différentes activités biologiques et pharmacologiques sont restés longtemps inconnus. Il semble désormais établi que les iridoïdes sont des précurseurs d'un agent d'alkylation. Cette propriété semble venir de leur génine.

Ainsi, Bartholomaeus et Ahokas estiment que l'aucubogénine peut être considérée comme un dérivé 1,5-dialdéhyde masqué. Ce type de système 1,5-dialdéhyde peut être envisagé comme un analogue du glutaraldéhyde¹⁸². Konno et al.¹⁷⁰ envisagent même de dénommer les glycosides d'iridoïdes, « glycosides du glutaraldéhyde ». L'aucuboside est employé en biologie et médecine comme virucide, bactéricide et même fixateur pour les coupes histologiques. Ils ont démontré qu'en présence de β -glucosidase, l'aucuboside est capable de se lier de manière irréversible aux protéines via les groupements ϵ -amino des lysines, ainsi que les thiols des cystéines. En formant des liaisons covalentes irréversibles, le composé **1** présente une activité dénaturante vis-à-vis de l'ovalbumine, protéine de réticulation. L'activité développée par l'aucuboside est supérieure à celle du glutaraldéhyde. L'effet indiquant cette interaction et qui peut être facilement mesuré est la diminution du taux de lysine disponible. Un effet similaire peut être également observé avec des séries de composés naturels alkylants qui régissent les relations plante-prédateur comme par exemple les quinones, les époxydes... La diminution de la quantité de lysine, qui se trouve être un acide aminé essentiel, entraîne une carence nutritive, ainsi qu'un retard de croissance. Pour comprendre le mécanisme d'action des activités biologiques des glycosides d'iridoïdes, il est important de connaître la stabilité de ces composés en milieu acide, mais aussi en présence d'enzyme comme la β -glucosidase.

Ainsi, Frederiksen et Smertitz ont étudié très largement les « Pyridine Monoterpene Alkaloids »¹⁸³ (PMTA). Ces PMTA sont obtenus par traitement des glycosides d'iridoïdes en milieu acide ou alors en présence de β -glucosidase. Dans ces conditions, la génine est libérée et se réarrange. Les tests menés sur les PMTA ont permis de mettre en évidence que certaines d'entre elles montraient des effets anti-inflammatoire, sédatif, hypoglycémiant, hypotenseur et relaxant musculaire. Par analogie, il a été

¹⁸⁰ Davini, E.; Javarone, C.; Trogolo, C.; Aureli, P.; Pasolini, B. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 24202-2422

¹⁸¹ Isiguro, K.; Yamaki, M.; Takagi, S.; Ikeda, Y.; Kawakami, I.; Nose, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2375-2379

¹⁸² Bartholomaeus, A.; Ahokas, J. *Toxicol. Lett.* **1995**, *80*, 75-83

¹⁸³ Frederiksen, S.; Smertitz, F. R. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 41-46

démonstré que l'aucuboside et d'autres glycosides d'iridoïdes, lorsqu'ils sont en contact avec des bactéries intestinales humaines, libèrent leur génine et sont réarrangés en alcaloïdes monoterpéniques du type pyrimidine (aucubinines A et B¹⁸⁴).

III. La chimie et la réactivité de l'aucuboside

La connaissance et l'étude de la réactivité de chaque fonction présente sur l'aucuboside est très importante pour utiliser cette molécule comme matière première, source de diversité chimique. Elles ont pour objectif l'accès à des séries chimiques originales obtenues par réarrangement du squelette cyclopenta[c]pyrane que l'on associe à des transformations fonctionnelles. Une chimiosélectivité a été observée lors des réactions de réduction des hydroxyles, des réactions de substitution catalysées par le palladium mais aussi lors des réactions de protection/déprotection.

1. Réactivité des hydroxyles en position C₆ et C₁₀

1.1. Réduction de Birch

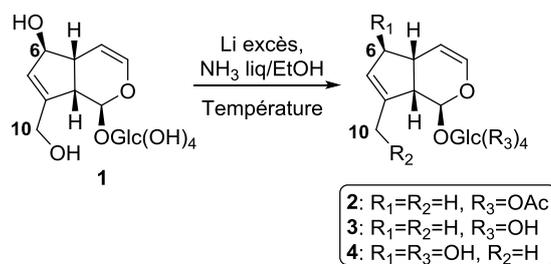


Figure 63: Réductions des groupements hydroxyles à partie de l'aucuboside

Birch et al.¹⁸⁵ ont montré que la réduction sélective des deux hydroxyles allyliques pouvait être obtenue en traitant l'aucuboside avec un mélange de lithium métal en excès dans un mélange éthanol/ammoniac liquide (-40 °C) (Figure 63). Après une rapide réaction d'acétylation des hydroxyles du sucre qui n'ont pas été réduits, ils obtiennent le 6,10-didésoxytetraacétylaucuboside **2** avec un rendement de 32 %. Dans les décennies suivantes, d'autres équipes de recherche se sont penchées sur la réaction de réduction mise au point par Birch. Ainsi, Bianco et al.¹⁸⁶ ont réalisé la même réaction en se plaçant à -60 °C. Ils isolent directement le 6,10-didésoxyaucuboside **3** avec un rendement de 24 % et le 10-

¹⁸⁴ Masao, H.; Yukio, K.; Kazuyo, I.; Yue-Zhong, S.; Qing-Ming, C.; Tsuneo, N.; Kyoichi, K. *Phytother. Res.* **2006**, *4*, 66-70

¹⁸⁵ Birch, A. J.; Grimshaw, J.; Juneja, H. R. *J. Chem. Soc.* **1961**, 5194-5198

¹⁸⁶ Bianco, A.; Guiso, M.; Iavarone, C.; Passacantilli, P.; Trogolo, C. *Gazz. Chim. Ital.* **1977**, *107*, 83-85

didésoxyaucuboside **4** avec un rendement de 40 %. Davini et al.¹⁸⁷ et Bonini et Di Fabio¹⁸⁸ en effectuant la réaction à -90 °C, ont obtenu le composé **4** avec un rendement de 80 % et le composé **3** avec un rendement de 10 %.

1.2. Réduction par le palladium en présence d'acide formique

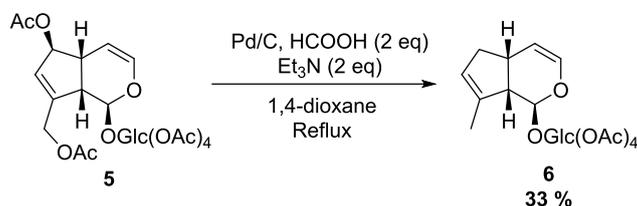


Figure 64: Réduction des acétates allyliques à partir de peracétylaucuboside

La réduction des deux acétates allyliques en partant du peracétylaucuboside **5** peut être réalisée en présence de Pd/C, d'acide formique et de triéthylamine dans le 1,4-dioxane (Figure 64). Cette méthodologie a été démontrée par Jensen et al.¹⁸⁹ Ils ont obtenu le 6,10-didésoxytetraacétylaucuboside **6** avec un rendement de 33 %.

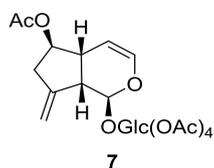


Figure 65: Sous-produit obtenu par Weinges et al.

En reprenant ces mêmes conditions réactionnelles, le groupe de Weinges et al.¹⁹⁰ a obtenu le composé **6** avec un rendement de 35 % et également un sous-produit **7** acétylé où la double liaison entre le C₇-C₈ s'est isomérisée (Figure 65).

¹⁸⁷ Davini, E.; Iavarone, C.; Mataloni, F.; Trogolo, C. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2089-2091

¹⁸⁸ Bonini, C.; Di Fabio, R. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 5199-5200

¹⁸⁹ Jensen, S. R.; Kirk, O.; Nielsen, B. J. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1949-1954

¹⁹⁰ Weinges, K.; Schick, H.; Ziegler, H. *J. Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *8*, 1623-1626

1.3. Substitution du groupement acétyle en position C₁₀

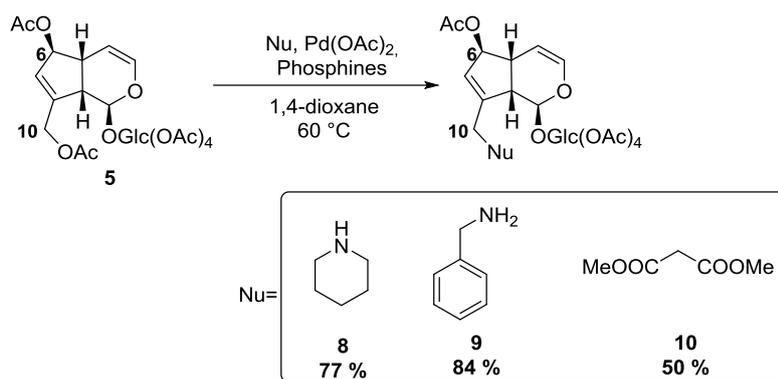


Figure 66: Couplage de Tsuji-Trost à partir du peracétylaucuboside

Il est connu que dans la littérature, il est possible de substituer par un nucléophile une fonction allylique portant un groupement acétyle. Cette réaction, connue sous le nom de couplage pallado-catalysé de Tsuji-Trost, s'effectue en présence d'un catalyseur au palladium II (Figure 66). Weinges et al.¹⁹¹ ont réalisé cette substitution sur le carbone C₁₀ du peracétylaucuboside. Les nucléophiles employés sont la benzylamine, la pipéridine ou encore le motif malonate. Ce couplage est réalisé dans le 1,4-dioxane à 60°C, avec de la triphénylphosphine et de la tris-*O*-trosylphosphine, en présence d'acétate de palladium.

2. Réactions de protection/déprotection des groupements hydroxyles

Le but est de pouvoir différencier de façon efficace et simple les groupements hydroxyles de l'aucuboside. Des réactions de protection/déprotection sélectives des hydroxyles ont été recherchées afin de réaliser des modifications chimiques sur les alcools libres. Différentes méthodologies ont ainsi été testées et développées en laboratoire.

¹⁹¹ Weinges, K.; Ziegler, H. J. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 109-111

2.1. Réaction de benzylation

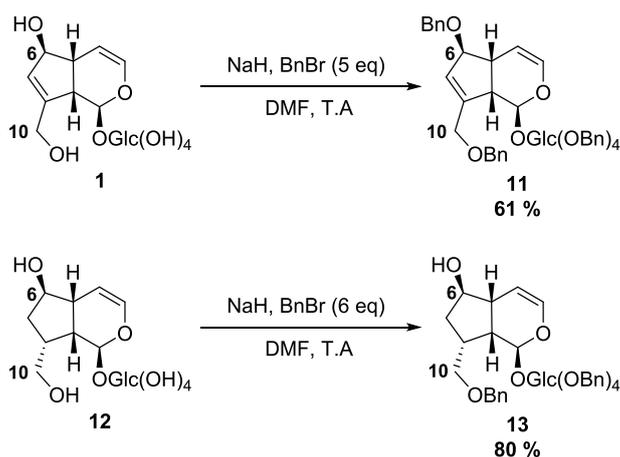


Figure 67: Réaction de benzylation de l'aucuboside et du dihydroaucuboside

Il a été montré que la benzylation de l'aucuboside **1** était possible¹⁹² (Figure 67). Néanmoins cette réaction ne présente aucune sélectivité. Dans la DMF, en présence de 5 équivalents de bromure de benzyle et d'hydrure de sodium, le composé *perbenzylaucuboside* **11** est formé avec un rendement de 61 %.

Cette même réaction, conduite sur le composé dihydroaucuboside **12** en présence de 6 équivalents de bromure de benzyle et d'hydrure de sodium dans la DMF¹⁹³, a montré cette fois que l'alcool en position C₆ n'est pas protégé par un groupement benzyle et reste libre. Cette sélectivité peut être expliquée du fait que les alcools primaire et secondaire du composé **12** ne possèdent plus un caractère allylique. La position C₆ du composé **12** doit présenter un encombrement stérique qui empêche la protection d'opérer. Le *perbenzylidihydroaucuboside* **13** est donc obtenu avec un rendement de 80 %.

2.2. Réaction de pivaloylation/dépivaloylation

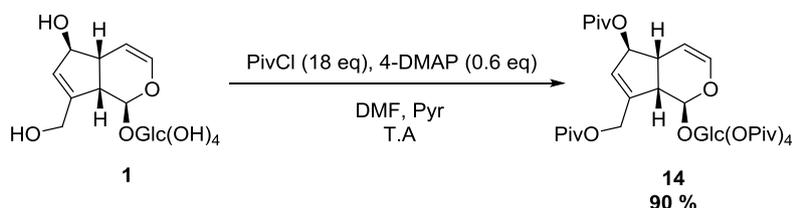


Figure 68: Réaction de pivaloylation de l'aucuboside

La pivaloylation de l'aucuboside **1** consiste à transformer les groupements alcools en ester pivaloate. Cette réaction est réalisée avec un très large excès de chlorure de pivaloyle (3 équivalents par fonction

¹⁹² Cachet, X. Thèse de doctorat, Université Paris-Descartes, Paris, 2000

¹⁹³ Tixidre, A. Thèse de 3^{ème} cycle, Université Paris-Sud, Orsay, 1980

à protéger), en présence de 4-*N,N'*-diméthylaminopyridine (4-DMAP) qui sert de catalyseur (Figure 68). L'aucuboside est solubilisé dans un mélange de pyridine/dichlorométhane. Le milieu réactionnel est agité pendant une semaine à température ambiante afin d'obtenir après purification le *perpivaloylaucuboside* **14** avec un rendement de 90 %.

Si l'on utilise un nombre d'équivalents plus faible, aucune sélectivité n'a été observée.

Pour la déprotection des ester pivaloates, si l'on utilise du *tert*butoxide de potassium (*t*-BuOK) à basse température, l'ensemble des esters se trouve clivé. L'emploi d'hydroxyde de lithium (LiOH) ou de méthanolate de sodium (MeONa) à température ambiante conduit à la même observation.

2.3. Réaction d'acétylation/déacétylation

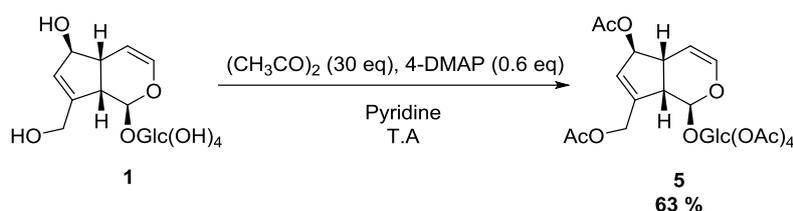


Figure 69: Réaction d'acétylation de l'aucuboside

Comme précédemment, la formation d'acétate n'est pas sélective. En partant de l'aucuboside, on obtient toujours le composé **5** totalement acétylé (Figure 69). La *per*acétylation, pour être plus rapide, a lieu en faisant réagir un très large excès d'anhydride acétique sur l'aucuboside **1** en présence de 4-DMAP catalytique dans la pyridine anhydre. La réaction est menée à température ambiante pendant une nuit. Le *per*acétylaucuboside est obtenu après purification avec un rendement quantitatif.

En revanche, il est possible de réussir à déprotéger sélectivement les acétates.

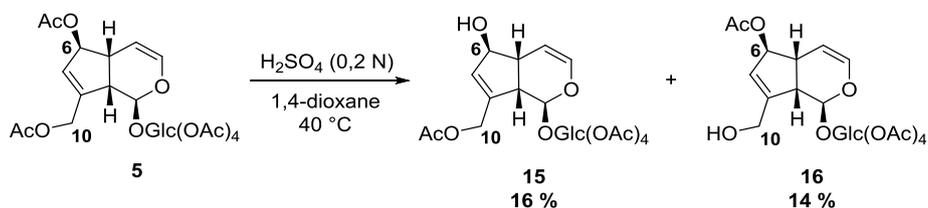


Figure 70: Déprotection des acétates par hydrolyse acide modérée

Bianco et al.¹⁹⁴ ont montré que l'hydrolyse acide ménagée des acétates du composé **5** avec de l'acide sulfurique dilué (0,2 N), permettait d'obtenir une déprotection sélective des groupements acétates en

¹⁹⁴ Bianco, A.; Passacantilli, P.; Nicoletti, M.; Alves De Lima, R. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 359-362

positions C₆ et C₁₀ (Figure 70). Il est donc possible d'obtenir le composé 6-désacétylaucuboside **15** avec un rendement de 16 % et le composé 10-désacétylaucuboside **16** avec un rendement de 14 %.

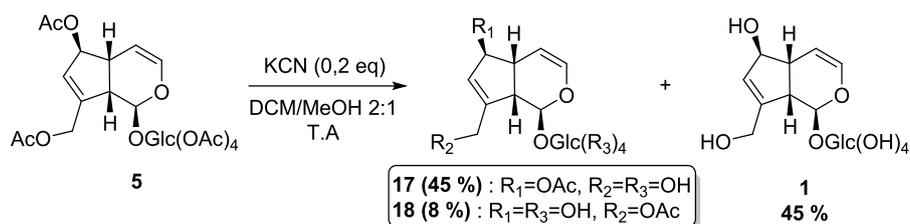


Figure 71: Déprotection sélective des acétates par le cyanure de potassium

Une nouvelle méthodologie développée au laboratoire par Xavier Cachet¹⁹⁵, a permis d'obtenir le 6-acétylaucuboside **17** et le 10-acétylaucuboside **18** avec des rendements respectifs de 45 % et 8 % (Figure 71). Le reste de produit formé étant le composé totalement déprotégé qui n'est autre que l'aucuboside **1**. L'aucuboside peut alors être récupéré et engagé de nouveau dans une étape de protection. Cette nouvelle méthode de déprotection sélective est réalisée à partir d'une quantité catalytique de cyanure de potassium (KCN) dans un mélange DCM/MeOH.

2.4. Réaction de silylation/désilylation

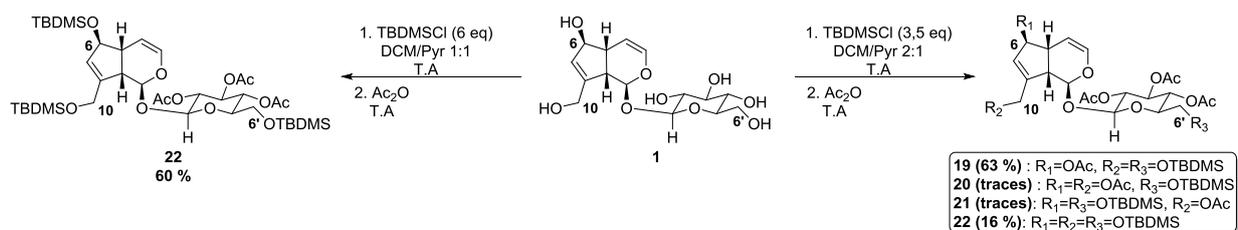


Figure 72: Réaction de silylation à partir de l'aucuboside

Au laboratoire, une large étude a été consacrée à la mise au point de conditions opératoires permettant la silylation régiosélective entre l'alcool primaire de la génine en C₁₀, l'alcool secondaire de la génine en C₆ et l'alcool primaire du glucose en C_{6'}. Le choix de la base et de la polarité du solvant sont des paramètres très importants pour obtenir une différence de cinétiques réactionnelles¹⁹⁶ (Figure 72).

La réaction de l'aucuboside avec 3,5 équivalents de chlorure de *tert*-butyldiméthysilyle (TBDMSCl) dans un mélange anhydre de pyridine/DCM (2:1) permet l'obtention de deux composés qui sont protégés simultanément sur les deux alcools primaires en C₁₀ et C_{6'}. Ainsi, le 6,2',3',4'-tetra-*O*-acétyl-10,6'-di-*O*-*tert*-butyldiméthysilylaucuboside **19** est obtenu après acétylation *in-situ* des hydroxyles libres restants. Le composé **19** est isolé avec un rendement de 63 % accompagné de deux autres composés monosilylés

¹⁹⁵ Cachet, X.; Deguin, B.; Koch, M.; Makhoulouf, K.; Tillequin, F. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 400-402

¹⁹⁶ Rakotondramasy, V. C.; Laschiazza, R.; Lecso-Bornet, M.; Koch, M.; Tillequin, F.; Deguin, B. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 19-23

uniquement sur l'alcool primaire. Le 6,10,2',3',4'-penta-*O*-acétyl-6'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylaucuboside **20** et 6,2',3',4',6'-penta-*O*-acétyl-10-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylaucuboside **21** sont obtenus sous forme de traces. Et pour finir, un composé silylé sur les deux alcools primaires en C₁₀ et C_{6'} et sur l'alcool secondaire C₆ de la génine est également formé. Ce composé 2',3',4'-tri-*O*-acétyl-6,10,6'-tri-*O*-*tert*-butyldiméthylsilylaucuboside **22** est obtenu avec 16 % de rendement. Il est possible de le former majoritairement avec un rendement de 60 % en faisant réagir l'aucuboside avec 6 équivalents de TBDMSCl toujours dans un mélange anhydre pyridine/DCM dans un ratio 1:1.

L'avantage d'effectuer « one pot » la réaction de silylation, suivi de l'acétylation des fonctions hydroxyles restantes permet d'obtenir le composé **22** avec un meilleur rendement. En effet, la purification s'en trouve grandement facilitée.

Le clivage des groupements silyles a été réalisé par un traitement avec de l'acide acétique (AcOH) dans un mélange THF/H₂O. La réaction est effectuée en une nuit à température ambiante et permet ainsi d'obtenir les dérivés acétylés ou pivaloylés présentant deux ou trois fonctions alcools libres. Les différents produits sont obtenus avec des rendements très corrects¹⁹⁷.

3. Réactivité des doubles liaisons de l'aucuboside

3.1. Réduction au niveau de la double liaison C₇=C₈

Nous avons vu précédemment que de nombreux travaux ont été effectués au niveau des hydroxyles de l'aucuboside. Maintenant, nous allons détailler les travaux qui ont été menés au sujet de la réactivité des doubles liaisons. La double liaison C₃=C₄ impliquée avec un groupement éther d'énol présente une très grande réactivité et sélectivité vis-à-vis d'électrophile, notamment si les alcools en C₆ et C₁₀ sont estérifiés. En revanche, la double liaison allylique C₇=C₈ présente quant à elle, une chimiosélectivité lors de l'hydrogénation.

3.1.1. Réduction en présence de palladium et d'hydrogène

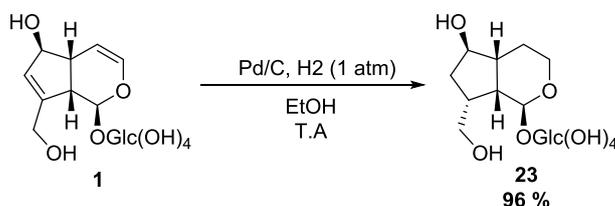


Figure 73: Réduction sous atmosphère d'hydrogène des doubles liaisons de l'aucuboside

¹⁹⁷ Rakotondramasy, V. C. Thèse de doctorat, Université Paris-Descartes, Paris 2005

En fonction des conditions et réactifs employés, les produits obtenus sont différents^{193,198} (Figure 73). En effet, l'hydrogénation de l'aucuboside en présence de Pd/C et sous atmosphère d'hydrogène dans l'éthanol conduit à la réduction des deux doubles liaisons pour former le tetrahydroaucuboside **23** avec un rendement de 96 %. L'addition des deux atomes d'hydrogène sur la double liaison allylique est stéréosélective. L'addition est réalisée sur la face la moins encombrée.

3.1.2. Réduction par le palladium en présence d'acide formique

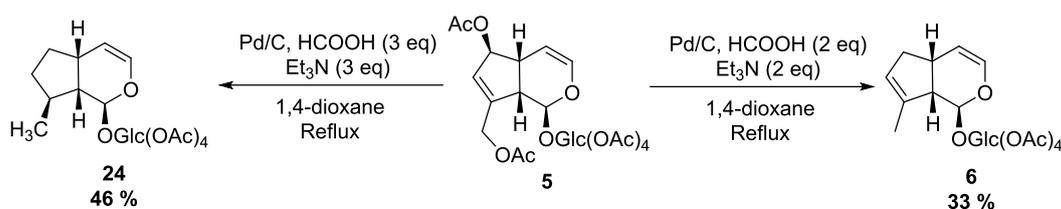


Figure 74: Hydrogénolyse des acétates allyliques et réduction de la double liaison C₇=C₈

Pour rappel, nous avons déjà vu que l'hydrogénolyse des groupements acétates en position C₆ et C₁₀ du peracétylaucuboside **5** était possible en faisant réagir deux équivalents d'acide formique et de triéthylamine en présence de Pd/C dans le dioxane au reflux¹⁸⁹ (Figure 74).

Si l'on applique les mêmes conditions réactionnelles mais en utilisant cette fois-ci trois équivalents d'acide formique et trois équivalents de triéthylamine, la double liaison allylique en C₇=C₈ peut être également réduite¹⁹⁹ pour donner le 6,10-didésoxydihydroperacétylaucuboside **24**. Ce composé est obtenu avec un rendement de 46 %. La réduction de la double liaison est stéréosélective et suggère une addition des atomes d'hydrogène sur la face la plus encombrée. Cette sélectivité n'a pas été discutée par les auteurs.

4. Réactions électrophiles au niveau de la double liaison C₃=C₄

Les réactions électrophiles au niveau de la double liaison du noyau pyranique ont été réalisées à l'aide de la formylation de Vilsmeier-Haack, d'une réaction de métallation et pour finir la réaction d'halogénéation.

¹⁹⁸ Tixdre, A.; Rolland, Y.; Gamier, J.; Poisson, J. *Heterocycles* **1982**, *19*, 253-256

¹⁹⁹ Weingnes, K.; Ziegler, H. J.; Mauer, W.; Schmidbauer, S. B. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 1029-1031

4.1. La formylation de Vilsmeier-Haack

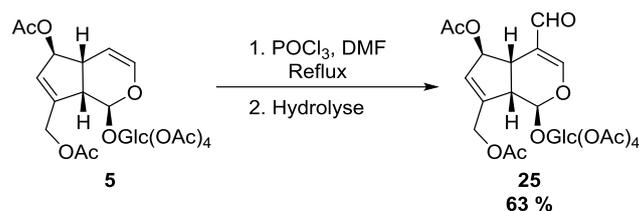


Figure 75: Réaction de Vilsmeier sur le peracétylaucuboside

Il est possible d'introduire sur le composé **5** une fonction aldéhyde en position C₄ en utilisant le réactif de Vilsmeier qui est généré *in-situ* à partir du DMF et de POCl₃ (Figure 75). Cette substitution est régiosélective étant donné que la position 4 est grandement plus réactive vis-à-vis d'un électrophile. Rosendal et al.²⁰⁰ ont ainsi obtenu le composé **25** avec un rendement de 63 %.

En traitant le composé **25** par le triméthylsilyldiazométhane et en fonction de la température, du solvant et du catalyseur employés, il est possible d'obtenir après déprotection des groupements protecteurs, l'un ou l'autre des motifs oxépanes²⁰¹ de la Figure 76.

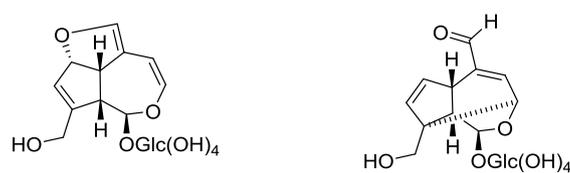


Figure 76: Motifs oxépanes

4.2. Réactions de métallation

4.2.1. Réaction d'hydroxymercuration/démercuration

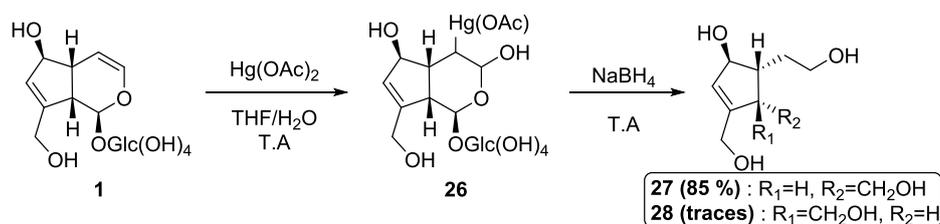


Figure 77: Réaction d'hydroxy-mercuration/démercuration

²⁰⁰ Rosendal, S.; Kirk, O.; Nielsen, B. J. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1949-1954

²⁰¹ Lemus, C.; Koch, M.; Michel, S.; Deguin, B. *ARKIVOC* **2014**, *iii*, 184-196

Le mercure, qui est un métal présentant un caractère électrophile important, peut facilement être additionné sur une double liaison. En faisant réagir l'aucuboside **1** en présence de di-acétate de mercure $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ dans un mélange THF/ H_2O , celui-ci s'additionne sur la double liaison $\text{C}_3=\text{C}_4$ pour conduire à un adduit organomercuriel **26** (Figure 77). Cet adduit peut être ensuite mis en réaction avec du tétraborohydruure de sodium NaBH_4 , pour conduire à la formation d'isoeucommiol **27** en présence de quelques traces de son épimère **28**. Le rendement global de cette réaction est de 85 %²⁰².

4.2.2. Réaction d'oxythallation/déthallation

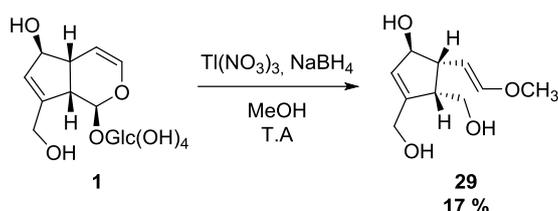


Figure 78: Réaction d'oxythallation/déthallation

Il a été démontré par Berdini et al.²⁰³ qu'il était possible d'observer l'ouverture réductrice du cycle dihydropyranique de l'aucuboside (Figure 78). Cette ouverture est réalisée par le tri-nitrate de thallium $\text{Tl}(\text{NO}_3)_3$ (TNT), en présence de NaBH_4 dans le méthanol pour former le composé **29** avec un rendement faible de 17 %.

4.3. Réactions d'halogénéation : halohydrines et halolactones

4.3.1. Formation d'halo-éthers et d'halo-acétates

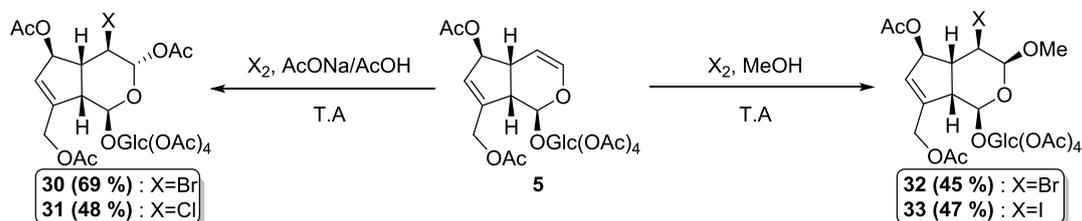


Figure 79: Formation d'halo-éthers et halo-acétates

Dans les années 1960, l'équipe de Birch¹⁸⁵ a démontré qu'à partir du *peracétylaucuboside* **5**, il était possible de réaliser la bromation sélective sur la double liaison $\text{C}_3=\text{C}_4$. Cette réaction est réalisée dans le méthanol à température ambiante et conduit à la formation du 3-méthoxy-4-

²⁰² Carnevale, G.; Davini, E.; Iavarone, C.; Trogolo, C. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5343-5345

²⁰³ Berdini, R.; Bianco, A.; Guiso, M.; Marini, E.; Nicoletti, M.; Passacantilli, P.; Righi, G. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1400-1403

bromoperacétylaucuboside **32**. C'est seulement quelques années plus tard, en 1968, que Le Quesne²⁰⁴ déterminera la stéréochimie des différents diastéréoisomères formés par RMN, ainsi que les dérivés 3-acétyl-4-chloroperacétylaucuboside **31**, 4-acétyl-3-bromoperacétylaucuboside **30** et 4-méthoxy-3-iodoperacétylaucuboside **33**. La stéréochimie des substituants sur les positions C₃ et C₄ a été déterminée à partir de spectres RMN.

Dans le cas où la bromation est suivie de l'attaque nucléophile par l'acétate de sodium, le groupement acétyle est additionné en position *trans* par rapport à l'atome d'halogène (composés **30** et **31**) (Figure 79). Ceci peut s'expliquer par la formation du pont halonium obtenu sur la face la moins encombrée du composé **5**, puis l'acétate étant un bon nucléophile, vient rapidement attaquer à l'opposé du pont halonium formé. Cette attaque de type substitution nucléophile d'ordre 2 (S_N2) conduit à l'obtention de composés *anti*. En revanche, lorsque le nucléophile est le méthanol, nous pouvons aisément supposer qu'étant moins nucléophile, l'intermédiaire réactionnel subit un effet anchimérique de l'oxygène du noyau pyranique conduisant à l'ouverture de l'ion halonium ponté. Par la suite, le méthanol vient attaquer sur le carbocation précédemment formé sur la face la moins encombrée. Cette attaque de type substitution nucléophile d'ordre 1 (S_N1) conduit à l'obtention privilégiée de composé *syn* (composés **32** et **33**).

²⁰⁴ Le Quesne, P. W. *J. Chem. Soc. C: Organics* **1968**, 1661-1663

4.3.2. Formation de bromohydrines (bromolactols) et bromolactones

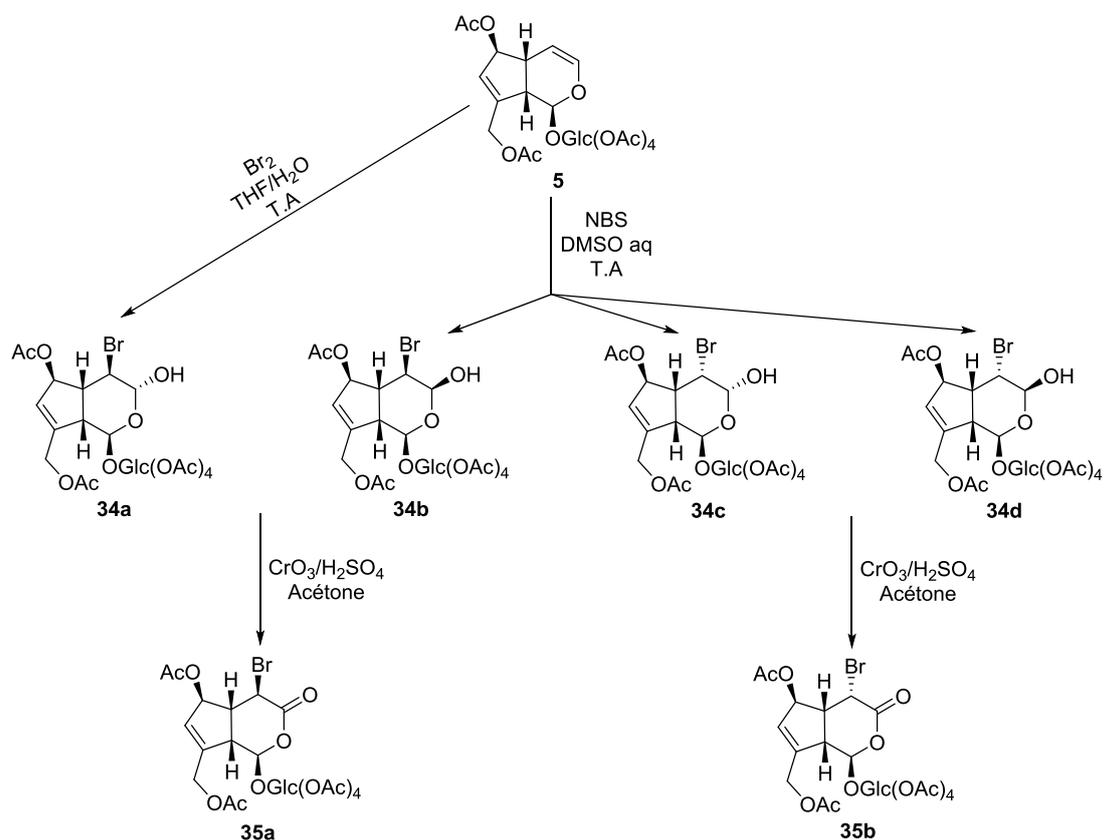


Figure 80: Formation de bromohydrines et bromolactones

Dans la synthèse des prostaglandines^{187,188,205}, utilisant l'aucuboside comme matière première chirale, les bromolactones sont des intermédiaires clés.

Schmid et al.²⁰⁶ ont décrit la formation d'une bromohydrine **34a**, par l'addition de brome sur le peracétylaucuboside **5**. Cette réaction est réalisée à température ambiante dans un mélange THF/H₂O et donne le composé **34a** avec un rendement de 35 %. Une fois cette bromolactone obtenue, elle est ensuite oxydée à l'aide de CrO₃ dans l'acide acétique pour conduire à la bromolactone **35a** avec un rendement de 65 %.

Par la suite, Berkowitz et al.²⁰⁷ ont décrit la formation de trois bromohydrines **34b**, **34c** et **34d** en utilisant cette fois-ci le N-bromosuccinimide dans le DMSO aqueux. Le rendement global de la formation de ces trois bromohydrines est de 95 %. La bromohydrine **34b** après cristallisation est oxydée par le réactif de Jones (CrO₃/H₂SO₄) pour conduire à la bromolactone **35a** avec un rendement de 90 % (Figure 80). De la

²⁰⁵ Bernini, R.; Davini, E.; Iavarone, C.; Trogolo, C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4600-4603

²⁰⁶ Wendt, M. W.; Haegele, W.; Simonitsch, E.; Schmid, H. *Helv. Chim. Acta* **1960**, *43*, 1440-1443

²⁰⁷ Berkowitz, W. F.; Sasson, I.; Sampathkumar, P. S.; Hrabie, K.; Choudhry, S.; Pierce, D. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 1641-1644

même manière, l'oxydation du mélange des deux bromohydrines **34c** et **34d** conduisent à une seule bromolactone **35b**. Les auteurs ont également montré que l'emploi de DMSO anhydre conduit directement à l'obtention des bromolactones **35a** et **35b** avec un ratio de 3:1. Le rendement global de cette transformation est de 90 %.

4.3.3. Formation de iodohydrines ou iodolactols et iodolactones

Nous avons vu précédemment que les bromolactones acétylées **35a** et **35b** obtenues par Berkowitz et al. formaient des mélanges inséparables. Il n'était donc pas possible de travailler sur des composés optiquement purs. Au laboratoire, la formation de iodohydrines et iodolactones a grandement été étudiée, notamment par X. Cachet¹⁹² et C. Mouriès²⁰⁸. Ces travaux ont montré un contrôle de la diastéréosélectivité de l'atome d'iode sur la double liaison C₃=C₄. Cette diastéréosélectivité est liée à la configuration absolue des substituants sur le carbone C₆ et à la méthode utilisée pour la formation des iodolactols.

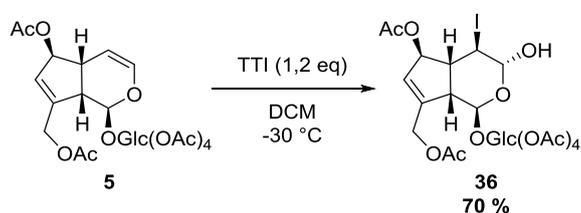


Figure 81: Formation de iodolactol en présence de TTI

En étant à -30 °C, à partir du *peracétylaucuboside* **5**, il est possible d'obtenir l'iodolactol **36** avec un rendement de 70 %. Cette réaction est effectuée en présence de tri-trifluoroacétate d'iode (TTI) dans le dichlorométhane (Figure 81).

La Figure 82 représente quatre composés qui ont été traités par la N-iodosuccinimide (NIS) dans un mélange hydro-organique tel que H₂O/ACN ou encore H₂O/THF. Ces conditions permettent d'obtenir les iodolactols correspondants dont la stéréochimie en C₃ et C₄ n'a pas été déterminée. En effet, nous observons la formation de plusieurs diastéréoisomères inséparables au cours de la réaction. L'oxydation de ces iodolactols en iodolactones est donc réalisée directement sur les différents mélanges. Pour obtenir les iodolactones **43** à **46**, la méthode de Czernecki et al.²⁰⁹ a été utilisée. Cette méthode utilise le pyridinium dichromate (PDC) dans du DCM anhydre en présence de tamis moléculaire 4 Å et d'acide acétique en quantité catalytique. Le centre asymétrique en position C₄ a été déterminé par RMN.

²⁰⁸ Mouriès, C. Thèse de doctorat, Université Paris Descartes, Paris **2003**

²⁰⁹ Czernecki, S.; Georgoulis, C.; Stevens, C.L.; Vijayakumaran, K. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1699-1702

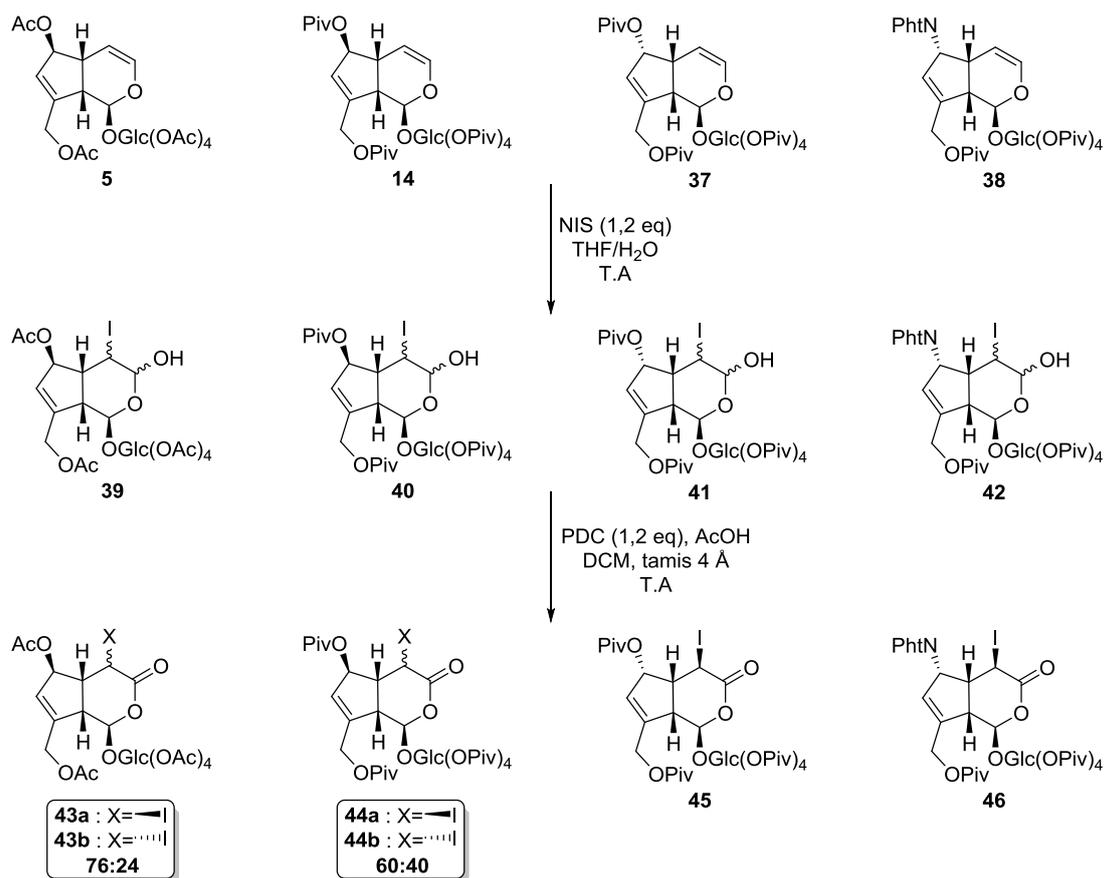


Figure 82: Synthèse de iodolactols puis de iodolactones à partir de dérivé de l'aucuboside

Pour les composés **5** et **14**, un mélange de quatre iodolactols diastéréoisomères a été obtenu. En revanche, pour les composés **37** et **38**, seulement deux diastéréoisomères ont été observés (Figure 82). L'atome d'iode s'additionne donc préférentiellement sur la face la moins encombrée de la molécule. Lorsque le groupement sur le carbone C₆ est vers l'avant du plan, on obtient quatre diastéréoisomères, avec une proportion plus importante pour les composés ayant l'iode sur la face la moins encombrée. Par contre, lorsque le groupement porté par le carbone C₆ est vers l'arrière du plan, l'attaque se fait exclusivement sur la face la moins encombrée et conduit donc à la formation de seulement deux diastéréoisomères. Ceci est dû à la structure de la génine dans l'espace, ainsi que l'encombrement stérique créé par le groupement protecteur porté par le carbone C₆.

Le ratio en iodolactones **44a/44b** peut être modifié en fonction des réactifs employés¹⁹². Le Tableau 3 récapitule les réactifs et les ratios obtenus entre les iodolactones **44a** (4R) et **44b** (4S) après purification en fonction des conditions réactionnelles employées.

Réactif	Solvant	Rendement (%)	Ratio β (4R)/ α (4S)
NIS	ACN/H ₂ O	90	70/30
NIS	THF/H ₂ O	88	60/40
I ₂ +Ag ₂ SO ₄	THF/H ₂ O	82	57/43
I ₂ +CF ₃ COOAg	DCM	77	35/65

Tableau 3: Ratio entre les iodolactones 44a (4R) et 44b (4S) en fonction des réactifs utilisés pour former les iodolactols

Nous pouvons ainsi observer que l'iodolactone **44a** peut être obtenue majoritairement en utilisant soit la NIS, soit le couple I₂/Ag₂SO₄ comme source d'iode électrophile et en effectuant la réaction dans des mélanges tel que THF/H₂O ou ACN/H₂O. En revanche, pour obtenir majoritairement l'iodolactone **44b**, il faut utiliser les conditions de Prévost²¹⁰ modifiées, c'est-à-dire diiode en présence de trifluoroacétate d'argent et utiliser un solvant très peu polaire du type DCM.

4.4. Réarrangement des iodolactols/iodolactones : contraction du cycle dihydropyrane

Afin d'obtenir de nouveaux synthons chiraux originaux possédant une diversité chimique et un squelette original, de nouvelles conditions réactionnelles²¹¹ ont ainsi été développées au laboratoire à partir de l'aucuboside **1**. Ces nouveaux motifs sont obtenus par réarrangement opéré au niveau du noyau pyranique (Figure 83). Ces transformations permettent de différencier chimiquement les deux aldéhydes du système 1,5-dialdéhyde masqué du composé **1**.

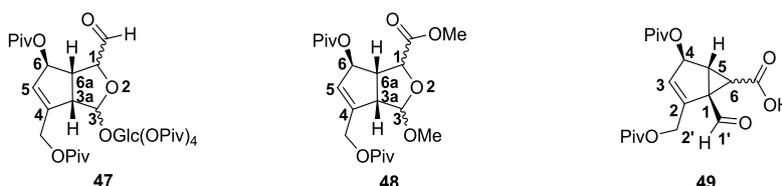


Figure 83 : Motifs cyclopenta[1.2]furane et bicyclo[3.1.0]hex-2-ène

4.4.1. Contraction du cycle dihydropyrane en squelette cyclopenta[1,2-c]furane à partir des iodolactols

a. Contraction du cycle dihydropyrane en utilisant le trinitrate de thallium (TNT)

Les travaux de Mc Killop et al.²¹² puis Kaye et al.²¹³ ont démontré que l'utilisation du trinitrate de thallium (TNT) conduisait à un réarrangement oxydatif d'oléfines dihydropyraniques en acétal ou en carbonyle selon les conditions utilisées. Le TNT se trouve être un puissant électrophile. Il se fixe sur la double liaison

²¹⁰ Haines, A. H. *Comprehensive Organic Synthesis* **1991**, 7, 437-448.

²¹¹ Cachet, X.; Deguin, B.; Tillequin, F.; Rolland, Y.; Koch, M. *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 2812-2822

²¹² McKillop, A.; Hunt, J. D.; Kienzle, F.; Bigham, E.; Taylor, E. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 3635

²¹³ Kaye, A.; Reese, C. B.; Neidle, S. *Nucleosides & Nucleotides* **1988**, 7, 609-612

du dihydropyrane **50** en formant un ion ponté sur la face la moins encombrée²¹⁴. Cet ion ponté est par la suite ouvert par l'attaque nucléophile d'une molécule de solvant et donne le composé **51** (Figure 84). Ce réarrangement implique une étape de réduction du thallium au degré d'oxydation II en thallium au degré d'oxydation I.

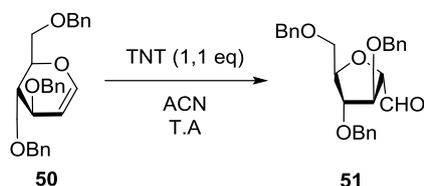


Figure 84: Réarrangement oxydatif d'oléfine dihydropyranique

Moriarty et al.²¹⁵ ont réalisé le même réarrangement oxydatif des oléfines dihydropyraniques en utilisant le iodosobenzène dans l'eau.

En traitant, le *perpivaloylaucuboside* **14**, avec le TNT dans l'acétonitrile à 0 °C, les composés **47a** et **47b** ont été isolés avec un ratio 4:1 et un rendement de 38 % (Figure 85).

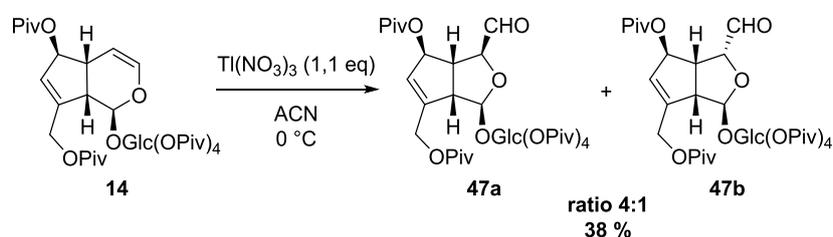


Figure 85: Contraction du cycle dihydropyrannique du *perpivaloylaucuboside*

b. Contraction du cycle dihydropyrane en utilisant une base

En utilisant des conditions plus douces que précédemment, il est également possible d'observer et d'obtenir cette contraction du cycle dihydropyrannique en noyau furanique. Le traitement en milieu basique des iodolactols ou iodohydrines **40** (présenté ci-après) permet l'obtention du squelette cyclopenta[1,2-*c*]furane. L'aldéhyde furanique est obtenu par déprotonation de l'alcool hémiacétalique qui conduit par la suite à une ouverture du iodolactol. L'alcoolate ainsi formé vient substituer l'atome d'iode pour conduire à la formation du cycle furanique. Lors de cette réaction, l'alcoolate formé réagissant instantanément comme nucléophile, le glucose reste sur la molécule et ne se trouve pas expulsé. Le mécanisme de cette réaction est détaillé dans la Figure 86.

²¹⁴ Suhara, Y.; Ichikawa, M.; Hildreth, J. E.; Ichikawa, Y. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2549-2552

²¹⁵ Moriarty, R. M.; Prakash, O.; Duncan, M. P.; Vaid, R. K.; Rani, N. *J. Chem. Res. Synop.* **1996**, 432-433

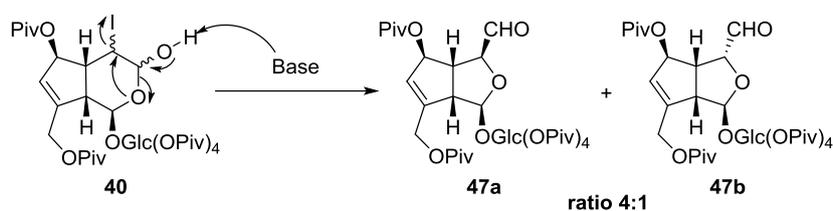


Figure 86: Mécanisme expliquant la formation du squelette cyclopenta[1,2-c]furane

Pour conduire aux composés **47a/47b** à partir du composé **40**, deux méthodologies ont été développées au laboratoire.

La première consiste à traiter les iodolactols **40** par un équivalent de phthalimide de potassium dans la DMF.

La seconde méthode fait intervenir un procédé one-pot. Les iodolactols sont formés, mais ne sont pas isolés. L'addition de toluène crée un milieu biphasique et une solution de bicarbonate de potassium (0,1 M) est ajoutée. La réaction est possible grâce à un agent de transfert de phase, le bromure de tetrabutylammonium (Bu_4NBr).

La Figure 87 résume les trois méthodes possibles pour obtenir les composés **47a/47b**. Les résultats sont très similaires quelle que soit la méthodologie employée^{192,207}.

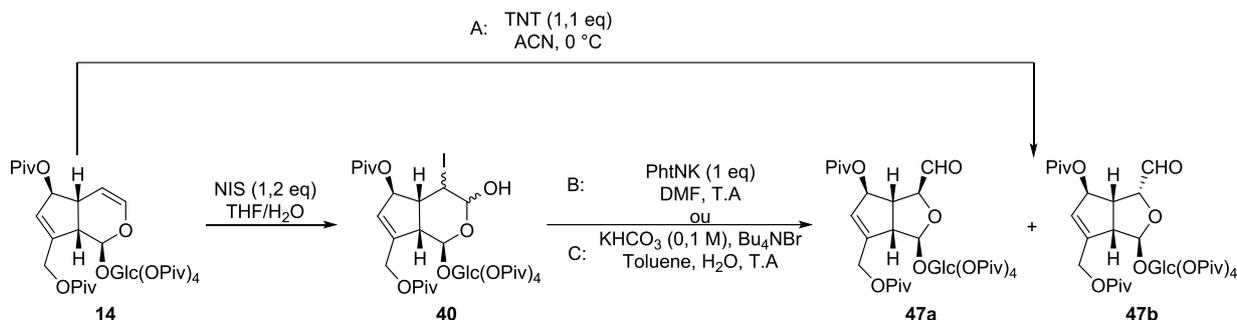


Figure 87: Différentes méthodes pour obtenir le motif cyclopenta[1,2-c]furane

Le Tableau 4 résume les différents ratios obtenus entre les composés **47a** et **47b**, ainsi que le rendement global de la réaction en fonction de la méthode utilisée. Ainsi, nous pouvons voir qu'avec la méthode C, nous obtenons exactement le même ratio qu'avec la méthode A impliquant l'emploi du TNT, un réactif très toxique. De plus, le rendement s'en trouve nettement augmenté avec la méthode C.

	Ratio 47a (1R)/ 47b (1S)	Rendement (%)
Méthode A	4:1	38
Méthode B	3:1	78
Méthode C	4:1	95

Tableau 4: Résultats obtenus avec les trois méthodes possibles

4.4.2. Contraction du cycle dihydropyrane à partir des iodolactones

a. Contraction du cycle dihydropyrane par l'action de méthanolate de sodium¹⁹²

Les conditions opératoires impliquant une base forte ($pK_a \sim 18$), tel que le méthanolate de sodium (MeONa) dans un solvant polaire protique comme le méthanol conduisent à la contraction du cycle pyranique et à l'obtention du squelette cyclopenta[1,2-c]furane. Le mécanisme de ce réarrangement est détaillé dans la Figure 88.

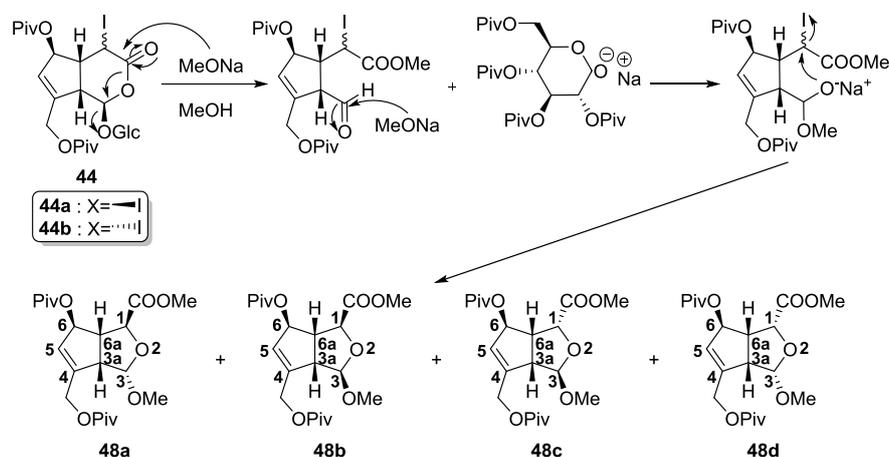


Figure 88 : Mécanisme réactionnel expliquant la formation du motif cyclopenta[1,2-c]furane

Le premier équivalent de MeONa va venir réagir en tant que nucléophile sur la iodolactone en ouvrant cette dernière qui va éliminer le glucose. Le second équivalent va de nouveau réagir comme nucléophile sur l'aldéhyde nouvellement formé pour conduire à un anion pseudo acétalique qui va tout de suite venir substituer l'atome d'iode.

Ainsi, en traitant la iodolactone **44b** par une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol à température ambiante, les composés **48a** et **48b** sont obtenus dans un ratio 5,5:2,5. En revanche, en traitant la iodolactone **44a** dans les mêmes conditions réactionnelles, trois composés sont formés, **48a**, **48b** et **48c**. Dans les deux cas, le composé **48d** est décelable à l'état de traces non quantifiables. (Figure 88).

L'étape clé de cette transposition est la seconde addition nucléophile du méthanolate sur l'aldéhyde libéré. Une fois le cycle furanique formé, le carbone C₃ n'est plus isomérisable. Au contraire, le carbone C₁ peut toujours subir une épimérisation.

b. Action du phtalimide de potassium sur les iodolactones

Les iodolactones **44** présentent une grande instabilité. En effet, quelle que soit la stéréochimie au niveau de l'atome d'iode, il occupe une position très encombrée.

Au contact de l'air, il a été observé que les iodolactones se dégradent progressivement. L'élimination d'acide iodhydrique (HI) conduisait à la formation d'une lactone α,β -insaturée **52**¹⁹². En solution, les iodolactones se dégradent complètement pour donner seulement le glucose protégé.

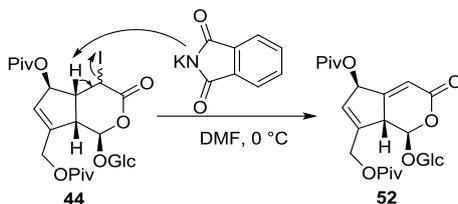


Figure 89 : Mécanisme réactionnel expliquant la formation de la lactone α,β -insaturée

Cette même réactivité a également été mise en évidence au laboratoire²¹⁶ (Figure 89). En effet, en traitant les iodolactones **44**, par une base non nucléophile telle que le phthalimide de potassium dans un solvant polaire aprotique comme la DMF, nous observons la formation de cette même lactone α,β -insaturée avec une double liaison en $C_4=C_5$. L'atome d'hydrogène en alpha de l'iode possède un caractère acide suffisamment marqué pour subir une déprotonation et ainsi conduire à une élimination de type E_2 pour former le composé **52**. Ce type de transformation a été exploité au laboratoire afin d'élaborer des analogues d'iridoïdes cytotoxiques présentant un motif cyclopenténone conjugué ayant une analogie structurale avec les oxylipines²¹⁷.

c. Contraction du cycle dihydropyrane par l'action du triméthylsilanolate de sodium¹⁹²

Les conditions réactionnelles impliquant le traitement de ces mêmes iodolactones **44** par une base moins forte, telle que le triméthylsilanolate de sodium ($pK_a \sim 14$) dans un solvant apolaire comme le dichlorométhane conduisent à la contraction du cycle pyranique et à l'obtention du squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène. Le mécanisme de cette réaction particulière est détaillé ci-dessous (Figure 90).

²¹⁶ Mouriès, C.; Rakotondramasy, V. C.; Libot, F.; Koch, M.; Tillequin, F. Deguin, B.; *Chem. Biodiversity* **2005**, *2*, 695-703

²¹⁷ Mouriès, C.; Deguin, B.; Koch, M.; Tillequin, F. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 147-156

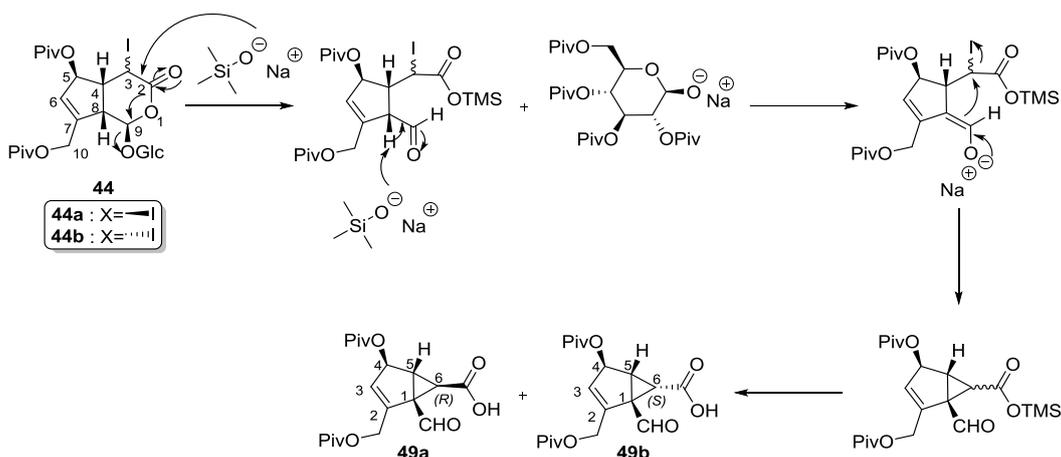


Figure 90: Mécanisme réactionnel expliquant la formation du bicyclo[3.1.0]hex-2-ène

Le premier équivalent de NaOTMS va venir réagir comme nucléophile sur la iodolactone en ouvrant cette dernière qui va expulser le glucose protégé. Cette première addition nucléophile est identique à celle observée avec le méthanolate. Le second équivalent va réagir cette fois-ci en tant que base. Il va déprotoner le proton H₉ en alpha de l'aldéhyde pour conduire à un énolate. Cet énolate en C₉ va venir substituer l'atome d'iode et créer ainsi la liaison C₁-C₆.

La stéréochimie du carbone C₁ ainsi créé est contrôlée par celle du carbone C₅. La réaction est totalement stéréospécifique étant donné qu'une seule cyclisation est possible. On devrait s'attendre à ce que la stéréochimie du carbone C₆ dépende de la stéréochimie au niveau de carbone C₄ de l'iodolactone de départ utilisée.

Or, contrairement à l'hypothèse de départ postulée et aux résultats observés lors du réarrangement en noyau furanique (Figure 91), les études réalisées au laboratoire²¹⁸ ont démontré qu'il n'y avait pas de lien entre la conformation des iodolactones de départ et les produits formés. En traitant par le NaOTMS, un mélange d'iodolactones **49a/49b** ayant un ratio 57:23 ou en utilisant uniquement une seule iodolactone énantio pure, les composés **49a/49b** sont toujours obtenus dans le même ratio 90:10. Le rendement de la réaction est de 44 %.

D'après notre hypothèse, en partant de l'iodolactone énantio pure **49a**, celle-ci devrait conduire uniquement au composé bicyclo[3.1.0]hex-2-ène **55a** et inversement si l'on part de l'iodolactone énantio pure **49b**.

Pour comprendre ce qu'il se produit d'un point de vue mécanistique, l'iodolactone énantio pure **49b** est mise en réaction dans le dichlorométhane anhydre en présence de NaOTMS. La réaction est menée à 0 °C et est volontairement stoppée après 10 minutes d'agitation. On observe alors que 70 % de l'iodolactone **49b** de départ s'est épimérisée en iodolactone **49a**. Cette observation démontre que lors de la réaction, la cinétique d'isomérisation des iodolactones est plus rapide que le réarrangement en

²¹⁸ Lemoine, H.; Markovic, D.; Deguin, B. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4358-4366

bicyclo[3.1.0]hex-2-ène. Il est donc légitime de conclure que l'ouverture de la lactone et son réarrangement en cyclopropane s'effectue majoritairement sur l'iodolactone **49a**.

Les structures de **49a** et **49b** ont été déterminées par différentes études RMN en solution. Une analyse par diffraction des rayons X²¹⁹ a été réalisée sur le composé **53**, un analogue de **49a** (Figure 91). Cette analyse a permis de valider la stéréochimie du composé **49a**. (Le composé **53** possède un ester méthylique en position C₁ à la place de l'acide carboxylique et un acide carboxylique en position C_{1'} au lieu de l'aldéhyde).

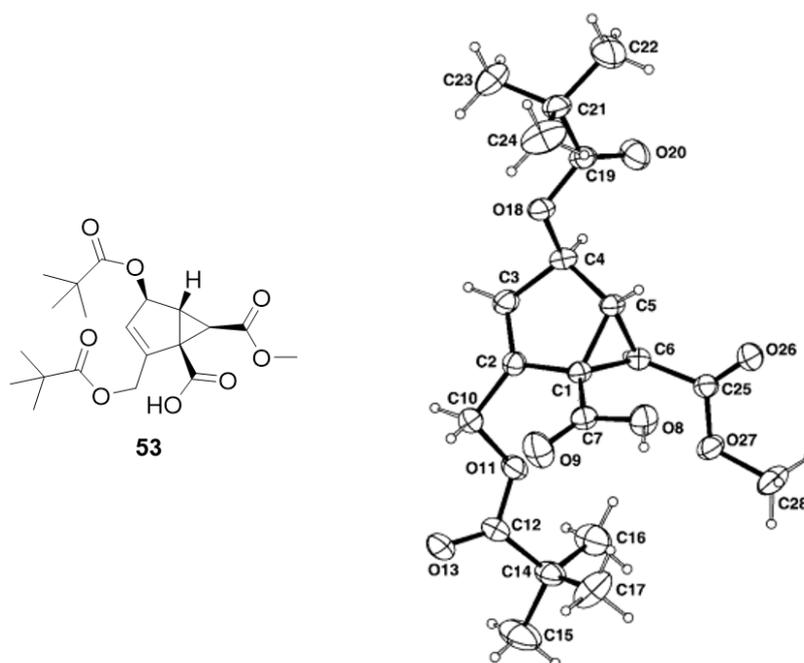


Figure 91: Structure Chemdraw et représentation ORTEP du composé **53**

En appliquant les conditions réactionnelles adéquates sur le mélange d'iodolactones **44** (TMSNa/DCM versus MeONa/MeOH), nous avons désormais accès à deux nouveaux squelettes originaux : le squelette cyclopenta[1,2-c]furane (contraction O₂→O₄) ou le squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène (contraction C₉→C₄).

Nous avons vu dans la partie I.3. (La chimie et la réactivité de l'aucuboside), que de nombreuses réactions de protection, de substitution, d'oxydation des différentes fonctions alcools étaient envisageables. De même, diverses réactions au niveau des doubles liaisons permettent d'obtenir de

²¹⁹ Chiaroni, A.; Riche, C.; Cachet, X.; Deguin, B.; Koch, M.; Tillequin, F. *Acta Cryst.* **2000**, *56*, 358-359

nouveaux squelettes contraints. La Figure 92 regroupe l'ensemble des familles de composés qui ont été synthétisés, comme des motifs cyclopropane, oxépane²⁰¹, furane ou pyridazinone²²⁰.

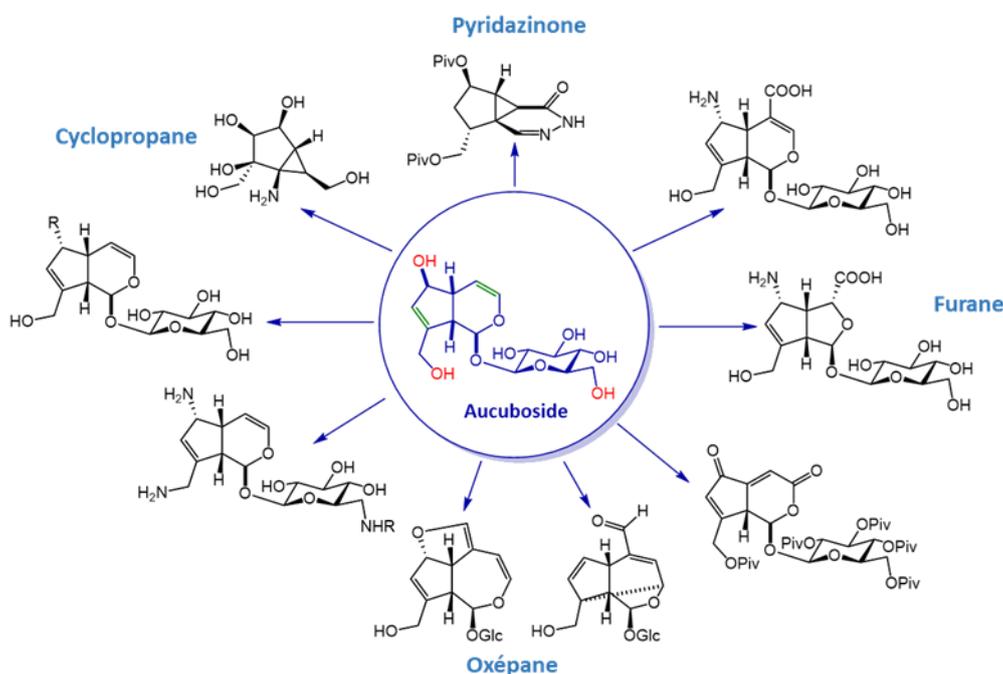


Figure 92: Composés obtenus à partir de la réactivité de l'aucuboside

IV. Développement de composés d'intérêt biologique à partir des nouveaux synthons originaux formés

Comme vu précédemment, la formation des iodolactones et les contractions du cycle dihydropyrane en noyau furane ou cyclopropane ont permis de former des squelettes originaux dérivés de l'aucuboside **1** (Figure 83).

Une nouvelle chimie des iridoïdes a donc vu le jour et a été développée dans cet objectif, notamment au niveau des groupements protecteurs à utiliser, des modifications de la génine, ainsi que du motif glycosidique. Ces nouvelles méthodologies ont permis l'accès à une large gamme de dérivés bio-actifs à partir de l'aucuboside, tels que des analogues cytotoxiques, des analogues contraints d'aminocyclopentitols ou encore des analogues contraints de γ -amino-acides.

Ces nouveaux dérivés ont également conduit au développement de châssis moléculaires chiraux possédant une grande diversité chimique pour la synthèse organique.

Ces différentes applications seront détaillées dans les chapitres suivantes.

²²⁰ Cachet, X.; Deguin, B.; Koch, M.; Tillequin, F.; Koch, M.; Chiaroni, A. *Heterocycles* **2002**, 57, 523-528

1. Analogues cytotoxiques d'aucuboside : dérivés de cyclopentènone

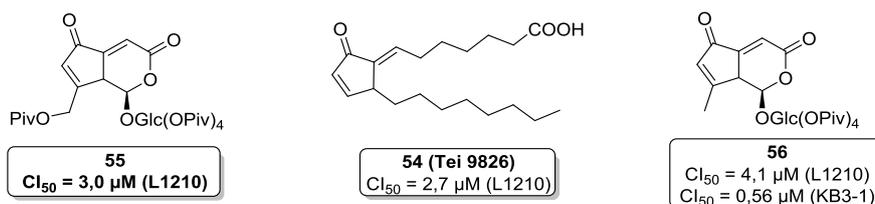


Figure 93: Analogues cytotoxiques possédant un dérivé cyclopentènone

La synthèse d'iridoïdes cytotoxiques possédant un motif cyclopentènone conjuguée a fait l'objet d'une étude au laboratoire. Ces composés sont des analogues d'oxylypine, composé antitumoral naturel²²¹.

Pour l'obtention de ces composés à motif cyclopentènone conjuguée la méthodologie présentée dans la Figure 89 a été appliquée (phtalimidure de potassium dans la DMF), suivie d'une déprotection de la fonction alcool en C₆ puis d'une oxydation. Parmi les différentes molécules synthétisées, deux composés (**55** et **56**) se sont révélés actifs sur les lignées de cellules cancéreuses L1210 et KB3-1²²². Le composé **55** présente même une excellente activité (Cl₅₀ = 3,0 μM) du même ordre de grandeur que la molécule servant de référence pour cette série, le composé **54** (Cl₅₀ = 2,7 μM). Cette activité a été mise en évidence sur le carcinome du côlon²²³ (Figure 93).

2. Analogues contraints d'aminocyclopentitols : analogues de manostatines

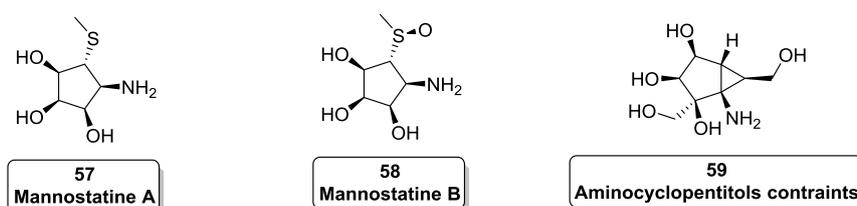


Figure 94: Monostatines et leur analogue aminocyclopentitol contraint

Les manostatines A et B (composés **57** et **58**) découvertes en 1989, sont connues pour être des aminocyclopentitols inhibiteurs d'osidases^{224,225}. Ce sont deux puissants inhibiteurs d' α -mannosidase.

²²¹ Iwashima, M.; Okamoto, K.; Iguchi, K. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6455-6459

²²² Rakotondramasy, V. C.; Mouriès, C.; Cachet, X.; Neghra, A.; El Mourabet, M.; Tillequin, F.; Koch, M.; Deguin, B. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2314-2320

²²³ Shirakawa, S.; Suzuki, M.; Furuta, K.; Noyori, R.; Sasaki, H.; Kikuchi, Y.; Kita, T.; Yamori, T.; Sawada, J.; Kojima, M.; Hazato, A.; Kurozumi, S.; Fukushima, M.; Fukushima, S.; Takeuchi, Y.; Kishimoto, S.; Yamashita, S.; Uetsuki, K. *Anti-Cancer Drugs* **2001**, *12*, 221-234

²²⁴ Aoyagi, T.; Hamada, M.; Kojiri, K.; Morishima, H.; Nagai, M.; Takeuchi, T.; Umezawa, H.; Yamamoto, T. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 883-889

²²⁵ Aoyagi, T.; Iitaka, Y.; Kojiri, K.; Morishima, H.; Nakamura, H.; Yamamoto, T. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1008-1011

Dans les années 2000, les relations structures-activités étaient encore mal connues²²⁶. L'accès à de nouveaux composés a donc été une priorité et a fait l'objet d'une étude au sein du laboratoire. L'objectif était de synthétiser des analogues de manostatines contraints par un cyclopropane tel que le composé **59**, afin de pouvoir préciser le rôle des différents substituants (hydroxyles et amine) dans le mécanisme d'inhibition des α -mannosidases. Ce type de motif présentant une très grande analogie structurale avec les manostatines (Figure 94).

Malheureusement, il s'est avéré que l'analogue d'aminocyclopentitols contraints **59** ne présentait pas d'activité inhibitrice significative vis-à-vis de l' α -mannosidase.

3. Analogues contraints de γ -amino-acides

3.1. γ -amino-acides glycosylés contraints²²⁷

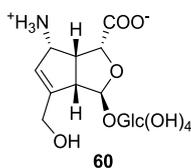


Figure 95: γ -amino-acides glycosylés contraints

La synthèse de γ amino-acides glycosylés contraints a été étudiée au laboratoire par C. Mouriès²⁰⁸²⁰⁸ (Figure 95). Ces amino-acides ont été obtenus à partir de la méthodologie développée autour des iodolactols, présentée Figure 87. Ces synthèses ont permis d'obtenir des γ -amino-acides glycosylés contraints originaux, énantiomériquement purs, possédant une conformation rigide. Ces composés à trois points de diversité chimique (acide, amine et alcool) sur la partie aglycone sont destinés à la synthèse de glycopeptides.

3.2. γ -amino-acides contraints

Pour rappel, les acides aminés neurotransmetteurs ont un rôle prépondérant dans le fonctionnement du système nerveux central (SNC). Les acides L-glutamique et L-aspartique sont des neurotransmetteurs excitateurs contrairement à l'acide γ -aminobutyrique qui possède un rôle inhibiteur. Les systèmes GABAergiques et glutamatergiques sont très liés et très importants, car ils possèdent de nombreux rôles physiologiques. Cependant, ces systèmes sont très complexes et possèdent une multitude de types et de sous-types de récepteurs dont la localisation et le fonctionnement restent mal connu. Néanmoins, il

²²⁶ Berecibar, A.; Grangjean, C.; Siriwardena, A. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 779-844

²²⁷ Mouriès, C.; Deguin, B.; Lamari, F.; Foglietti, M.-J.; Tillequin, F.; Koch, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1083-1086

a été démontré que l'ensemble de ces systèmes et de ces récepteurs étaient impliqués dans de nombreuses pathologies²²⁸ comme l'épilepsie, la schizophrénie ou encore la maladie de Parkinson. Il est donc nécessaire et essentiel de comprendre le fonctionnement des systèmes glutamatergiques et GABAergiques pour pouvoir traiter efficacement ces maladies. C'est pourquoi depuis 60 ans, de nombreux agonistes et antagonistes de GABA (γ -Amino Butyrique Acid)^{229,230} ont vu le jour, comme des dérivés de cyclopropane ou de bicyclo[3.1.0]hexane^{231,232}. La compréhension du rôle joué par les acides aminés contraints présente un intérêt majeur pour l'étude des relations structure-activité (RSA) des amino-acides neuromédiateurs. Le développement d'acides aminés contraints, analogues de GABA présentant des conformations rigides bien définies permet de comprendre les interactions qui se produisent avec les récepteurs protéiques transmembranaires²³³.

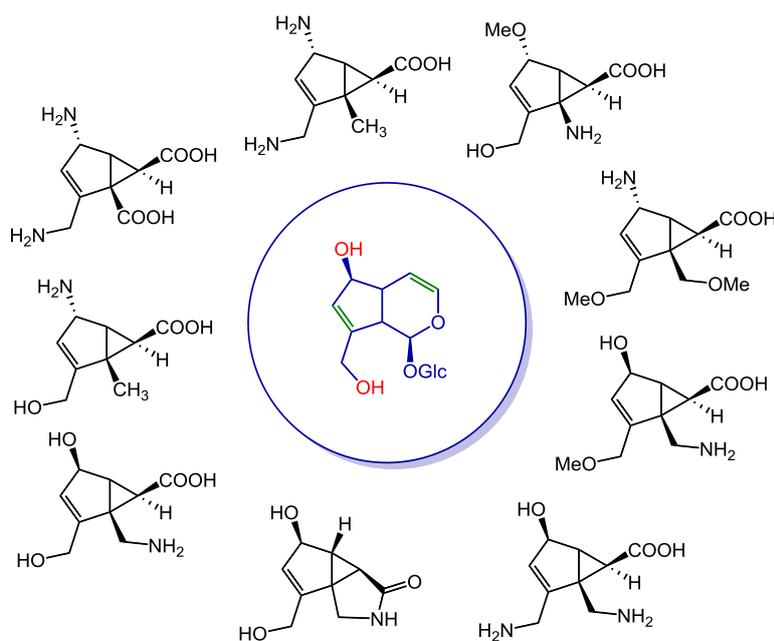


Figure 96: γ -amino-acides contraints, analogue de GABA

La synthèse de deux séries de γ -amino-acides contraints à partir du squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène a été réalisée au laboratoire par X. Cachet¹⁹² et M. El Mourabet²³⁴, dans le but d'étudier l'activité de ces analogues de GABA sur le système nerveux central. Ce type d'analogue bicyclo[3.1.0]hex-2-ène est encore peu connu et peu étudié. Ces analogues bicyclo[3.1.0]hex-2-ène possèdent des structures très similaires aux composés développés par le laboratoire Eli Lilly¹⁵¹ (Figure 96).

²²⁸ Vamvakides, A. *Ann. Pharm. Fr.* **1998**, *56*, 26-30

²²⁹ Yogeewari, P.; Ragavendran, J. V.; Sriram, D. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* **2006**, *1*, 113-118

²³⁰ Pratima, A.; Nikalje, G.; Girbane, A. *Asian J. Biol. Sci.* **2011**, *4*, 201-220

²³¹ Wang, Z.; Silverman, R. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2242-2252

²³² Jimeno, C.; Pericàs, M. A.; Wessel, H. P.; Alker, A.; Müller, K. *Chem. Med. Chem.* **2011**, *6*, 1792-1795

²³³ Callahan, J. F.; Newlander, K. A.; Burgess, J. L.; Eggleston, D. S.; Nichols, A.; Wong, A.; Huffman, W. F. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3479-3488

²³⁴ El-Mourabet, M. Thèse de doctorat, Université Paris-Descartes, Paris **2011**

3.3. Développement de châssis moléculaires chiraux²³⁵

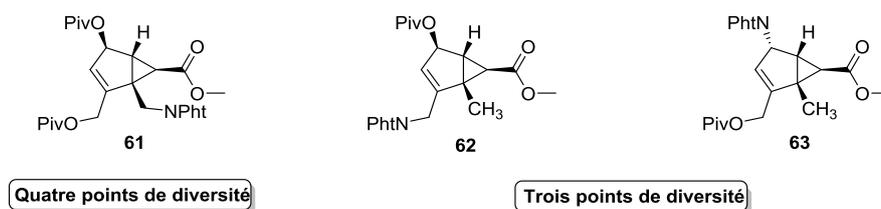


Figure 97: châssis moléculaires chiraux

Le dernier axe de recherche développé au laboratoire de pharmacognosie a été l'élaboration de châssis moléculaires chiraux de squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène (Figure 97). Ces châssis possèdent trois ou quatre points de diversité chimique (acide carboxylique, alcool(s), amine).

Le premier châssis moléculaire synthétisé a été le composé **61** qui possède quatre points de diversité chimique. Le composé **64** totalement déprotégé (déjà utilisé comme analogue contraints de GABA), issu de **61**, a été utilisé pour un travail de synthèse sur support solide pour pouvoir réaliser une étude de différenciation des deux alcools allyliques. Il était donc nécessaire de protéger la fonction amine avant de pouvoir greffer le substrat par sa fonction acide carboxylique sur une résine. Le composé **65** a donc été synthétisé à partir du composé **64** mis en réaction dans un mélange acétone/H₂O en présence d'une base inorganique et de chlorure de Fmoc (Figure 98).

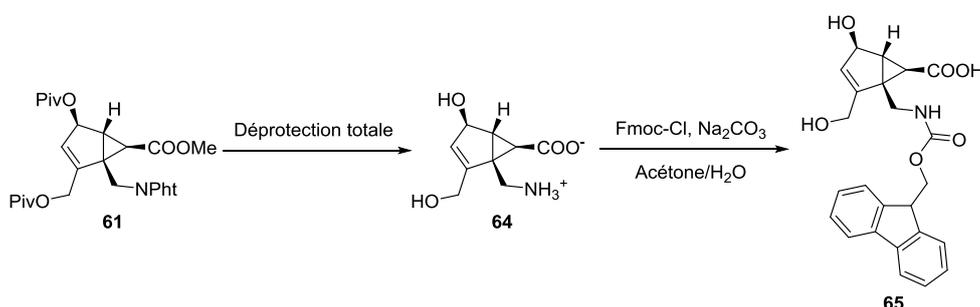


Figure 98: Fonctionnalisation de la fonction amine à partir du châssis 61

La seconde partie du projet a porté sur le développement des deux châssis chiraux **62** et **63**. La synthèse de ces composés a été validée à l'échelle pilote en partant de 300 g d'aucuboside **1**. Les composés **62** et **63** ont été obtenus en grosse quantité à l'échelle de la dizaine de gramme (respectivement 10,5 g et 5,5 g) selon la voie de synthèse linéaire en dix étapes avec un rendement global de 9 % (Figure 99).

²³⁵ Loury, N. Thèse de doctorat, Université Paris-Descartes, Paris 2005

L'ensemble des transformations chimiques de cette voie de synthèse ont été réalisées à température ambiante.

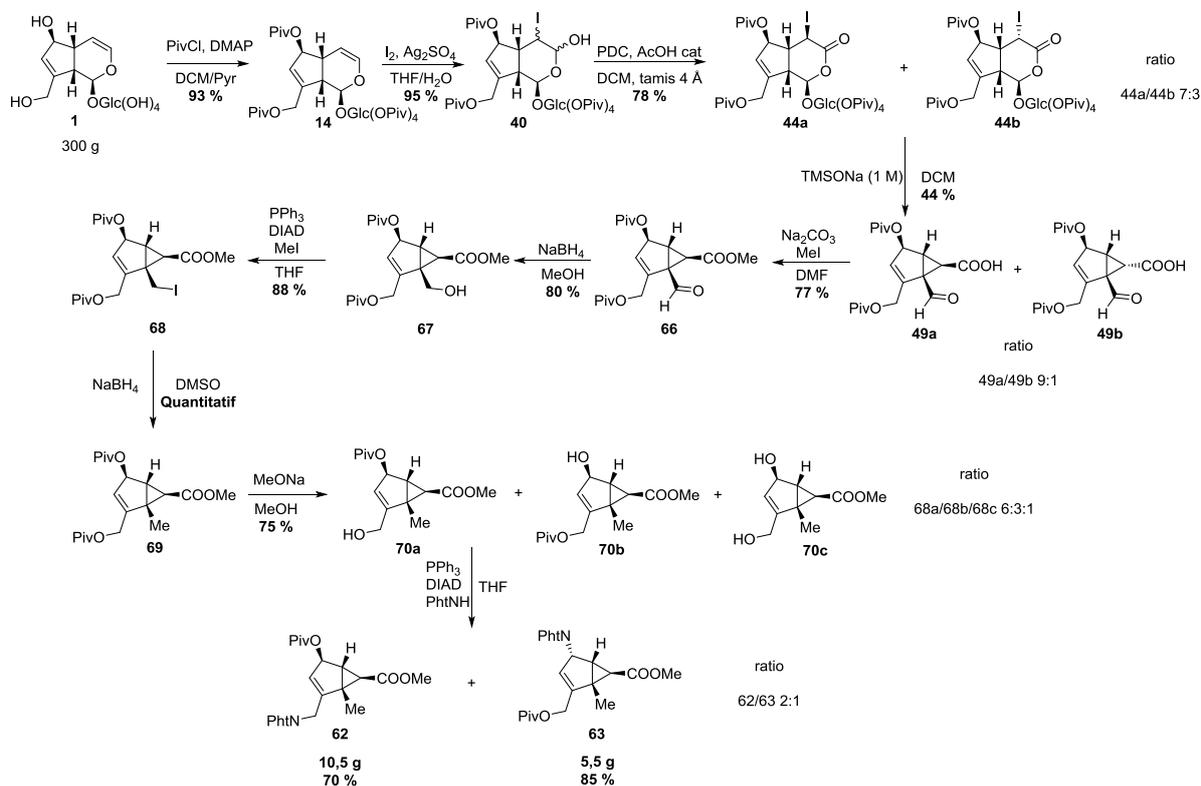


Figure 99: Schéma résumant la synthèse de **62** et **63** réalisée à grande échelle

Ces deux châssis ont été développés dans le but d'un travail de fonctionnalisation de la fonction amine en solution et d'essais de chimie parallèle.

A titre d'exemple, les différentes fonctionnalisations de la fonction amine ont été réalisées uniquement sur le composé **62** (Figure 100).

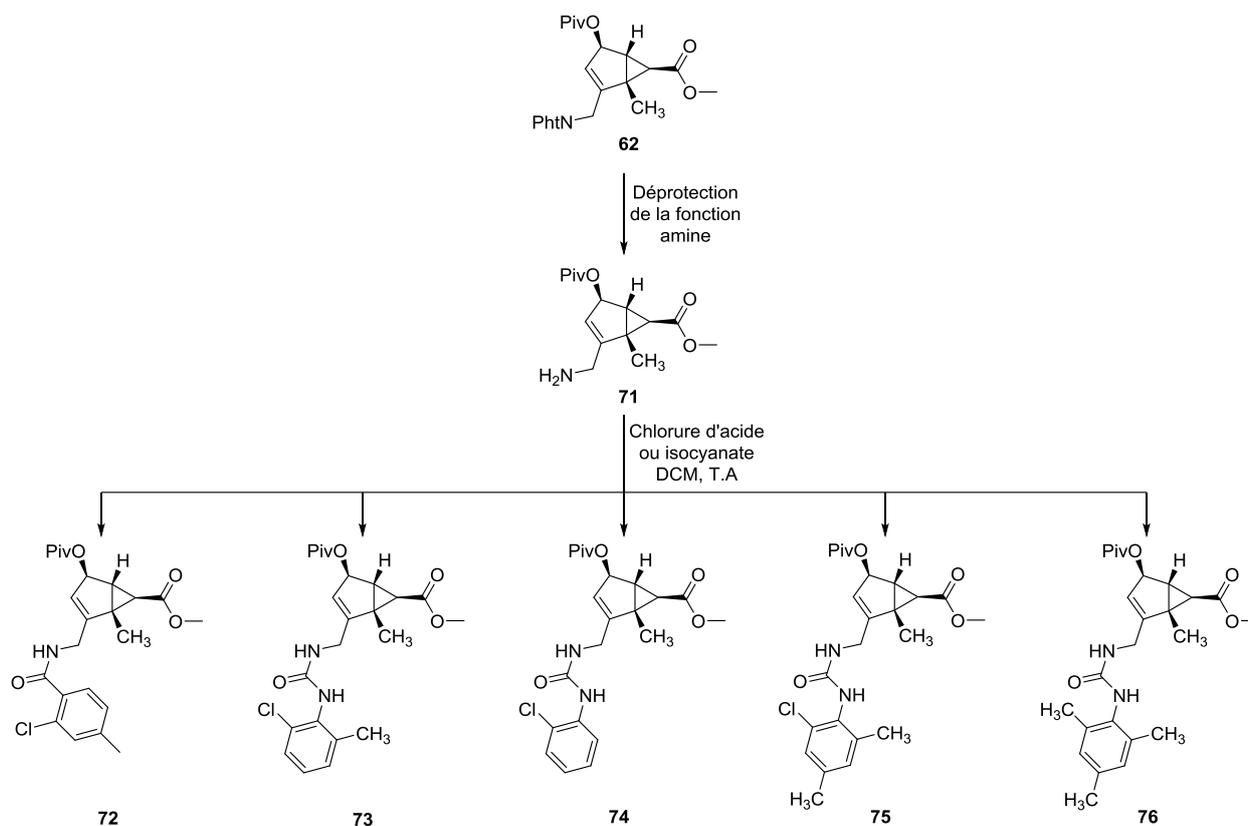


Figure 100: Fonctionnalisation de la fonction amine à partir du châssis 62

Les composés **72** à **76** ont été obtenus avec des rendements variant de 19 % à 61 %.

V. Conclusion

Nous avons largement détaillé dans ce chapitre III, les travaux réalisés et les méthodologies développées au laboratoire de pharmacognosie. En effet, il est possible de distinguer les différentes fonctions alcools ainsi que les deux doubles liaisons de l'aucuboside. Des réactions de protection, de réduction, d'addition électrophile ou encore de transposition du squelette pyranique de l'aucuboside sont envisageables et ont été effectuées. Ces différentes transformations chimiques permettent l'accès notamment à deux nouveaux squelettes chiraux originaux, le motif cyclopenta[1,2-c]furane et le motif bicyclo[3.1.0]hex-2-ène.

Nous avons également discuté de la possibilité de l'obtention de composés bio-actifs à partir de ces deux synthons : développement d'analogues cytotoxiques de cyclopenténone, d'analogues contraints d'aminocyclopentitols mais également d'analogues contraints de GABA.

Pour finir, nous avons détaillé la synthèse de châssis moléculaires chiraux fortement fonctionnalisés permettant de réaliser des synthèses chimiques parallèles en phase solide ou en solution. L'aucuboside **1** (Figure 63), qui peut être facilement extrait en grosse quantité à partir de l'*Aucuba japonica*, est une matière première très intéressante possédant un gros potentiel.

Objectifs de la thèse

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre deux équipes de recherche de l'UMR 8638, l'équipe « Hétérocycles et Peptides : Approche Ciblée, Cancer et Angiogenèse » et l'équipe « Pharmacognosie, Chimie des Substances Naturelles et Electrochimie ».

La recherche et la mise au point de nouvelles molécules permettant de cibler plus efficacement et spécifiquement le système VEGF/VEGFR est en constante évolution. Le but est de développer des molécules facilement synthétisables, actives, ciblant une protéine biologique bien définie, tout en limitant au maximum les effets secondaires pour les patients. Nous avons constaté que depuis les années 2000, l'axe de recherche concernant les thérapies anti-angiogéniques s'est orienté vers la synthèse de petits peptides.

L'équipe « Cancer et Angiogenèse » a travaillé sur l'optimisation du peptide V114, qui possède deux structures secondaires (hélice α et coude β). Ce peptide est un ligand affiné du VEGF. En solution, les peptides non contraints se trouvent en général dans une conformation aléatoire, mais lorsqu'ils interagissent avec une cible biologique, ces derniers adoptent une conformation bioactive. L'idée est donc de stabiliser le peptide dans cette conformation bioactive. Une première optimisation a été réalisée afin de stabiliser l'hélice α par un pont lactame. Cette optimisation a conduit à un gain d'activité et d'affinité du V114.

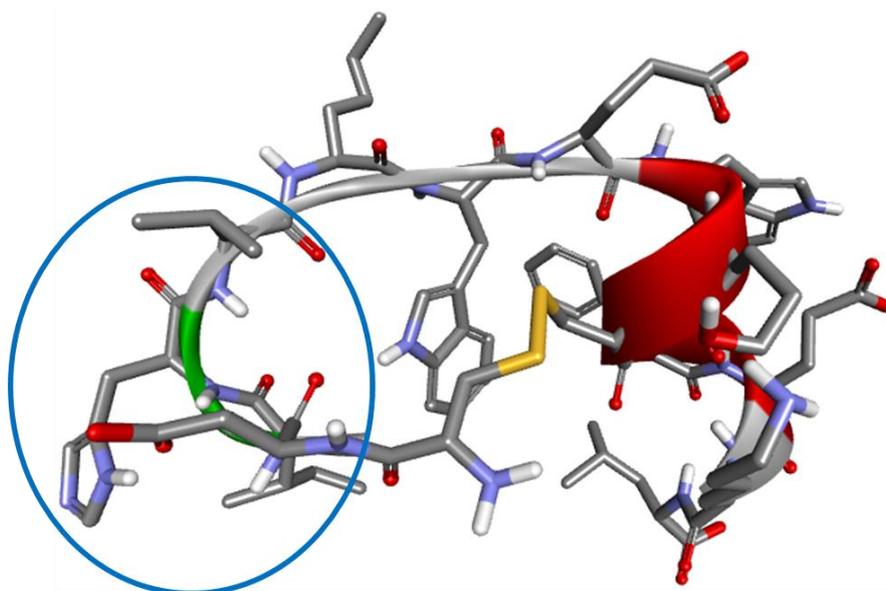


Figure 101: Représentation du peptide v114 avec le logiciel Discovery Studio

Une optimisation au niveau du coude β est maintenant envisagée, afin de gagner encore en stabilité et affinité (rond bleu, Figure 101). Pour ce faire, l'objectif est de mimer ce coude β par un acide aminé

contraint non protéinogène. Mon projet de thèse est de synthétiser et d'étudier dans de petits peptides modèles de tels acides aminés possédant un motif bicyclo[3.1.0]hex-2-ène. Ce type de motif devrait entraîner une structuration secondaire en coude β des peptides modèles, et par la suite du peptide V114. Cette modification structurale devrait également augmenter la stabilité du V114 vis-à-vis des protéases. L'acide aminé à incorporer au sein du peptide est obtenu par une héli-synthèse développée par l'équipe « Pharmacognosie, Chimie des Substances Naturelles et Electrochimie ». Elle utilise comme matière première, un terpénoïde naturel, l'aucuboside extrait de *Aucuba japonica* Thumb. Cette héli-synthèse fait intervenir notamment une étape de contraction de cycle originale qui permet la formation du motif bicyclique.

Chapitre IV : Développement d'acide
inducteur de coude β et synthèses
de peptides

I. Obtention de l'aucuboside

1. Extraction de l'aucuboside

Pour extraire l'aucuboside, nous avons appliqué la technique de Bourquelot et Herissey¹⁶⁰ mise au point pour l'extraction et la séparation d'iridoïdes du plantain lancéolé. Cette technique peut être facilement mise en œuvre avec une grosse quantité. Nous avons réalisé cette extraction à partir de 12 kg de feuilles fraîches d'*Aucuba japonica* (Cornaceae).

La procédure utilisée est la suivante : 70 litres d'eau sont chargés et chauffés à une température de 80 °C au sein d'un réacteur double enveloppe. La matière fraîche (feuilles) lavée est ensuite introduite dans le réacteur. Le milieu est laissé ainsi pendant 5 heures. Après refroidissement, l'extrait aqueux est soutiré par le bas de la cuve du réacteur. Une deuxième extraction aqueuse est réalisée avec 30 litres d'eau. Comme précédemment, le milieu est chauffé pendant 5 heures. L'extrait est de nouveau vidangé et les feuilles sont rincées avec 5 litres d'eau.

L'extrait est filtré pour éliminer les résidus solides (morceaux de feuilles, brindilles, ...) et est ramené à un volume final de 12 litres. 24 litres d'éthanol sont ensuite ajoutés et le mélange est laissé reposer une nuit. Le lendemain, le mélange est filtré pour éliminer les composés qui ont précipités. Le filtrat est ensuite concentré et amené à un volume final de 5 litres (soit une concentration en extrait de 220 g/l), puis cet extrait est stocké en bouteille au congélateur.

2. Purification de l'aucuboside

L'extrait brut est évaporé à sec et repris dans du méthanol auquel est ajouté de la silice afin de réaliser un dépôt solide. Mais étant donné la grosse quantité à purifier, il n'est pas possible de mettre en œuvre une colonne de chromatographie classique. Nous avons donc utilisé la technique V.L.C.C. (Vacuum Liquid Column Chromatography) dite du « Schott ». Au lieu de mettre sous pression la colonne de chromatographie afin de faire éluer le composé, on utilise une colonne de chromatographie ouverte que l'on place sur une ampoule équipée d'une prise de vide permettant de recueillir les volumes d'éluat souhaités par aspiration. On parle alors d'une chromatographie liquide sous vide. Nous avons obtenu 100 g d'aucuboside. Nous estimons aux environs de 4 à 5 % la teneur d'aucuboside obtenu lors de notre extraction réalisée au mois de novembre, ce qui semble être en accord avec les données du Tableau 2 (page 83).

Malgré la purification, nous obtenons plusieurs fractions d'aucuboside ayant des puretés différentes. En effet, il n'est pas rare de retrouver des traces de saccharides en mélange avec notre composé. Pour

augmenter la pureté, il est possible de réaliser plusieurs cristallisations successives de l'aucuboside dans le méthanol. D'après la littérature²³⁶, l'aucuboside pur se trouve sous forme d'un solide blanc ayant un point de fusion de 180-182 °C et un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = -151$ (H₂O, c = 0,5).

Il est également possible de purifier l'aucuboside par une chromatographie par partage centrifuge¹⁶⁴.

3. Conclusion

Nous avons vu qu'il était facile d'obtenir de l'aucuboside en grosse quantité avec une pureté plus que convenable par extraction à grande échelle d'*Aucuba japonica*.

II. Modélisation moléculaire

1. Les coudes α et β

1.1. Généralités

Les coudes β ont été découverts par Venkatachalam²³⁷. Un coude β implique l'enchaînement de quatre acides aminés qui s'organisent en un pseudo-cycle à 10 centres, formé par une liaison hydrogène entre l'oxygène de la fonction carbonyle de l'acide-amino i et l'hydrogène porté par la fonction amide de l'acide-amino $i+3$ (Figure 102). Les deux acides-amino centraux orientent la formation de cette liaison en permettant le rapprochement de chaque bras en ayant des valeurs d'angles dièdres ϕ_1 (angle mesuré entre C=O $\{i\}$, N, C α , C=O $\{i+1\}$) et ψ_1 (angle mesuré entre N, C α , C=O, N $\{i+2\}$), ainsi que ϕ_2 (angle mesuré entre C=O $\{i+1\}$, N, C α , C=O $\{i+2\}$) et ψ_2 (angle mesuré entre N, C α , C=O, N $\{i+3\}$) bien définies. Dans les peptides naturels, les coudes β formés possèdent des valeurs d'angles dièdres définies dans le tableau 1. On retrouve ce type de coude β dans les structures secondaires en épingle connectant deux feuillets β . Ces feuillets ont des valeurs d'angles préférentiels qui sont en moyenne de $(\phi, \psi) = (-120^\circ, 115^\circ)$ pour les feuillets β parallèles et de $(\phi, \psi) = (-140^\circ, 135^\circ)$ pour les antiparallèles.

Différents sous-types de coudes ont été caractérisés en fonction des valeurs des angles dièdres²³⁸.

²³⁶ Li, Y.; Zhao, Y.; Zhang, Y. M.; Wang, M. J.; Sun, W. J. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 2270-2273

²³⁷ Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436

²³⁸ Chou, K. C. *Anal. Biochem.* **2000**, *286*, 1-16

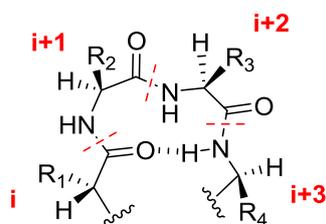


Figure 102: Coude β formé à partir de quatre acides aminés

Type de coude β	Résidu $i+1$		Résidu $i+2$	
	Angle ϕ_1	Angle ψ_1	Angle ϕ_2	Angle ψ_2
I	-60°	-30°	-90°	0°
II	-60°	$+120^\circ$	$+80^\circ$	0°
IV	-61°	$+10^\circ$	-53°	-17°
VIII	-60°	-30°	-120°	$+120^\circ$
I'	$+60^\circ$	$+30^\circ$	$+90^\circ$	0°
II'	$+60^\circ$	-120°	-80°	0°

Tableau 5: Valeurs des angles dièdres relevées pour les coudes β des peptides naturels

On distingue les coudes β classiques et les coudes β inverses représentés par un signe prime. Ainsi un coude β de type I' est inverse d'un coude β de type I et aura ainsi des valeurs d'angles dièdres de signes opposés. Les coudes I, I', II et II' sont les plus fréquents dans les protéines. Le coude β de type I étant le plus fréquent (deux à trois fois par rapport au type II), suivi par les coudes β de type II, I', II' respectivement (Tableau 5).

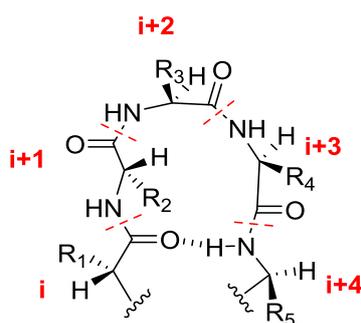


Figure 103: Coude α formé à partir de cinq acides aminés

Il est également possible d'observer des coudes α . Ce type de coude α se trouve notamment dans les structures secondaires présentant un agencement en hélice α , avec des valeurs régulières des angles $\phi = -58^\circ$ et $\psi = -47^\circ$. Les coudes α impliquent l'enchaînement de cinq acides aminés qui s'organisent en un pseudo-cycle à 13 centres, formé par une liaison hydrogène entre l'oxygène de la fonction carbonyle de l'acide-amino i et l'hydrogène porté par la fonction amide de l'acide-amino $i+4$ (Figure 103). Comme pour les coudes β , il existe neuf sous-types de coude α (en plus de l'agencement en hélice) qui ont été caractérisés en fonction des valeurs des angles dièdres²³⁸.

Type de coude α	Résidu i+1		Résidu i+2		Résidu i+3	
	Angle ϕ_1	Angle ψ_1	Angle ϕ_2	Angle ψ_2	Angle ϕ_3	Angle ψ_3
I- α_{RS}	-60°	-29°	-72°	-29°	-96°	-20°
I- α_{LS}	+48°	+42°	+67°	+33°	+70°	+32°
II- α_{RS}	-59°	+129°	+88°	-16°	-91°	-32°
II- α_{LS}	+53°	-137°	-95°	+81°	+57°	+38°
I- α_{RU}	+59°	-157°	-67°	-29°	-68°	-39°
I- α_{LU}	-61°	+158°	+64°	+37°	+62°	+39°
II- α_{RU}	+54°	+39°	+67°	-5°	-125°	-34°
II- α_{LU}	-65°	-20°	-90°	+16°	+86°	+37°
I- α_c	-103°	+143°	-85°	+2°	-54°	-39°

Tableau 6: Valeurs des angles dièdres autorisés pour les coudes α dans les peptides naturels

Les trois amino-acides centraux orientent la formation de cette liaison en permettant le rapprochement de chaque bras en ayant des valeurs d'angles dièdres ϕ_1 (angle mesuré entre C=O {i}, N, C α , C=O {i+1}) et ψ_1 (angle mesuré entre N, C α , C=O, N {i+2}), ϕ_2 (angle mesuré entre C=O {i+1}, N, C α , C=O {i+2}) et ψ_2 (angle mesuré entre N, C α , C=O, N {i+3}), ainsi que ϕ_3 (angle mesuré entre C=O {i+2}, N, C α , C=O {i+3}) et ψ_3 (angle mesuré entre N, C α , C=O, N {i+4}) bien définies. Comme vu précédemment pour les coudes β , les acides aminés d'un coude α ne peuvent prendre que certaines valeurs d'angles dièdres (Tableau 6). Les coudes I- α_{LS} , II- α_{RS} et I- α_{RU} sont les plus fréquents dans les protéines. Le coude α de type I- α_{LS} étant le plus fréquent (avec environ 70 % d'abondance), suivi par les coudes α de type II- α_{RS} et I- α_{RU} respectivement.

1.2. Formation de coude β de peptides modèles constitués du squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène

Les amino-acides de squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène présentés ci-dessous (Figure 104) possèdent un agencement spatial intéressant dû à leur squelette rigide. Il est donc possible d'envisager que ces composés possédant des angles dièdres bien spécifiques (notamment pour les δ et γ amino-acides bicyclo[3.1.0]hex-2-ène) puissent induire soit des coudes α , soit des coudes β .

Le squelette d'un amino-acide est constitué par trois atomes. On peut donc facilement envisager d'utiliser les châssis moléculaires bicyclo[3.1.0]hex-2-ène comme étant la combinaison de deux acides aminés. Les δ -acides aminés **77** et **79** comportent six atomes de la fonction amine à la fonction acide.

Quant au γ -acide aminé **78**, il comporte un enchaînement rigide constitué seulement de cinq atomes entre la fonction amine et la fonction acide, ce qui rend cet amino-acide plus contraint que les précédents. Les chaînes latérales des acides aminés centraux au niveau du coude β du peptide ciblé V114 ne sont pas impliquées directement dans les interactions avec le VEGF, on peut donc supposer que l'introduction de ces motifs ne diminuera aucunement l'activité déjà observée pour ce peptide. De plus, le remplacement des deux amino-acides naturels par des amino-acides contraints chiraux devrait augmenter cette activité en stabilisant la conformation en solution adoptée par ce nouveau peptide modifié.

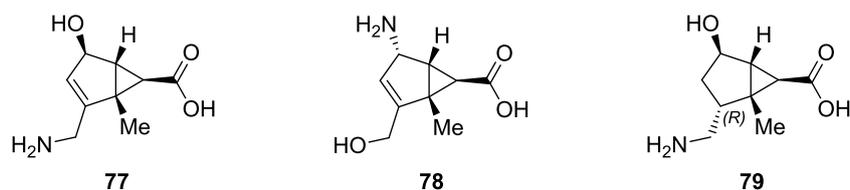


Figure 104: δ et γ amino-acides bicyclo[3.1.0]hex-2-ène

2. Application de la modélisation moléculaire à notre projet

2.1. Introduction

Pour vérifier les hypothèses précédentes et s'assurer du choix de l'acide aminé à incorporer pour modifier le peptide V114, nous avons réalisé une série de modélisations moléculaires à l'aide du logiciel Discovery Studio²³⁹ pour étudier, sur un temps donné, les différentes conformations adoptées par des peptides modèles en solution dans l'eau. Ils sont formés du motif bicyclo[3.1.0]hex-2-ène qui constitue la partie centrale mimant les acides aminés $i+1$ et $i+2$ du coude β et de deux alanines greffées en i (protégée par une fonction Boc sur l'amine) et en $i+3$ (protégée sous forme d'ester méthylique) qui sont nécessaires pour pouvoir observer la formation du coude β . Etant donné que nous disposons en grande quantité de deux synthons bicyclo[3.1.0]hex-2-ène déjà construits, nous avons effectué la modélisation dans un premier temps à partir de ces deux synthons **77** et **78** (Figure 104). Pour cette étude, les molécules d'eau sont représentées de façon explicite comme une cage de solvant dans lequel se trouve le peptide.

Dans un premier temps, les peptides **80** et **81** ont été modélisés avec le N-terminal acétylé et le C-terminal sous forme d'amide, comme il est classique de les représenter (Figure 105).

²³⁹ Discovery Studio BIOVIA, San Diego: Dassault Systèmes 2017

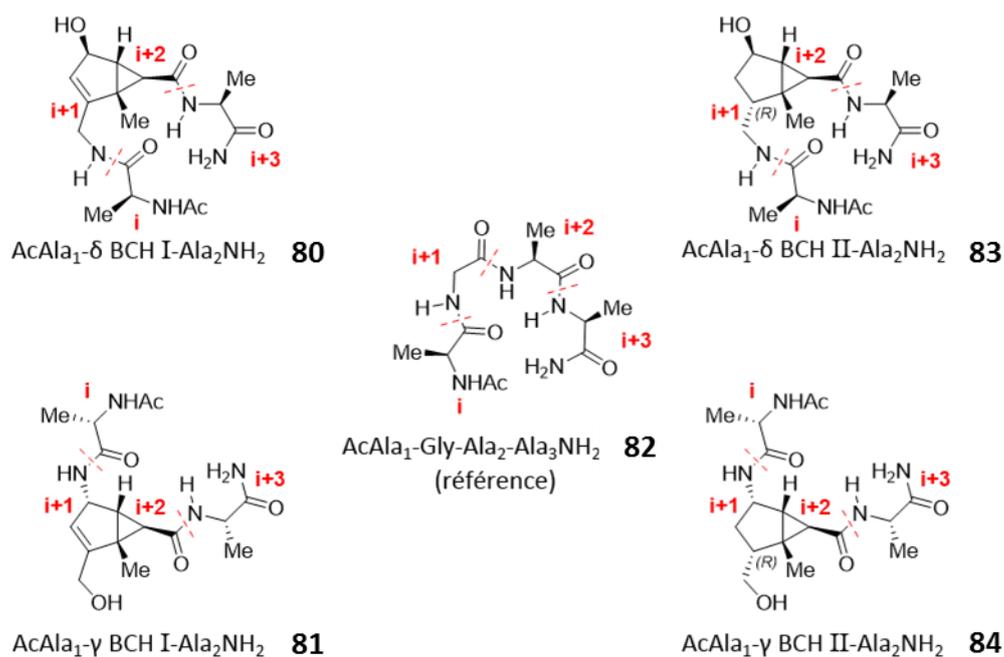


Figure 105: Peptides modèles avec le N-ter acétylé et le C-ter amidifié

Les quatre peptides **80**, **81**, **82**, **83** ont été comparés à un peptide linéaire non contraint **82** servant de contrôle négatif. Les résultats de modélisation obtenus pour les composés **80** et **81** montrent que le groupement méthyle du squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène pourrait gêner la formation du coude β. Nous avons donc modélisé les composés **83** et **84** qui correspondent à la réduction de la double liaison et à l'obtention du diastéréoisomère R.

Puis dans un second temps, les peptides ont été modélisés sous forme protégée correspondant aux structures des peptides modèles qui seront synthétisés (Figure 106). Pour ces peptides, l'alanine du côté du N-terminal (résidu i) sera protégée par une fonction Boc, et l'alanine du côté C-terminal (résidu i+3) sera sous forme d'ester méthylique.

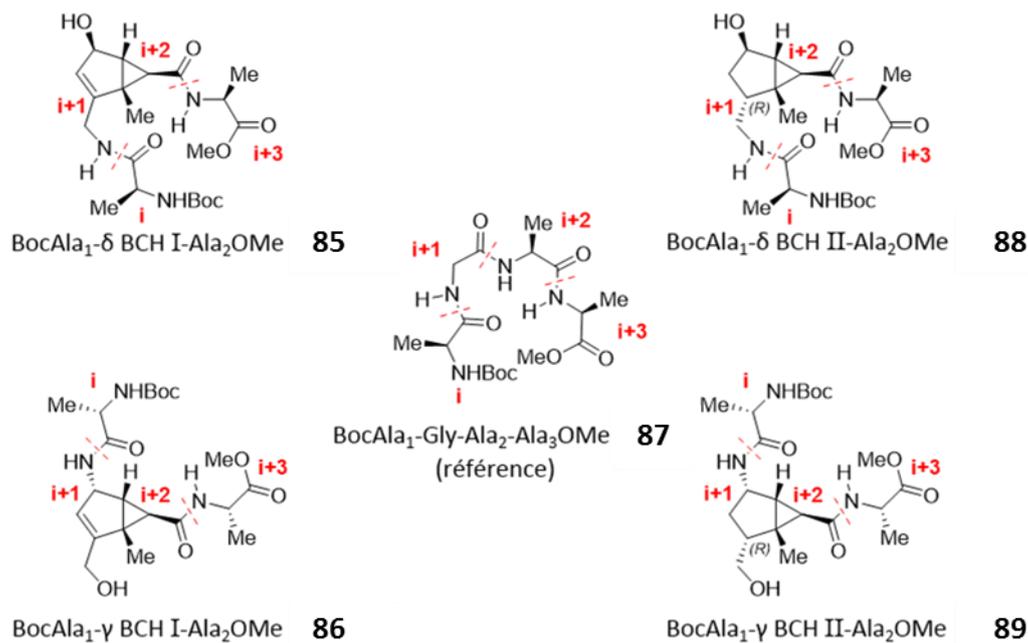


Figure 106: Peptides modèles protégés au niveau du N-ter et du C-ter

2.2. Procédure pour générer les conformations par dynamique moléculaire

Nous avons procédé comme présenté sur la Figure 107 pour obtenir un ensemble de conformations modélisées.

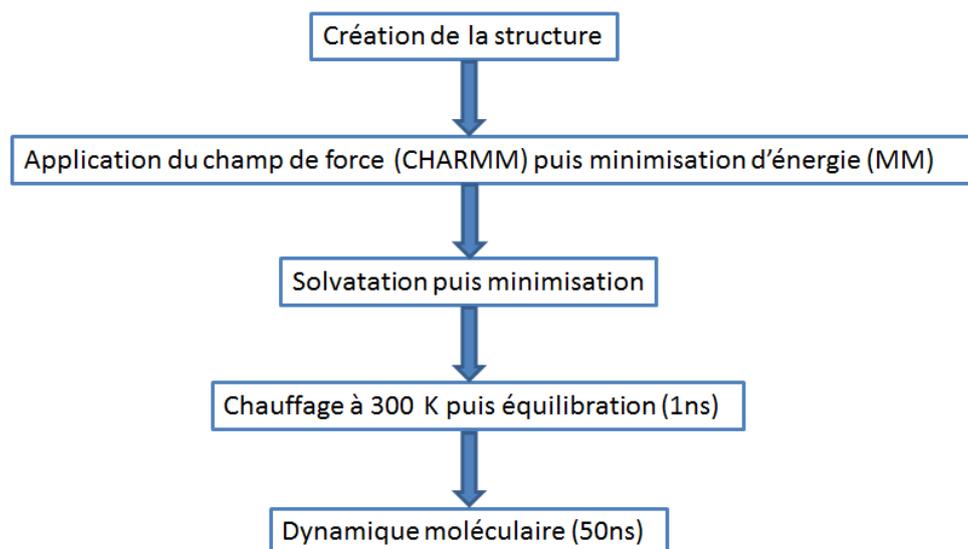


Figure 107: Procédure pour réaliser la dynamique moléculaire

Tout d'abord, il faut dessiner la structure du peptide dans le logiciel, ensuite appliquer le champ de force, ici CHARMM. (Un champ de force est un ensemble de potentiels et de paramètres permettant de calculer l'énergie potentielle d'un système de particules). Les potentiels et paramètres d'un champ

de force donné sont déterminés à partir de résultats expérimentaux et de calculs précis en mécanique quantique. Après l'application du champ de force, une minimisation d'énergie est effectuée. Ensuite, le peptide est solvato par plusieurs centaines de molécules d'eau traitées de façon explicite (les molécules d'eau sont représentées) par le champ de force, puis l'énergie de l'ensemble est à nouveau minimisée. Avant de pouvoir passer à la dynamique moléculaire proprement dite, il faut modéliser un chauffage du peptide solvato à une température de 300 K. Après ce chauffage, une équilibration d'une durée de 1 ns est nécessaire afin de stabiliser le système.

La production des conformations est réalisée avec un pas de 2 fs sur l'ensemble de la trajectoire (ce qui correspond environ à la fréquence de vibration des liaisons atomiques), et nous avons décidé de sauvegarder une conformation toutes les 10 ps afin de ne pas avoir trop de données à traiter (et de ne pas générer des fichiers trop volumineux à manipuler). Les valeurs par défaut des autres paramètres du logiciel sont conservées.

3. Traitement des résultats et analyses

Avec une dynamique réalisée sur 50 ns, nous avons ainsi généré 5000 conformations pour tous les peptides, que nous avons par la suite échantillonnées aléatoirement à 500 conformations afin de pouvoir les traiter et les analyser. Nous avons également réalisé un second échantillonnage aléatoire afin de vérifier si cette méthode permettait de valider les résultats obtenus.

Nous avons, de plus, réalisé la modélisation moléculaire sur un peptide linéaire **87** (BocAla₁-Gly-Ala₂-Ala₃OMe) afin d'étudier le pourcentage de coude formé dans le cas d'un peptide n'ayant aucune contrainte et possédant une très grande flexibilité. Ce peptide **87** sert de contrôle négatif. Dans un peptide linéaire, on s'attend à ce que la présence de la liaison hydrogène entre le C=O du résidu *i* et le NH du résidu *i*+3 soit très faible étant donné que le peptide possède une grande liberté de mouvement et peut adopter un grand nombre de conformations.

Afin de pouvoir conclure à propos des hypothèses faites sur le choix de l'acide-amino à incorporer dans le peptide biologique, nous avons traité les résultats des trajectoires de dynamique moléculaire obtenus de diverses manières.

3.1. Mesure des valeurs des angles dièdres

Initialement, nous avons voulu étudier les valeurs des angles dièdres observés dans les différents peptides modélisés (BocAla₁- δ BCH I-Ala₂OMe **85**, BocAla₁- γ BCH I-Ala₂OMe **86**, ainsi que sur les deux

peptides ayant la double liaison réduite soit BocAla₁- δ BCH II-Ala₂OMe **88** et BocAla₁- γ BCH II-Ala₂OMe **89**). Nous avons ensuite comparé ces valeurs avec celles connues et autorisées dans les peptides naturels. Cependant, étant donné que le bicyclic est très contraint nous avons des valeurs d'angles dièdres très particulières qui ne sont pas comparables deux à deux avec celles des peptides naturels.

3.2. Formation de cluster

Nous avons dans un second temps analysé l'ensemble des conformations échantillonnées en les comparant deux à deux à l'aide du RMSD (« Root Mean Square Deviation ») pour les peptides **85**, **86**. Le RMSD permet de mesurer la distance moyenne (basée sur une sélection d'atomes, ici, les atomes C et O du résidu i et les atomes N et H du résidu $i+3$, formant la liaison hydrogène du coude β) entre un composé et une référence. Ici, chaque conformation est comparée à la totalité des autres, ce qui génère une matrice de données qui est ensuite représentée sous un ensemble de clusters en fonction des distances trouvées. Les clusters du peptide **85** sont représentés dans la Figure 108.

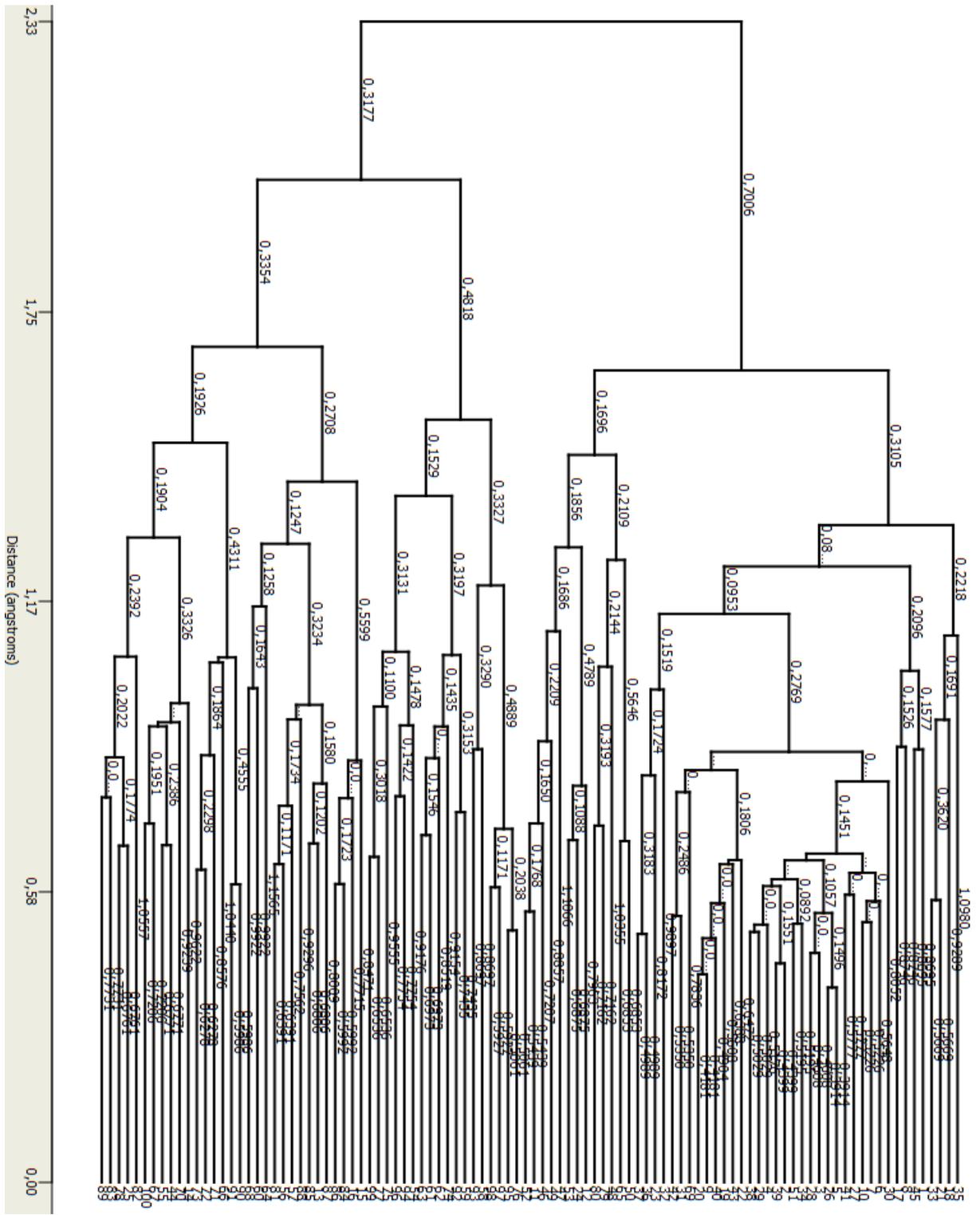


Figure 108: Cluster issu de l'analyse par RMSD

Ce type de résultat est assez difficile à interpréter. Nous pouvons seulement observer que pour une distance aux alentours de 2,33 Å, il existe seulement deux clusters. Le premier cluster (groupe du haut) comprend l'ensemble des conformations où les deux bras sont suffisamment proches dans l'espace pour former potentiellement un coude β . Par conséquent, le second regroupe l'ensemble des conformations où les deux bras du peptide sont très éloignés dans l'espace (groupe du bas). Plus la distance est faible entre les conformations, plus elles sont proches spatialement. Néanmoins, une faible distance entre deux conformations n'indique pas la présence d'un coude β .

3.3. Etude de la présence ou de l'absence de la liaison hydrogène

Afin d'avoir des résultats facilement interprétables, nous avons envisagé d'observer la présence ou l'absence de la liaison hydrogène caractéristique impliquée dans la formation du coude β (entre le C=O du résidu i et le NH du résidu $i+3$), comme décrit originellement par Venkatachalam²³⁷. La présence de la liaison hydrogène caractéristique entre le C=O du résidu i et le NH du résidu $i+3$ dans les conformations modélisées est une première définition d'un coude β . Cependant, Lewis et son équipe²⁴⁰ ont trouvé que 25 % des coudes β étaient « ouverts » en analysant un grand nombre de protéines. Un coude β « ouvert » signifie qu'il ne possède pas la liaison hydrogène intramoléculaire. Une nouvelle définition a donc vu le jour. Un coude β comprend quatre résidus consécutifs où la distance $C\alpha_i \rightarrow C\alpha_{i+3}$ est inférieure ou égale à 7,0 Å et la chaîne tetrapeptide n'est pas dans une conformation en hélice^{241,242}. Cette distance de 7,0 Å permet d'avoir une orientation correcte des deux extrémités du coude et le changement de direction souhaité de la séquence peptidique.

Nous avons donc à nouveau analysé les trajectoires de dynamique moléculaire en fonction des distances $C\alpha_i \rightarrow C\alpha_{i+3}$ du coude β .

Nous avons ainsi représenté sur le même graphique, la présence ou l'absence de liaison hydrogène ainsi que la valeur de la distance $C\alpha_i \rightarrow C\alpha_{i+3}$ pour les quatre peptides modèles ainsi que le peptide linéaire qui nous sert de référence.

²⁴⁰ Lewis, P. N.; Momany, F. A.; Scheraga, H. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 211-229

²⁴¹ Richardson, J. S. *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167-339

²⁴² Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1-109

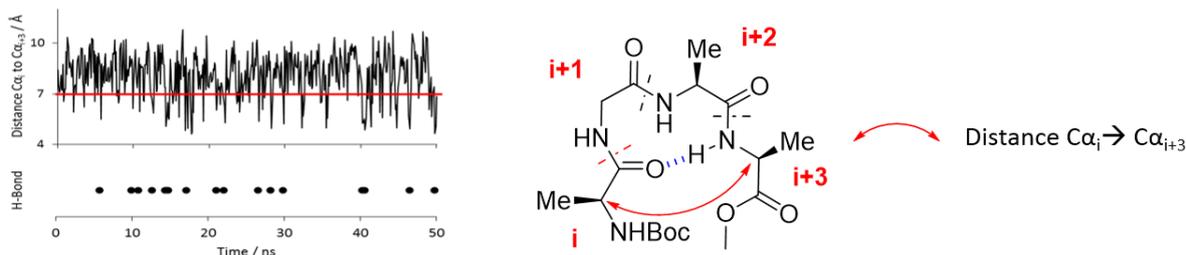


Figure 111009: Représentation de la liaison hydrogène et des distances $C\alpha_i \rightarrow C\alpha_{i+3}$ du peptide 87

Pour commencer, le peptide BocAla₁-Gly-Ala₂-Ala₃OMe **87** servant de référence et de contrôle négatif, ne montre que très peu de liaison hydrogène formée sur l'ensemble de sa dynamique moléculaire. Ce peptide est très flexible et ne présente aucune contrainte structurale. Les distances $C\alpha_i \rightarrow C\alpha_{i+3}$ du peptide **87** oscillent avec une amplitude très ample comprise entre 5 et 10 Å environ, avec une moyenne aux alentours de 9,0 Å. Cependant, 18,8 % des conformations possèdent tout de même une distance inférieure à 7,0 Å (Figure 109Figure 1110).

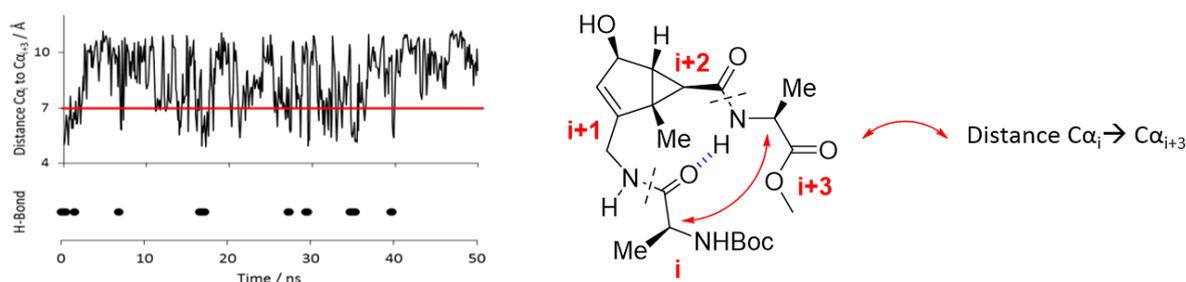


Figure 11110: Représentation de la liaison hydrogène et des distances $C\alpha_i \rightarrow C\alpha_{i+3}$ du peptide 85

Pour le peptide modèle BocAla₁- δ BCH I-Ala₂OMe **85**, la liaison hydrogène est très peu formée au cours de la dynamique moléculaire de 50 ns. Le peptide **85** présente une assez grande flexibilité, visible par l'alternance rapide des conformations ayant des distances $C\alpha_i \rightarrow C\alpha_{i+3}$ proches (5,5 à 7,0 Å) et éloignées (>10 Å). 17,4 % seulement des conformations ont une distance inférieure à 7,0 Å (Figure 110Figure 111).

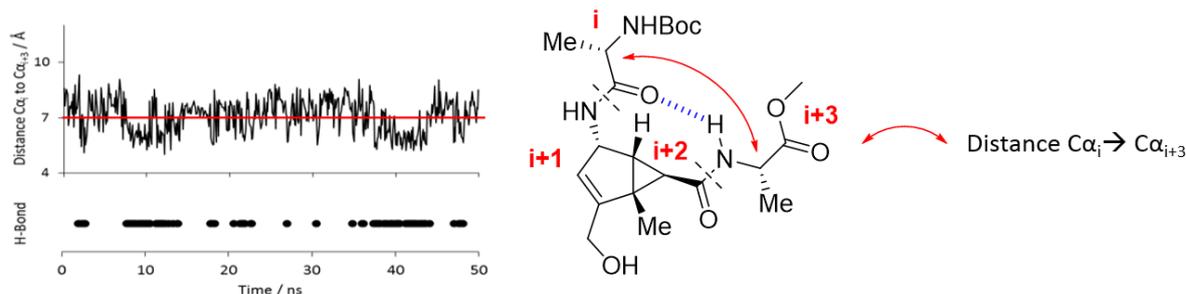


Figure 11111: Représentation de la liaison hydrogène et des distances $C\alpha_i \rightarrow C\alpha_{i+3}$ du peptide 86

Pour le peptide modèle BocAla₁-γ BCH I-Ala₂OMe **86**, la liaison hydrogène est régulièrement présente sur l'ensemble de la dynamique moléculaire. Lorsque la liaison est formée, elle est maintenue sur plusieurs conformations consécutives. On peut en déduire que cette liaison est de force moyenne. Les distances Cα_i → Cα_{i+3} du peptide **86** oscillent avec moins d'amplitude (entre 5 et 9 Å environ), avec une moyenne autour de 7,0 Å. Et 41,4 % des conformations ont une distance inférieure à 7,0 Å (Figure 111).

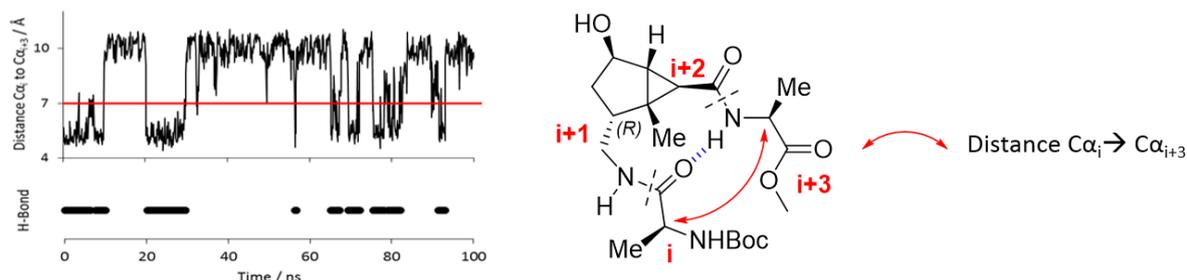


Figure 112: Représentation de la liaison hydrogène et des distances Cα_i → Cα_{i+3} du peptide **88**

Dans le cas du peptide modèle BocAla₁-δ BCH II-Ala₂OMe **88**, on peut observer que la liaison hydrogène est très présente et très forte (formation de paquets) jusqu'à la conformation 30 ns, mais par la suite elle n'est plus formée de 30 ns à 50 ns. C'est pourquoi nous avons poursuivi la dynamique moléculaire jusqu'à 100 ns afin d'étudier si la liaison se reformait, ce qui est bien le cas. Le peptide **88** présente également une alternance de conformations proches et éloignées, mais les conformations proches (distance inférieure à 7,0 Å) semblent plus stables car elles sont groupées, et elles représentent 30,6 % de la trajectoire (Figure 112).

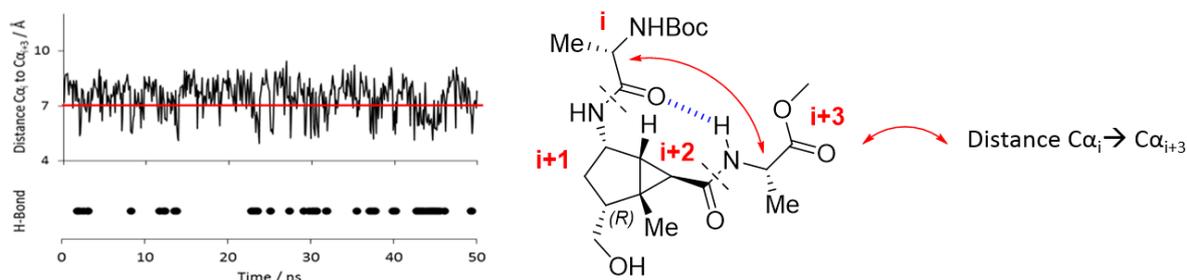


Figure 113: Représentation de la liaison hydrogène et des distances Cα_i → Cα_{i+3} du peptide **89**

Pour le peptide modèle BocAla₁-γ BCH II-Ala₂OMe **89**, la liaison hydrogène est présente par intermittence sur l'ensemble de la dynamique moléculaire. Cependant, elle est moins souvent présente que pour son homologue non réduit. Lorsque la liaison est formée, elle est maintenue sur plusieurs conformations consécutives. Les distances Cα_i → Cα_{i+3} du peptide **89** oscillent avec une amplitude comprise entre 5 et 9 Å environ, avec une moyenne aux alentours de 7,0 Å comme pour le peptide **86**. Cette fois-ci, seulement 26,2 % des conformations ont une distance inférieure à 7,0 Å

(Figure 113). La réduction de la double liaison n'a que très peu amélioré les propriétés de l'acide aminé **86**.

Les résultats calculés à partir de la dynamique moléculaire pour chaque tripeptide modèle ont été rassemblés dans le Tableau 7.

Peptide	% Coude β^a / Liaison H			% Coude β^b / $d(C\alpha_1-C\alpha_4) \leq 7,0 \text{ \AA}$		
	50 ns	50 ns (bis)	100 ns	50 ns	50 ns (bis)	100 ns
BocAla₁-δ BCH I-Ala₂OMe (85)	6,4 (6,8) ^c	5,8 (6,5)		17,4 (18,2)	14,8 (15,8)	
BocAla₁-δ BCH II-Ala₂OMe (88)	51,6 (52,2)	15,6 (14,9)	26,4 (26,7)	58,8 (59,4)	20,0 (20,0)	30,6 (30,3)
BocAla₁-γ BCH I-Ala₂OMe (86)	20,7 (18,2)	24,4 (27,0)		41,4 (42,4)	44,0 (46,2)	
BocAla₁-γ BCH II-Ala₂OMe (89)	11,8 (11,2)	9,4 (9,7)		26,2 (29,2)	23,4 (22,2)	
BocAla₁-Gly-Ala₂-Ala₃OMe (87)	3,4 (3,0)	4,2 (3,6)		18,8 (19,6)	22,2 (23,0)	

Tableau 7: Pourcentage des conformations contenant un coude β calculé par dynamique moléculaire

a. % de coude β calculé en fonction de la présence de la liaison hydrogène entre le groupement C=O du résidu alanine N-terminal et le groupement NH du résidu alanine C-terminal (« i à $i+3$ »)

b. % de coude β calculé en fonction de la distance entre le C α du résidu alanine N-terminal et le C α du résidu alanine C-terminal (« C α_i à C α_{i+3} »)

c. Les résultats entre parenthèses sont obtenus après un échantillonnage de la trajectoire à partir de la conformation 5 (au lieu de la conformation 1, voir la partie expérimentale)

L'échantillonnage de la trajectoire à partir de la conformation 1 ou de la conformation 5 donne des résultats semblables (avec un écart de 1 % à 3 %).

La méthode d'échantillonnage (500 conformations extraites à partir de 5000 conformations sauvegardées toutes les 10 ps pendant la simulation) est bien représentative de l'ensemble de la trajectoire.

Les deux trajectoires successives de 50 ns donnent des résultats similaires (avec un écart moyen de 4 %) pour l'ensemble des peptides modèles BocAla₁- δ BCH I-Ala₂OMe (**85**), BocAla₁- γ BCH I-Ala₂OMe (**86**) et BocAla₁- γ BCH II-Ala₂OMe (**89**), sauf pour le peptide BocAla₁- δ BCH II-Ala₂OMe (**88**). Dans le cas de **88**, une nouvelle simulation de 100 ns est réalisée.

Le Tableau 8 et le Tableau 9 regroupent la moyenne de tous les résultats obtenus par dynamique moléculaire pour les peptides modèles BocAla₁-δ BCH I-Ala₂OMe (**85**), BocAla₁-γ BCH I-Ala₂OMe (**86**), BocAla₁-δ BCH II-Ala₂OMe (**88**) et BocAla₁-γ BCH II-Ala₂OMe (**89**).

Nom peptide	% coude β*	% coude α*
AcAla ₁ -δ BCH I-Ala ₂ NH ₂ (80)	1,6	21,6
AcAla ₁ -γ BCH I-Ala ₂ NH ₂ (81)	10,6	12,2
AcAla ₁ -δ BCH II-Ala ₂ NH ₂ (83)	27,9	5,8
AcAla ₁ -γ BCH II-Ala ₂ NH ₂ (84)	10,2	5,6
AcAla ₁ -Gly-Ala ₂ -Ala ₃ NH ₂ (82)	11	12
BocAla ₁ -δ BCH I-Ala ₂ OMe (85)	6,1	/
BocAla ₁ -γ BCH I-Ala ₂ OMe (86)	22,6	10,6
BocAla ₁ -δ BCH II-Ala ₂ OMe (88)	31,2 ^a	/
BocAla ₁ -γ BCH II-Ala ₂ OMe (89)	10,6	/
BocAla ₁ -Gly-Ala ₂ -Ala ₃ OMe (87)	3,8	/

Tableau 8: Pourcentage sur 100 ns de coude formé en fonction de la présence de la liaison hydrogène. (a) Pourcentage sur 200 ns

*Calcul basé sur la présence d'une liaison hydrogène entre le C=O du résidu *i* et le NH du résidu *i*+3.

Nom peptide	% coude β*
BocAla ₁ -δ BCH I-Ala ₂ OMe (85)	16,1
BocAla ₁ -γ BCH I-Ala ₂ OMe (86)	42,7
BocAla ₁ -δ BCH II-Ala ₂ OMe (88)	36,5 ^a
BocAla ₁ -γ BCH II-Ala ₂ OMe (89)	24,8
BocAla ₁ -Gly-Ala ₂ -Ala ₃ OMe (87)	20,5

Tableau 9: Pourcentage sur 100 ns de coude formé en fonction de la distance Ca_{*i*} → Ca_{*i*+3}. (a) Pourcentage sur 200 ns

*Calcul basé sur la distance Ca_{*i*} → Ca_{*i*+3} inférieure ou égale à 7.0 Å.

La valeur 11 % de formation de la liaison hydrogène pour le peptide **82** linéaire (contrôle négatif), semble montrer que le champ de force CHARMM aurait une légère tendance à surestimer les structures secondaires de type β. Cette observation est en accord avec les données de la littérature²⁴³.

²⁴³ Lindorff-Larsen, K.; Maragakis, P.; Piana, S.; Eastwood, M. P.; Dror, R. O.; Shaw, D. E. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32131

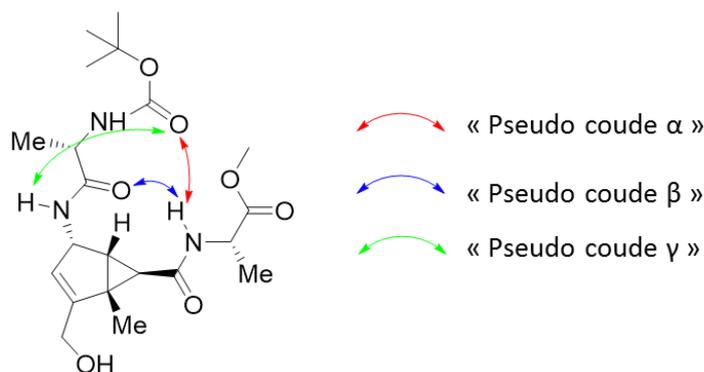


Figure 114 : Représentation des pseudo coudes observés

Dans tous les cas, nous avons également observé la formation de liaison hydrogène γ ou liaison intra-bras (pseudo-cycle à 7 centres). Pour le peptide **86**, des liaisons hydrogènes caractéristiques d'un pseudo coude α (pseudo-cycle à 12 centres) représentent 10,6 % des conformations (Figure 114).

Les corrélations liaisons hydrogène - distances nous permettent d'avoir une idée précise dans le choix de l'acide aminé pouvant induire un coude β (Tableau 7, Tableau 8 et Tableau 9).

Le peptide **86** semble être un bon candidat pour induire le coude β recherché. Le fait qu'il possède moins de degrés de liberté que son homologue le δ -amino acide **85** (seulement 2 rotations autour de liaisons simples contre 3 pour les autres) et qu'il s'arrange en un pseudo-cycle à 9 atomes pour le coude β (contre 10 pour les δ -amino acides), induit une distance plus faible en moyenne sur l'ensemble de ces conformations.

La réduction de la double liaison a eu un impact très important pour le δ -amino acide **88**. En effet, la transformation du carbone hybridé sp^2 (plan) en un carbone hybridé sp^3 (tétraédrique), permet le rapprochement des deux bras du peptide **88** et ainsi favorise la formation de la liaison hydrogène. Nous avons ainsi pu gagner 20 % de présence de liaison hydrogène, ainsi que 13,2 % de distance $C\alpha_i \rightarrow C\alpha_{i+3}$ inférieure ou égale à 7,0 Å. De plus, nous avons observé que lorsque la liaison hydrogène est formée, elle est maintenue sur un grand nombre de conformations consécutives.

4. Conclusion et perspectives

Nous avons donc deux candidats potentiels, les peptides **86** et **88** qui peuvent induire un coude β et ainsi orienter correctement les extrémités du peptide. Afin de valider les résultats obtenus par modélisation moléculaire, nous avons synthétisé en parallèle ces mêmes peptides modèles.

III. Mécanique quantique

1. Introduction

Afin d'affiner notre première étude *in-silico* et déterminer l'énergie des conformations les plus stables, nous avons réalisé une étude de mécanique quantique basée sur la DFT (théorie de la fonctionnelle de la densité). Cette méthode de mécanique quantique ne dépend d'aucun paramètre empirique ajustable et fait donc parti des techniques de calculs appelées *ab-initio*. La DFT repose sur deux théorèmes de Hohenberg et Kohn. Elle permet de connaître totalement l'état d'un système électronique (position, quantité de mouvement, spin et énergie des électrons) en déterminant sa densité électronique. La densité électronique de l'état fondamental peut être obtenue en minimisant l'énergie du système.

Pour ce faire, nous avons effectué une recherche conformationnelle en utilisant la méthode de « recherche aléatoire » du logiciel Discovery Studio²³⁹. Cette méthode de dynamique moléculaire est toujours réalisée dans l'eau en appliquant le champ de force CHARMM. Nous avons généré 100000 conformations qui ont été traitées et analysées en utilisant le RMSD avec une limite fixée à 1 Å. Cette analyse a permis de sélectionner les trois conformations de plus basse énergie pour chaque tripeptide modèle BocAla₁-δ BCH I-Ala₂OMe (**85**), BocAla₁-γ BCH I-Ala₂OMe (**86**) et BocAla₁-δ BCH II-Ala₂OMe (**88**).

Une fois les trois conformations sélectionnées pour les trois tripeptides modèles, ces dernières ont subi une optimisation de leur géométrie par DFT. Nous avons appliqué le fonctionnel B3LYP avec le set d'orbitales de base 6-31+G(d)²⁴⁴ du logiciel GAMESS²⁴⁵. Ce set d'orbitales de base est classiquement utilisé avec le fonctionnel B3LYP pour optimiser la géométrie et évaluer l'énergie de molécules contenant des atomes de la deuxième période. Deux séries de calculs ont été réalisées, l'une dans le vide et la seconde dans l'eau. La population des conformères pour chaque peptide modèle a par la suite été calculée en utilisant l'équation de Boltzmann, en considérant l'enthalpie libre de Gibbs total (ΔG).

²⁴⁴ Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623-11627

²⁴⁵ Schmidt, M. W.; Baldridge, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347-1363

2. Résultats

L'ensemble des résultats obtenus par DFT est rassemblé dans le Tableau 10.

Peptide	Conformation initiale	Conformation finale	Vide		Eau (Modèle PCM)	
			$\Delta\Delta G^a$	Population	$\Delta\Delta G^a$	Population
			(kcal/mol)	% ^b	(kcal/mol)	% ^b
BocAla ₁ - δ BCH I-Ala ₂ OMe (85)	"Coude β "	"Coude β "	0	99,82	0,53	26,98
	"Coude à 11 membres" (NH-Boc)	"Pas de liaison H" ^c	8,03 ^c	0,00 ^c	0 ^c	66,03 ^c
	"Pas de liaison H"	"Pas de liaison H"	3,73	0,18	1,33	6,99
BocAla ₁ - δ BCH II-Ala ₂ OMe (88)	"Coude β "	"Coude β "	0	84,85	0	76,53
	"Coude α "	"Coude α "	8,82	0,00	9,15	0,00
	"Pas de liaison H"	"Pas de liaison H"	1,02	15,15	0,70	23,47
BocAla ₁ - γ BCH I-Ala ₂ OMe (86)	"Coude β "	"Pas de liaison H" ^c	0,73 ^c	22,57 ^c	0 ^c	100 ^c
	"Coude α "	"Coude α "	11,69	0,00	11,15	0,00
	Pas de liaison H"	"Pas de liaison H"	0	77,43	7,59	0,00

Tableau 10: Pourcentage des conformations finales calculé par DFT à un niveau de théorie B3LYP/6-31+G(d)

a. Energies libres relatives calculées en prenant en compte les énergies électroniques (incluant les énergies de solvation dans le cas de l'eau) et l'enthalpie libre à 298,15 K

b. Calculé selon l'équation de Boltzmann

c. La liaison hydrogène indiquée était rompue pendant l'optimisation de la géométrie, résultant une nouvelle conformation « Pas de liaison H »

La recherche conformationnelle utilisant le champ de force CHARMM donne les conformations en coude α parmi les plus stables pour le peptide BocAla₁- δ BCH II-Ala₂OMe (**88**) et le peptide BocAla₁- γ BCH I-Ala₂OMe (**86**), tandis que les calculs DFT trouvent systématiquement ces conformations avec une énergie supérieure (0,00 % de coude α , à la fois dans l'eau et dans le vide).

2.1. Le peptide BocAla₁- δ BCH I-Ala₂OMe (85)

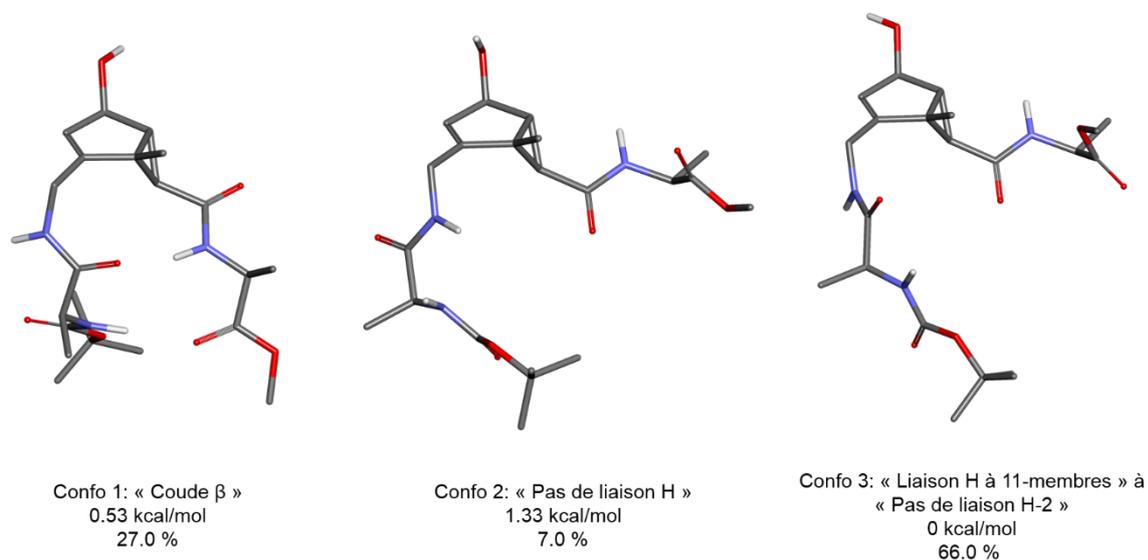


Figure 115: Conformations dans l'eau du peptide 85

Un effet de solvant important est observé pour le peptide BocAla₁- δ BCH I-Ala₂OMe (85): la conformation en coude β est exclusivement présente dans le vide, mais elle diminue à 27 % dans l'eau (Figure 115).

2.2. Le peptide BocAla₁- δ BCH II-Ala₂OMe (88)

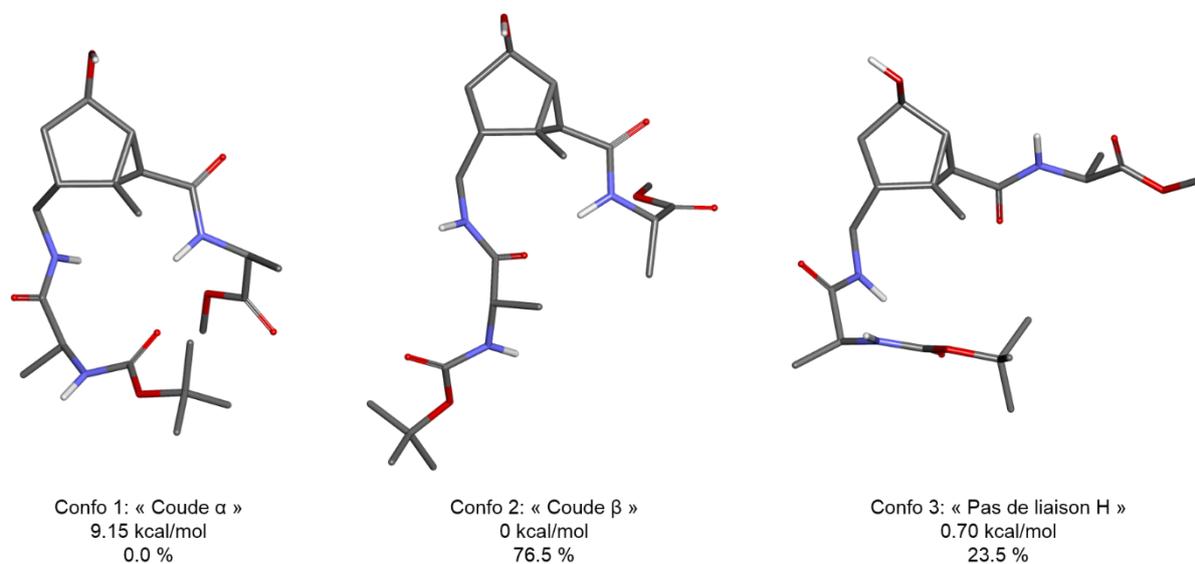


Figure 116: Conformations dans l'eau du peptide 88

Le peptide BocAla₁-δ BCH II-Ala₂OMe (**88**) présente la conformation en coude β comme étant la plus importante (approximativement 80 %) à la fois dans l'eau et dans le vide (Figure 116).

2.3. Le peptide BocAla₁-γ BCH I-Ala₂OMe (**86**)

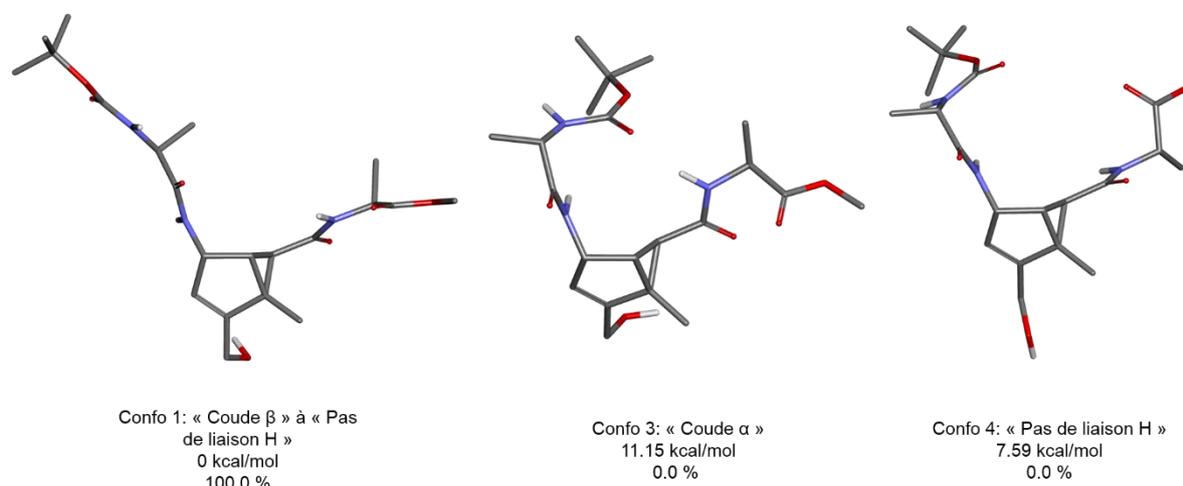


Figure 117: Conformations dans l'eau du peptide 86

Pour le peptide BocAla₁-γ BCH I-Ala₂OMe (**86**), la liaison hydrogène de la conformation en coude β est rompue dans le vide et dans l'eau pendant l'optimisation d'énergie. Il en résulte l'apparition d'une nouvelle conformation stable présentant une liaison hydrogène non formée (environ 100 % dans l'eau) (Figure 117).

3. Conclusion

Nous avons étudié pour chaque tripeptide modèle à un niveau de théorie B3LYP/6-31+G(d) et seules trois conformations ont été identifiées comme étant les plus stables selon la méthode de recherche conformationnelle aléatoire parmi une infinité de conformations. Même si les résultats donnent un classement utile des différentes conformations spécifiques, d'autres conformations et/ou un niveau de théorie supérieure peut être nécessaire pour avoir une représentation moyenne plus précise de l'espace conformationnel. Cette étude nous a permis de trouver que le peptide BocAla₁-δ BCH II-Ala₂OMe (**88**) était le meilleur candidat pour l'induction d'un coude β.

Différentes études : RMN (effet NOE correspondant aux interactions H-H, valeurs des couplages ³J C-H, variations de température, ajouts de DMSO-d₆), infrarouge, dichroïsme circulaire devraient permettre de valider ou non l'étude *in-silico*.

IV. Préparation du synthon 69

Afin d'obtenir nos trois acides aminés **62**, **63** et **90**, il a été nécessaire de synthétiser à nouveau le synthon **69** en quantité suffisante. Ce synthon est un intermédiaire commun. A partir de ce dernier, il est possible d'orienter la suite de la synthèse vers l'acide aminé désiré et d'obtenir ce dernier en deux ou trois étapes (Figure 118).

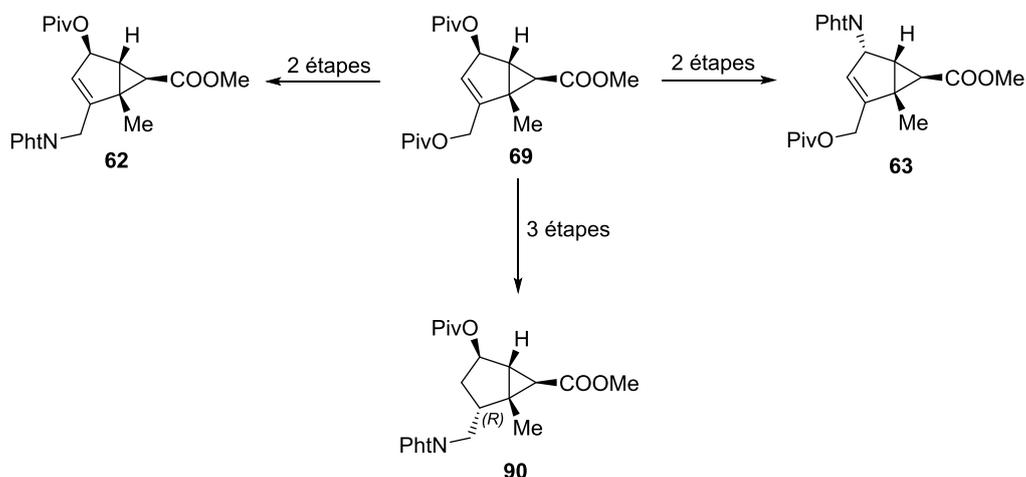


Figure 118: Synthons clés de la synthèse

Pour synthétiser le synthon **69**, nous avons utilisé la voie de synthèse développée et validée par Natacha Loury¹³⁵ lors d'une synthèse réalisée à l'échelle semi-industrielle. Le schéma de synthèse est rappelé Figure 119. Toutes les transformations chimiques ont été menées à température ambiante.

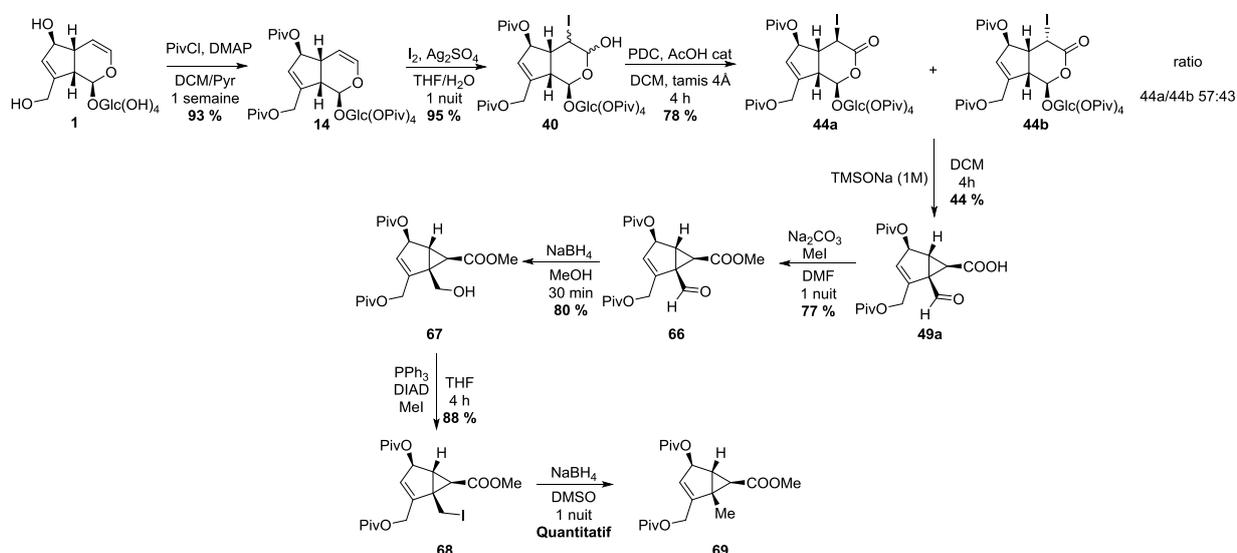


Figure 119: Voie de synthèse à l'échelle semi-industrielle du synthon **69**

1. Description de la synthèse

1.1. Première étape : Protection

La première étape de cette synthèse est une étape de protection des différentes fonctions alcools à la fois primaires et secondaires en utilisant le chlorure de pivaloyle en large excès en présence de 4-DMAP (4-Diméthylaminopyridine) catalytique dans un mélange anhydre de dichlorométhane/pyridine (1:1). Cette réaction est effectuée à température ambiante pendant une semaine (Figure 120). La 4-DMAP permet d'augmenter la réactivité du chlorure d'acide.

Si le lot d'aucuboside **1** de départ n'était pas très pur et qu'il contenait une certaine quantité de sucres, il est possible d'obtenir après purification, un lot de composé **14** partiellement pivaloylé. Il est donc recyclé pour finir la perpivaloylation. Le mécanisme de protection de la fonction alcool est détaillé Figure 120.

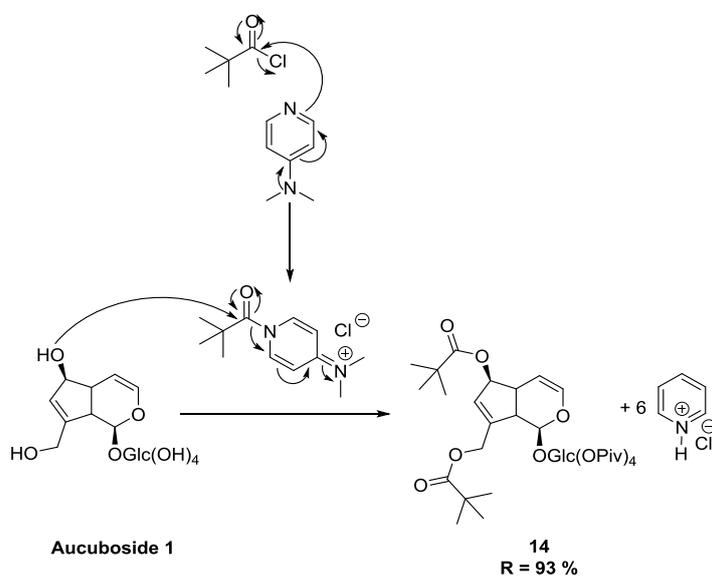


Figure 120 : Mécanisme réactionnel expliquant la formation du perpivaloylaucuboside

1.2. Deuxième étape : Oxydation de la double liaison - Formation des iodolactols

La seconde étape consiste à réaliser l'oxydation de la double liaison du noyau pyranique en formant un iodolactol **40** en utilisant du sulfate d'argent en présence d'iode dans un mélange de THF/eau (9:1). Cette réaction est effectuée selon le mécanisme décrit Figure 121.

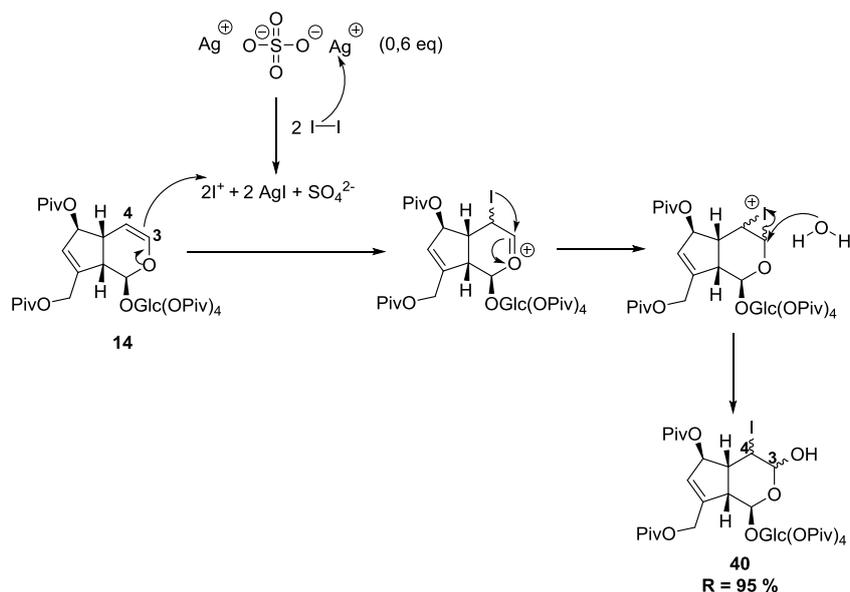


Figure 121: Mécanisme réactionnel expliquant la formation des iodolactols

La liaison dans la molécule de diiode se polarise en réagissant avec le sulfate d'argent. En formant un précipité stable d'iodure d'argent, on génère ainsi *in-situ*, une source d'iode électrophile réactif. La double liaison C₃=C₄ du noyau pyranique réagit avec cet iode électrophile pour former ainsi un pont iodonium. Une fois ce pont formé, une molécule d'eau vient attaquer le carbone le plus électrophile pour conduire à l'ouverture du pont iodonium. On obtient ainsi un mélange de quatre diastéréoisomères **40** (deux majoritaires et deux minoritaires) étant donné que nous avons créé deux centres asymétriques. Ce mélange n'est pas purifié et est engagé directement dans l'étape suivante après une simple filtration sur silice.

1.3. Troisième étape : Oxydation de la double liaison - Formation des iodolactones

L'étape suivante consiste en l'oxydation du mélange de iodolactols **40** en iodolactones **44** en utilisant les conditions de S. Czernecki²⁰⁹, soit le pyridinium dichromate (PDC) dans du dichlorométhane anhydre en présence d'acide acétique catalytique. La réaction est menée sous atmosphère inerte. Du tamis 4 Å activé est ajouté au milieu réactionnel, dès le début de la réaction d'oxydation. Le tamis possède deux rôles importants. Il favorise la réaction en adsorbant les différents réactifs et il permet également d'éliminer les traces d'eau résiduelles et ainsi empêcher une dégradation de notre substrat. Après purification, nous obtenons un mélange de deux iodolactones **44a** et **44b**. Le mécanisme d'oxydation est détaillé Figure 122.

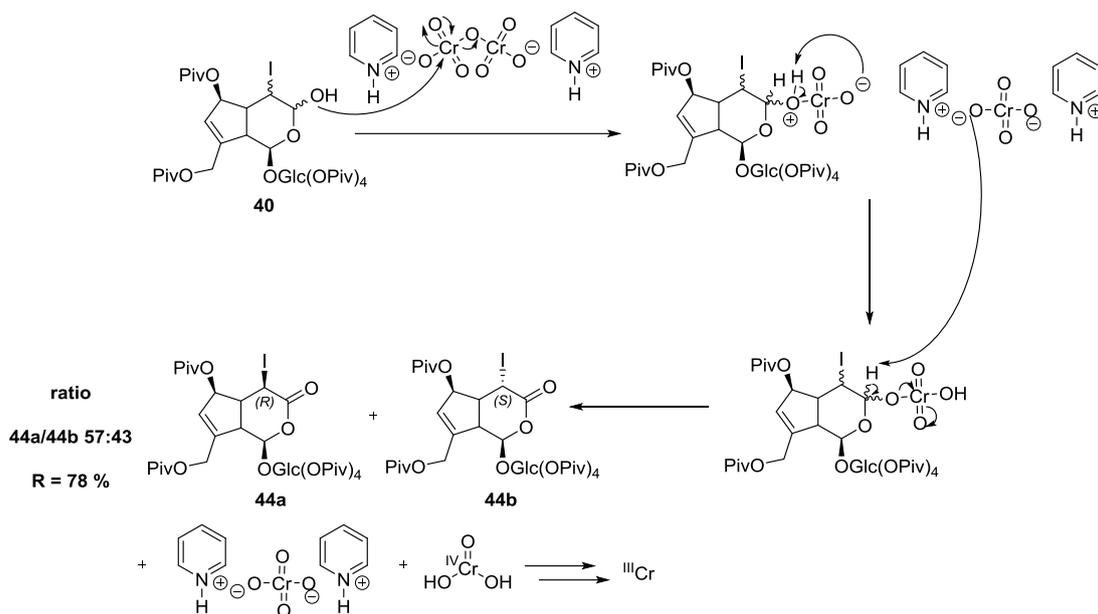


Figure 122: Mécanisme réactionnel expliquant la formation des iodolactones

1.4. Quatrième étape : formation du bicyclo[3.1.0]hex-2-ène

La quatrième étape consiste à réaliser la contraction du cycle pyranique afin de générer le motif bicyclo[3.1.0]hex-2-ène (Figure 123). Cette réaction est mise en œuvre en présence de deux équivalents de triméthylsianoate de sodium dans du dichlorométhane anhydre et sous atmosphère d'argon. Le mécanisme de cette réaction particulière a déjà été discuté dans le chapitre III, Figure 90.

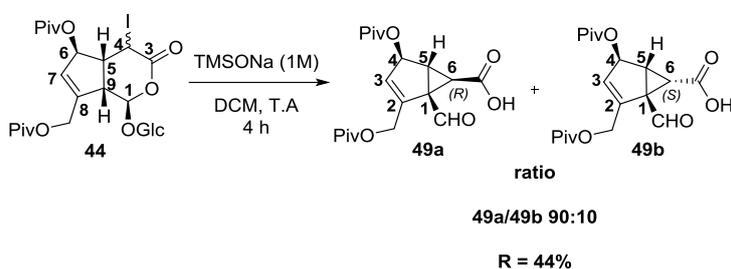


Figure 123: Formation du bicyclo[3.1.0]hex-2-ène

Il a été démontré que la stéréochimie du carbone C₁ est contrôlée par le C₅. Un seul mode de cyclisation a lieu ici. La réaction est parfaitement stéréospécifique. La stéréochimie du C₆, contrairement à ce que l'on pourrait penser, ne dépend pas de la configuration absolue du C₄ portant l'atome d'iode.

Pour rappel, de précédentes études menées au laboratoire par Xavier Cachet¹⁹² et Natacha Loury²³⁵ ont montré qu'il n'y avait pas de relation entre la stéréochimie des iodolactones de départ et celle des produits formés. En faisant réagir le TMSO-Na sur le mélange d'iodolactones **44a** (R) et **44b** (S) ou sur chaque iodolactone isolée séparément, les composés sont obtenus après purification avec le même

ratio (90 pour le (R) et 10 pour le (S)). Cette expérience montre que le rôle basique du TMSNa permet également l'épimérisation au niveau du C₃ des iodolactones **44** afin de conduire majoritairement à la formation du composé thermodynamique **49a**.

1.5. Cinquième étape : Alkylation

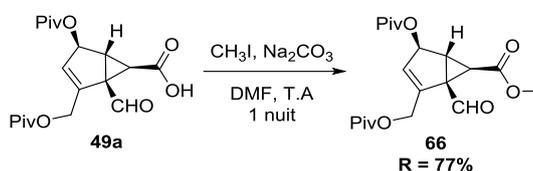


Figure 124: Alkylation de la fonction acide carboxylique

L'étape qui suit est une simple transformation d'un acide carboxylique en ester méthylique par réaction d'alkylation. L'acide **49a** est transformé en ester **66** à l'aide de iodométhane, de carbonate de sodium dans un solvant polaire aprotique : le *N,N*-diméthylformamide (Figure 124).

1.6. Etapes 6 à 8 : réduction de l'aldéhyde en groupement méthylène

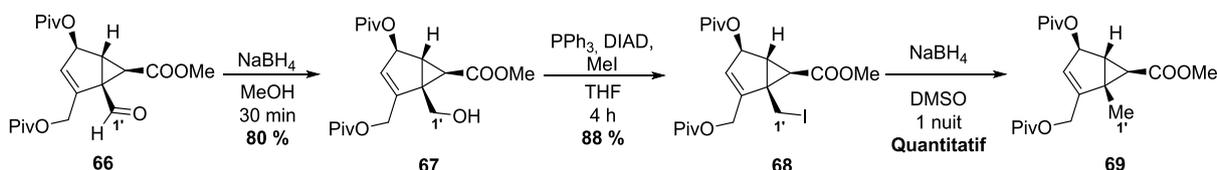


Figure 125: Obtention du composé **69**

Trois étapes sont nécessaires pour conduire au composé **69** possédant un groupement méthylène en position C_{1'} (Figure 125). Les trois étapes pour transformer la fonction aldéhyde en groupement méthyle sont les suivantes :

- 1) la réduction de l'aldéhyde en alcool primaire avec du NaBH₄ dans le MeOH permet de former le composé **67**.
- 2) l'emploi d'une variante de la réaction de Mitsunobu²⁴⁶ : dans ces conditions particulières le nucléophile à activer est l'iodure de méthyle et le groupement à substituer est l'alcool primaire en C_{1'}. Dans un premier temps, la bétaine vient déprotoner l'alcool primaire. L'alcoolate ainsi généré réagit avec le phosphonium pour former un nucléofuge. Le nucléophile est généré *in-situ* après l'alkylation du DIAD réduit. L'iodure une fois libéré vient substituer le groupement partant en C_{1'} pour conduire au

²⁴⁶ Dormoy, J.-R. *Synthesis* **1982**, 753

composé **68** (en utilisant les conditions d'Appel²⁴⁷, l'obtention d'un autre dérivé halogéné (chlorure ou bromure était également possible).

3) la réduction du dérivé iodé **68** par du NaBH₄ dans le DMSO pour former le composé souhaité **69**.

Le mécanisme de la réaction de Mitsunobu est détaillé Figure 126.

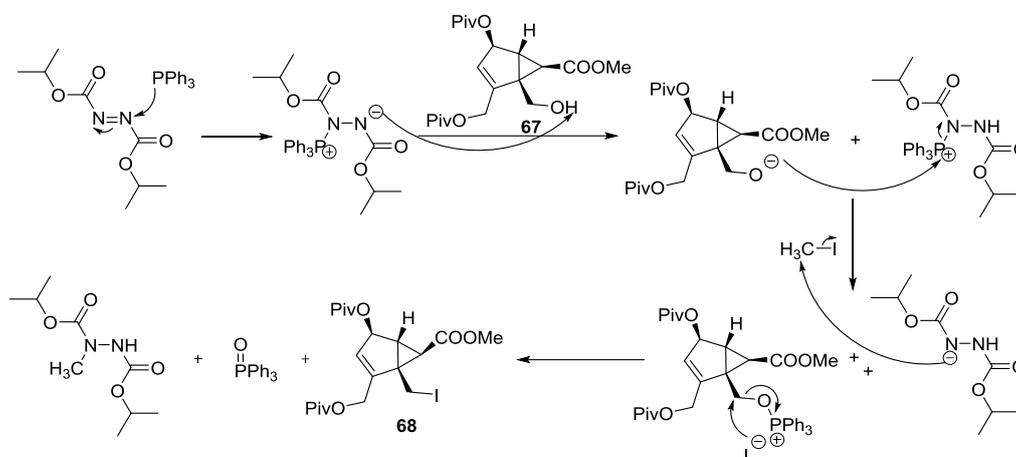


Figure 126: Mécanisme réactionnel expliquant la formation du dérivé iodé par la variante de la réaction de Mitsunobu

En suivant cette voie de synthèse, le synthon **69** est obtenu avec un rendement global de 16 % en huit étapes.

2. Optimisation de la voie de synthèse

En étudiant la suite réactionnelle de la synthèse, ainsi que les différents rendements obtenus, deux optimisations semblent envisageables. Ces optimisations devraient diminuer le nombre d'étapes, permettant ainsi de gagner du temps, mais elles devraient également augmenter le rendement global.

2.1. Optimisation de l'étape d'alkylation

La première optimisation concerne l'étape d'alkylation de l'acide carboxylique en ester méthylique. Cette transformation est effectuée dans des conditions classiques d'alkylation (iodométhane/base inorganique) et permet d'obtenir le composé **66** avec seulement 77 % de rendement.

²⁴⁷ Newman, S. G.; Bryan, C. S.; Perez, D.; Lautens, M. *Synthesis* **2011**, 342-346

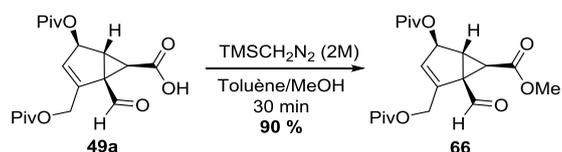


Figure 127 : Alkylation par le (triméthylsilyl)diazométhane

La variante réalisée est l'alkylation de l'acide **49a** par le (triméthylsilyl)diazométhane (2M dans l'éther diéthylique) dans un mélange toluène/méthanol (Figure 127). Le diazométhane est généré *in-situ* et permet ainsi l'alkylation. Cette réaction, facile à mettre en œuvre, est réalisée en un temps de réaction extrêmement court et donne généralement d'excellents rendements.

Le mécanisme de cette alkylation est détaillé Figure 128.

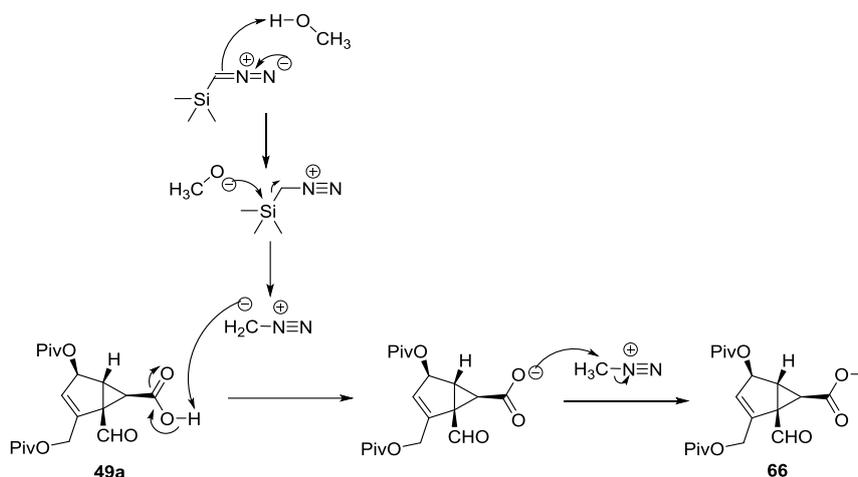


Figure 128: Mécanisme d'alkylation par le (triméthylsilyl)diazométhane

Ces nouvelles conditions permettent d'obtenir le composé **66** avec un rendement de l'ordre de 90 %.

2.2. Optimisation du passage de 66 à 69

Cette transformation consiste en la réduction de l'aldéhyde sur le C_{1'} en groupement méthylène. Pour rappel, elle est réalisée en trois étapes consécutives : réduction de l'aldéhyde, réaction de Mitsunobu et réduction du dérivé iodé. Lors de la réduction de l'alcool primaire par du NaBH₄, la lactone **91** se forme très rapidement si la réaction n'est pas traitée et purifiée dans la journée (Figure 129).

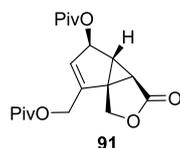


Figure 129: Lactone **91** formée lors du passage de **66** à **69**

2.2.1. Conditions testées précédemment au laboratoire

Des essais ont été menés au laboratoire, en utilisant des agents réducteurs classiques à base d'hydrures pour tenter de réduire cette fonction aldéhyde, directement en dérivé carboné. Différents essais ont été menés (variation du nombre d'équivalent du réducteur, présence ou non d'acide). Ces premiers tests n'ont permis que l'obtention du dérivé alcool **67** (Figure 130).

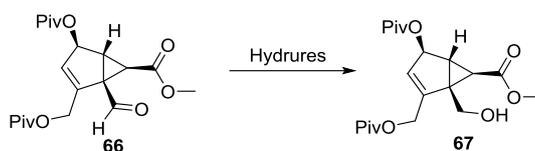


Figure 130: Essais de réduction du composé **66**

De même, la formation d'un groupement tosylate **92** ou mésylate **93** afin de faciliter la substitution du groupement porté par le carbone C₁' par un hydrure de bore, du type triéthylborohydrure de lithium (LiEt₃BH)^{248,249} n'a pas conduit au composé **69** (Figure 131).

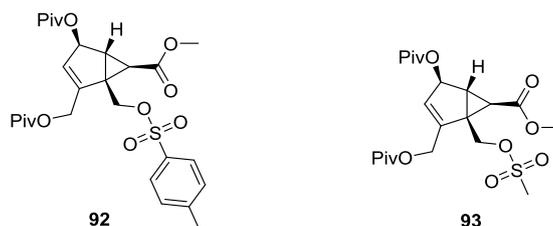


Figure 131: Formation d'un bon nucléofuge (tosylate à gauche et mésylate à droite)

De nombreux autres essais menés au laboratoire pour réduire le composé **66** et obtenir directement le composé **69** ont été réalisés. Cependant, avec l'apparition de nouveaux réactifs et de nouvelles conditions réactionnelles dans la littérature, nous avons cherché à optimiser, à notre tour, cette réduction.

²⁴⁸ Krishnamurthy, S.; Brown, H. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 3064-3066

²⁴⁹ Hua, D. ; Venkataraman, S. ; Ostrander, R. ; Sinai, G. ; McCann, P. ; Coulter, M. ; Xu, M. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 507-515

2.2.2. Conditions de réduction testées

Trois conditions ont été mises en œuvre sur notre composé **66**. Elles sont détaillées ci-dessous.

a. Réduction par le Nickel de Raney via un thioacétal intermédiaire

Cette méthodologie de synthèse se décompose en deux étapes. Tout d'abord, la condensation du 1,3-propandithiol sur l'aldéhyde **66** en présence d'un acide de Lewis afin de conduire au thioacétal intermédiaire **94**. Puis une fois le thioacétal **94** obtenu, il est réduit à l'aide de Nickel de Raney²⁵⁰ (Figure 132).

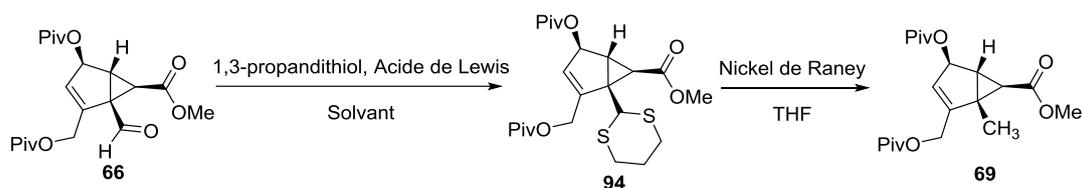


Figure 132 : Réduction via la formation d'un thioacétal

Formation du dithiane

Entrée	Acide de Lewis	Solvant	Produit attendu (RMN)
1	BF ₃ .Et ₂ O	DCM anhydre	Dégradation
2	H ₃ PW ₁₂ O ₄₀ .nH ₂ O	Ether de pétrole	94 %

Tableau 11: Conditions réactionnelles pour la formation du dithiane

Classiquement, les catalyseurs utilisés pour augmenter la réactivité du groupement carbonyle sont, soit des acides de Lewis du type BF₃.Et₂O (trifluorure de bore étherate), soit des acides de Brønsted inorganiques du type acide sulfurique, acide chlorhydrique ou des acides organiques du type acide triflique, acide méthane sulfonique, acide *p*-toluène sulfonique. Lorsque l'on met en réaction l'aldéhyde correspondant en présence du 1,3-propandithiol dans du dichlorométhane anhydre en présence du trifluoroborane étherate fraîchement distillé²⁵¹ (entrée 1, Tableau 11), le produit souhaité n'est pas formé. La RMN ¹H du brut réactionnel obtenu montre un mélange complexe de produits. Le produit semble s'être totalement dégradé. Aucun pic caractéristique du motif cyclopropane n'est observé. BF₃.Et₂O semble être un acide de Lewis trop fort. Le bore étant un atome de petite taille et possédant un rayon atomique de faible valeur, sa densité électronique se trouve très localisée. Il est

²⁵⁰ Pettit, G.; van Tamelen, E. *Organic Reactions* **1962**, 12, 356-529

²⁵¹ Shiina, J.; Oikawa, M.; Nakamura, K.; Obata, R.; Nishiyama, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5190-5197

donc considéré d'après la théorie HSAB (Hard and Soft Acids and Bases) comme un acide dur. L'oxygène du carbonyle est quant à lui considéré par cette même théorie comme une base dure. Les deux atomes interagissent et se lient donc très fortement ensemble. Cette forte interaction semble conduire à une dégradation de notre molécule.

Nous avons donc envisagé d'utiliser un acide de Lewis moins fort et plus mou d'après la théorie HSAB. Un acide de Lewis plus mou possède une charge délocalisée, un rayon atomique plus grand et surtout une densité électronique plus faible. Cet acide peut faire partie soit des métaux de transition (yttrium, tungstène, vanadium, titane, ...), soit des composés venant des terres rares du type lanthanides (cérium, praséodyme²⁵², ...). En fonction des métaux à notre disposition, nous avons effectué un essai avec un complexe de tungstène (entré 2, Tableau 11). Nous avons mis en réaction le dérivé **66** dans de l'éther de pétrole, après ajout du catalyseur à base de tungstène²⁵³ (10 % en mole) et du 1,3-propandithiol, le milieu est laissé en réaction pendant deux heures à température ambiante. Nous obtenons ainsi le thioacétal avec un excellent rendement de 94 %. L'intermédiaire est par la suite engagé dans l'étape de réduction à l'aide du Nickel de Raney.

Réduction du thioacétal à l'aide de Nickel de Raney

➤ Préparation du Nickel de Raney

Le nickel de Raney a été développé en 1926 par l'ingénieur américain Murray Raney²⁵⁴. C'est un catalyseur métallique non supporté. L'alliage nickel-aluminium composé à 50 % d'aluminium et 50 % de nickel est préparé par fusion des deux solides. L'alliage encore en fusion est refroidi par une trempe. Il est ensuite broyé et pulvérisé en fines particules. Les particules de l'alliage sont ensuite attaquées par une solution alcaline concentrée (le plus souvent de l'hydroxyde de sodium). L'aluminium attaqué forme des aluminates ainsi que du dihydrogène qui se trouve adsorbé ou piégé dans les pores de l'alliage. L'alliage ainsi obtenu est lavé plusieurs fois avec de l'eau pour éliminer les aluminates. La surface spécifique permettant l'adsorption de l'hydrogène ainsi que la sélectivité du catalyseur dépendent des conditions de préparation de l'alliage (température, pourcentage en métal, solutions alcalines).

²⁵² De Kanta, S. *Synthesis* **2004**, 17, 2837-2840

²⁵³ Firouzabadi, H.; Iranpoor, N.; Amani, K. *Synthesis* **2002**, 59-62

²⁵⁴ De Bellefon, C. *L'Act. Chim.* **2000**, 44, 69-70

➤ Utilisation du Nickel de Raney

Entrée	Nickel de Raney	Atmosphère d'hydrogène	Produit attendu (RMN)
1	Solide	Non	Pas de conversion
2	50 % dans H ₂ O	Non	Pas de conversion
3	50 % dans H ₂ O	1 atm	Pas de conversion

Tableau 12: Conditions réactionnelles pour la réduction du thioacétal

Nous avons essayé dans un premier temps de réduire le thioacétal en le mettant en réaction dans du THF avec 20 à 30 équivalents de Nickel de Raney sous forme solide. La suspension est agitée pendant trois heures au reflux (entrée 1, Tableau 12). En parallèle, nous avons effectué la même réaction mais cette fois-ci en utilisant du Nickel de Raney en suspension à 50 % dans l'eau (entrée 2, Tableau 12). Ce dernier devrait être plus réactif et contenir plus d'atomes d'hydrogène adsorbés à sa surface. En étant stocké dans l'eau, l'alliage n'est pas oxydé en surface et les pores sont toujours actifs et accessibles. Dans les deux conditions testées, nous n'avons pas formé le produit réduit. L'analyse RMN montre que nous retrouvons notre substrat de départ. Au vu des premiers résultats, nous avons essayé de nouveau la réduction du thioacétal pour former le composé **69** en utilisant le Nickel de Raney à 50 % en suspension dans l'eau, mais cette fois, nous avons ajouté une atmosphère d'hydrogène (1 atm) à l'aide d'un ballon de baudruche. La réaction a été menée dans le THF au reflux (entrée 3, Tableau 12). Après trois heures de réaction et filtration pour éliminer le catalyseur, le résidu obtenu est analysé par RMN. Nous observons une nouvelle fois qu'il n'y a eu aucune réaction et que le substrat de départ n'a pas été transformé. Les conditions de réaction et la voie de synthèse passant par la formation du thioacétal sont donc abandonnées.

Il est connu que les dérivés soufrés sont des poisons pour les catalyseurs métalliques. Les atomes de soufre viennent se chélater au métal et inhibent ainsi sa réactivité, ce qui peut expliquer l'absence de réaction dans notre cas.

b. Réduction par un hydrure via la formation d'une tosylhydrazone

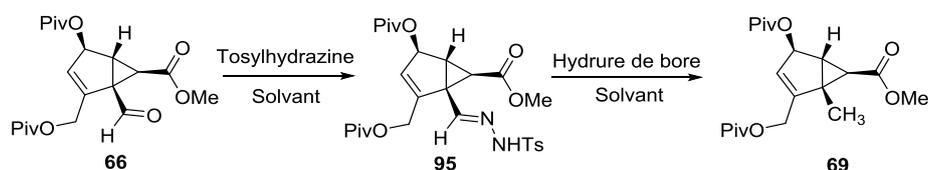


Figure 133: Réduction via la formation d'une tosylhydrazone

Cette méthodologie de synthèse se décompose donc en deux étapes (Figure 133). Tout d'abord, la formation de la tosylhydrazone **95**²⁵⁵, par condensation de la tosylhydrazine sur le carbonyle. Cette réaction est réalisée dans l'éthanol absolu à température ambiante. La présence d'un catalyseur ainsi qu'un léger excès de réactif n'est pas nécessaire. En effet, l'hydrazone **95** est obtenue quantitativement. Elle peut être engagée directement dans l'étape suivante de réduction sans purification. Puis, dans un second temps, la réduction du dérivé **95** est réalisée à température ambiante par un réducteur du type tetraborohydruure de sodium (NaBH₄), cyanoborohydruure de sodium (NaBH₃CN)²⁵⁶ ou catécholborane²⁵⁷ pour arriver au composé carboné **69**.

Réduction de la tosylhydrazone par un borane

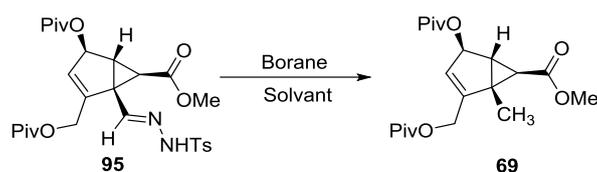


Figure 134: Réduction de la tosylhydrazone par un borane

Avec l'emploi d'un borane comme agent de réduction, il était possible d'envisager la formation du produit souhaité (Figure 134).

Le mécanisme global de cette réduction est décrit Figure 135. L'hydrure de bore vient s'additionner sur le carbone électrophile de la tosylhydrazone **95**. Une fois que l'hydrazone est réduite, il faut ajouter de l'acétate de sodium qui joue le rôle de nucléophile dans le milieu. Cet acétate va venir réagir sur le borane pour le charger négativement et permettre ainsi l'élimination de ce dernier ainsi que du *p*-toluènesulfinate de sodium pour générer le diimide **96**. Sans l'ajout de ce nucléophile, l'intermédiaire n'évoluerait pas vers la formation du dérivé hydrocarboné **69**.

²⁵⁵ Han, O.; Shih, Y.; Liu, L.-D.; Liu, H.-W. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 2105-2108

²⁵⁶ Miller, V.; Yan, D.-Y.; Weigel, T.; Han, O.; Liu, H.-W. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4175-4188

²⁵⁷ Kabalka, G.; Baker, J. *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 1834-1835

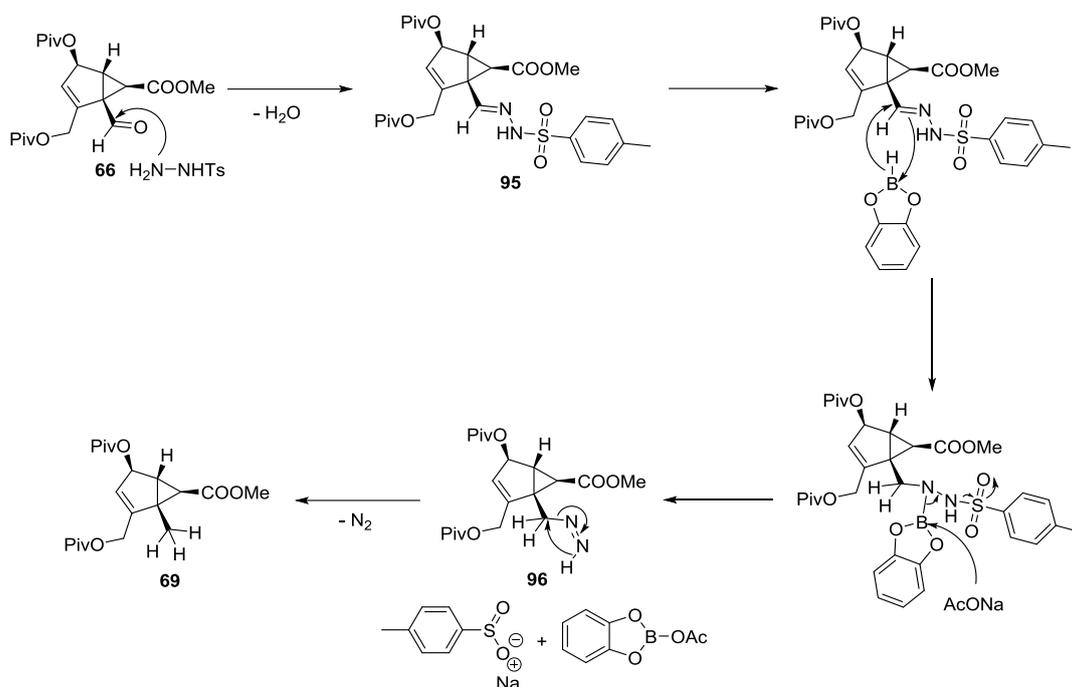


Figure 135: Mécanisme expliquant la réduction de la tosylhydrazone par le catécholborane

Nous avons testé deux réducteurs à base de bore, le catécholborane et le complexe BH_3 .

Entrée	Hydruure	Solvant	Température (°C)	Produit attendu (RMN)
1	Catécholborane (1M THF)	DCM	T.A	Pas de conversion
2	Complexe BH_3 .THF (1M THF)	THF	T.A	Pas de conversion

Tableau 13: Conditions réactionnelles pour la réduction de la tosylhydrazone par un borane

Nos résultats expérimentaux (entrée 1, Tableau 13), ont montré qu'il n'y avait aucune réaction avec la tosylhydrazone. L'ajout d'un large excès de réactif n'a rien changé. Nous avons supposé que le catécholborane était peut-être trop encombré pour pouvoir réagir au niveau du carbone de l'hydrazone. Nous avons mené un nouvel essai (entrée 2, Tableau 13), mais cette fois-ci en utilisant le complexe BH_3 .THF (borane-tetrahydrofurane)²⁵⁸ comme réactif. Si le manque de réactivité du catécholborane était réellement dû à l'encombrement stérique de notre composé, l'utilisation du complexe BH_3 .THF devrait pallier ce problème. De nouveau, les résultats ont montré que l'emploi d'un borane pour réduire la tosylhydrazone et ainsi conduire au composé carboné n'était pas efficace.

Etant donné qu'en utilisant un dérivé borane, nous n'avons observé aucune conversion de l'hydrazone **95** en dérivé **69**, nous avons envisagé de tester un autre type de réducteur, le cyanoborohydrure de sodium ($NaBH_3CN$).

²⁵⁸ Kragol, G.; Benko, I.; Muharempahic, J.; Mlinaric. Majerski, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2622-2625

Réduction de la tosylhydrazone par NaBH_3CN

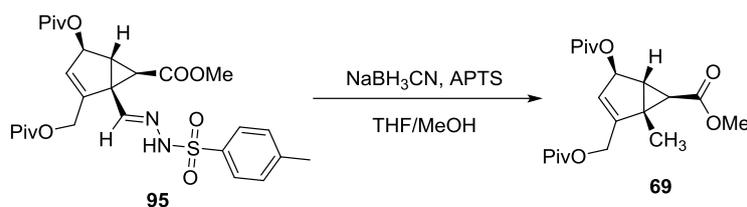


Figure 136: Réduction de la tosylhydrazone par NaBH_3CN

Le cyanoborohydrure de sodium est connu pour être un réducteur doux et sélectif des imines et hydrazones (Figure 136). Il est toutefois nécessaire d'être en milieu légèrement acide pour qu'il puisse opérer plus facilement en formant l'hydrazonium. Un pH trop acide conduit à la décomposition du réducteur. Il faut donc contrôler le pH afin d'être aux alentours de $\text{pH}=3.5-4.0$ en utilisant un indicateur coloré comme le méthyl orange qui possède une zone de virage comprise entre $\text{pH}=3.1$ (rouge) à $\text{pH}=4.4$ (jaune).

Le mécanisme de la réduction est décrit Figure 137. Une fois l'hydrazone **95** formée, elle est protonée par l'acide *p*-toluènesulfonique ajouté en quantité catalytique pour conduire à l'hydrazonium. Cette hydrazonium est beaucoup plus réactif vis-à-vis du réducteur, qui vient s'additionner sur le carbone électrophile. Le composé formé se décompose en libérant l'acide *p*-toluène sulfonique pour conduire au dérivé diimide **96**. Comme précédemment, le diimide se décompose en diazote et libère *in-situ* un hydruure pour former le composé carboné **69**.

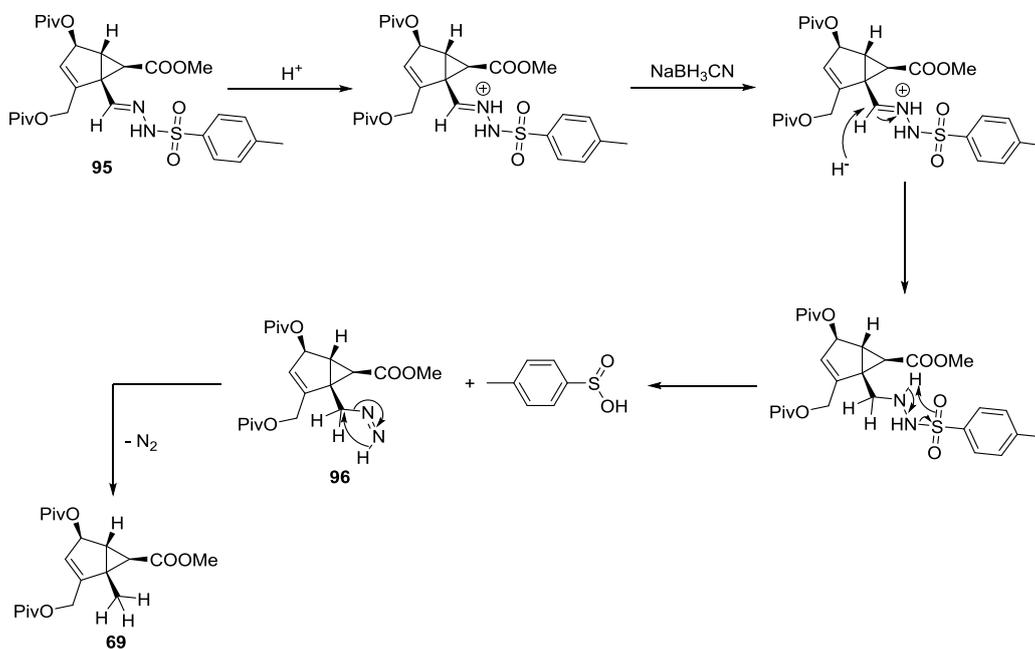


Figure 137: Mécanisme expliquant la réduction de la tosylhydrazone par le NaBH_3CN

Nous avons testé différentes conditions réactionnelles qui sont présentées dans le Tableau 14.

Entrée	Hydruure	Acide	Température (°C)	Equivalent hydruure	Produit formé (RMN)
1	NaBH ₃ CN	APTS	T.A	Excès	Deux composés
2	NaBH ₃ CN	APTS	50	Excès	Deux composés
3	NaBH ₃ CN	APTS	T.A puis 50	3X1	Deux composés
4	NaBH ₄	Aucun	T.A puis 50	Excès	Dégradation

Tableau 14: Conditions réactionnelles pour la réduction de la tosylhydrazone par NaBH₃CN

Au vu des trop faibles quantités isolées des différents composés formés lors de ces essais, aucune analyse RMN ¹H n'a permis de les caractériser convenablement.

Toutes les conditions impliquant la formation de la tosylhydrazone **95**, puis la réduction de celle-ci par un réducteur de type NaBH₄ ou NaBH₃CN n'ont pas permis d'obtenir le composé **69**.

c. Réduction à l'aide d'un hydruure de silane/siloxane en présence d'un acide de Lewis

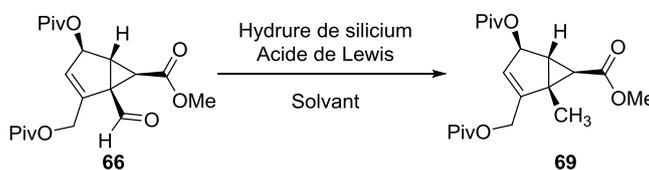


Figure 138: Réduction par un hydruure de silicium

Cette méthodologie consiste à faire réagir un hydruure de silane ou de siloxane sur l'aldéhyde pour former le produit réduit en présence d'un activateur (Figure 138). Deux choix s'offrent à nous : une activation au niveau de l'hydruure pour augmenter sa nucléophilie. Pour ce faire, un activateur fluoré²⁵⁹ (fluorure de césium : CsF ou fluorure de tetrabutylammonium : TBAF) ou plus récemment dans la littérature, le carbonate de potassium²⁶⁰ (K₂CO₃) est ajouté pour former un réactif silylé hypervalent, afin de libérer l'hydruure plus facilement. D'après la littérature, cette activation ne permet malheureusement pas la réduction complète du carbonyle, seul l'alcool peut être obtenu. L'autre activation possible est l'ajout d'un acide de Brønsted ou de Lewis pour activer le carbone du carbonyle et ainsi augmenter son électrophilie vis-à-vis de l'hydruure. Nous avons décidé d'utiliser l'activation électrophile en se limitant à l'utilisation exclusive d'acide de Lewis. L'emploi d'un acide au sens de Brønsted (acide trifluoroacétique : TFA ou l'acide *p*-toluènesulfonique : APTS) n'étant pas envisageable au vu du mécanisme de réduction impliqué. Ce type d'acide conduit forcément à un passage par un

²⁵⁹ Fujita, M.; Hiyama, T. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 5405-5415

²⁶⁰ Zhao, X.-X.; Zhang, P.; Guo, Z.-X. *ChemistrySelect* **2017**, 2, 7670-7677

carbocation²⁶¹. Dans notre cas, le carbocation généré serait un carbocation primaire, ce qui conduirait instantanément à un réarrangement de ce dernier et l'ouverture du cyclopropane²⁶².

Nous avons testé différentes conditions réactionnelles qui sont présentées dans le tableau ci-dessous. Dans les différents essais que nous avons réalisés, nous avons utilisé un acide au sens de Lewis (bore ou métal de transition) en présence de différents réducteurs.

Entrée	Hydruire	Acide de Lewis	Solvant	Température (°C)	Produit attendu (RMN)
1	EtO ₃ SiH	ZnI ₂ (3 % moles)	Toluène	T.A	Pas de conversion
2	EtO ₃ SiH	ZnI ₂ (3 % moles)	DCM	T.A	Pas de conversion
3	Et ₃ SiH	B(C ₆ F ₅) ₃ (5 % moles)	DCM	T.A	Dégradation
4	PMHS	B(C ₆ F ₅) ₃ (5 % moles)	DCM	T.A	/
5	PMHS	B(C ₆ F ₅) ₃ (5 % moles)	DCM	0 puis T.A	/
6	PMHS	B(C ₆ F ₅) ₃ (5 % moles)	DCM	0	/
7	PMHS	FeCl ₃ .6H ₂ O (10 % moles)	DCE	T.A	Dégradation
8	PMHS	FeCl ₃ .6H ₂ O (10 % moles)	DCE	90	Dégradation

Tableau 15: Conditions réactionnelles pour la réduction via un hydruire de silane/siloxane

Lors des essais de réduction menés avec un hydruire de triéthoxysilane (entrées 1 et 2, Tableau 15) en présence de iodure de zinc²⁶³ dans un solvant apolaire aprotique fraîchement distillé tel que le dichlorométhane ou le toluène, nous n'avons obtenu aucune réaction. Ces réactions ont été effectuées sous atmosphère inerte à température ambiante.

Dans la littérature, il apparaît que depuis quelques années l'utilisation d'hydruire de siloxane est de plus en plus employée. Le polyméthylhydrosiloxane (PMHS)²⁶⁴ comme réducteur est très attractif du fait de sa stabilité à l'air, à l'humidité, qu'il est non toxique, disponible facilement et peu coûteux étant donné que c'est un sous-produit de l'industrie du silicium. De plus, le PMHS présente une plus faible réactivité que les autres hydrosilanes, probablement à cause de sa structure polymérique, ce qui implique une grande chimiosélectivité. L'utilisation du tris(pentafluorophényl)borane (B(C₆F₅)₃), un nouveau catalyseur de bore beaucoup plus stable et plus facile de manipulation et d'utilisation que BF₃.Et₂O a fait son apparition.

Nous avons donc utilisé l'hydruire de triéthylsilane (Et₃SiH)^{265,266} avec le nouveau catalyseur B(C₆F₅)₃ (entrée 3, Tableau 15). Lors du traitement en présence de fluorure d'ammonium dans l'acide sulfurique

²⁶¹ Kursanov, D.; Parnes, Z.; Loim, N. *Synthesis* **1974**, 633-651

²⁶² Carey, F.; Tremper, H. J. *Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 2967-2972

²⁶³ Li, J.; Peng, J.; Bai, Y.; Chen, L. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2011**, 186, 1621-1625

²⁶⁴ Chandrasekhar, S.; Raji Reddy, C.; Nagendra Babu, B. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 9080-9082

²⁶⁵ Gevorgyan, V.; Rubin, M.; Liu, J.-X.; Yamamoto, Y. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 1672-1675

²⁶⁶ Bajracharya, G.; Nogami, T.; Jin, T.; Matsuda, K.; Gevorgyan, V.; Yamamoto, Y. *Synthesis* **2004**, 2, 308-311

concentré chauffé à 40 °C, notre composé s'est totalement dégradé. La réaction a de nouveau été réalisée, mais cette fois, le résidu est repris par de l'eau et mis à réagir avec le fluorure d'ammonium toujours à 40 °C pendant une heure. Ce traitement est nécessaire pour l'obtention du composé **69**. Sans l'utilisation du fluorure, nous obtiendrions l'éther silylé. Nous obtenons le même résultat que précédemment, c'est-à-dire une dégradation de notre composé.

En parallèle, nous avons réalisé différents essais en utilisant le PMHS comme source d'hydrure en présence du même catalyseur $B(C_6F_5)_3$ dans le dichlorométhane anhydre et sous atmosphère d'argon comme décrit dans plusieurs publications des années 2000. Lors de l'ajout de PMHS à température ambiante, il se produit une forte exothermie, tout le solvant s'évapore pour former un gel. Après ajout à nouveau de solvant, le gel formé n'est plus soluble et forme une suspension que l'on filtre sur silice. Après évaporation du filtrat et analyse RMN du brut, le substrat a complètement disparu et s'est dégradé (entrée 4, Tableau 15). Nous avons repris les mêmes conditions, mais cette fois-ci le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C avant l'ajout du PMHS (entrée 5, Tableau 15). La totalité du PMHS a pu être introduite. Une fois le milieu ramené à température ambiante, l'exothermie se produit (après quelques secondes) et fait s'évaporer le solvant pour conduire à la formation du gel déjà observé. Nous observons les mêmes conclusions que précédemment, le produit semble emprisonné dans le gel de silicone. Nous avons donc tenté une dernière fois d'effectuer cette réaction (entrée 6, Tableau 15). L'ajout du réducteur et la réaction sont menés à 0 °C afin de contrôler et de limiter cette trop forte exothermie. Après cinq minutes de réaction, l'effervescence a lieu, mais elle est contrôlée. Cette effervescence indique normalement que la réaction est terminée selon le protocole suivi. Le milieu est filtré sur silice et rincé plusieurs fois successivement pour éliminer les différents dérivés siloxanes. Après analyse RMN de notre brut réactionnel, aucun pic caractéristique de notre composé n'est visible.

Le mécanisme de la réaction de réduction d'un dérivé carbonyle par le PMHS en présence du catalyseur $B(C_6F_5)_3$ est détaillé ci-dessous (Figure 139).

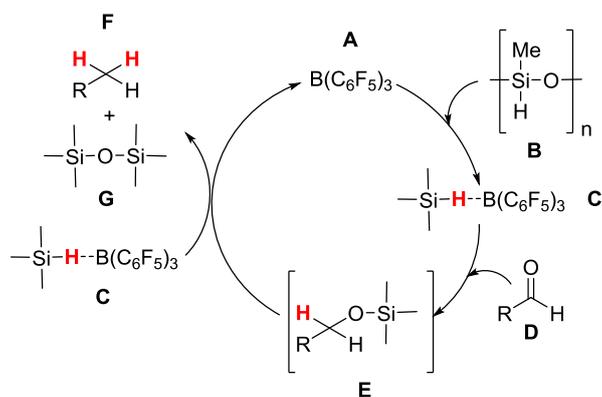


Figure 139: Mécanisme impliqué dans la réduction d'un dérivé carbonyle par le PMHS en présence de $B(C_6F_5)_3$

Le complexe **C** est l'espèce réactive responsable de la réduction de la fonction carbonyle. Il est formé à partir de $B(C_6F_5)_3$ **A** et de PMHS **B**. Le complexe **C** réagit avec le groupement carbonyle **D** pour former l'intermédiaire **E** qui n'est pas isolé. De nouveau le complexe **C** réagit avec l'intermédiaire **E** pour donner le produit carboné de la réaction **F** et le sous-produit **G** et ainsi régénérer le catalyseur **A**. Il est supposé également que la coordination entre le bore et l'oxygène du carbonyle facilite le transfert d'hydrogène.

Plus récemment encore dans les différentes publications, le catalyseur $B(C_6F_5)_3$ qui reste un réactif assez onéreux et qui nécessite l'emploi de solvant anhydre et une atmosphère inerte, a été remplacé par un catalyseur plus classique et moins cher, le trichlorure de fer hexahydraté ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$). Ce catalyseur est toujours utilisé en présence de PMHS (entrées 7 et 8, Tableau 15). L'emploi de ce catalyseur permet donc de s'affranchir des conditions anhydres. Cependant, ces nouvelles conditions nécessitent d'effectuer la réaction soit par chauffage micro-onde, soit par chauffage thermique. Une fois la réaction terminée, le catalyseur ferrique formant un milieu hétérogène avec le solvant halogéné utilisé (dichloroéthane) est éliminé par une simple filtration. Après évaporation du filtrat, il est lavé avec un solvant apolaire pour éliminer les résidus siloxanes. Que ce soit à température ambiante ou au reflux du solvant, après analyse RMN 1H de notre brut réactionnel, aucun pic caractéristique de notre composé n'est visible.

Toutes les conditions impliquant la réduction du dérivé carbonyle **66** par un hydrure de silicium en présence d'un catalyseur du type acide de Lewis, n'ont pas permis d'obtenir le composé **69**.

3. Conclusion

Ces échecs répétés, nous ont conduit à reprendre les conditions déjà mises au point. D'autres techniques auraient pu être encore testées, comme par exemple l'utilisation de l'*o*-NitroBenzèneSulfonylHydrazine²⁶⁷ (NBSH) introduit par une réaction de Mitsunobu.

Nous avons réalisé notre synthèse du synthon **69** en partant de 75 g d'aucuboside purifié. Cette synthèse a été réalisée en huit étapes avec un rendement global de 17 %, soit l'obtention d'environ 10 g de composé **69**. Les rendements de chaque étape sont très similaires à ceux obtenus par Natacha Loury.

V. Synthèses des différents peptides modèles

La précédente étude *in-silico* a démontré que deux des quatre peptides modèles semblent être d'excellents candidats pour former le coude β . Afin de valider ces résultats, il convient maintenant de synthétiser ces peptides afin d'avoir des résultats expérimentaux permettant de confirmer l'étude de modélisation moléculaire (Figure 140).

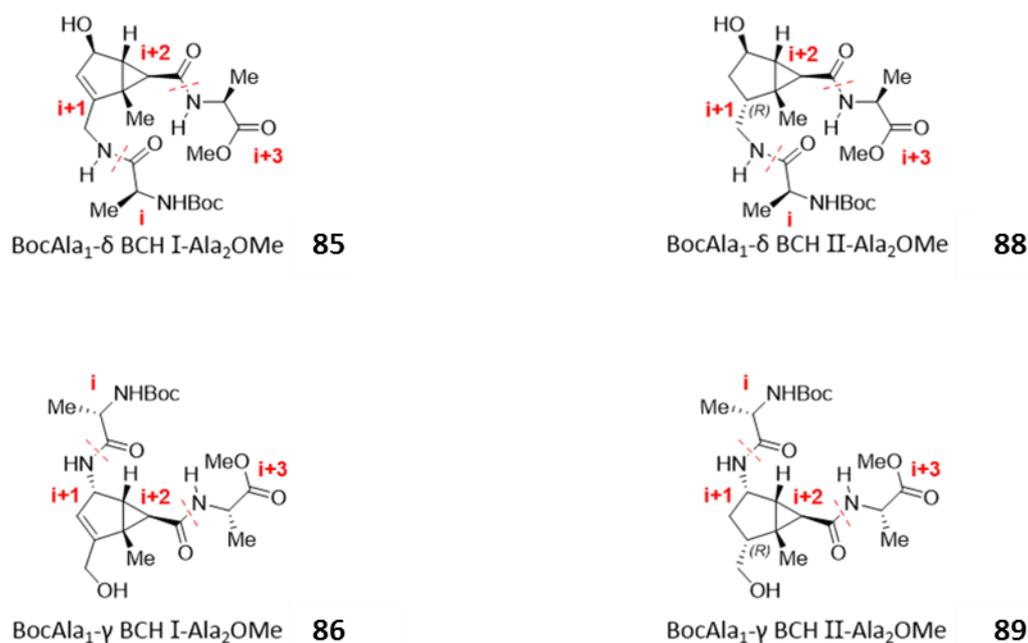


Figure 140: Peptides modèles à synthétiser

²⁶⁷ Myers, A.; Movassaghi, M.; Zheng, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8572-8573

Nous avons décidé d'en synthétiser seulement trois sur les quatre. Même si le peptide **85** n'est pas un candidat propice à la formation du coude β , nous allons quand même le synthétiser pour développer les conditions réactionnelles. Les peptides **86** et **88** seront également synthétisés. En revanche, le peptide **89** quant à lui ne sera pas synthétisé. En effet, d'après les résultats de modélisation moléculaire, ce peptide ne conduirait pas à la formation d'un coude β (moins favorable que **86**).

Pour synthétiser les peptides modèles **85** et **86**, nous sommes partis du synthon **69** afin d'obtenir les deux précurseurs **62** et **63**. Deux étapes sont nécessaires pour obtenir ces précurseurs.

La première étape consiste en la déprotection de la fonction pivalique du dérivé **69** afin de libérer la fonction alcool (Figure 141).

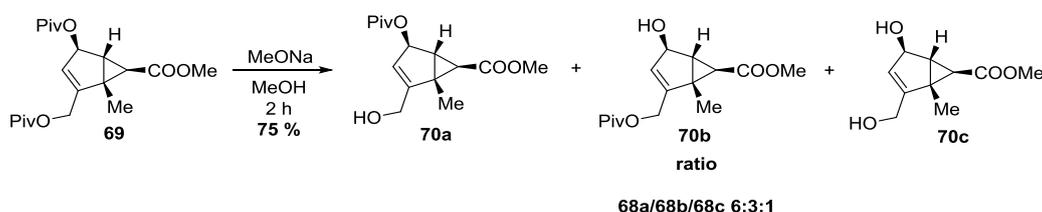


Figure 141: Réaction de déprotection des esters pivaliques

Cette réaction est effectuée à l'aide d'une solution de méthanolate de sodium 1M dans du méthanol anhydre. Même en employant un seul équivalent de MeONa, cette réaction n'est pas sélective entre les alcools allyliques primaire et secondaire du composé **69**. Ce manque de sélectivité conduit à la formation de trois composés : le composé **70a** avec l'alcool primaire libre en position C₂, le composé **70b** avec l'alcool secondaire libre en position C₄ et le composé **70c** ayant les deux alcools libres. Ces trois composés sont obtenus avec un ratio de 6:3:1 (Figure 141). Afin de limiter la formation du produit **70c**, il est nécessaire d'arrêter la réaction avant la consommation totale du substrat de départ **69**. Ces quatre composés sont séparés par purification sur gel de silice. Le composé **70c** peut être recyclé et être de nouveau transformé en composé **69** en le remettant en réaction en présence de chlorure de pivaloyle dans un mélange pyridine/DCM.

La seconde étape consiste en la transformation de la fonction alcool des composés **70a** et **70b** en fonction amine. Cette fonction amine est introduite par une réaction de Mitsunobu. Elle est menée en présence de triphénylphosphine, de diisopropyl azodicarboxylate et de phtalimide dans du tétrahydrofurane anhydre (Figure 142).

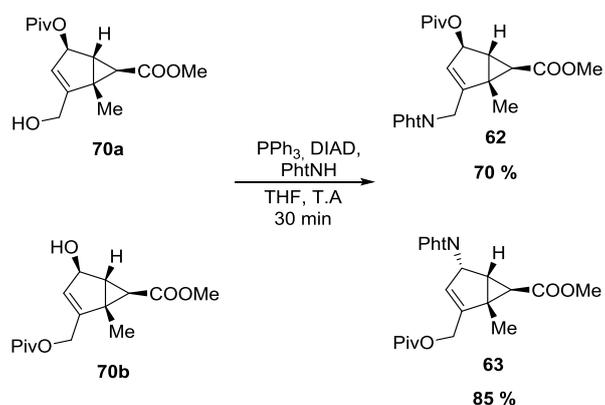


Figure 142: Obtention des précurseurs **62** et **63**

Les composés **62** et **63** sont ainsi formés avec respectivement 70 % et 85 % de rendement.

1. Synthèse du peptide modèle **85**

Le schéma de synthèse de la Figure 143 a été envisagé et mis en application. Nous obtenons le peptide **85** en quatre étapes avec un rendement global de 15 % après optimisation de chaque étape.

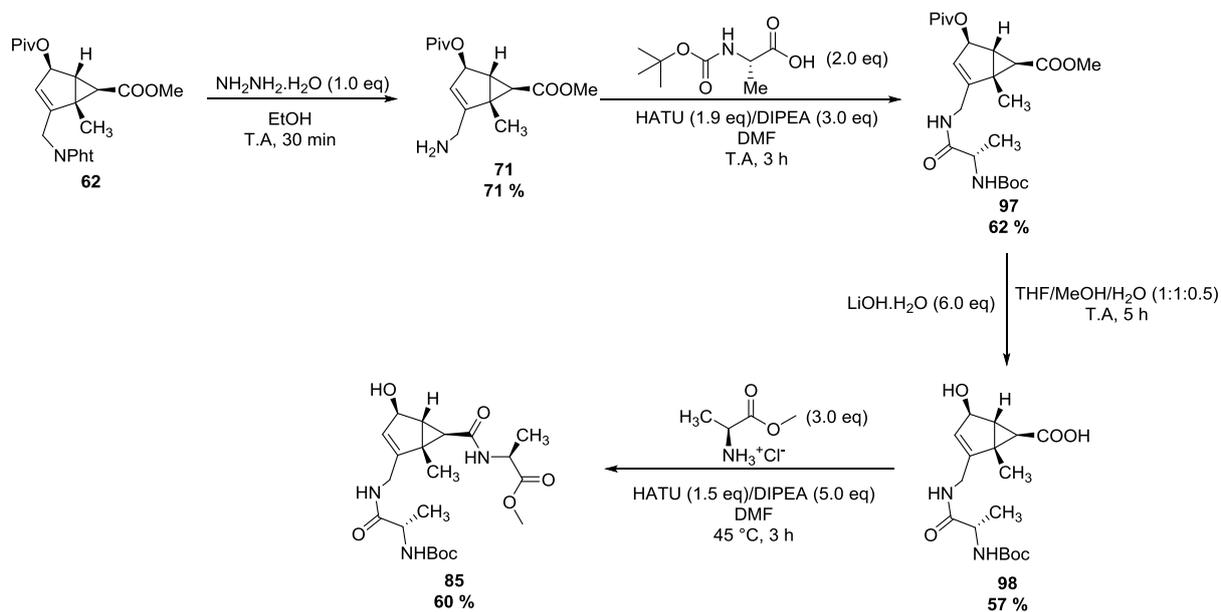


Figure 143: Voie de synthèse du peptide **85**

1.1. Déprotection du groupement phtalimide

Classiquement, l'ouverture d'un groupement phtalimide peut se faire soit en milieu acide, soit en milieu basique ou enfin en présence d'hydrazine²⁶⁸. Les conditions basiques (bases inorganiques) ne peuvent pas être appliquées dans notre cas, sinon les deux esters seraient saponifiés. De même, lors de l'utilisation d'hydrazine dans l'éthanol au reflux sur un intermédiaire de synthèse, Xavier Cachet avait observé la formation d'un seul composé. Cependant, ce composé n'était pas celui attendu.

Nous avons donc pour ouvrir le phtalimide **62** afin de libérer l'amine primaire, appliqué une procédure classiquement utilisée au laboratoire (Figure 144). Des conditions en deux étapes avaient été mises au point afin d'obtenir l'amine libre en milieu acide.

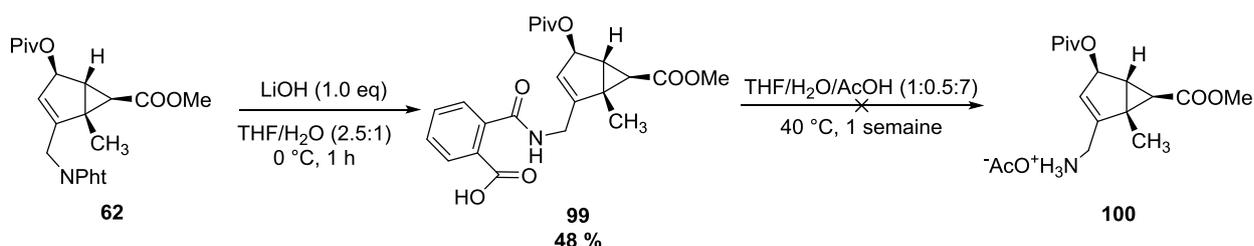


Figure 144: Condition classique du laboratoire pour déprotéger le phtalimide

Dans un premier temps, le substrat a été solubilisé dans un mélange THF/H₂O (2,5:1) placé à 0 °C. Puis un équivalent d'hydroxyde de lithium a été additionné. Cette première étape permettait l'ouverture partielle du phtalimide pour conduire au composé **99**. Une fois le composé **99** isolé, il a été engagé dans une seconde étape, où il a été mis en réaction dans un mélange THF/H₂O/AcOH glacial (1:0,5:7). Le milieu réactionnel est chauffé à 40 °C et laissé en réaction pendant une semaine. Dans notre cas, nous sommes revenus au produit de départ, c'est-à-dire le composé **62**. Le composé **100** n'a pas été formé.

Nous avons donc envisagé par la suite, de se placer dans des conditions non aqueuses. Pour cela, le mélange THF/H₂O a été remplacé par de l'ACN seul. Le mélange est toujours mis à réagir une semaine à 40 °C. Cette fois-ci, aucune réaction n'a été observée. Le composé **100** ne s'est toujours pas formé.

²⁶⁸ Sen, S. E.; Roach, S. L. *Synthesis* **1995**, 756-758

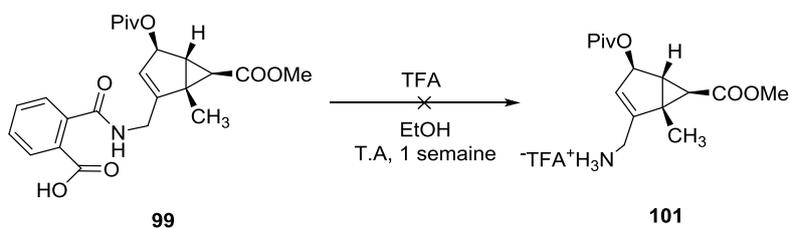


Figure 145: Variation de la procédure standard du laboratoire pour retirer le phtalimide

L'intermédiaire **99** a également été mis en réaction en présence de TFA dans l'éthanol et mis à réagir à température ambiante (Figure 145). Nous avons observé la formation de différents composés. L'analyse RMN ^1H ne permettait pas d'identifier un composé majoritaire.

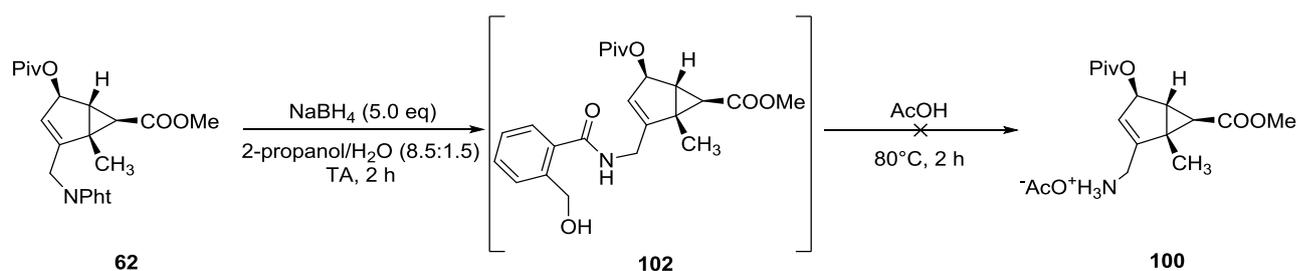


Figure 146: Déprotection du phtalimide à l'aide du NaBH_4 puis d'acide acétique

Nous avons également trouvé d'autres conditions applicables à notre composé²⁶⁹ (Figure 146). Le phtalimide **62** a été placé en solution dans un mélange isopropanol/ H_2O (85:15). NaBH_4 (5,0 eq) a été additionné par petites portions. Le mélange a été mis en réaction pendant deux heures. L'intermédiaire formé **102** n'est pas isolé et est directement engagé dans l'étape suivante qui consiste à libérer l'amine. Pour ce faire, de l'AcOH glacial a été ajouté en excès pour « quencher » l'excès de réducteur et libérer l'ammonium. Le milieu a été agité pendant deux heures à 80 °C. En générant cet intermédiaire, il ne peut pas y avoir de retour en arrière avec l'obtention de nouveau du phtalimide **62** comme nous avons pu l'observer précédemment. Néanmoins, le produit **100** est difficilement isolable étant donné qu'il se trouve sous forme d'ammonium. Malgré l'utilisation d'une résine échangeuse d'ion, nous n'avons pas réussi à l'isoler.

²⁶⁹ Osby, J. O.; Martin, M. G.; Ganem, B. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 2093-2096

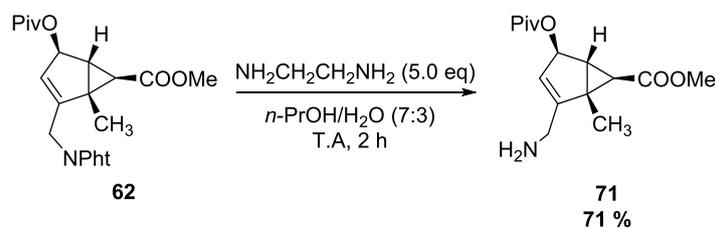


Figure 147: Déprotection du phtalimide à l'aide d'éthylène di-amine

Face à ces différents problèmes rencontrés en milieu acide, nous avons envisagé d'utiliser une di-amine comme l'éthylène diamine (Figure 147). Cette di-amine serait susceptible d'avoir un comportement nucléophile semblable à celui de l'hydrazine et permettrait ainsi la di-substitution du phtalimide.

En plaçant le phtalimide **62** dans un mélange *n*-PrOH/H₂O (7:3) suivi de l'ajout d'éthylène diamine (1.5 eq) et en laissant le milieu à température ambiante pendant cinq heures, nous obtenons après purification le composé voulu. En utilisant cinq équivalents de diamine, la réaction est terminée en deux heures et le composé **71** a été obtenu avec un rendement isolé de 71 %. La purification est assez difficile à cause de l'excès d'éthylène di-amine.

Pour finir, nous avons tout de même réalisé un dernier essai en utilisant l'hydrazine dans l'éthanol.

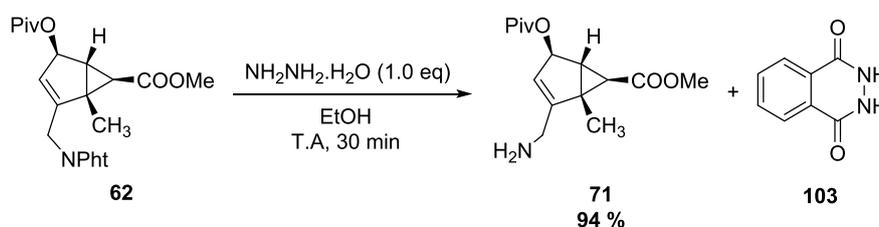


Figure 148: Déprotection du phtalimide à l'aide d'hydrazine

Il s'est avéré que l'utilisation d'un seul équivalent d'hydrazine dans l'éthanol à température ambiante conduisait au composé **71** (Figure 148). La réaction est terminée en 30 minutes. Le sous-produit **103** de la réaction précipite et il est éliminé par une simple filtration. Une purification sur gel de silice est tout de même nécessaire pour retirer les dernières traces du composé **103**. Dans ces conditions, le composé **71** a été obtenu avec un rendement isolé de 94 %.

1.2. Couplage peptidique du côté N-terminal

La seconde étape consiste à réaliser un couplage peptidique entre la fonction acide d'une alanine protégée sur l'azote par un groupement Boc et l'amine primaire de notre motif bicyclo[3.1.0]hex-2-ène **71**. Pour se faire, nous allons utiliser comme agent de couplage HATU. Cet agent de couplage

permet de générer *in-situ* un ester stable à partir de l'alanine après passage par un dérivé uronium. Cet ester présente une activité grandement augmentée vis-à-vis de l'acide initial. L'addition de l'amine sur cet ester suivi de l'élimination du groupement partant se fait facilement, ce qui permet de déplacer l'équilibre vers la formation de la fonction amide. Le mécanisme d'un couplage peptidique est détaillé dans le paragraphe VI de ce chapitre.

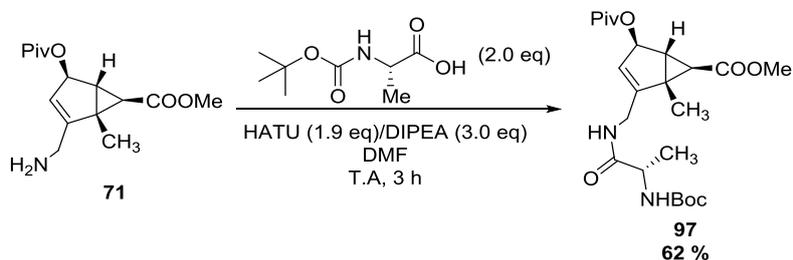


Figure 149: Couplage peptidique entre l'alanine Boc et l'amine du bicyclo[3.1.0]hex-2-ène

Cette réaction (Figure 149) a été réalisée en trois heures à température ambiante dans un solvant polaire aprotique tel que la DMF, en faisant réagir N-Boc alanine (2,0 eq), en présence d'une base de Hünig type DIPEA (3,0 eq), avec HATU comme agent de couplage (1,9 eq) et notre amine **71**. Après purification, le composé **97** a été obtenu avec un rendement isolé de 62 %. L'augmentation du nombre d'équivalents d'acide, de base et d'agent de couplage n'impactent ni le temps de réaction, ni le rendement final.

1.3. Saponification de l'ester méthylique et de l'ester pivalique

La troisième étape consiste en réalité à effectuer deux réactions de saponification en parallèle. Nous souhaitons à la fois saponifier l'ester méthylique pour revenir à l'acide carboxylique et également libérer l'alcool allylique secondaire en saponifiant le groupement pivaloyle.

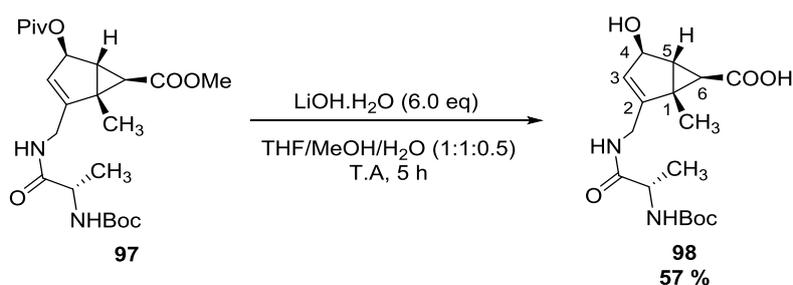


Figure 150: Double saponifications des esters méthylique et pivalique

L'utilisation d'hydroxyde de lithium pour cliver les esters pivaliques et méthyliques a été développée au laboratoire sur des motifs comportant un noyau bicyclo[3.1.0]hex-2-ène. C'est pourquoi nous les avons appliqué à notre squelette **97** (Figure 150).

Ce réactif possède un double caractère : c'est à la fois un nucléophile et une base. Il est connu que l'utilisation de ce réactif en tant que base, n'entraîne pas de réactions secondaires d'épimérisation, c'est pourquoi notre choix s'est porté sur ce dernier. En effet, en position C₆, nous avons un proton en alpha d'un groupement attracteur (ester méthylique) qui est suffisamment acide pour pouvoir être facilement épimérisé.

Le substrat **97** a été mis en solution dans un mélange THF/MeOH/H₂O (1:1:0.5), puis LiOH monohydraté (3 équivalents par fonction à réagir) a été ajouté. Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation pendant cinq heures. Le produit **98** est isolé après colonne chromatographique avec un rendement de 57 %.

1.4. Couplage peptidique du côté C-terminal

La dernière étape consiste à réaliser un couplage peptide entre la fonction acide de notre squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène **98** et la fonction amine d'une alanine protégée sous la forme d'un ester méthylique (Figure 151).

Pour ce faire, nous allons utiliser les mêmes réactifs que pour le précédent couplage peptidique, à savoir, DIPEA en tant que base, HATU en tant qu'agent de couplage peptidique et la DMF comme solvant.

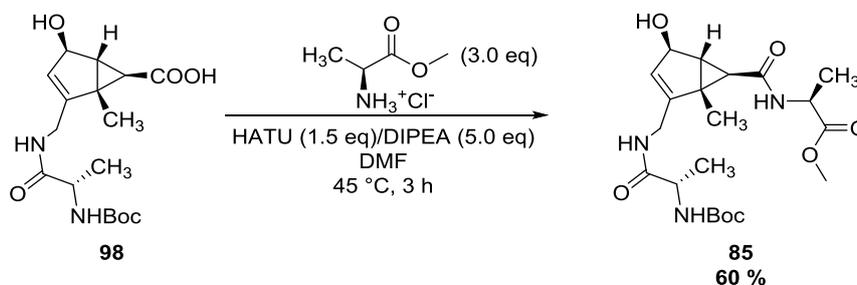


Figure 151: Couplage peptidique entre l'acide du bicyclo[3.1.0]hex-2-ène et l'amine de l'alanine methyl ester

Cette réaction a été réalisée en faisant réagir l'alanine ester méthylique (3,0 eq) avec le substrat bicyclo[3.1.0]hex-2-ène **98**, en présence de DIPEA (5,0 eq), avec HATU comme agent de couplage (1,5 eq) dans la DMF. Après trois heures de réaction à température ambiante, aucun produit ne semblait

s'être formé. Le milieu a donc été agité et placé à 45 °C pendant quatre heures. Après purification, le composé **85** a été obtenu avec un rendement isolé de 60 %.

Ce couplage peptidique semble être plus difficile à effectuer que le premier. Il est nécessaire de chauffer le milieu réactionnel pour obtenir une conversion.

3. Synthèse du peptide modèle **86**

La voie de synthèse précédemment développée et optimisée pour le peptide **85** a été appliquée pour la synthèse du peptide **86** (Figure 152). Cette voie de synthèse se déroule toujours en quatre étapes. Le peptide final **86** est obtenu avec un rendement global de 14 %.

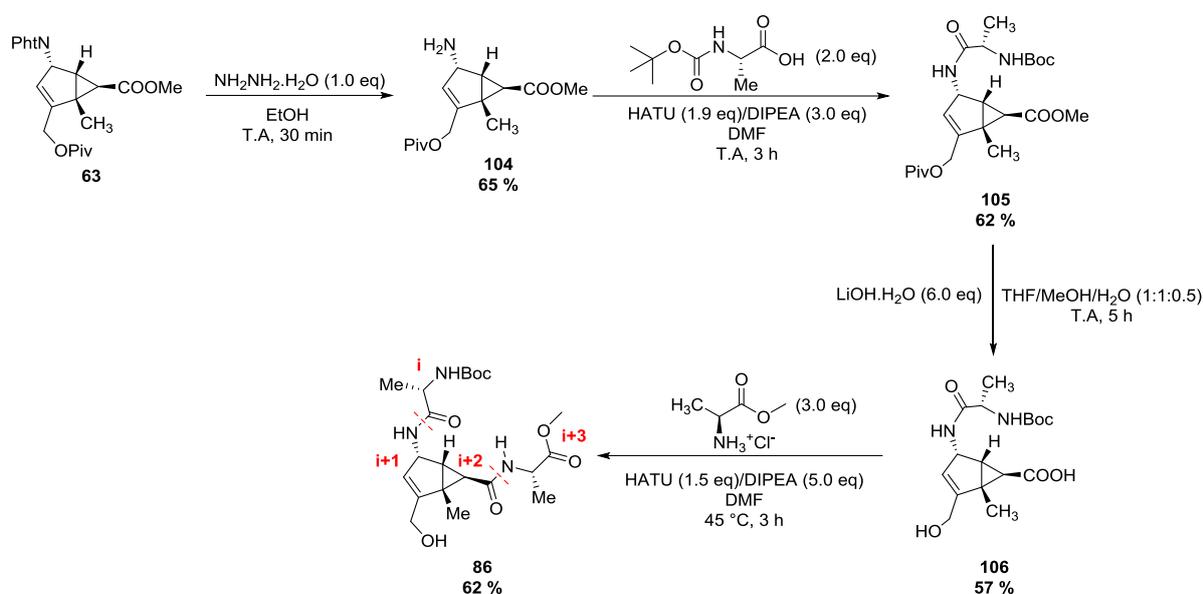


Figure 152: Voie de synthèse du peptide **86**

3.1. Déprotection du groupement phtalimide

L'emploi d'hydrazine pour permettre l'ouverture du phtalimide a également très bien fonctionné pour l'obtention de l'intermédiaire **104**. Le produit **104** a été isolé avec un rendement de 65 %.

3.2. Couplage peptidique du côté N-terminal

La seconde étape consistant à réaliser un couplage peptide entre la fonction acide de l'alanine protégée et l'amine secondaire de substrat **104** a été réalisée sans difficulté, malgré l'encombrement stérique que pouvait posséder l'amine. Le produit **105** a été isolé avec un rendement de 62 %.

3.3. Saponification de l'ester méthylique et de l'ester pivalique

La troisième étape consistant à réaliser deux saponifications (ester méthylique et ester pivalique) en une seule étape a également très bien fonctionné. Le produit **106** a été isolé avec un rendement de 57 %.

3.4. Couplage peptidique du côté C-terminal

Pour finir, le second couplage peptidique entre la fonction acide de l'intermédiaire **106** et la fonction amine de l'alanine ester méthylique a permis d'obtenir le peptide **86** avec un rendement isolé de 62 % comme dans le cas du peptide **85**. Comme précédemment, ce couplage doit être réalisé à 45 °C pour conduire au composé attendu.

Le rendement global de cette synthèse est similaire à celui du peptide **85**. Même avec un substrat plus encombré, la synthèse se déroule sans aucune difficulté particulière dans les conditions opératoires développées.

4. Synthèse du peptide modèle réduit **88**

4.1. Mise au point de la réduction de la double liaison

Avant de réaliser la réaction de réduction de la double liaison sur le substrat **62**, cette réduction a été testée et mise au point sur le substrat modèle **69** disponible en quantité suffisante (Figure 153).

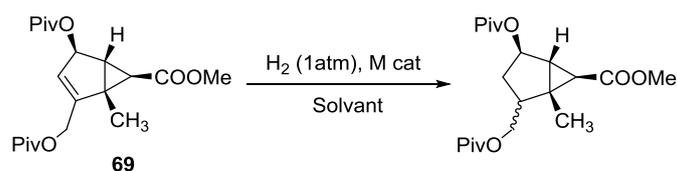


Figure 153: Réduction de la double liaison en présence d'un catalyseur métallique et sous atmosphère de dihydrogène

Le composé **69** est solubilisé dans le solvant approprié. Le catalyseur est ensuite additionné, puis le milieu est dégazé à l'argon. Enfin, le milieu est placé sous atmosphère d'hydrogène (1 atm) à l'aide d'un ballon de baudruche. Les résultats ont été rassemblés dans le Tableau 16.

Entrée	Catalyseur	Type de solvant	Produit formé
1	Pd/C (10 %w)	DCM	Aucune réaction
2	Rh/C (5 %w)	DCM	Aucune réaction
3	Pt/C (10 %w)	DCM	Aucune réaction
4	Pd/C (10 %w)	EtOH	Mélange de trois composés majoritaires
5	Rh/C (5 %w)	EtOH	
6	Pt/C (10 %w)	EtOH	
7	PtO ₂ (80 %w)	EtOH	

Tableau 16: Différentes conditions testées pour la réduction de la double liaison en présence d'un catalyseur métallique

Nous avons observé que lorsque l'on utilise le dichlorométhane comme solvant de réaction, aucune réaction n'a lieu. En revanche en utilisant l'éthanol comme solvant, le produit réagit quel que soit le type de catalyseur métallique utilisé. Après analyse RMN ¹H des différents bruts réactionnels, nous observons dans chaque cas un mélange non séparable de composés.

Lors de l'hydrogénation en présence d'un catalyseur métallique, il est également possible d'observer des réactions secondaires. Soit une isomérisation de la double liaison ou encore une réaction d'hydrogénolyse (c'est-à-dire dans la rupture de la liaison carbone oxygène). La présence de composés minoritaires pourrait laisser supposer que nous avons été confrontés à ce type de réaction secondaire.

Nous avons donc envisagé d'utiliser un autre agent réducteur qui pourrait éviter ces réactions parasites. L'hydrazine est connue comme étant un très bon nucléophile, mais elle possède également un caractère réducteur^{270,271} moins connu qui a été mis en évidence dans les années 1960. En effet, en s'oxydant, elle génère une espèce très réactive (diimide ou diazène) qui se décompose à son tour en diazote et en dihydrogène. Ce diimide peut se trouver sous trois formes *cis* ou *trans*. C'est la forme *cis* qui est réactive et qui permet la réaction de réduction (Figure 154).

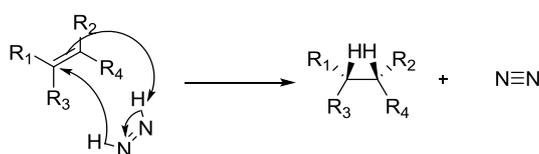


Figure 154: Mécanisme réactionnel de la réduction de la double liaison par le diimide

²⁷⁰ Hünig, S.; Müller, H.; Thier, W. *Angew. Chem. Internat. Edit.* **1965**, *4*, 271-382

²⁷¹ Pasto, D.; Taylor, R. *Organic Reaction* **1991**, *40*, 91-155

Il s'agit d'un mécanisme concerté impliquant un état de transition pseudo-cyclique à 6 atomes. Les deux atomes d'hydrogène sont additionnés sur la même face de la double liaison. Le produit de la réaction possède la même diastéréosélectivité que dans le cas d'une addition syn de dihydrogène catalysé par un métal. L'attaque se fait sur la face la moins encombrée.

L'utilisation de cette technique est une manière élégante de réduire une double liaison. De plus, l'emploi de ce réactif évite l'utilisation d'hydrogène sous pression ainsi que l'utilisation de catalyseurs métalliques qui peuvent être coûteux. Le sous-produit issu de la réduction par l'hydrazine n'est autre que le diazote qui est un gaz totalement inerte.

Cependant, dans le cas de dérivés carbonyles, la présence d'un atome présentant une forte électronégativité réduit considérablement le taux de produit réduit ou ne permet tout simplement pas la réduction.

Cette méthodologie a déjà été utilisée par Xavier Cachet pour réduire la double liaison du composé **66**. Dans les conditions utilisées (5 équivalents d'hydrazine dans l'éthanol), le milieu est chauffé au reflux du solvant pendant une nuit. Il a obtenu seulement un composé majoritaire, mais qui n'était pas celui attendu. En effet, il a formé le composé pyridazinone **107** (Figure 155). Ce composé a été isolé, cristallisé et caractérisé complètement à l'aide de la diffraction des rayons X.

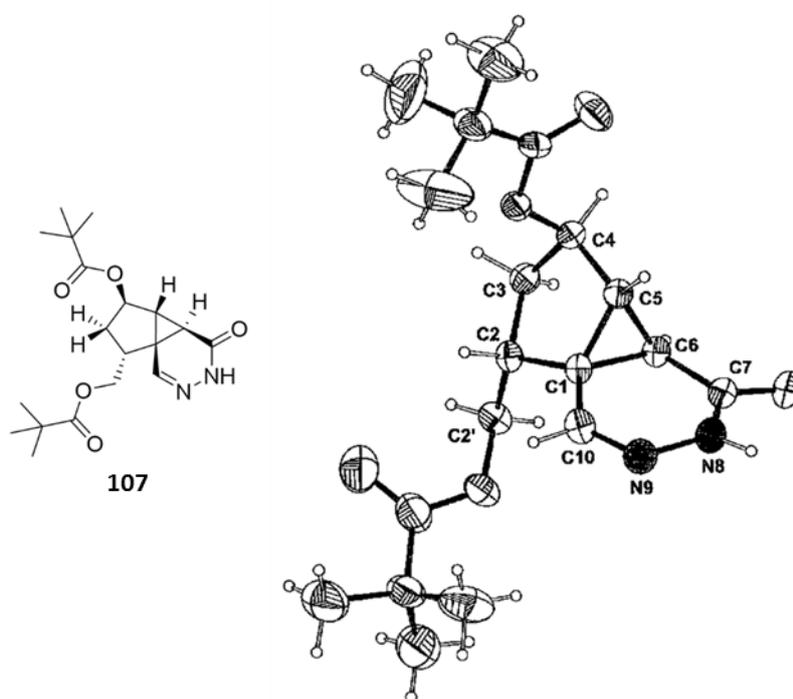


Figure 155: Structure Chemdraw et représentation ORTEP de la pyridazinone **107**

Nous avons donc appliqué cette méthodologie à notre substrat **69**. Dans notre cas, il n'y a aucun risque d'obtenir le motif pyridazinone étant donné que nous n'avons pas la fonction aldéhyde (Figure 156). De plus, nous avons utilisé un oxydant pour former le diimide et nous avons effectué la réaction à température ambiante.

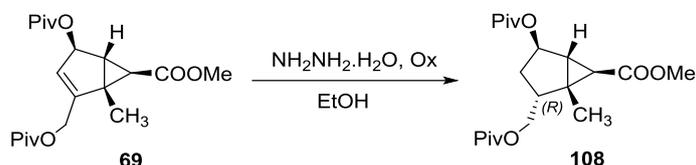


Figure 156: Réduction de la double liaison en présence d'hydrazine et d'un oxydant

L'ensemble des résultats en fonction des conditions utilisées est rassemblé dans le Tableau 17.

Entrée	Equivalent hydrazine	Oxydant	Temps (h)	Température	Conversion RMN (%)
1	5	Air/CuSO ₄	5	Reflux	0
2	20	Air/CuSO ₄	8	Reflux	0
3	5	H ₂ O ₂ (5 eq)	5	T.A	50
4	50	H ₂ O ₂ (50 eq)	14	T.A	50
5	20x3	H ₂ O ₂ (20 eq)x3	20	T.A	70
6	20x4	H ₂ O ₂ (20 eq)x4	40	T.A	100

Tableau 17: Différentes conditions testées pour la réduction de la double liaison en présence d'hydrazine et d'un oxydant

Nous pouvons conclure que lorsque l'on fait réagir à reflux de l'éthanol, le substrat modèle **69** avec de l'hydrazine monohydratée en présence d'air et de sulfate de cuivre, nous observons un seul composé en CCM. Après analyse RMN ¹H, le produit obtenu (entrées 1 et 2, Tableau 17) s'avère être le substrat de départ **69**.

En changeant l'oxydant et en remplaçant l'air par du peroxyde d'hydrogène, nous observons la formation du produit attendu (entrée 3, Tableau 17). Une large quantité d'hydrazine et d'oxydant ajoutée en une seule fois ne permet pas d'avoir une conversion totale. Nous avons obtenu seulement 50 % de conversion (entrée 4, Tableau 17). Nous en avons conclu que l'espèce générée *in-situ* est fugace et très peu stable. De plus, il se peut que nous générions d'autres produits d'oxydation comme des oxydes d'azote, ce qui peut expliquer la limite de conversion. Nous avons donc réalisé plusieurs ajouts successifs afin d'obtenir une conversion quantitative.

Avec trois ajouts d'hydrazine et d'oxydant sur deux jours, une conversion de 70 % est observée (entrée 5, Tableau 17). La conversion complète du composé non réduit **69** en composé réduit **108** est obtenue après deux jours de réaction et après avoir ajouté quatre fois de l'hydrazine et de l'eau oxygénée

(entrée 6, Tableau 17). Après purification, le composé réduit **108** est obtenu avec un rendement de 95 %.

A partir des données RMN 2D NOESY, nous pouvons conclure que nous avons bien obtenu le diastéréoisomère (R) (Figure 157).

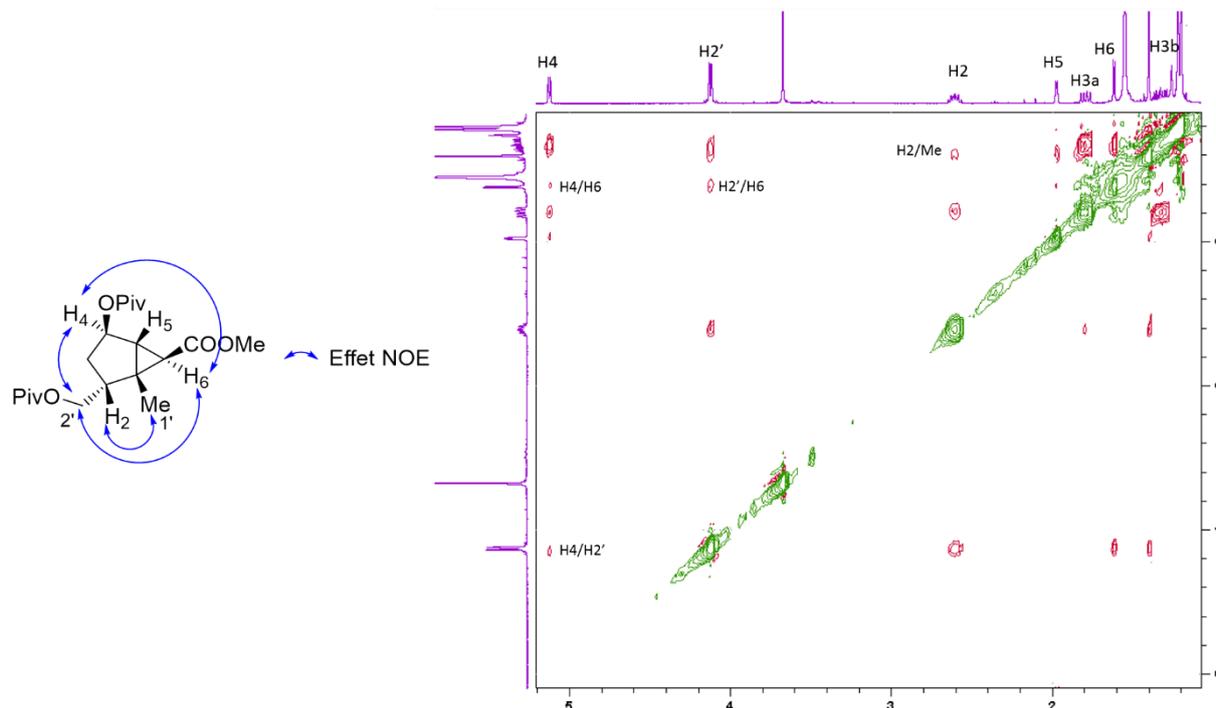


Figure 157: Effets NOE prouvant l'obtention du diastéréoisomère R du composé **108** (RMN 2D NOESY)

Nous observons bien la disparition du signal de H₃ (5,53-5,50 ppm) pour donner H_{3a} (1,79 ppm) et H_{3b} (1,33 ppm). Les deux protons H_{2'} (4,17-4,08 ppm) présentent un couplage dipolaire avec le proton H₆ (1,61 ppm) qui se trouve en arrière du plan, ce qui nous indique bien que le substituant en position 2' est en arrière du plan. De même, H₂ (2,65-2,55 ppm) et le méthyl 1' (1,40 ppm) couplent ensemble, ce qui nous confirme que le proton H₂, additionné lors de la réduction, s'est bien additionné sur la face avant du composé. Nous observons également la corrélation entre H₄ (4,12 ppm) et H₆ (1,61 ppm) ainsi que celle entre H₄ (4,12 ppm) et les deux protons H_{2'} (4,17-4,08 ppm). En revanche, le couplage entre H₂ et H₅ n'est pas visible par RMN 2D NOESY. La réduction de la double liaison a entraîné la formation d'un cyclopentène qui n'est plus plan.

La méthodologie impliquant l'utilisation du couple hydrazine/eau oxygénée permet de réduire la double liaison allylique et d'obtenir le composé **108** avec un excellent rendement. Nous allons donc appliquer cette méthodologie dans la synthèse du peptide modèle **88**.

4.2. Synthèse de 88 : Première voie de synthèse

Le schéma de synthèse est similaire à celui utilisé pour la synthèse des peptides modèles **85** et **86**. En effet, nous retrouvons les étapes employées précédemment : déprotection, premier couplage peptidique, saponification et second couplage peptidique. A ces quatre étapes, il est juste nécessaire d'en ajouter une cinquième au début de cette séquence afin de réduire la double liaison (Figure 158).

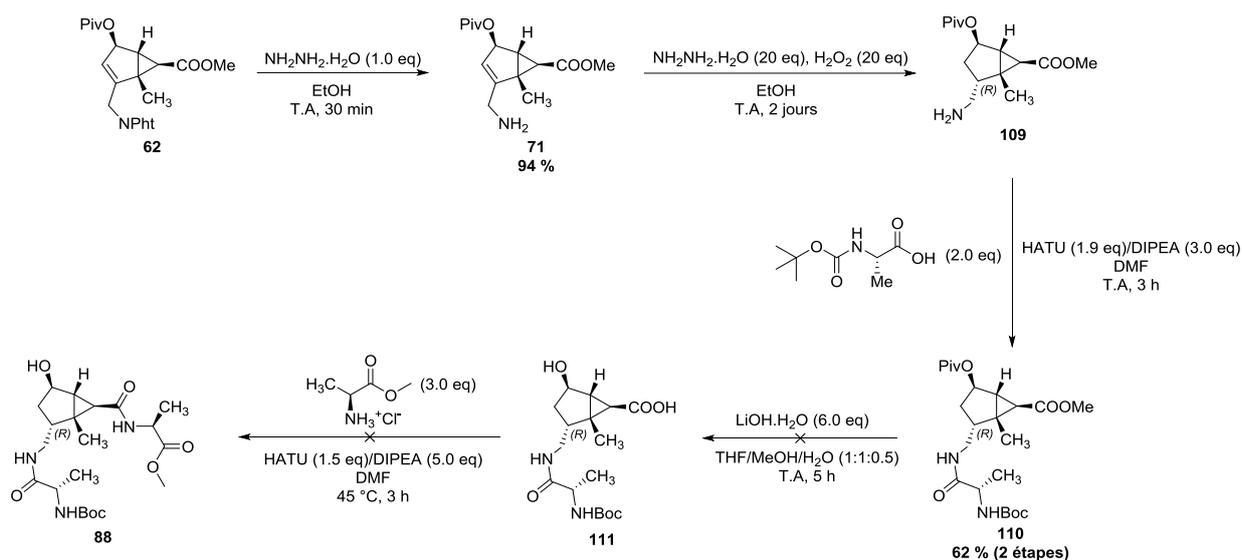


Figure 158: Première voie de synthèse du peptide **88**

4.2.1. Déprotection du phtalimide et réduction de la double liaison allylique

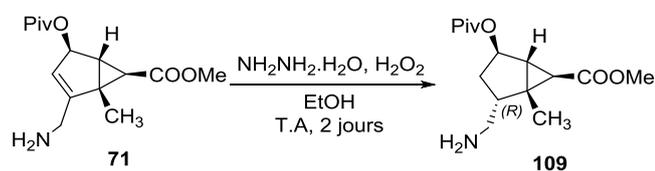


Figure 159: Réduction du composé **71** avec le couple hydrazine/eau oxygénée

Initialement, nous voulions effectuer deux réactions en une seule étape de synthèse (déprotection du groupement phtalimide et réduction de la double liaison). Toutefois, il s'est avéré que la réduction du composé **62** était difficile. La déprotection du groupement phtalimide intervenant en premier, la présence du sous-produit **103** issu de cette déprotection semble gêner par la suite la réduction de la double liaison.

Il est donc envisagé de procéder en deux temps. Tout d'abord déprotéger le groupement phtalimide en faisant réagir un seul équivalent d'hydrazine dans l'éthanol à température ambiante afin d'obtenir le dérivé **71** et purifier ce dernier. Puis dans un second temps, réduire la double liaison du composé **109** possédant l'amine primaire libre (Figure 159).

Entrée	Equivalent NH ₂ NH ₂	Equivalent H ₂ O ₂	Temps (h)	Conversion RMN (%)
1	10	10	12	Pas de conversion
2	20x2	20x2	20	70
3	20x4	20x4	40	100

Tableau 18 : Conditions testées pour la réduction de la double liaison du composé **71**

Avec un seul ajout de dix équivalents (entrée 1, Tableau 18), aucune conversion n'est observée. En revanche avec deux ajouts de vingt équivalents (entrée 2, Tableau 18), nous obtenons un taux de conversion de 70 %. Comme déjà observé, lors du développement de cette méthodologie, quatre ajouts de vingt équivalents sont nécessaires pour obtenir une conversion totale (entrée 3, Tableau 18).

Une fois la réaction terminée, nous nous retrouvons avec un milieu réactionnel très dilué. L'extraction du composé réduit **109** est difficile et de l'hydrazine se retrouve mélangée au brut réactionnel après évaporation. Cette présence d'hydrazine complique fortement la purification du composé. Le composé réduit **109** n'a jamais été isolé avec une pureté convenable. Nous avons donc envisagé d'engager directement le composé **109** de pureté moyenne, directement dans l'étape suivante qui consiste à effectuer le couplage peptidique de l'alanine Boc avec le substrat **109**.

4.2.2. Couplage peptidique du côté N-terminal

La troisième étape de cette synthèse consiste à réaliser un couplage peptide entre la fonction acide de l'alanine protégée et l'amine primaire du composé **109**. Les mêmes conditions opératoires que lors des synthèses des peptides modèles sont appliquées, à savoir, l'utilisation de la DMF, de l'agent de couplage HATU et d'une base organique, la DIPEA. Le produit **110** issu du couplage a été isolé avec un rendement de 62 % pour les deux étapes. Après analyse RMN, nous pouvons confirmer que nous avons obtenu le composé **110** dont la double liaison a bien été réduite pour conduire au diastéréoisomère R (Figure 160).

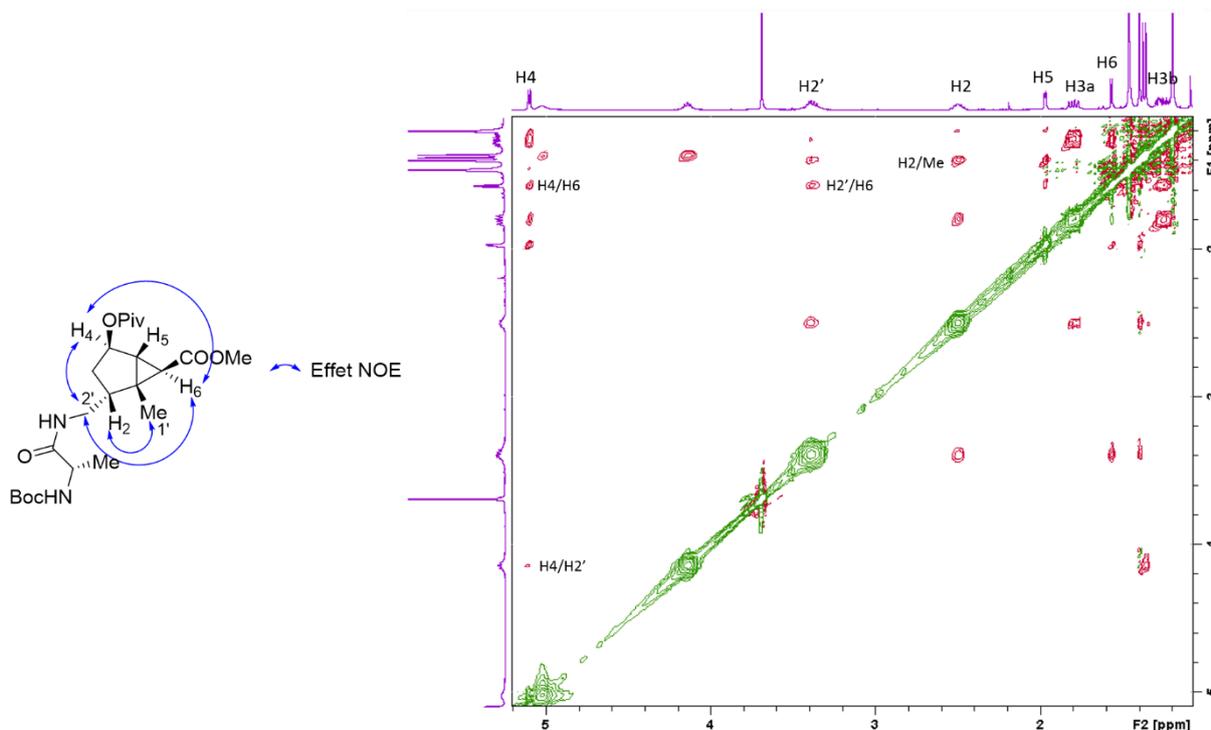


Figure 160: Effets NOE prouvant l'obtention du diastéréoisomère R du composé **110** (RMN 2D NOESY)

Nous observons bien l'absence de signal H₃ (5,34 ppm) pour donner H_{3a} (1,77 ppm) et H_{3b} (1,34 ppm). Les deux protons H_{2'} (4,34-3,28 ppm) présentent un couplage dipolaire avec le proton H₆ (1,54 ppm) qui se trouve en arrière du plan, ce qui nous indique bien que le substituant en position 2' est en arrière du plan. De même, H₂ (2,53-2,42 ppm) et le méthyl 1' (1,37 ppm) couplent ensemble, ce qui nous confirme que le proton H₂, additionné lors de la réduction, s'est bien additionné sur la face avant du composé. Nous observons également la corrélation entre H₄ (5,07 ppm) et H₆ (1,54 ppm) ainsi que celle entre H₄ (5,07 ppm) et les deux protons H_{2'} (3,44-3,28 ppm). En revanche, le couplage entre H₂ et H₅ n'est pas visible par RMN 2D NOESY. La réduction de la double liaison a entraîné la formation d'un cyclopentène qui n'est plus plan.

4.2.3. Saponification de l'ester méthylique et de l'ester pivalique

La quatrième étape consistant à réaliser la saponification des deux esters en une seule étape a été effectuée en se plaçant dans les conditions optimisées précédemment, à savoir six équivalents d'hydroxyde de lithium dans un mélange THF/MeOH/H₂O (1:0,5:1). Cependant, au lieu d'obtenir le composé attendu **111** avec l'alcool secondaire libre et l'acide carboxylique, nous avons obtenu le dérivé **112** avec un rendement isolé de 60 % (Figure 161).

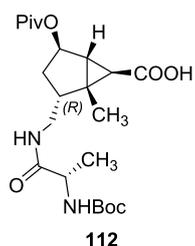


Figure 161 : Composé obtenu lors de l'étape de saponification

La réduction de la double liaison a modifié la répartition électronique sur la molécule et l'ester pivalique en position C₄ ne s'est pas clivé dans les conditions appliquées. Nous avons tout de même engagé le composé **112** dans la dernière étape de synthèse pour étudier la faisabilité du second couplage peptidique.

4.2.4. Couplage peptidique du côté C-terminal

Pour finir, le second couplage peptidique entre la fonction acide du composé **112** et la fonction amine de l'alanine ester méthylique est effectué dans les conditions de couplage habituelles. Le peptide BocAla₁-δBCHII (OPiv)-Ala₂OMe **113** toujours protégé sur l'alcool secondaire est obtenu avec un rendement isolé de 57 % (Figure 162).

Le peptide **113** a été obtenu avec un rendement global de 20 %.

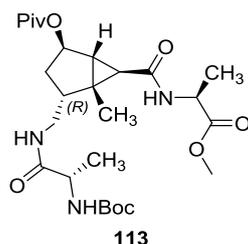


Figure 162 : Peptide **113**

La voie de synthèse pour l'obtention du peptide modèle **88** reste à optimiser à deux endroits :

- Il faut trouver les bonnes conditions pour obtenir le composé **109** pur.
- Puis, optimiser l'étape de clivage de l'ester pivalique.

Même si nous n'avons pas obtenu le peptide **88**, nous avons tout de même démontré que la voie de synthèse envisagée était applicable.

4.3. Synthèse de 88 : Seconde voie de synthèse

Nous savons que la réduction de la double liaison du composé **69** se réalise facilement et efficacement. En revanche, lorsque celle-ci est réalisée à partir du composé **71**, possédant une amine libre, nous avons rencontré des problèmes de purification. Avec ces observations, nous avons donc décidé de repartir du synthon commun **69** et de développer une nouvelle voie de synthèse pour synthétiser le peptide **88** (Figure 163).

Cette nouvelle voie de synthèse, même si elle présente l'inconvénient de faire intervenir sept étapes au lieu de cinq, devrait nous permettre d'obtenir le composé **88** avec un rendement convenable. De plus, la mise en œuvre de cette nouvelle synthèse devrait être facile, étant donné qu'elle fait intervenir des réactions déjà utilisées et maîtrisées.

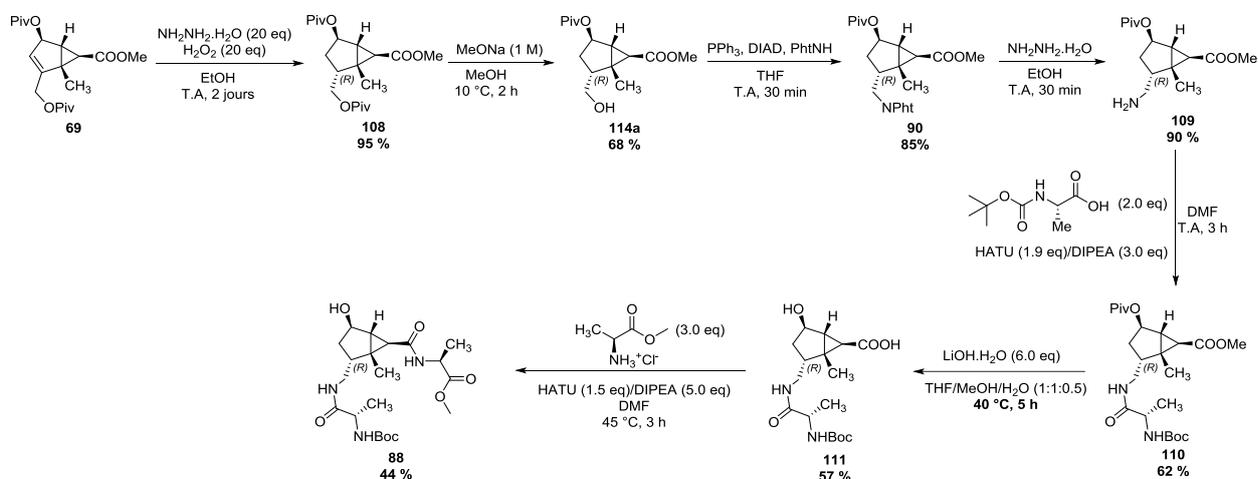


Figure 163 : Nouvelle voie de synthèse pour obtenir **88**

4.3.1. Réduction de la double liaison

La réduction de la double liaison est effectuée d'après la méthodologie mise au point et décrite précédemment, à savoir quatre ajouts de vingt équivalents d'hydrazine et vingt équivalents d'eau oxygénée toutes les quatre heures. La réaction est réalisée dans l'éthanol à température ambiante en deux jours. Le composé **108** est obtenu avec 95 % de rendement après purification.

4.3.2. Déprotection sélective des esters pivaliques par le méthanolate de sodium

L'étape de déprotection sélective de l'alcool primaire vis-à-vis de l'alcool secondaire a demandé plus de travail (Figure 164). En effet, nous avons supposé que la réduction de la double liaison faisant perdre

le caractère allylique des fonctions alcools permettrait d'avoir une bonne sélectivité désormais entre l'alcool primaire en position C_{2'} et l'alcool secondaire en position C₄.

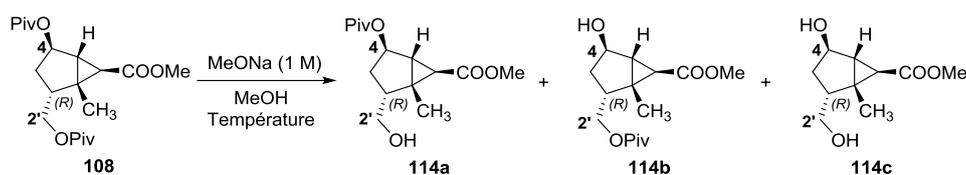


Figure 164 : Déprotection sélective au méthanolate de sodium

Afin d'obtenir une sélectivité entre les deux alcools, nous avons mené cette réaction en commençant à une température de -80 °C. Toutes les 30 minutes, un suivi réactionnel était effectué. Tant que le composé **108** n'était pas consommé et que la réaction de déprotection n'avait pas débuté, la température du milieu réactionnel était augmentée par palier de 10 °C. L'ensemble des résultats expérimentaux sont rassemblés dans le Tableau 19.

Entrée	Température (°C)	Composé(s) formé(s)	Ratio
1	-80 à 0	Aucune conversion	
2	+10	110a/110b	75 : 25
3	T.A = 25	110a/110b	1 : 1
4	40	110c	100

Tableau 19 : Conditions testées pour la déprotection sélective du composé **108**

De -80 °C à 0 °C, aucune conversion du composé de départ **108** n'est observée (Entrée 1). Lorsque, nous atteignons la température de +10 °C, nous observons la formation de composés plus polaires, **114a** et **114b**. Après 5 h de réaction, la totalité du composé **108** est consommée. Après purification, les deux composés **114a** et **114b** sont obtenus dans un ratio 75 : 25 avec un rendement respectif de 68 % et 23 % (Entrée 2). En utilisant un seul équivalent de méthanolate de sodium (1 M) à température ambiante (+25 °C), nous avons obtenu un mélange des composés **114a** et **114b** avec un ratio 1 :1, après seulement 1 h de réaction (Entrée 3). Pour finir, si la réaction est menée à +40 °C afin d'accélérer la cinétique, en 30 minutes, seul le composé **114c** est obtenu (Entrée 4).

Cette étude cinétique de la réaction de déprotection des esters pivaliques, nous a permis de trouver des conditions réactionnelles permettant d'avoir une sélectivité augmentée vis-à-vis du composé **114a**.

4.3.3. Introduction du groupement phtalimide par une réaction de Mitsunobu

La transformation de **114a** en **90** est réalisée selon les conditions standards de Mitsunobu, à savoir phtalimide, triphénylphosphine et dérivé azo (DIAD) dans du THF anhydre. La réaction n'a pas présentée de problème particulier. Le composé **90** est obtenu avec un rendement isolé de 85 %

4.3.4. Déprotection du phtalimide

L'étape suivante est la déprotection du groupement phtalimide par l'hydrazine dans l'éthanol. Comme précédemment, cette déprotection est terminée en 30 minutes et conduit à l'obtention du composé **109** avec un rendement de 90 %.

4.3.5. Couplage peptidique du côté N-terminal

La cinquième étape de cette synthèse consiste à réaliser un couplage peptidique entre la fonction acide de l'alanine protégée et l'amine primaire du composé **109**. Les conditions opératoires appliquées lors des couplages peptidiques sont reproduites ici, à savoir, Boc-alanine/HATU/DIPEA dans la DMF. Le dérivé **110** a été isolé avec un rendement de 62 %.

4.3.6. Saponification des deux esters

L'avant dernière étape consistant à réaliser la saponification des deux esters (méthylique en C₆ et pivalique en C₄) en une seule étape a demandé également une légère mise au point des conditions réactionnelles. En effet, comme nous en avons discuté dans la partie précédente, la perte du caractère allylique de l'ester pivalique a diminué la réactivité de celui-ci, le rendant plus stable vis-à-vis des attaques nucléophiles.

Nous nous sommes placés dans les mêmes conditions opératoires, à savoir six équivalents d'hydroxyde de lithium dans un mélange THF/MeOH/H₂O (1:0,5:1). Mais, cette fois-ci, le milieu réactionnel est chauffé à 40 °C. Dans ces conditions, nous obtenons le produit attendu **111** avec un rendement isolé de 57 %.

4.3.7. Second couplage peptidique du côté C-terminal

Pour finir, la dernière étape de cette voie de synthèse consiste à réaliser le second couplage peptidique entre la fonction acide du composé **111** et la fonction amine de l'alanine ester méthylique. Nous avons déjà étudié la faisabilité de ce couplage. Nous avons donc obtenu le peptide modèle **88** sans encombre avec un rendement isolé de 44 %.

5. Conclusion

La seconde voie de synthèse envisagée pour l'obtention du peptide **88** s'est avérée efficace et nous a donc permis d'obtenir ce peptide avec un rendement global de 8 %, malgré l'ajout de deux étapes supplémentaires au chemin réactionnel envisagé dans un premier temps. Il a cependant été nécessaire d'effectuer quelques mises au point de cette seconde voie de synthèse.

VI. Synthèses des peptides d'intérêt biologique

1. Généralités à propos de la synthèse peptidique

1.1. Introduction

La synthèse peptidique peut être réalisée soit en solution, soit sur support solide. La Synthèse Peptidique sur Support Solide (SPPS) présente de nombreux avantages par rapport à celle en solution. Cette méthode de synthèse a été développée en 1963 par Merrifield²⁷². Elle est basée sur l'addition successive d'acides aminés sur un support solide (Figure 165).

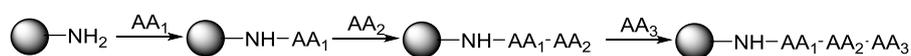


Figure 165: Schématisation de la synthèse peptidique sur support solide

L'utilisation d'un support solide permet d'isoler le produit synthétisé du milieu réactionnel par une simple filtration, ce qui permet un gain de temps considérable notamment au niveau des purifications. Seul le peptide final est purifié. Avec ce constat, il est donc possible d'utiliser des excès de réactifs, afin d'avoir un taux de conversion optimal.

²⁷² Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154

Les résines sont couramment utilisées comme support solide. Elles sont constituées d'un polymère insoluble possédant des linkers fonctionnalisés. C'est sur ces linkers que le premier acide aminé est fixé. Il existe un grand nombre de résines en fonction du nombre et du type de linker souhaité pour l'ancrage du peptide.

Un autre avantage de la synthèse peptidique sur support solide est que cette dernière peut être réalisée par un synthétiseur automatique, et éventuellement sous activation micro-ondes (Figure 166). Le temps de réaction s'en trouve donc considérablement réduit. De plus, dans certains cas, l'irradiation micro-ondes permet d'effectuer des réactions difficiles dans des conditions « classiques » (en solution et par chauffage thermique).



Figure 166: Synthétiseur automatique de peptides

En synthèse peptidique sur support solide, il existe deux grandes stratégies : la stratégie Fmoc et la stratégie Boc. Ces stratégies correspondent au groupement protecteur utilisé sur la fonction amine. Dans les deux cas, il s'agit d'un groupement de type carbamate aussi appelé uréthane. La grande différence de ces stratégies réside dans la stabilité de ces groupements et donc par conséquent les conditions de déprotection à utiliser pour les cliver. Dans le cadre du groupement Boc, il est stable en milieu basique mais est clivé en milieu acide. Au contraire, le groupement Fmoc, présente une stabilité en milieu acide et est clivé dans des conditions basiques.

Il est également nécessaire parfois, d'avoir des groupements protecteurs orthogonaux sur les chaînes latérales afin d'éviter les réactions secondaires qui pourraient avoir lieu lors des couplages.

1.2. La formation de l'ester activé

Il est nécessaire d'activer l'acide carboxylique afin de pouvoir réaliser le couplage avec l'amine. La formation du chlorure d'acide n'est que très peu utilisée comme stratégie, car les chlorures d'acide ne sont pas très stables et peuvent facilement se dégrader. Il est également possible de former des anhydrides mixtes ainsi que des fluorures d'acide beaucoup plus stables que les chlorures (Figure 167).

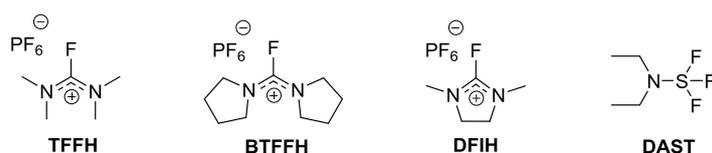


Figure 167: Agents de fluoration

Cependant, les réactifs les plus couramment utilisés pour former la liaison amide sont les agents de couplage qui augmente la réactivité de l'acide en formant un ester activé afin de faciliter l'addition de l'amine et l'élimination du bon nucléofuge.

Plusieurs types d'agents de couplage permettent de former cet ester activé. Les plus couramment employés sont le couple carbodiimide/bon nucléophile, mais il existe également des réactifs « tout-en-un » comme les dérivés d'uronium ou phosphonium. Ces dérivés possèdent à la fois le motif carbodiimide ainsi que le bon nucléophile dans leur structure.

1.2.1. Le couple carbodiimide/bon nucléophile

Certains des carbodiimides (comme l'EDC), ont été développés pour faciliter l'élimination de l'urée formée en tant que sous-produit. D'autres ont été conçus spécialement pour la synthèse sur support solide (BMC, BEC) (Figure 168).

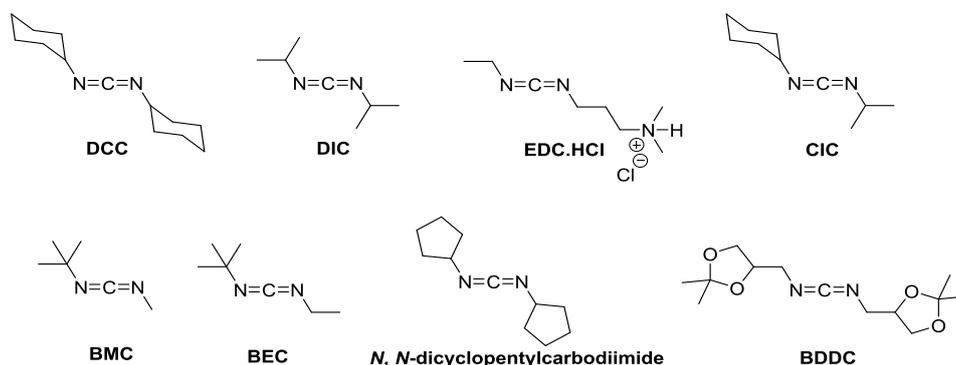


Figure 168: Les carbodiimides

Tous ces réactifs peuvent être combinés avec les nucléophiles présentés ci-dessous pour permettre l'activation de la fonction acide (Figure 169).

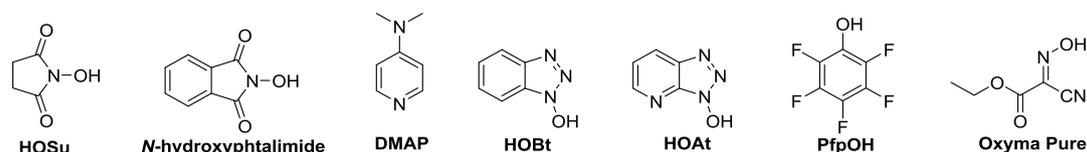


Figure 169: Les bons nucléophiles

La formation de l'ester activé peut être facilement mise en évidence. En effet la polarité du composé est différente et celui-ci est visible sous UV.

Mais, il existe également des réactifs à base d'uronium ou de phosphonium combinant à la fois un dérivé carbodiimide et un bon nucléophile.

1.2.2. Les dérivés uroniums^{273,274}

La liste des dérivés uroniums présentée ci-dessous n'est pas exhaustive (Figure 170).

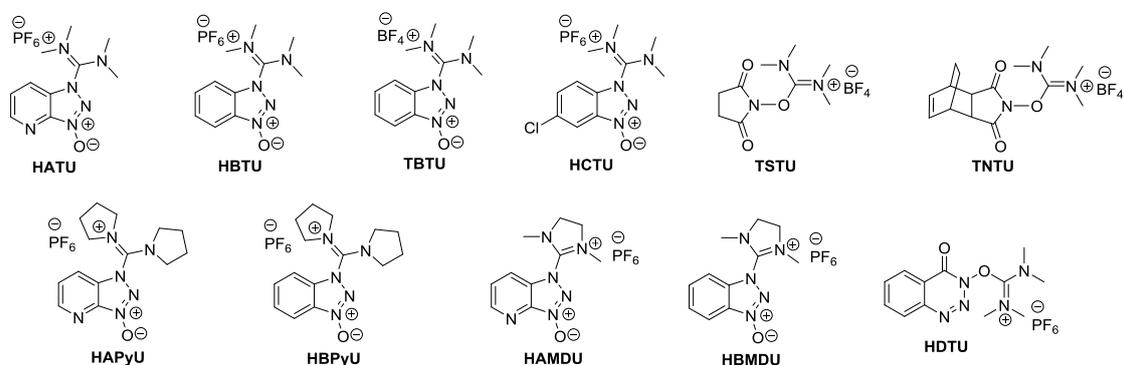


Figure 170: Dérivés uroniums

HATU est le réactif possédant la meilleure réactivité. Il est utilisé dans les couplages difficiles, mais c'est également le plus coûteux. HCTU est une bonne alternative à HATU. TSTU et TNTU ont été développés pour la synthèse en solution.

²⁷³ Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683

²⁷⁴ Valeur, E.; Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631

1.2.3. Les dérivés phosphoniums^{273,274}

Comme pour les dérivés uroniums, la liste des dérivés phosphoniums présentée ci-après n'est pas, non plus, exhaustive (Figure 171).

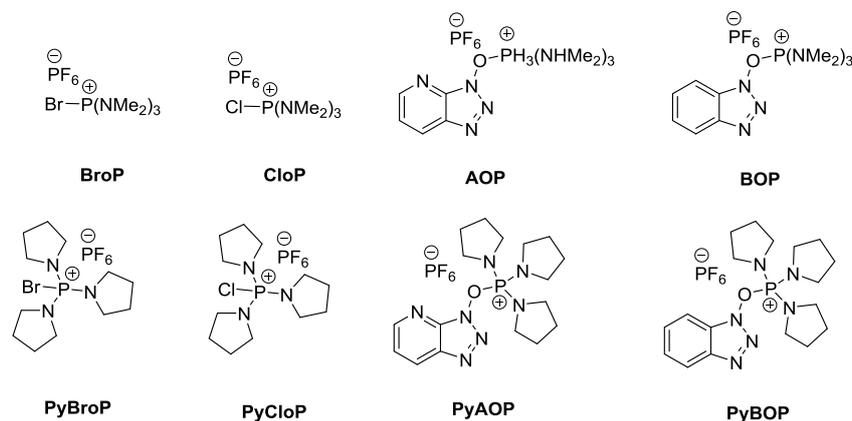


Figure 171: Dérivés phosphoniums

AOP et BOP sont les équivalents en version phosphonium de HATU et HBTU. En utilisant les dérivés phosphoniums qui possèdent NMe_2 , de l'hexaméthylphosphoramide (HMPA) est formé comme sous-produit. Ce sous-produit est un CMR. De nouveaux dérivés phosphoniums possédant un motif pyrrolidine ont donc été développés pour résoudre ce problème de toxicité.

En fonction de la difficulté du couplage peptidique à réaliser et de la nature des différentes chaînes latérales des amino-acides, il peut être nécessaire de varier l'agent de couplage.

1.3. Mécanisme d'un couplage peptidique

La formation de l'ester activé, ainsi que la création de la liaison peptidique sont expliquées ci-dessous (Figure 172). Le mécanisme est détaillé avec l'agent de couplage HATU que nous avons utilisé tout au long de ce travail.

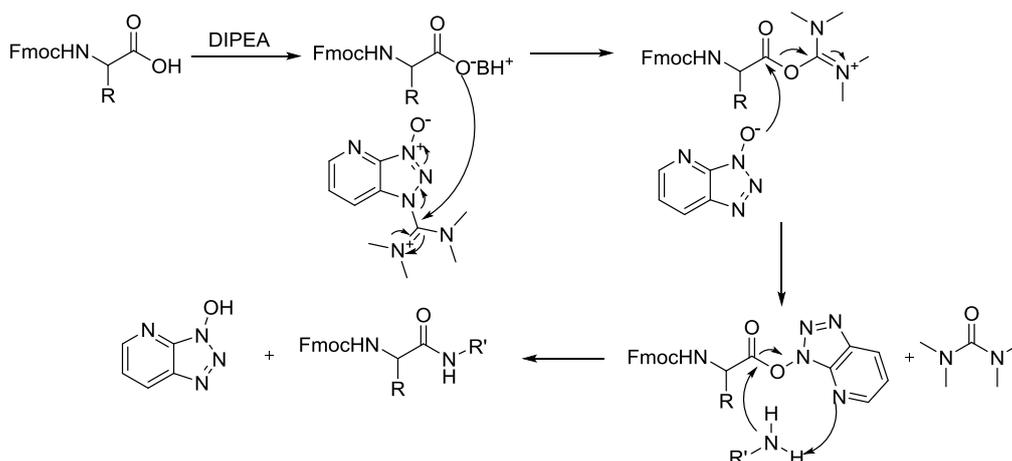


Figure 172: Mécanisme expliquant la formation de l'ester activé

La base vient déprotoner l'acide carboxylique afin de former le carboxylate qui vient par la suite réagir sur le carbone très électrophile du guanidinium de HATU pour former un premier intermédiaire uronium. Ensuite, l'oxyde de benzotriazole (HOAt) substitue l'uronium précédemment formé pour donner une espèce beaucoup plus stable et réactive que l'on appelle ester activé. C'est à cette étape que la *N,N,N',N'*-tetraméthylurée, dérivé toxique, est générée. L'amine de l'acide aminé peut ainsi venir réagir pour former la liaison amide. Le noyau pyridine de HOAt permet le bon positionnement de l'amine vis-à-vis du carbonyle de l'ester activé, ce qui améliore grandement l'efficacité du couplage en évitant les problèmes d'épimérisation.

2. Le principe de la synthèse peptidique sur support solide

La construction du peptide suit une série de trois étapes qui vont être détaillées par la suite. Afin d'éviter des problèmes d'épimérisation, l'élongation peptidique est réalisée du C-terminal vers le N-terminal.

2.1. Fixation du premier acide aminé sur la résine

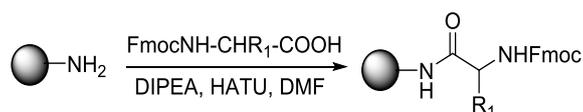


Figure 173: Fixation du premier acide aminé sur la résine

La première étape consiste à fixer le premier acide aminé sur la résine. Dans notre cas, nous utilisons une résine qui possédant des linkers amines primaires (Figure 173).

2.2. La construction du peptide

La seconde étape est l'étape de construction du peptide proprement dite. L'addition de chaque acide aminé suit à son tour deux étapes distinctes. La première étape consiste à déprotéger la fonction amine de l'acide aminé fixé sur la résine (Figure 174).

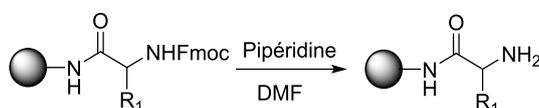


Figure 174: Déprotection du groupement protecteur

Le mécanisme de déprotection du groupement Fmoc par une solution de pipéridine dans du DMF est détaillée ci-après (Figure 175).

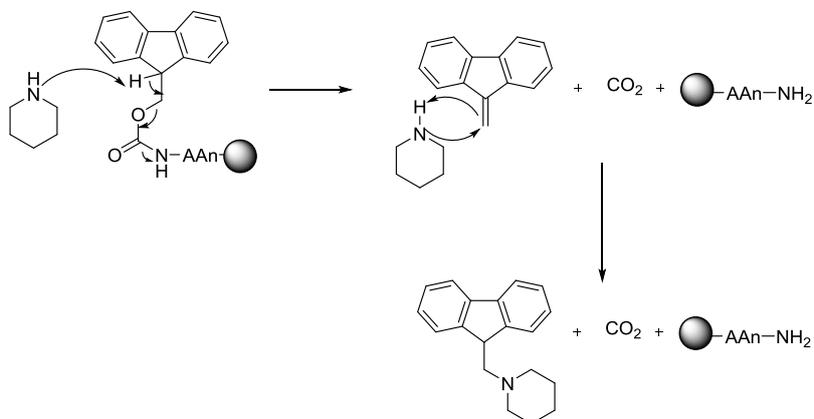


Figure 175: Mécanisme de clivage d'un groupement Fmoc

La seconde étape conduisant à la construction du peptide est l'étape de couplage à proprement parler. Une fois la fonction amine libérée, elle est mise en réaction dans du DMF, en présence de l'agent de couplage peptidique, d'une base et de l'acide aminé à coupler (libre au niveau de sa fonction acide et protégé sur sa fonction amine par un groupement Fmoc). Une fois le couplage réalisé, un lavage est effectué afin d'éliminer l'excès des différents réactifs utilisés.

Cet enchaînement de déprotection, activation de l'acide et couplage sont réalisés jusqu'à obtenir le peptide désiré (Figure 176).

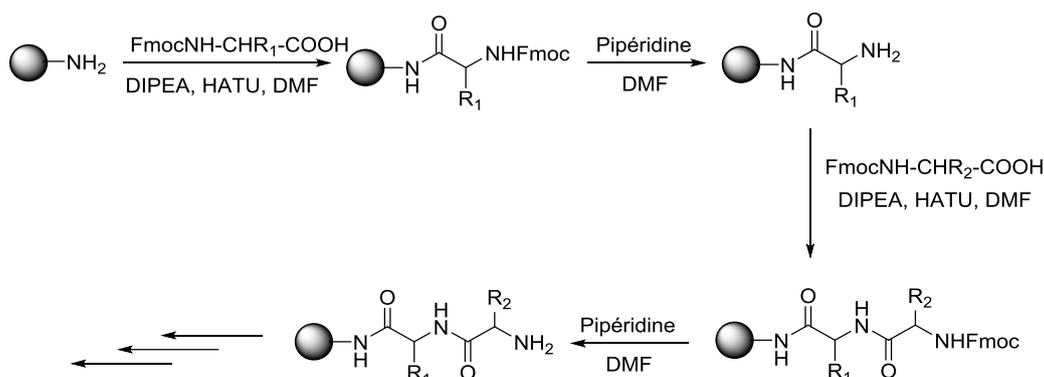


Figure 176: Représentation du protocole utilisé pour la synthèse peptidique sur support solide

2.3. Déprotection des groupements protecteurs et clivage de la résine

Pour finir, la troisième et dernière étape consiste en la déprotection des groupements protecteurs des chaînes latérales (alcools, amines) ainsi que le clivage du peptide de la résine (Figure 177).



Figure 177: Clivage des groupements protecteurs et de la résine

Cette étape de déprotection/clivage est réalisée en présence d'un acide fort comme l'acide trifluoroacétique (TFA) en présence d'eau et de triisopropylsilane (TIPS). L'eau et le TIPS servent de piège afin de limiter la formation des carbocations et ainsi contrôler les réactions secondaires qui pourraient se produire.

Une fois en solution et déprotégé, le peptide est purifié, typiquement par HPLC semi-préparative.

3. Préparation des amino-acides bicycliques pour leurs incorporations dans le peptide d'intérêt biologique

3.1. Introduction

Les études *in-silico* réalisées par dynamique moléculaire et par DFT, nous avaient donné les peptides modèles BocAla₁-γ BCH I-Ala₂OMe (**86**) et BocAla₁-δ BCH II-Ala₂OMe (**88**) comme potentiel amino-acide conduisant à la formation d'un coude β.

Etant donné que nous avons à notre disposition l'acide aminé bicyclo[3.1.0]hex-2-ène **63** et l'acide aminé bicyclo[3.1.0]hexane **90** protégés, ils ne peuvent être engagés dans une synthèse peptidique sous cette forme.

Le noyau bicyclique apparenté à un motif pentadiène, étant assez fragile, nous avons sélectionné la stratégie Fmoc impliquant l'utilisation de condition basique lors des réactions de déprotection. En effet, en condition acide, nous supposons que le cyclopropane pourrait s'ouvrir et conduire à une dégradation de nos composés. Pour confirmer notre hypothèse, nous avons solubilisé notre acide aminé **62** dans un mélange à volume égaux de chloroforme deutéré (CDCl_3) et d'acide trifluoroacétique (TFA). Des analyses RMN ont été réalisées à différents intervalles de temps (Figure 178).

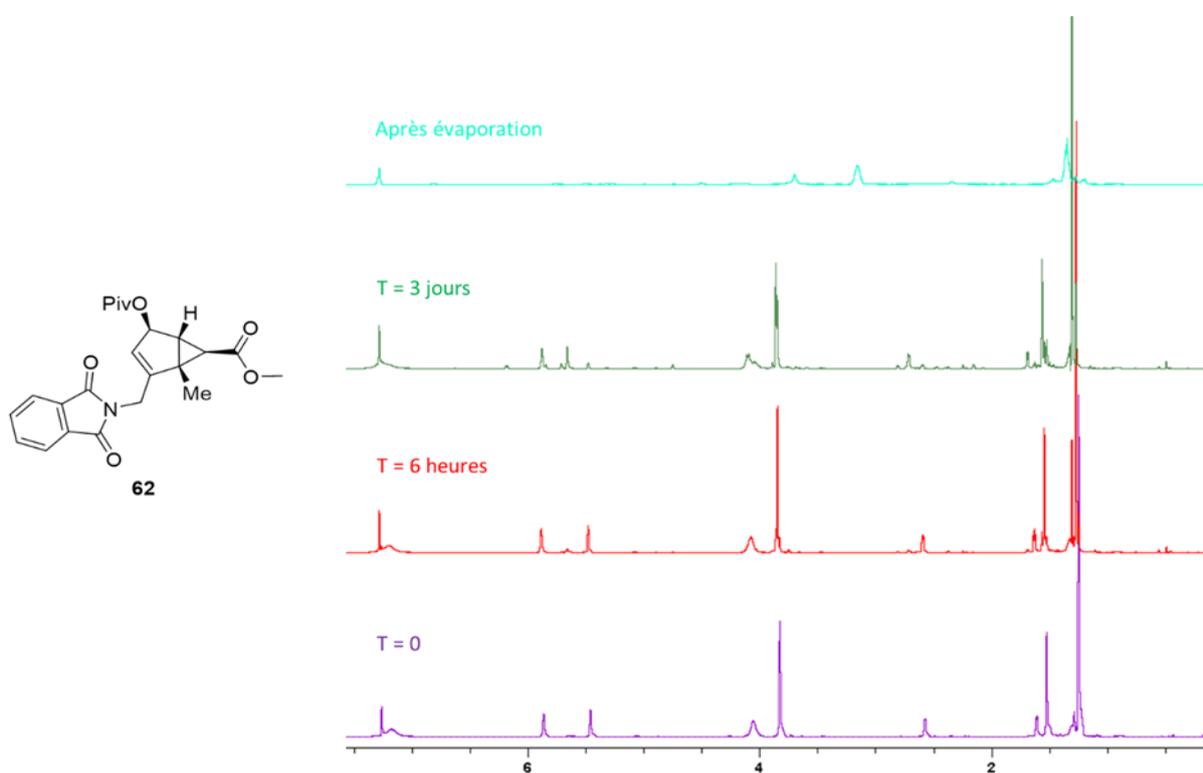


Figure 178: Etude de stabilité par RMN ^1H de nos composés en milieu acide

A $T = 0$, seuls les pics caractéristiques de notre composé sont visibles. A $T = 6$ heures, quelques petits pics commencent à apparaître, ce qui laisse penser à un début de dégradation. A $T = 3$ jours, de nombreux pics sont apparus, une dégradation importante a eu lieu. Après évaporation du tube, une dernière RMN ^1H du produit récupéré est réalisée. Le spectre RMN ^1H ne correspond plus au produit de départ, le produit est complètement dégradé.

3.2. Stratégie Fmoc

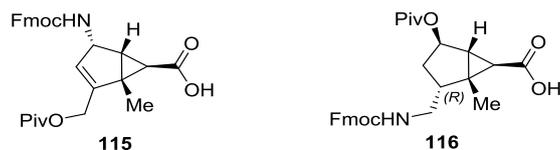


Figure 179: Amino-acides Fmoc à utiliser pour la synthèse peptidique

Afin d'obtenir les composés **115** et **116** (Figure 179) avec l'amine protégée par un groupement Fmoc et l'acide carboxylique libre, nous avons développé la voie de synthèse décrite ci-dessous. C'est une synthèse linéaire en trois étapes. La mise au point de la synthèse est réalisée avec le composé **63** (Figure 180).

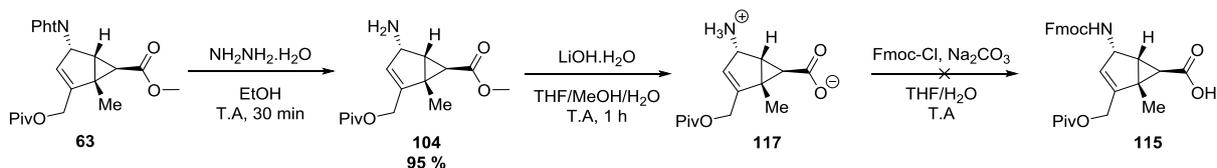


Figure 180: Schéma de synthèse pour la préparation de la stratégie Fmoc

3.2.1. Déprotection du phtalimide

La première étape est comme toujours la déprotection du phtalimide **63** par l'hydrazine. Cette étape fonctionne sans problème et donne le composé **104** avec un rendement de 95 %.

3.2.2. Saponification de l'ester méthylique

La deuxième étape consiste à réaliser la saponification de l'ester méthylique **104** pour conduire au composé **117**. Il faut utiliser un seul équivalent d'hydroxyde de lithium afin de ne pas déprotéger en même temps l'ester pivalique en position C₄. Lorsque nous formons le composé **117**, il se trouve alors sous forme zwitterionique (ammonium et carboxylate). La purification du brut réactionnel sur gel de silice ne permet pas d'obtenir le composé attendu. Il semble rester piégé sur la silice. Il en est de même, lorsque le milieu réactionnel est acidifié afin d'obtenir l'acide carboxylique et l'ammonium. Des essais de purification sur résine échangeuse de cation ont également été tentés, mais les résultats n'ont pas été concluants. Il a alors été envisagé d'effectuer la dernière étape en partant directement du brut réactionnel sans purification.

3.2.3. Formation du composé 115

La dernière étape consiste à protéger la fonction amine par un groupement Fmoc. L'intermédiaire **117** non purifié est donc mis en réaction en présence du chlorure de 9-fluorenylmethyl chloroformiate (Fmoc-Cl) et en présence d'une base inorganique comme le carbonate de sodium dans un mélange THF/H₂O. La réaction est menée à température ambiante. Le composé **115** ne s'est pas formé. Le milieu est alors chauffé à 40 °C, mais toujours aucune conversion n'est observée. La présence d'impuretés obtenues lors de l'étape précédente semble empêcher la formation du composé.

Etant donné que nous n'avons pas réussi à former le composé **115**, nous n'avons pas essayé cette suite réactionnelle afin de synthétiser le substrat **116**.

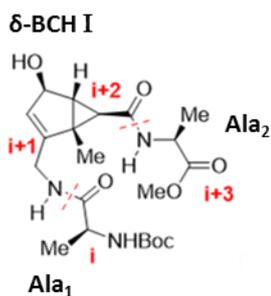
4. Conclusion

La protection de nos acides aminés **63** et **90** par un groupement Fmoc, en vue de leur utilisation dans la synthèse du peptide d'intérêt biologique n'a pas été concluante.

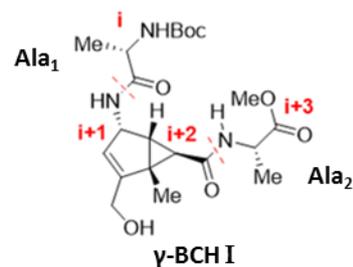
Nous avons donc envisagé d'utiliser un autre groupement protecteur sur la fonction amine, le groupement *o*-nosyle. Ce groupement peut être introduit par une réaction de Fukuyama-Mitsunobu. Ces nouvelles conditions devraient être facilement mises en œuvre étant donné que nous maîtrisons la méthodologie pour réaliser des réactions de Mitsunobu sur les différentes fonctions alcools. Lors de ces réactions nous n'avons pas rencontré de problème particulier. Mais par manque de temps, nous n'avons pu mettre en place cette nouvelle stratégie

VII. Analyses spectroscopiques des peptides synthétisés

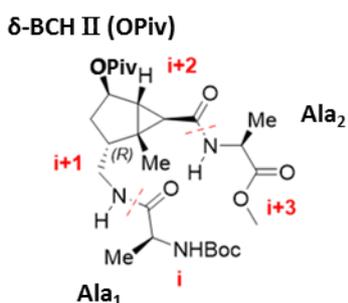
Afin de caractériser complètement nos peptides BocAla₁- δ BCH I-Ala₂OMe **85**, BocAla₁- δ BCH II (OPiv)-Ala₂OMe **113** et BocAla₁- γ BCH I-Ala₂OMe **86** et (Figure 181) et d'étudier leurs capacités à former un coude β , nous avons réalisé différentes analyses spectroscopiques par RMN, ainsi que par infrarouge en phase solide. Les résultats obtenus par ces différentes analyses conformationnelles, nous ont permis de conclure à propos de nos études *in-silico*.



BocAla₁-δ BCH I-Ala₂OMe **85**



BocAla₁-γ BCH I-Ala₂OMe **86**



BocAla₁-δ BCH II (OPiv)-Ala₂OMe **113**

Figure 181: Peptides modèles

1. Ajouts de DMSO-d₆ dans CDCl₃

Afin d'étudier si une liaison hydrogène est formée entre le carbonyle de l'acide aminé *i* et le NH de la fonction amide de l'acide aminé *i*+3, nous avons solubilisé notre composé dans le chloroforme deutéré. Nous avons ensuite réalisé plusieurs ajouts de DMSO-d₆ successifs et à chaque fois nous avons effectué une ¹H RMN. Le DMSO-d₆ étant un solvant polaire aprotique, il peut former des interactions avec les différents NH de nos composés. En revanche, si une liaison hydrogène intramoléculaire est présente au sein de notre composé, le NH impliqué ne pourra pas interagir avec le solvant et son déplacement chimique ne variera que très peu^{275,276}. Aitken et al.²⁷⁷ ont montré qu'un pourcentage de 10 % de DMSO-d₆ était suffisant pour conclure de l'implication ou non d'un NH dans une liaison hydrogène. Pour un déplacement chimique de 0 à 0,5 ppm, le NH est impliqué dans une liaison hydrogène. En revanche, pour un déplacement chimique compris entre 0,5 et 1 ppm, le NH n'est pas impliqué dans une liaison hydrogène.

²⁷⁵ Mahalakshmi, R.; Raghothama, S.; Balam, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1125-1138

²⁷⁶ Jeannotte, G.; Lubell, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14334-14335

²⁷⁷ Awada, H.; Grison, C. M.; Charnay-Pouget, F.; Baltaze, J. -P.; Brisset, F.; Guillot, R.; Robin, S.; Hachem, A.; Jaber, N.; Naoufal, D.; Yazbeck, O.; Aitken, D. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 4819-4828

1.1. Peptide BocAla₁- δ BCH I-Ala₂OMe 85

% DMSO	NH δ -BCH I	NH Ala ₁	NH Ala ₂
0	6,71	5,17	6,54
2,5	6,88	5,48	6,88
5	6,93	5,62	7,06
10	6,94	5,75	7,24
15	6,92	5,8	7,35
20	6,87	5,8	7,4
25	6,84	5,79	7,42
30	6,81	5,79	7,42
Déplacement total	0,1	0,62	0,88

Tableau 20: Déplacements chimiques des NH du peptide 85

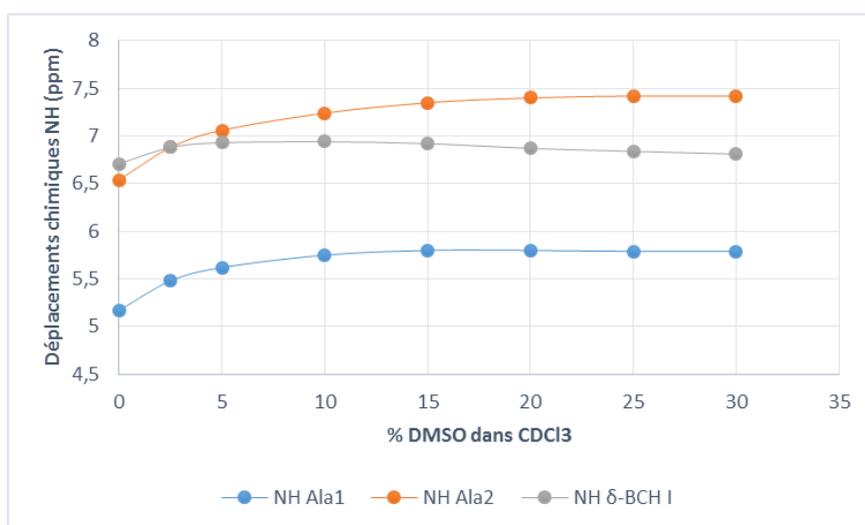


Figure 182: Représentation graphique des déplacements chimiques des NH du peptide 85

On peut observer d'après la Figure 182 et le Tableau 20 que deux des trois NH (NH Ala₁ et NH Ala₂) ont une variation de déplacement chimique importante. Ils ne sont donc pas impliqués dans une liaison hydrogène. En revanche, le NH δ -BCH I semble impliqué dans une liaison hydrogène avec le C=O du groupement Boc. C'est, d'après la modélisation moléculaire, probablement une liaison hydrogène intra-bras. La liaison hydrogène qui nous intéresse, impliquant le NH de l'Ala₂ ne semble pas être présente.

1.2. Peptide BocAla₁- δ BCH II (OPiv)-Ala₂OMe 113

% DMSO	NH δ -BCH II (OPiv)	NH Ala ₁	NH Ala ₂
0	6,68	5,74	7,03
2,5	6,97	5,76	7,2
5	7,04	5,76	7,24
10	7,14	5,76	7,34
15	7,18	5,76	7,44
20	7,18	5,76	7,49
25	7,18	5,76	7,54
30	7,18	5,76	7,54
Déplacement total	0,5	0,02	0,51

Tableau 21: Déplacements chimiques des NH du peptide 113

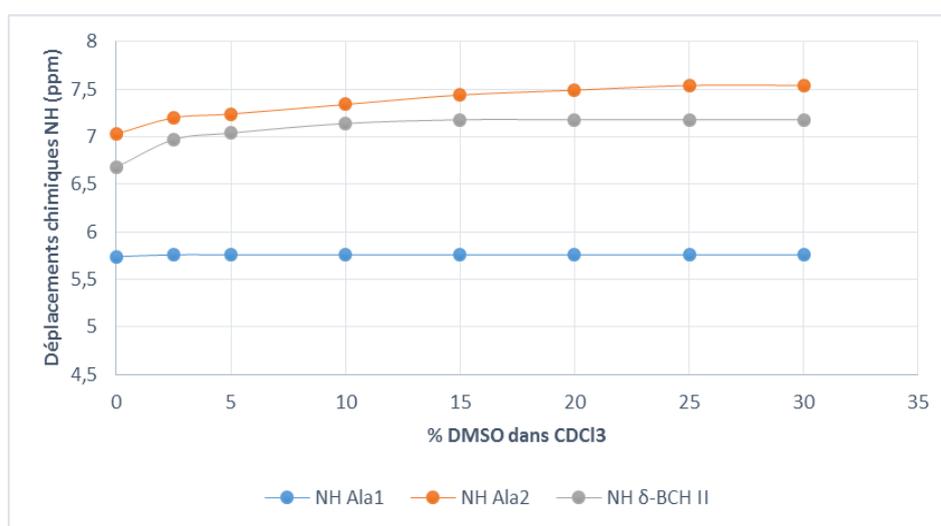


Figure 183: Représentation graphique des déplacements chimiques des NH du peptide 113

D'après la Figure 183 et le Tableau 21, les deux NH (NH Ala₂ et NH δ -BCH II (OPiv)) ont une variation de déplacement chimique moins importante que pour le peptide 85. Ils semblent donc être plus impliqués dans des liaisons hydrogènes. En particulier, le NH Ala₁ semble être impliqué dans une liaison hydrogène très forte. Cependant, c'est difficile de savoir avec quelle fonction carbonyle cette liaison s'est établie.

2. Variations de température

Une autre possibilité d'observer si une liaison hydrogène intramoléculaire est présente au sein d'une molécule est de faire varier la température. Comme pour les ajouts de DMSO-d₆, le NH impliqué dans une liaison hydrogène n'aura qu'une faible variation de déplacement chimique. Nous avons solubilisé nos composés dans un mélange H₂O/D₂O dans un ratio 95:5. Nous avons fait varier la température de

25 °C à 60 °C avec un pas de 5 °C. Nous avons également refait une RMN de contrôle après retour à température ambiante. Les résultats expérimentaux sont rassemblés ci-après.

2.1. Peptide BocAla₁-δ BCH I-Ala₂OMe 85

Température (°C)	NH δ-BCH I	NH Ala1	NH Ala2
25	8,32	6,83	8,36
30	8,28	6,79	8,32
35	8,23	6,73	8,27
40	8,18	6,68	8,23
45	8,13	6,62	8,18
50	8,09	6,55	8,14
55	8,04	6,48	8,09
60	8,00	6,44	8,05
Retour T.A	8,33	6,84	8,37
Déplacement total	-0,32	-0,39	-0,31
Pente=δ(ppb)/T(°C)	-9,3	-11,6	-9,0

Tableau 22: Déplacements chimiques des NH du peptide 85

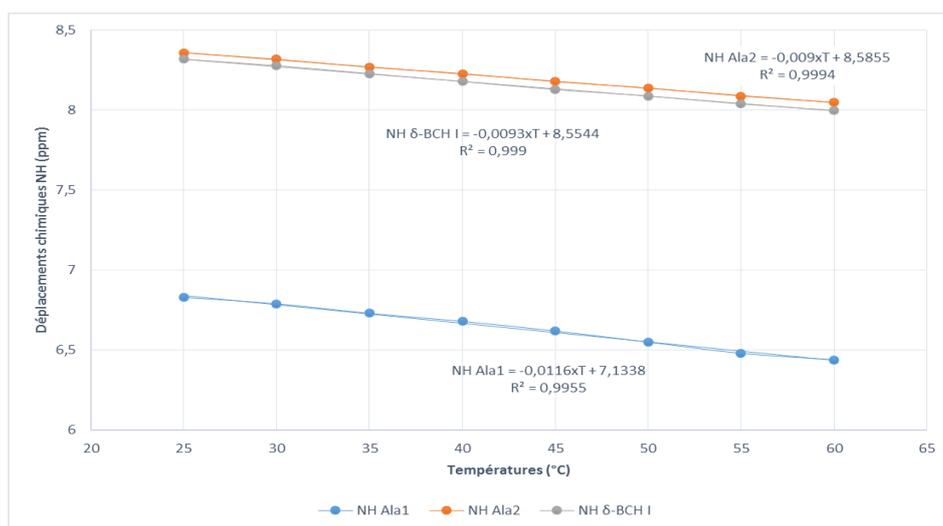


Figure 184: Représentation graphique des déplacements chimiques des NH du peptide 85

On peut observer d'après le Tableau 22 et la Figure 184 que les trois NH (NH Ala₁, NH Ala₂ et NH δ-BCH I) ont un déplacement chimique important. En traçant les courbes des déplacements chimiques des NH en fonction de la température, les coefficients directeurs de ces droites nous donnent une valeur qui caractérise la présence d'une liaison hydrogène ou non. Pour qu'il y ait une liaison hydrogène, cette valeur doit être aux alentours de 5-6. Dans notre cas, nos trois NH ont des valeurs proches de 10. Ils ne sont donc pas impliqués dans une liaison hydrogène.

3. Couplages spatiaux H-H

Si la liaison hydrogène caractéristique de la formation d'un coude β n'est pas formée à proprement parlé, en étudiant en détails nos peptides par RMN 2D NOESY, il est possible de déterminer si les résidus i et $i+3$ sont proches dans l'espace. Ce qui traduirait une orientation du peptide vers la formation d'un coude β .

3.1. Peptide BocAla₁- δ BCH II (OPiv)-Ala₂OMe 113

La Figure 185 représente le spectre RMN 2D NOESY du peptide **113**.

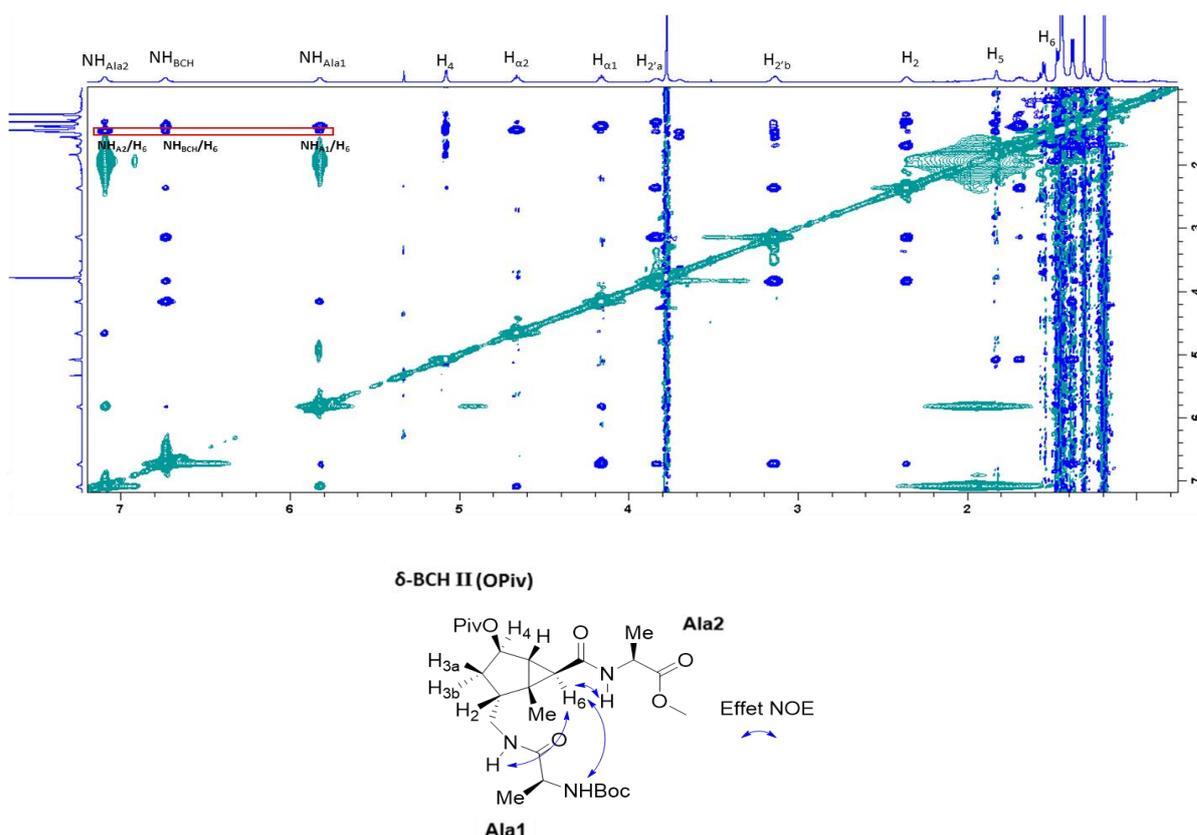


Figure 185: Effets NOE impliquant le proton H₆ (RMN 2D NOESY)

Il en résulte trois couplages spatiaux H-H importants (cadre en rouge). Evidemment, le couplage entre H₆ et NH (alanine 2) est observé étant donné que ces deux protons sont proches dans le squelette du peptide **113**. Nous observons également le couplage entre H₆ et NH (BCH II (OPiv)), ainsi que le couplage entre H₆ et NH (alanine 1). Ces interactions prouvent que les résidus i et $i+3$ sont proches spatialement. Il serait nécessaire d'extrapoler à partir du spectre RMN la valeur de ces distances H-H afin de pouvoir l'incorporer dans notre étude de modélisation moléculaire.

4. Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

L'analyse infrarouge à transformée de Fourier est une technique puissante pour l'analyse des structures secondaires des peptides. Les bandes d'absorptions des différents carbonyles ont été étudiées par spectroscopie IRTF à l'état solide pour chaque peptide.

4.1. Peptide BocAla₁- δ BCH I-Ala₂OMe 85

Le C=O de l'ester présente une bande d'absorption à 1742 cm⁻¹. La bande C=O du carbamate apparaît à 1709 cm⁻¹. Les deux C=O des amides présentent respectivement une bande d'absorption à 1691 et 1669 cm⁻¹. Aucune de ces bandes caractéristiques des groupements carbonyles indiquent l'implication dans une liaison hydrogène.

4.2. Peptide BocAla₁- γ BCH I-Ala₂OMe 86

Le C=O du carbamate du carbamate présente une bande d'absorption à 1717 cm⁻¹. La bande C=O de l'ester apparaît à 1722 cm⁻¹. Les deux C=O des amides présentent une seule bande d'absorption à 1665 cm⁻¹. La bande caractéristique de l'ester indique que ce dernier est impliqué dans une liaison hydrogène.

4.3. Peptide BocAla₁- δ BCH II (OPiv)-Ala₂OMe 113

La bande d'absorption C=O des deux esters et du C=O carbamate apparaît en une unique bande à 1723 cm⁻¹. Les deux C=O des amides présentent une seule bande d'absorption à 1657 cm⁻¹. La bande C=O des esters nous permet de conclure qu'ils sont impliqués dans une liaison hydrogène. Les deux C=O des fonctions amides semblent également être impliqués dans une interaction.

Conclusion générale

Les interactions protéine-protéine ou protéine-ligand jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques. Un dysfonctionnement de ces interactions entraîne de nombreuses pathologies. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles molécules permettant de perturber ces interactions en interagissant avec les « hot spots » de la protéine cible. C'est ainsi que les peptidomimétiques, une nouvelle classe de peptides possédant une restriction conformationnelle afin d'être maintenus dans une conformation bioactive, ont vu le jour et ont été développés.

Dans notre projet de thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude d'acides aminés γ et δ contraints chiraux, de squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène, permettant d'induire une structuration secondaire en coude β . L'objectif recherché était le choix du meilleur acide aminé bicyclique contraint afin de l'introduire dans le peptide V114, un ligand du VEGF.

Dans un premier temps, nous avons synthétisé un amino-acide γ et deux amino-acides δ selon une synthèse multi-étapes d'environ dix étapes. La matière première utilisée dans cette synthèse est l'aucuboside, un iridoïde extrait en grande quantité à partir d'*Aucuba japonica* Thumb. Le squelette principal de ces amino-acides γ et δ est basé sur un motif bicyclo[3.1.0]hex-2-ène (ou bicyclo[3.1.0]hexane) obtenu par contraction de iodolactones à l'aide du triméthylsilanolate de sodium. Pour l'obtention du motif bicyclo[3.1.0]hexane, nous avons mis au point une méthodologie de réduction basée sur le couple hydrazine/eau oxygénée pour obtenir une réduction stéréosélective de la double liaison. Cette synthèse multi-étapes nous a permis d'obtenir le synthon **69** en grande quantité (environ 10 g) en partant de 75 g d'aucuboside. Ce synthon étant un intermédiaire clé, à partir de ce dernier, nous pouvons synthétiser au choix l'un des trois amino-acides bicycliques.

Dans un second temps, à partir de ces trois amino-acides bicycliques contraints à notre disposition, nous avons réalisé la synthèse de trois tripeptides modèles (BocAla₁- δ BCHI-Ala₂OMe **85**, BocAla₁-BocAla₁- γ BCHI-Ala₂OMe **86** et δ BCHII-Ala₂OMe **88**) dans le but de sélectionner l'acide aminé le plus prometteur pouvant induire un coude β . La synthèse de ces trois tripeptides a été réalisée en quatre étapes pour **85** et **86** et en sept étapes pour **88**. Chacune des étapes a été optimisée. Le rendement global de ces synthèses varie de 8 % à 15 %.

En parallèle, nous avons mené deux études *in-silico* de modélisation moléculaire en appliquant un champ de force. La première étude par dynamique moléculaire nous a permis d'étudier la formation

de la liaison hydrogène au sein du peptide, ainsi que la distance $d(C\alpha_1-C\alpha_4) \leq 7.0 \text{ \AA}$ qui caractérise la présence d'un coude β . Cette première étude nous a permis de mettre en évidence que les tripeptides BocAla₁- γ BCHI-Ala₂OMe **86** et BocAla₁- δ BCHII-Ala₂OMe **88** présentent une forte aptitude à induire un coude β . La seconde étude utilisant une méthode par recherche conformationnelle aléatoire nous a permis d'obtenir un grand nombre de conformations et de sélectionner trois conformations de plus basse énergie pour chaque tripeptide modèle. Pour finir, chacune des conformations sélectionnées a, par la suite, été traitée par DFT en appliquant un niveau de théorie B3LYP/6-31+G(d). Cette étude par mécanique quantique a mis en évidence que le peptide BocAla₁- δ BCH II-Ala₂OMe **88** semblait être le meilleur candidat pour l'induction d'un coude β . Les deux études *in-silico* ont mis en évidence que nous avons deux candidats potentiels comme inducteur de coude β (le peptide **86** et le peptide **88**).

Les premières études spectroscopiques réalisées par RMN (ajouts de DMSO-d₆, variations de température) sur les peptides synthétisés BocAla₁- δ BCHI-Ala₂OMe **85** et BocAla₁- δ BCHII (OPiv)-Ala₂OMe **113** semblent confirmer les résultats *in-silico*. Ces études sont en cours pour les peptides BocAla₁- γ BCHI-Ala₂OMe **86** et BocAla₁- δ BCHII-Ala₂OMe **88**.

Perspectives

Afin de pouvoir incorporer nos deux amino-acides inducteurs potentiels de coude β (validés par modélisation moléculaire) dans la synthèse peptidique du V114, ligand du VEGF, il est nécessaire qu'ils possèdent un groupement protecteur sur sa fonction amine et une fonction acide carboxylique libre.

Nous avons tenté de mettre un groupement Fmoc, mais cette stratégie s'était révélée non prometteuse.

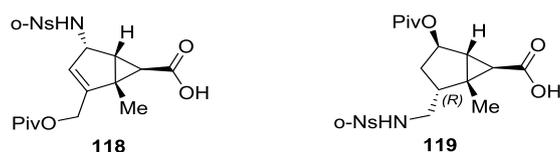


Figure 186: Amino-acides ortho-nosyle à utiliser pour la synthèse peptidique

Nous avons alors envisagé d'utiliser un groupement nosyle qui peut être facilement introduit par une réaction de Fukuyama-Mitsunobu (Figure 186). Ce type de groupement possède deux avantages majeurs : son introduction permet d'ajouter un groupement chromophore, ce qui permet une meilleure détection de notre composé lors de la purification. Le second avantage est que ce groupement est clivé dans des conditions douces, par exemple en présence de thiophénol et d'une base inorganique (pas d'utilisation de base ou d'acide fort).

Par manque de temps, nous n'avons pas pu mettre en application le schéma réactionnel suivant permettant l'accès aux amino-acides **118** et **119** (Figure 187). Ce travail reste donc à réaliser.

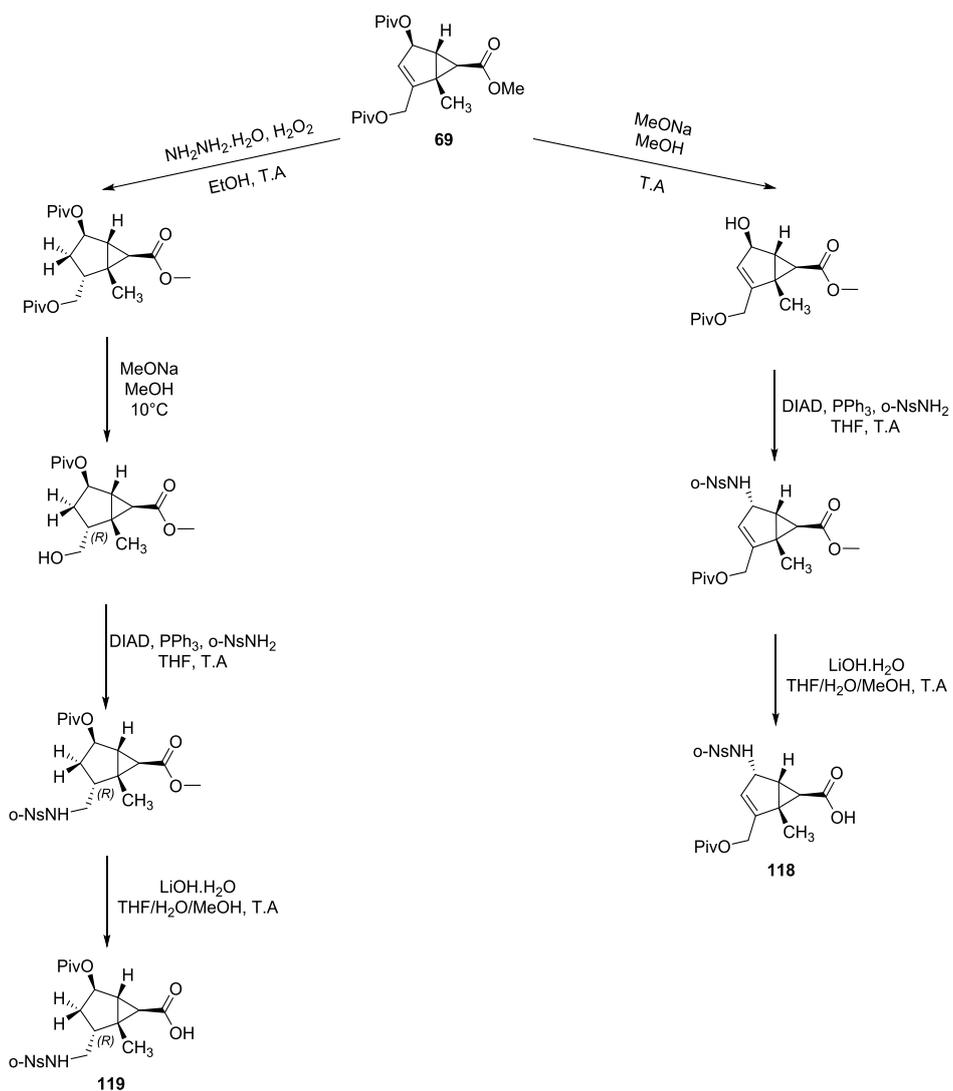


Figure 187: Schéma de synthèse pour la préparation des acides aminés **118** et **119**

Puis, il restera à synthétiser les peptides d'intérêts biologiques, ligands du VEGF, et à évaluer leurs affinités et leurs stabilités en milieu biologique.

Experimental part

I. Materials and Methods

General. Dry DCM and THF were taken from a Solvent Dispensing System (Pur Solv); dry MeOH was dried over calcium hydride, distilled and stored over molecular sieves 3 Å; DMSO, DMF, pyridine and DIPEA were stored over molecular sieves 3 Å. Column chromatographies were conducted using silica gel [6-35 µm, 20-45 µm or 35-70 µm (flash)] with an overpressure of 300 mbar. TLC were performed on silica gel 60 F254 aluminium sheets, using vanillin/H₂SO₄ or ninhydrin as spray reagent. Yields refer to chromatographically and spectroscopically pure compounds. TMSO_{Na} was purchased as a 1 M solution in DCM and trimethylsilyl diazomethane as a 2M solution in ether. Trivial nomenclature of iridoids was employed.

IR Spectroscopy. Spectra were obtained on a Perkin Elmer FT-IR. Wavelength are expressed in cm⁻¹.

Mass Spectroscopy. Mass spectral data, HRMS were obtained on Q-ToF1 Waters (ESI-Z spray source).

NMR Spectroscopy. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400 MHz and/or Avance 300 MHz spectrometers, chemical shifts are expressed in ppm (δ units) downfield to TMS. When necessary, all structures of the novel compounds were insured and the signals unambiguously assigned by 2D NMR techniques: ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H NOESY, ¹H-¹³C HMQC and ¹H-¹³C HMBC. These experiments were performed using standard microprograms. Chemical shifts are reported in ppm and corrected to δ_H 7.26 for CDCl₃, δ_H 4.79 for D₂O or δ_H 2.50 for DMSO-*d*₆ as internal reference. Chemical shifts are reported in ppm and corrected to δ_C 77.00 for CDCl₃ or δ_C 39.52 for DMSO-*d*₆ as internal reference. Splitting patterns in the ¹H NMR spectra are designated as s, singlet; d, doublet; dd, double doublet; t, triplet; q, quartet; quin, quintuplet; sext, sextuplet; m, multiplet; br, broad.

Optical Spectroscopy. Spectra were obtained on a Perkin-Elmer 341. Concentration *c* was expressed in g/100ml.

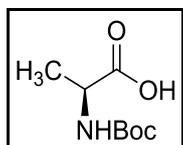
Compounds **14** to **66** were completely characterized in a previous paper of our group²¹¹.

Compounds **14** to **63** were previously obtained by Natacha Loury²³⁵.

II. Protocols and characterizations

1. Preparation of reagents

(*tert*-butoxycarbonyl)-L-alanine



To a suspension of L-alanine (1.02 g, 11.22 mmol, 1.0 equiv) in H₂O (10 ml) was added sodium hydroxide (404 mg, 16.82 mmol, 1.5 equiv) at 0 °C. Di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc₂O) (3.19 g, 14.63 mmol, 1.3 equiv) in solution in THF (10 ml) was added. The resulted solution was stirred at rt overnight. The mixture was treated with petroleum ether (2x20 ml). The aqueous layer was acidified to pH = 1 with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M. The product was extracted with EtOAc (4x20 ml). The combined organic layers were washed with a saturated solution of sodium chloride, dried over on magnesium sulfate and concentrated *in vacuo* to give the title compound (2.05 g, 97 %) as a white solid.

Formula: C₈H₁₅NO₄

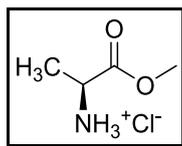
Molecular weight: 189.21 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 10.52 (br s, 1H, COOH_H), 5.14 (br s, 1H, NH_H), 4.28-4.12 (m, 1H, H_α), 1.38 (m, 12H, COOC(CH₃)₃ and CH₃).

Spectral data were consistent with the literature²⁷⁸.

²⁷⁸ Ke, D.; Zhan, C.; Li, X.; Li, A. D. Q.; Yao J. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8269–8276

(S)-1-methoxy-1-oxopropan-2-aminium chloride



Chlorotrimethylsilane (2.9 ml, 22.51 mmol, 2.0 equiv) was added to a stirred solution of L-alanine (1.02 g, 11.20 mmol, 1.0 equiv) in dry MeOH (10 ml) under inert atmosphere. The reaction mixture was stirred overnight at rt. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure to give the title compound (1.56 g, 100 %) as a pale green solid.

Formula: C₄H₁₀ClNO₂

Molecular weight: 139.58 g/mol

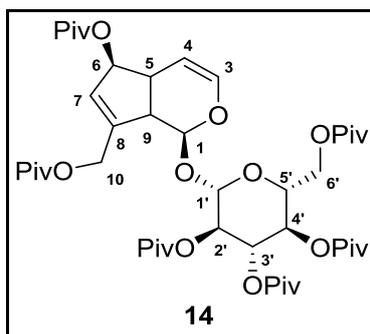
¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.11 (m, 1H, H_α), 3.78 (s, 3H, COOCH₃), 1.44 (m, 3H, CH₃).

Spectral data were consistent with the literature²⁷⁹.

²⁷⁹ Li, J.; Sha, Y. *Molecules* **2008**, *13*, 1111-1119

2. Synthesis of starting material

Perpivaloylaucubin (14)



Aucubin **1** (75.01 g, 216.62 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in mixture of pyridine freshly distilled and dry DCM (700 ml, 1:1 v/v). The reaction mixture was placed under inert atmosphere and was cooled at 0 °C with ice bath. Pivaloyl chloride (320 ml, 2.62 mol, 12 equiv) was added dropwise. Then, 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (15.91 g, 130.02 mmol, 0.6 equiv) was added. The mixture was allowed to reach rt and stirred for one week. The mixture was quenched with 80 g of ice. The product was extracted with DCM eight times (500 ml). The combined organic layers were washed with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M until pH = 3 (5x200 ml), water (200 ml), a saturated aqueous solution of sodium chloride (200 ml), then dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel with cyclohexane/EtOAc (100 to 95:5 v/v) as eluent and afforded title compound (170.62 g, 93 %) as a colorless oil.

Formula: C₄₅H₇₀O₁₅

Molecular weight: 851.04 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.20 (dd, 1H, $J_{3-4} = 6.0$ Hz, $J_{3-5} = 2.0$ Hz, H3), 5.82-5.79 (m, 1H, H7), 5.35 (t, 1H, $J_{3'-2'} = J_{3'-4'} = 9.5$ Hz, H3'), 5.30-5.26 (m, 1H, H6), 5.13 (t, 1H, $J_{4'-3'} = J_{4'-5'} = 9.5$ Hz, H4'), 5.09 (dd, 1H, $J_{2'-3'} = 9.5$ Hz, $J_{2'-1'} = 8.0$, H2'), 5.06 (d, 1H, $J_{1-9} = 5.0$ Hz, H1), 4.90 (dd, 1H, $J_{4-3} = 6.0$ Hz, $J_{4-5} = 3.5$ Hz, H4), 4.90 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 8.0$ Hz, H1'), 4.70 (br s, 2H, H10a and H10b), 4.22 (dd, 1H, $J_{6'a-6'b} = 12.5$ Hz, $J_{6'a-5'} = 1.5$ Hz, H6'a), 4.05 (dd, 1H, $J_{6'b-6'a} = 12.5$ Hz, $J_{6'b-5'} = 6.0$ Hz, H6'b), 3.78 (ddd, 1H, $J_{5'-4'} = 9.5$ Hz, $J_{5'-6'b} = 6.0$ Hz, $J_{5'-6'a} = 2.0$ Hz, H5'), 3.05 (dd, 1H, $J_{9-5} = 8.0$ Hz, $J_{9-1} = 5.0$ Hz, H9), 2.80-2.74 (m, 1H, H5), 1.26-1.10 (6 s, 54H, COC(CH₃)₃).

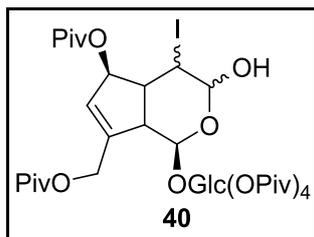
¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, CDCl₃): 170.8, 170.6, 170.3, 170.1, 169.4, 169.2 (COC(CH₃)₃), 144.4 (C8), 139.7 (C3), 127.3 (C7), 104.0 (C4), 95.9 (C1'), 93.5 (C1), 82.4 (C6), 72.5 (C3'), 72.0 (C5'), 70.6 (C2'), 68.2 (C4'), 61.6 (C6'), 61.2 (C10), 468.8 (C9), 39.1 (C5), 21.1, 20.7, 20.6 (COC(CH₃)₃).

MS (DCI/NH₃) m/z: [M+NH₄⁺]⁺ 616.

IR v (cm⁻¹): 2942 (C-H), 1747(6 C=O ester), 1661 (C=C), 1434, 1371, 1230, 1043, 967, 908, 735.

[α]_D¹⁹ -159 (c 0.6, CHCl₃).

3-hydroxy-4-iodo-3,4-dihydroperpivaloylaucubin (40)

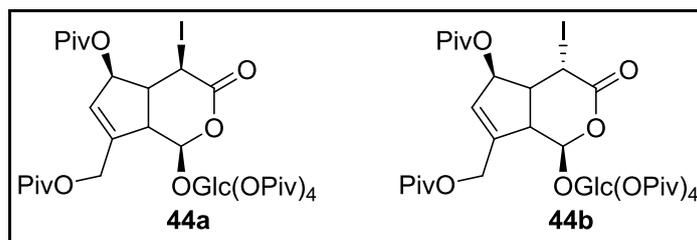


Compound **14** (86.11 g, 101.24 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in mixture of THF and H₂O (250 ml, 9:1 v/v). Ag₂SO₄ (18.90 g, 60.72 mmol, 0.6 equiv), then I₂ (28.30 g, 111.32 mmol, 1.1 equiv) were added to the mixture. The reaction mixture was stirred overnight at rt. Brown precipitate was observed. The mixture was filtered through a silica pad and washed with DCM. The combined organic layers were washed with water (200 ml), an aqueous solution of sodium thiosulfate 0,1 M (200 ml) and a saturated aqueous solution of sodium chloride (200 ml), dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was removed under reduced pressure to give the title compound (93.37 g, 87 %) as a pale-yellow oil. The crude product (mixture of four iodolactols) was engaged in the next step without more purification.

Formula: C₄₅H₇₁I₁₆O₁₆

Molecular weight: 995.06 g/mol

(4R)-4-iodo-3-oxo-3,4-dihydropervivaloylaucubin (44a) and (4S)-4-iodo-3-oxo-3,4-dihydropervivaloylaucubin (44b)



Compound **40** (40.01 g, 40.24 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry DCM (200 ml). The reaction mixture was placed under argon atmosphere. Activated molecular sieves 3 Å (40 g), then pyridiniumchlorochromate (PDC) (18.21 g, 48.22 mmol, 1.2 equiv) were added. The reaction mixture was stirred for 4 hours at rt. The suspension was filtered through a silica pad and washed with DCM. The filtrate was concentrated under *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with cyclohexane/EtOAc (100 to 90:10 v/v) as eluent to obtain and afforded title compound (31.11 g, 76 %) as a yellowish syrup.

(4R)-4-iodo-3-oxo-3,4-dihydropervivaloylaucubin (44a)

Formula: C₄₅H₇₁IO₁₆

Molecular weight: 995.06 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.92 (d, 1H, $J_{1-9} = 5.0$ Hz, H1), 5.82-5.79 (m, 1H, H7), 5.49-5.46 (m, 1H, H6), 5.35 (t, 1H, $J_{3'-2} = J_{3'-4'} = 9.5$ Hz, H3'), 5.18 (d, 1H, $J_{4-5} = 6.5$ Hz, H4), 5.15 (t, 1H, $J_{4'-3'} = J_{4'-5'} = 9.5$ Hz, H4'), 5.10 (dd, 1H, $J_{2'-3'} = 9.5$ Hz, $J_{2'-1'} = 8.0$ Hz, H2'), 4.98 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 8.0$ Hz, H1'), 4.72 (br d, 1H, $J_{10a-10b} = 14.5$ Hz, H10a), 4.68 (br d, 1H, $J_{10a-10a} = 14.5$ Hz, H10b), 4.25 (dd, 1H, $J_{6'a-6'b} = 12.5$ Hz, $J_{6'a-5'} = 1.5$ Hz, H6'a), 4.05 (dd, 1H, $J_{6'b-6'a} = 12.5$ Hz, $J_{6'b-5'} = 6.0$ Hz, H6'b), 3.80 (ddd, 1H, $J_{5'-4'} = 9.5$ Hz, $J_{5'-6'b} = 6.0$ Hz, $J_{5'-6'a} = 1.5$ Hz, H5'), 3.36-3.29 (m, 1H, H9), 2.88 (ddd, 1H, $J_{5-9} = 10.0$ Hz, $J_{5-4} = 6.5$ Hz, $J_{5-6} = 3.0$ Hz, H5), 1.24-1.09 (18 s, 54H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, CDCl₃): 178.1, 177.8, 177.3, 176.9, 176.7, 176.4 (COC(CH₃)₃), 165.2 (C3), 143.1 (C8), 127.4 (C7), 97.5 (C1), 97.3 (C1'), 85.8 (C6), 72.8 (C5'), 71.8 (C3'), 70.6 (C2'), 67.5 (C4'), 61.6 (C6'), 60.6 (C10), 49.4 (C9), 45.3 (C5), 38.8 (COC(CH₃)₃), 27.1, 26.4 (COC(CH₃)₃), 19.6 (C4).

MS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ 1015.

Anal. Calcd for C₄₅H₇₁IO₁₆: C, 54.42; H, 7.01. Found: C, 54.37; H, 6.99.

IR v (cm⁻¹): 2974, 2874, 1731 (7 C=O), 1480, 1461, 1397, 1367, 1280, 1229, 1138, 1073, 1034, 984, 738.

[α]_D²⁰ -65 (c 1.0, DCM).

(4S)-4-iodo-3-oxo-3,4-dihydroperpivaloylaucubin (44b)

Formula: C₄₅H₇₁IO₁₆

Molecular weight: 995.06 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.79-5.76 (m, 1H, H7), 5.58-5.55 (m, 1H, H6), 5.38 (d, 1H, *J*₁₋₉ = 8.0 Hz, H1), 5.32 (t, 1H, *J*_{3'-2'} = *J*_{3'-4'} = 9.5 Hz, H3'), 5.20 (t, 1H, *J*_{4'-3'} = *J*_{4'-5'} = 9.5 Hz, H4'), 5.10 (dd, 1H, *J*_{2'-3'} = 9.5 Hz, *J*_{2'-1'} = 8.0 Hz, H2'), 5.00 (d, 1H, *J*_{1'-2'} = 8.0 Hz, H1'), 4.72 (br d, 1H, *J*_{10a-10b} = 14.5 Hz, H10a), 4.68 (br d, 1H, *J*_{10b-10a} = 14.5 Hz, H10b), 4.55 (d, 1H, *J*₄₋₅ = 11.5 Hz, H4), 4.20 (dd, 1H, *J*_{6'a-6'b} = 12.5 Hz, *J*_{6'a-5'} = 1.5 Hz, H6'a), 4.10 (dd, 1H, *J*_{6'b-6'a} = 12.5 Hz, *J*_{6'b-5'} = 4.5 Hz, H6'b), 3.75 (ddd, 1H, *J*_{5'-4'} = 9.5 Hz, *J*_{5'-6'b} = 4.5 Hz, *J*_{5'-6'a} = 1.5 Hz, H5'), 3.23-3.17 (m, 2H, H5 and H9), 1.25-1.11 (18 s, 54H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, CDCl₃): 177.7, 177.2, 177.0, 176.2 (COC(CH₃)₃), 164.2 (C3), 143.1 (C8), 126.6 (C7), 98.4 (C1), 97.0 (C1'), 84.4 (C6), 72.8 (C5'), 71.6 (C3'), 70.3 (C2'), 67.2 (C4'), 61.1 (C6'), 60.7 (C10), 50.5 (C9), 50.0 (C5), 38.7 (COC(CH₃)₃), 27.0, 26.9, 26.4 (COC(CH₃)₃), 21.6 (C4).

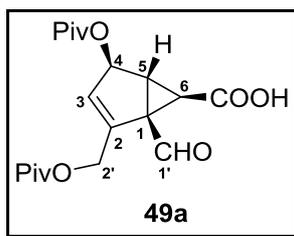
MS (ESI) [M+Na]⁺: 1015.

Anal. Calcd for C₄₅H₇₁IO₁₆: C, 54.42; H, 7.01. Found: C, 54.24; H, 6.98.

IR ν (cm⁻¹): 2973, 1731 (7 C=O), 1480, 1461, 1397, 1368, 1281, 1132, 1061, 990.

[α]_D¹⁹ -77 (c 1.2, CHCl₃).

(1*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-1-formyl-4-(pivaloyloxy)-2-((pivaloyloxy)methyl)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylic acid (49a)



Compound **44** (19.41 g, 19.52 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry DCM (160 ml). The reaction mixture was placed under inert atmosphere. 1M solution of sodium trimethylsilanolate (TMSONa) in DCM (43.0 ml, 43.02 mmol, 2.2 equiv) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 4 hours at rt. The excess of sodium trimethylsilanolate was neutralized by addition of silica (70 g). After 30 min, the suspension was concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with cyclohexane/EtOAc (100 to 60:40 v/v) 1% AcOH as eluent to afford the title compound (3.18 g, 46 %) as a yellowish oil.

Formula: C₁₉H₂₆O₇

Molecular weight: 366.41 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.50 (s, 1H, CHO), 5.67-5.64 (m, 1H, H3), 5.53-5.50 (m, 1H, H4), 5.06-5.03 (br s, 2H, H2'a and H2'b), 3.17 (dd, 1H, *J*₅₋₆ = 5.0 Hz, *J*₅₋₃ = 1.5 Hz, H5), 2.05 (d, 1H, *J*₆₋₅ = 5.0 Hz, H6), 1.25-1.22 (2 s, 18H, COC(CH₃)₃).

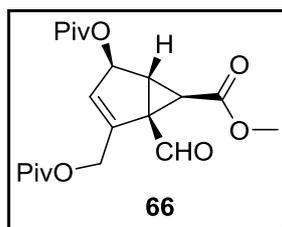
¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, CDCl₃): 195.0 (CHO), 177.9, 177.6 (COC(CH₃)₃), 172.3 (COOH), 146.7 (C2), 126.4 (C3), 75.5 (C4), 61.0 (C2'), 50.5 (C1), 40.0 (C6), 38.7 (COC(CH₃)₃), 37.1 (C5), 27.0 (COC(CH₃)₃).

HRMS (FAB) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₁₉H₂₆O₇ 367.1756; Found 367.1758.

IR ν (cm⁻¹): 3470, 3239, 3067 (COOH), 2963, 2871, 2629, 1727 (2 C=O ester, C=O acide), 1704 (C=O aldehyde), 1479, 1398, 1364, 1277, 1151, 1030, 984, 840, 736.

[α]_D²¹ -205 (c 1.7, CHCl₃).

Methyl (1*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-1-formyl-4-(pivaloyloxy)-2-((pivaloyloxy)methyl)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (66)



Compound **49a** (4.76 g, 13.03 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in mixture of MeOH/toluene (150 ml, 7:3 v/v). The reaction mixture was cooled at 0 °C and 2 M solution of (trimethylsilyl)diazomethane in Et₂O (7.2 ml, 14.32 mmol, 1.1 equiv) was added dropwise. The mixture was allowed to reach rt and stirred for 30 min. Excess of (trimethylsilyl)diazomethane was quenched with acetic acid. The solution was diluted with water (50 ml) and the product was extracted with Et₂O (2x50 ml). The combined organic layers were washed with water (50 ml), dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude was chromatographed on silica gel with cyclohexane/EtOAc (100 to 90:10 v/v) as eluent to afford the title compound (4.43 g, 90 %) as a colorless oil.

Formula: C₂₀H₂₈O₇

Molecular weight: 380.44 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.45 (s, 1H, CHO), 5.61-5.58 (m, 1H, H₃), 5.48-5.45 (m, 1H, H₄), 5.03-4.99 (m, 2H, H₂'a and H₂'b), 3.74 (s, 3H, COOCH₃) 3.13 (dd, 1H, *J*₅₋₆ = 5.0 Hz, *J*₅₋₃ = 1.5 Hz, H₅), 2.02 (d, 1H, *J*₆₋₅ = 5.0 Hz, H₆), 1.18 (s, 18H, COC(CH₃)₃).

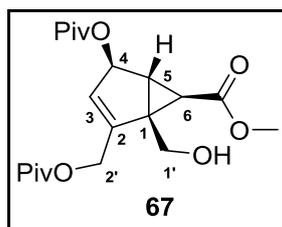
¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, CDCl₃): 195.0 (CHO), 177.8, 177.7 (COC(CH₃)₃), 167.7 (COOCH₃), 146.9 (C₂), 126.1 (C₃), 75.5 (C₄), 61.0 (C₂'), 52.5 (COOCH₃), 50.2 (C₁), 40.2 (C₆), 38.7 (COC(CH₃)₃), 36.9 (C₅), 27.0 (COC(CH₃)₃).

HRMS (FAB) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₂₀H₂₈O₇ 381.1913; Found 381.1931.

IR ν (cm⁻¹): 2967, 2873 (C-H), 1731 (3 C=O ester), 1702 (C=O aldehyde), 1637 (C=C), 1478, 1443, 1367, 1273, 1243, 1149, 1061, 985, 838, 773.

[α]_D²² -168 (c 1.1, CHCl₃).

Methyl (1*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-1-(hydroxymethyl)-4-(pivaloyloxy)-2-((pivaloyloxy)methyl)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (67)



Compound **66** (3.59 g, 9.42 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry MeOH (70 ml). The reaction mixture was placed under argon atmosphere. NaBH₄ (357 mg, 9.42 mmol, 1.0 equiv) was added slowly over 15 min. The reaction mixture was stirred at rt for 30 min. To stop the reaction, boric acid (584 mg, 9.42 mmol, 1.0 equiv) and silica (10 g) were added simultaneously. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel with cyclohexane/EtOAc (95:5 to 90:10 v/v) as eluent and afforded title compound (2.89 g, 80 %) as a colorless syrup.

Formula: C₂₀H₃₀O₇

Molecular weight: 382.45 g/mol

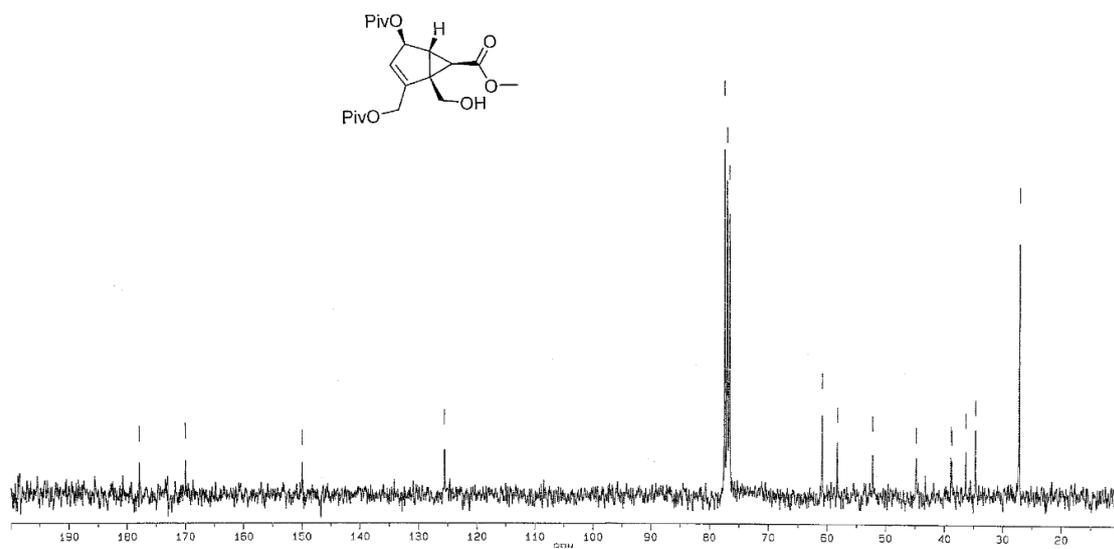
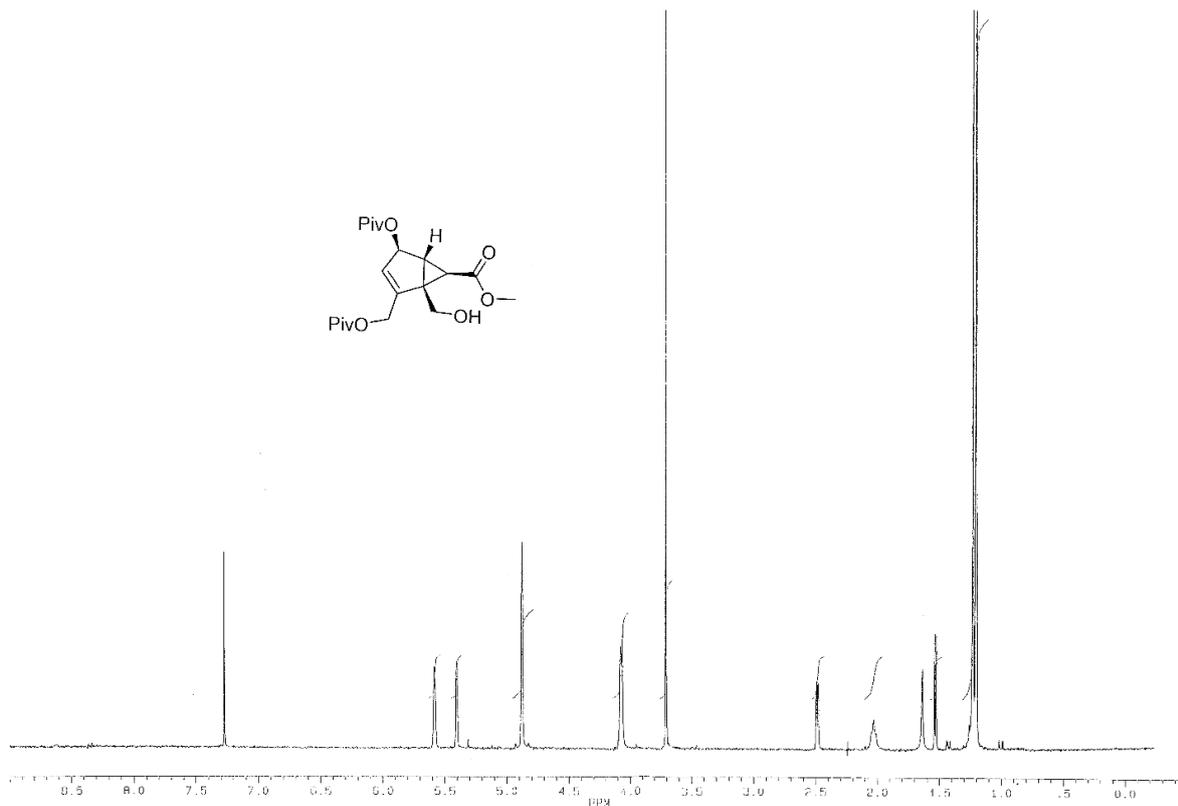
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.59-5.56 (m, 1H, H₃), 5.40-5.38 (m, 1H, H₄), 4.88-4.81 (m, 2H, H_{2'}), 4.10-4.00 (m, 2H, H_{1'}), 3.70 (s, 3H, COOCH₃), 2.47 (dd, 1H, *J*₅₋₆ = 4.0 Hz, *J*₅₋₃ = 1.5 Hz, H₅), 2.05 (br s, 1H, OH (exchangeable with D₂O)), 1.52 (d, 1H, *J*₆₋₅ = 4.0 Hz, H₆), 1.22-1.19 (2s, 18H, 2 COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, CDCl₃): 177.9 (2 COC(CH₃)₃), 169.9 (COOCH₃), 149.9 (C₂), 125.5 (C₃), 76.6 (C₄), 60.8 (C_{2'}), 58.2 (C_{1'}), 52.2 (COOCH₃), 44.7 (C₁), 38.8, 38.7 (2 COC(CH₃)₃), 36.3 (C₆), 34.6 (C₅), 27.1 (2 COC(CH₃)₃).

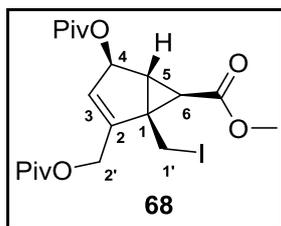
HRMS (FAB) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₂₀H₃₁O₇ 383.2069; Found 383.2096.

IR ν (cm⁻¹): 3515 (OH), 2972 (C-H), 1728 (3 C=O ester), 1480, 1459, 1440, 1398, 1366, 1278, 1232, 1150, 1031, 974.

[α]_D²⁰ -160 (c 0.9, DCM).



Methyl (1*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-1-(iodomethyl)-4-(pivaloyloxy)-2-((pivaloyloxy)methyl)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (68)



Compound **67** (4.70 g, 12.33 mmol, 1.0 equiv), triphenylphosphine (12.89 g, 49.24 mmol, 4.0 equiv), iodomethane (2.3 ml, 36.92 mmol, 3.0 equiv) were dissolved in dry THF (80 ml). The reaction mixture was cooled at 0 °C with ice bath and diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (9.7 ml, 49.24 mmol, 4.0 equiv) was added dropwise. The mixture was allowed to reach rt and stirred for 4 h. The suspension was filtered over a silica pad to eliminate triphenylphosphine oxide. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude product was chromatographed on silica gel with cyclohexane/EtOAc (100 to 95:5 v/v) as eluent to afford the title compound (5.31 g, 90 %) as a colorless syrup.

Formula: C₂₀H₂₉I O₆

Molecular weight: 492.35 g/mol

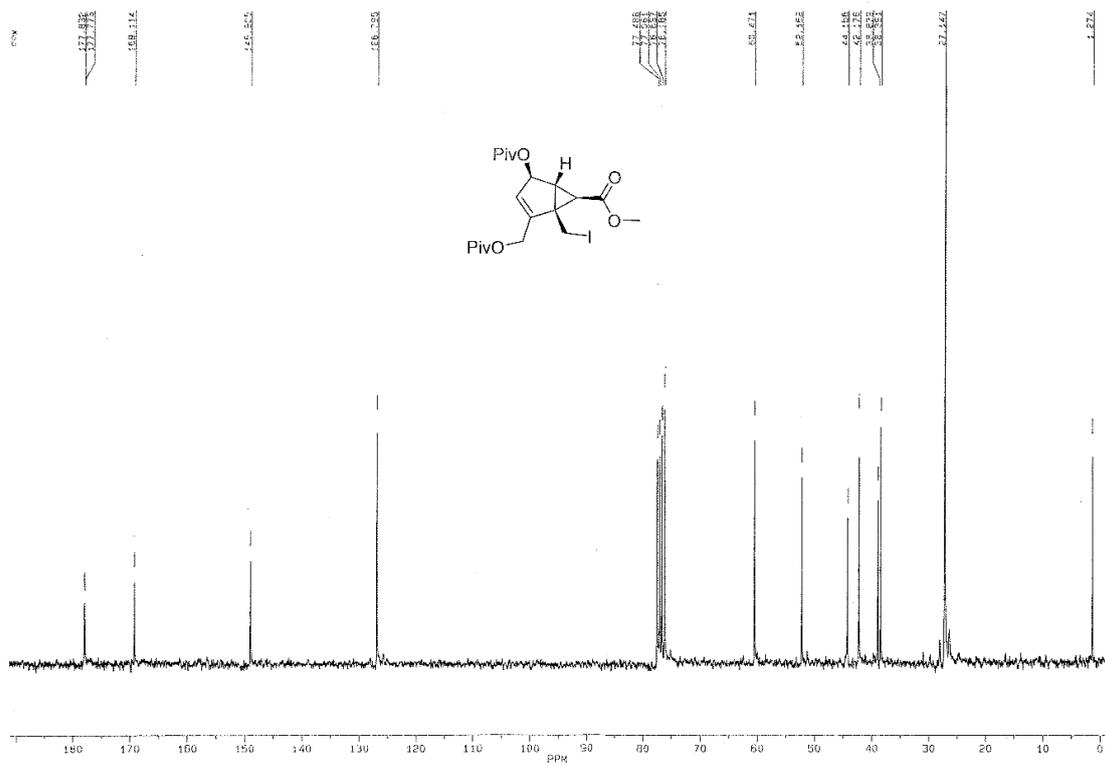
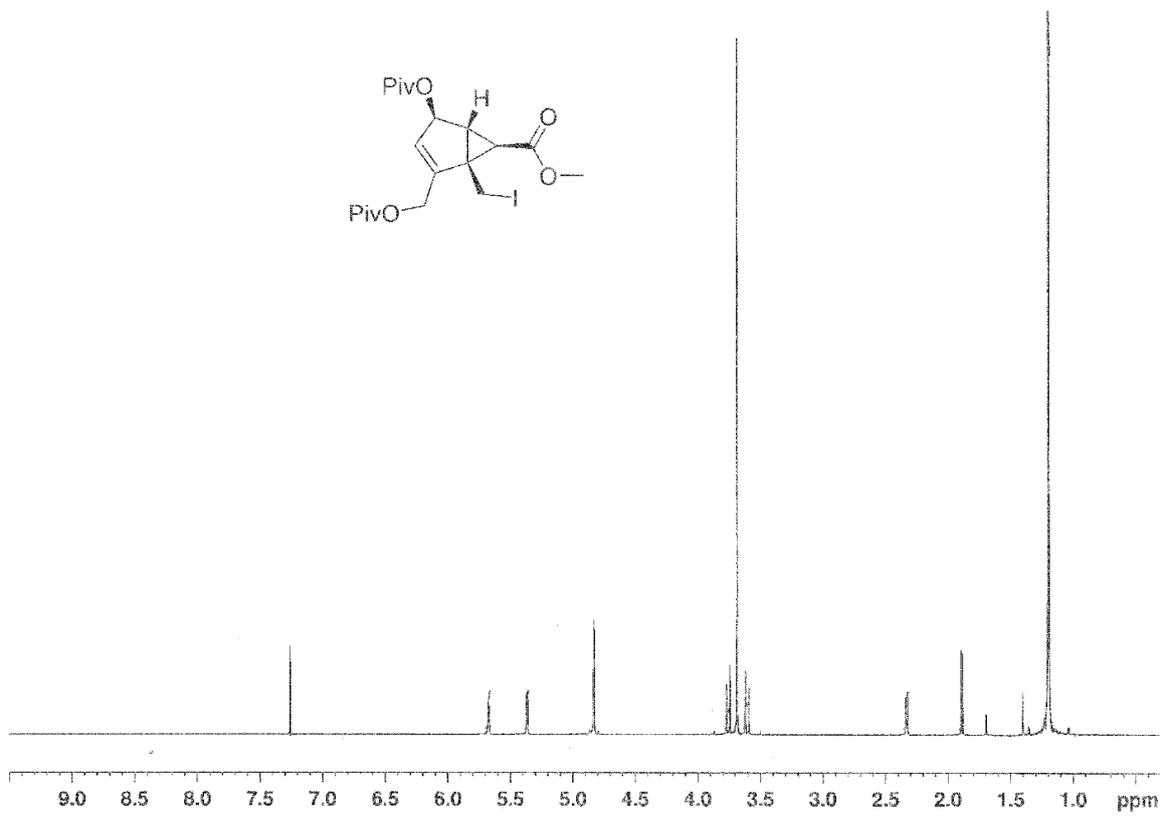
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.69-5.66 (m, 1H, H3), 5.38-5.36 (m, 1H, H4), 4.85-4.80 (m, 2H, H2'), 3.76 (d, 1H, *J*_{1'a-1'b} = 11.0 Hz, H1'a), 3.69 (s, 3H, COOCH₃), 3.61 (d, 1H, *J*_{1'b-1'a} = 11.0 Hz, H1'b), 2.33 (dd, 1H, *J*₅₋₆ = 4.5 Hz, *J*₅₋₃ = 1.5 Hz, H5), 1.89 (d, 1H, *J*₆₋₅ = 4.5 Hz, H6), 1.24-1.17 (1s, 18H, 2 COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 177.8, (2 COC(CH₃)₃), 169.1 (COOCH₃), 145.9 (C2), 126.8 (C3), 76.2 (C4), 60.5 (C2'), 52.2 (COOCH₃), 44.2 (C1), 42.2 (C6), 38.8 (2 COC(CH₃)₃), 38.4 (C5), 27.2 (2 COC(CH₃)₃), 1.3 (C1').

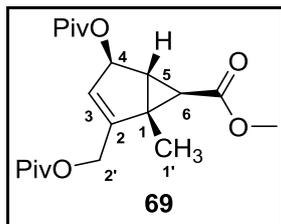
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₂₀H₂₉O₆Na 515.0907; Found 515.0908.

IR ν (cm⁻¹): 2970 (C-H), 1728 (3 C=O ester), 1483, 1439, 1277, 1145.

[α]_D²⁷ -41 (c 0.6, DCM).



Methyl (1*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-1-methyl-4-(pivaloyloxy)-2-((pivaloyloxy)methyl)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (69)



Compound **68** (2.58 g, 5.24 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in DMSO (45 ml). NaBH₄ (397 mg, 10.48 mmol, 2.0 equiv) was added slowly over 20 min. The reaction mixture was stirred at rt overnight. The solvent was removed under high vacuum. The residue was dissolved with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M. The product was extracted with DCM three times (25 ml). The combined organic layers were washed with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (25 ml), water (25 ml), dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was removed under reduced pressure to afford the title compound (1.92 g, quantitative) as a colorless oil.

Formula: C₂₀H₃₀O₆

Molecular weight: 366.45 g/mol

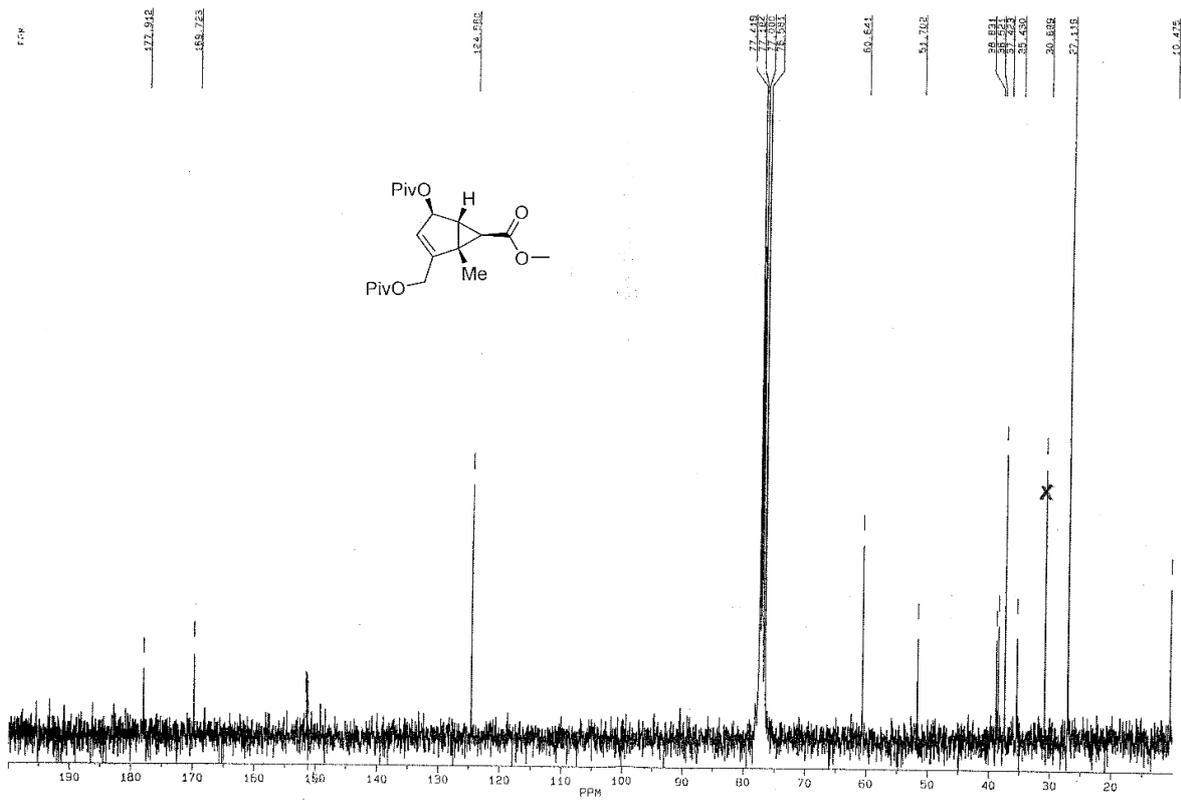
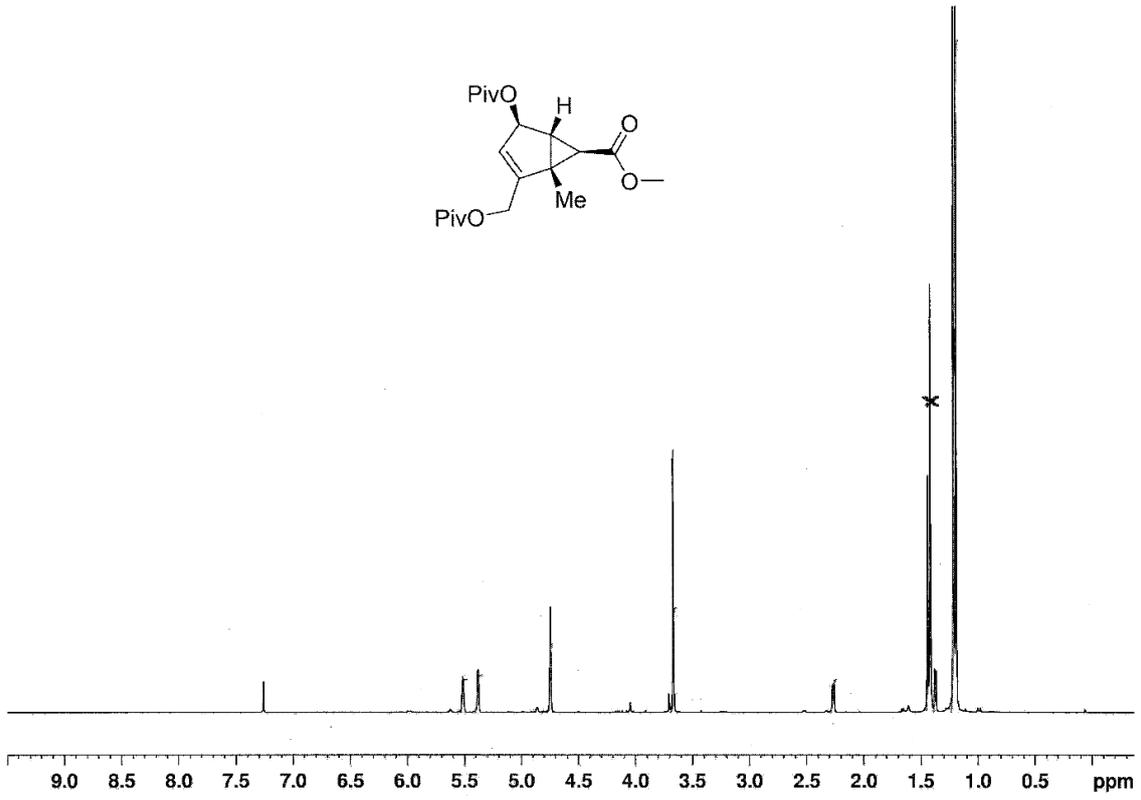
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.53-5.50 (m, 1H, H₃), 5.40-5.37 (m, 1H, H₄), 4.76-4.73 (br s, 2H, H_{2'}), 3.67 (s, 3H, COOCH₃), 2.27 (dd, 1H, *J*₅₋₆ = 4.0 Hz, *J*₅₋₃ = 1.5 Hz, H₅), 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.37 (d, 1H, *J*₆₋₅ = 4.0 Hz, H₆), 1.23-1.17 (2s, 18H, 2 COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 177.9 (2 COC(CH₃)₃), 169.7 (COOCH₃), 151.5 (C₂), 124.6 (C₃), 77.2 (C₄), 60.6 (C_{2'}), 51.7 (COOCH₃), 38.8 (2 COC(CH₃)₃), 38.5 (C₁), 37.4 (C₆), 35.4 (C₅), 27.1 (2 COC(CH₃)₃), 10.5 (C_{1'}).

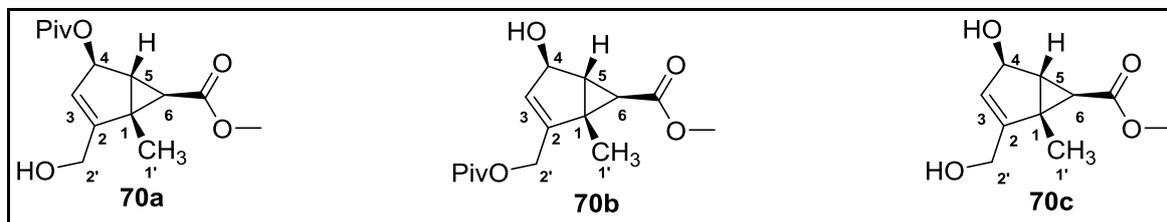
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₂₀H₃₀O₆Na 389.1940; Found 389.1925.

IR ν (cm⁻¹): 2959 (C-H), 1728 (3 C=O ester), 1481, 1439, 1277, 1146, 969.

[α]_D²⁷ -51 (c 0.7, DCM).



Methyl (1*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-(hydroxymethyl)-1-methyl-4-(pivaloyloxy)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (70a) ; methyl (1*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-4-hydroxy-1-methyl-2-((pivaloyloxy)methyl)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (70b) and methyl (1*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-1-methylbicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (70c)



Compound **69** (150 mg, 0.42 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry MeOH (10 ml). A solution of MeONa 1M (410 μ l, 0.42 mmol, 1.0 equiv) in dry MeOH was added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt. The progress of a reaction was monitored by TLC. The reaction mixture was stopped when the more polar compound had a proportion similar to the starting material **69**. It was quenched by adding an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (1 ml). The solution was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with water, dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude was chromatographed through silica gel column with cyclohexane/EtOAc (95:5 to 80:20 v/v) to give in order of elution compound **69** as colorless oil (12 mg, 20 %), compound **70a** as colorless amorphous solid (17 mg, 29 %) and compound **70b** as colorless amorphous solid (10 mg, 16 %). Then, DCM/MeOH (100 to 97:3 v/v) was used as eluent to afford the last compound **70c** as colorless needles (7 mg, 10 %). The overall yield of the reaction was 75 %.

Methyl (1*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-(hydroxymethyl)-1-methyl-4-(pivaloyloxy)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (70a)

Formula: C₁₅H₂₂O₅

Molecular weight: 282.34 g/mol

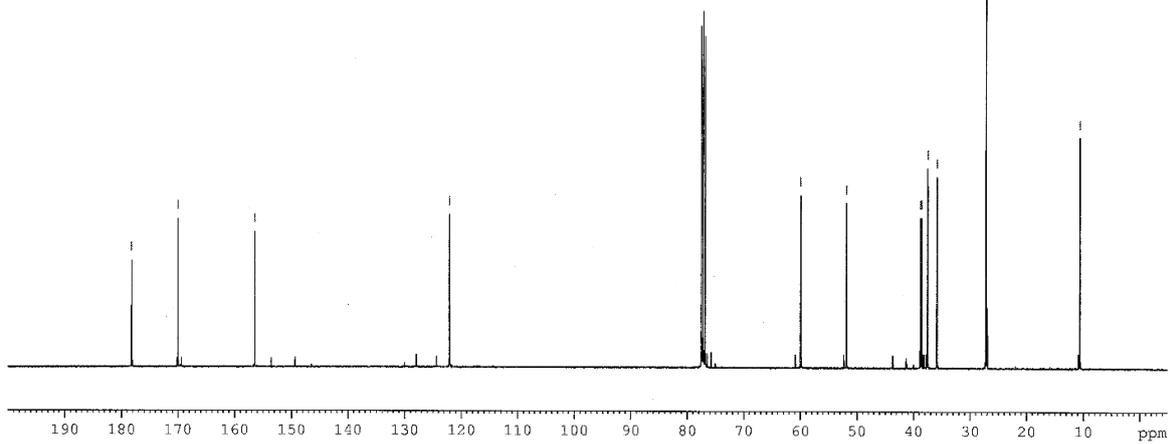
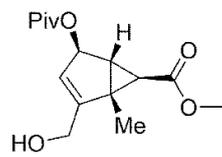
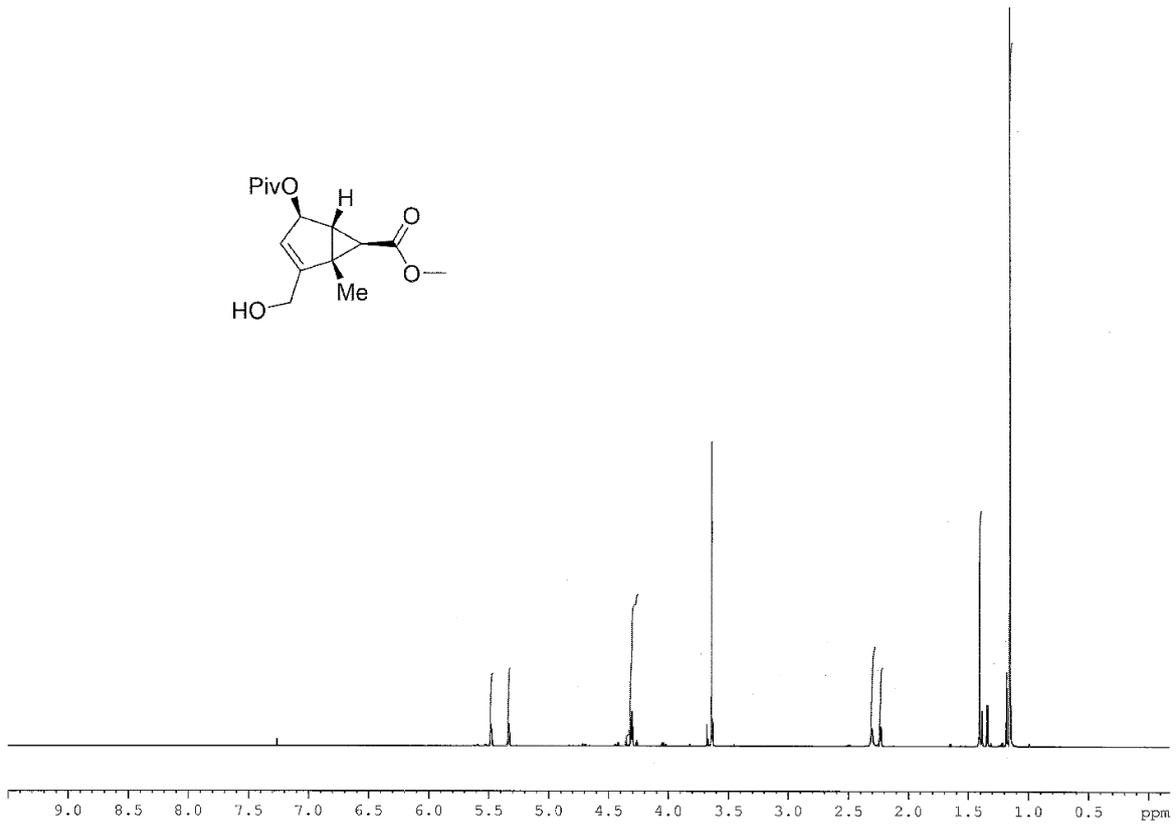
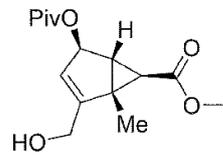
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.53-5.50 (m, 1H, H3), 5.40-5.37 (m, 1H, H4), 4.36 (dt, 1H, $J_{2'a-2'b} = 14.0$ Hz, $J_{2'a-3} = J_{2'a-4} = 0.5$ Hz, H2'a), 4.30 (dt, 1H, $J_{2'a-2'b} = 14.0$ Hz, $J_{2'a-3} = J_{2'a-4} = 1.0$ Hz, H2'b), 3.68 (s, 3H, COOCH₃), 2.33 (br s, 1H, OH), 2.25 (dd, 1H, $J_{5-6} = 3.5$ Hz, $J_{5-3} = 1$ Hz, H5), 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.36 (d, 1H, $J_{6-5} = 3.5$ Hz, H6), 1.18 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 178.2 (COC(CH₃)₃), 170.1 (COOCH₃), 156.4 (C2), 122.1 (C3), 77.4 (C4), 59.9 (C2'), 51.9 (COOCH₃), 38.7 (COC(CH₃)₃), 38.6 (C1), 37.5 (C6), 35.9 (C5), 27.2 (COC(CH₃)₃), 10.6 (C1').

HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₁₅H₂₂O₅Na 305.1365; Found 305.1370.

IR v (cm⁻¹): 3435 (OH), 2959, 2876 (C-H), 1725 (2 C=O ester), 1481, 1439, 1398, 1365, 1279, 1233, 1156, 1074, 1033, 957.

[α]_D²⁰ -186(c 2.2, DCM).



Methyl (1*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-4-hydroxy-1-methyl-2-((pivaloyloxy)methyl)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (70b)

Formula: C₁₅H₂₂O₅

Molecular weight: 282.34 g/mol

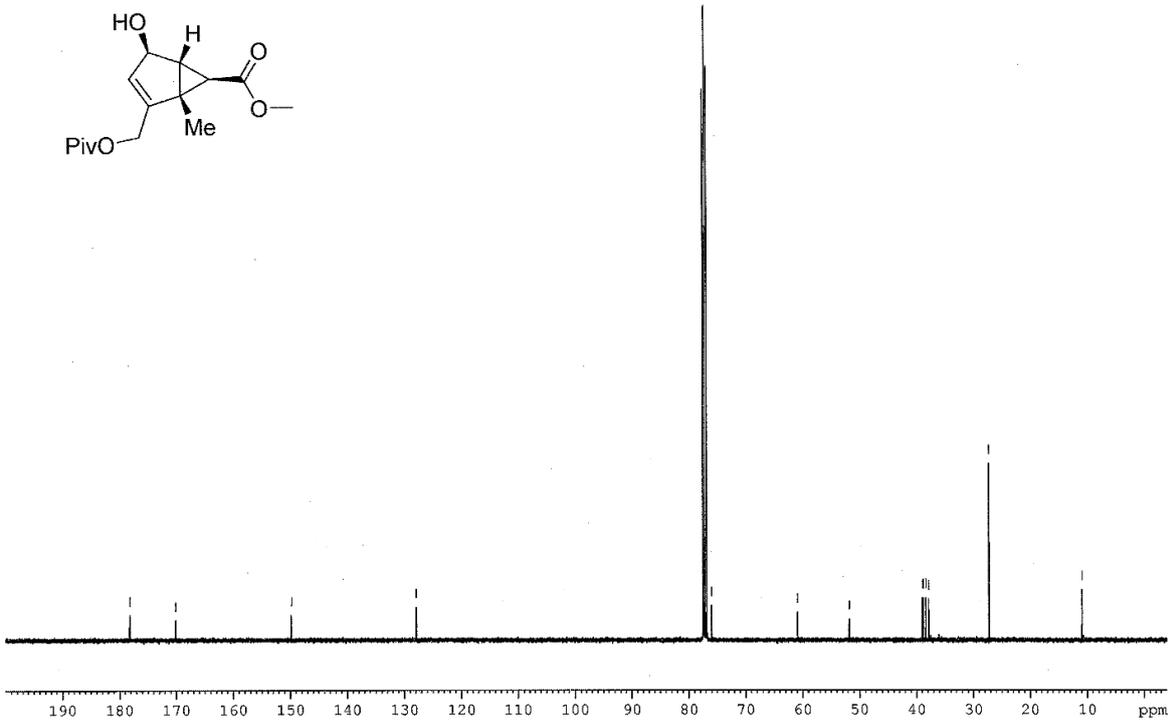
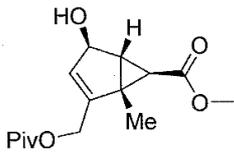
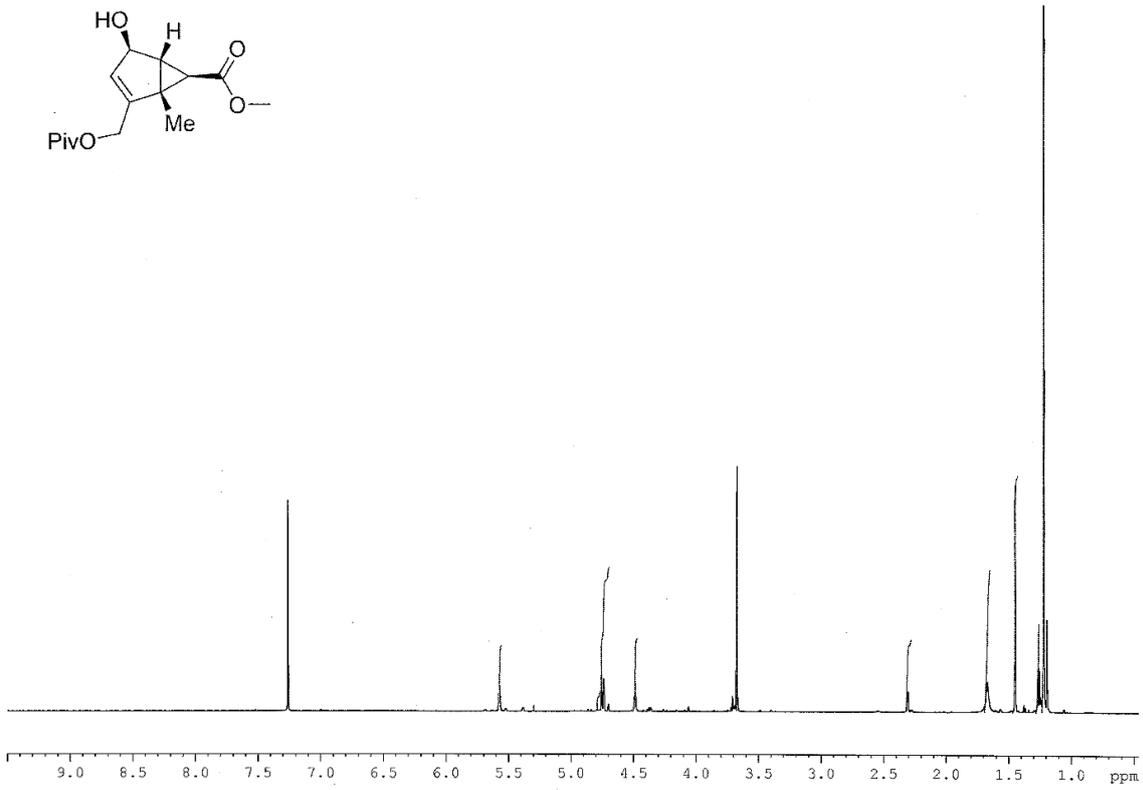
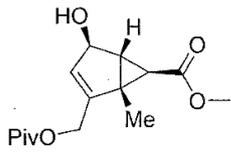
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.60-5.56 (m, 1H, H3), 4.77 (dt, 1H, $J_{2'a-2'b} = 14.0$ Hz, $J_{2'a-3} = J_{2'a-4} = 0.5$ Hz, H2'a), 4.72 (dt, 1H, $J_{2'a-2'b} = 14.0$ Hz, $J_{2'a-3} = J_{2'a-4} = 1.0$ Hz, H2'b), 4.50-4.47 (m, 1H, H4), 3.68 (s, 3H, COOCH₃), 2.32 (dd, 1H, $J_{5-6} = 4.0$ Hz, $J_{5-3} = 1.5$ Hz, H5), 1.62 (br s, 1H, OH), 1.46 (s, 3H, CH₃), 1.27 (d, 1H, $J_{6-5} = 4.0$ Hz, H6), 1.23 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 178.1 (COC(CH₃)₃), 170.1 (COOCH₃), 149.8 (C2), 127.8 (C3), 76.0 (C4), 60.9 (C2'), 51.8 (COOCH₃), 39.0 (COC(CH₃)₃), 38.8 (C5), 38.4 (C1), 37.9 (C6), 27.3 (COC(CH₃)₃), 11.0 (C1').

HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₁₅H₂₂O₅Na 305.1365; Found 305.1372.

IR ν (cm⁻¹): 3434 (OH), 2975, 2876 (C-H), 1731 (2 C=O ester), 1481, 1439, 1398, 1281, 1230, 1170, 1070, 1018, 894, 834, 772.

[α]_D²⁰ -159 (c 2.2, DCM).



Methyl (1*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-1-methylbicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (70c)

Formula: C₁₀H₁₄O₄

Molecular weight: 198.22 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.62-5.57 (m, 1H, H3), 4.40 (m, 1H, H4), 4.42-4.27 (m, 2H, H2'), 3.69 (s, 3H, COOCH₃), 2.31 (dd, 1H, *J*₅₋₆ = 4.0 Hz, *J*₅₋₃ = 1.5 Hz, H5), 1.89 (br s, 2H, 2 OH), 1.46 (s, 3H, CH₃), 1.27 (d, 1H, *J*₆₋₅ = 4.0 Hz, H6).

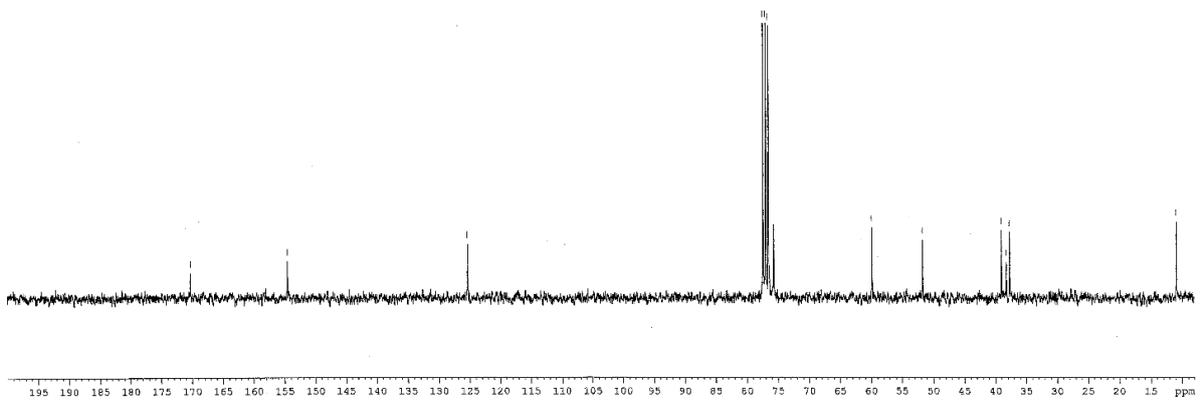
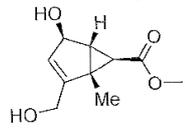
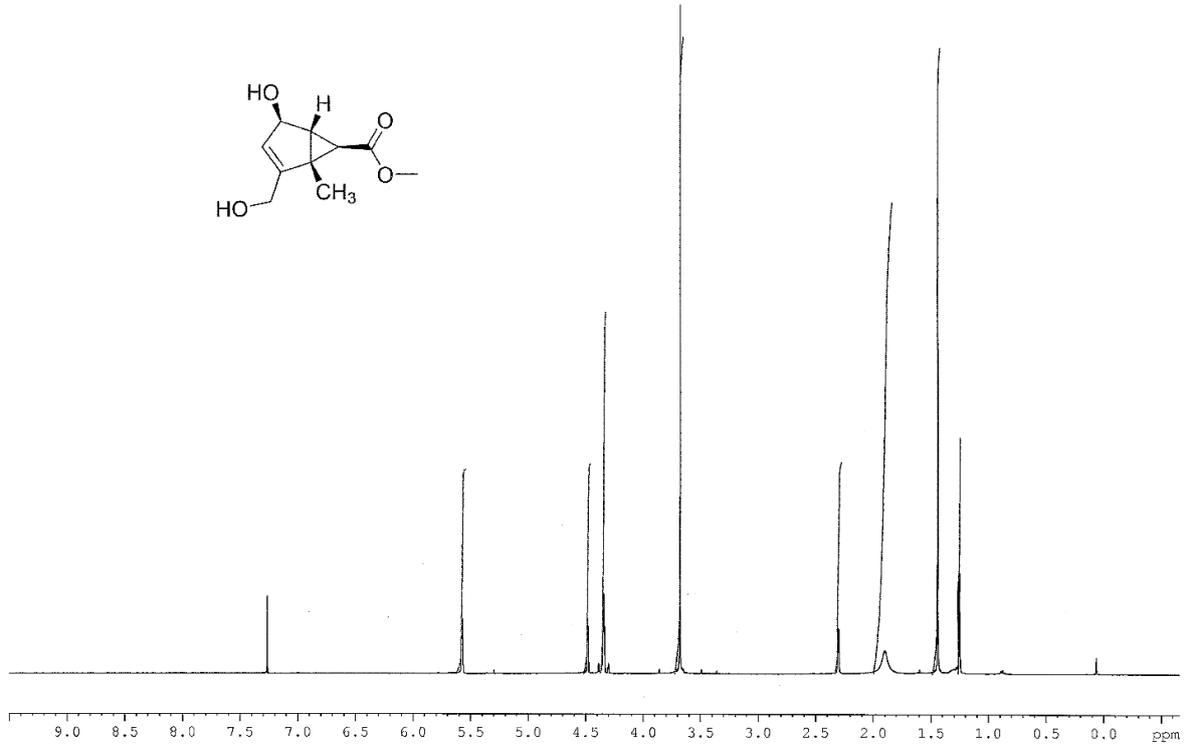
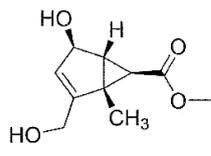
¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, CDCl₃): 170.2 (C=O), 154.5 (C2), 125.4 (C3), 75.7 (C4), 59.9 (C2'), 51.7 (COOCH₃), 39.0 (C6), 38.2 (C1), 37.7 (C5), 10.9 (C1').

HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₁₀H₁₄O₄Na 221.0790; Found 221.0775.

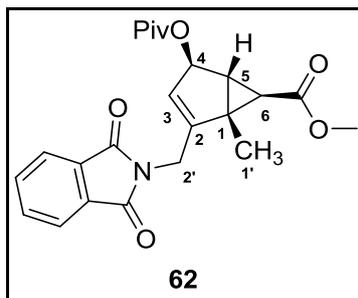
IR ν (cm⁻¹): 3410 (2 OH), 1719 (C=O ester), 1641, 1433, 1395, 1227, 1166, 1002.

[α]_D²⁰ -214 (c 1.0, DCM).

Mp 100 °C (DCM/MeOH 9:1 v/v).



Methyl (1*R*,2*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-1-methyl-4-(pivaloyloxy)-2-[(*N*-phthalimido)methyl]bicyclo[3.1.0] hex-2-ene-6-carboxylate (62)



Compound **70a** (17 mg, 0.12 mmol, 1.0 equiv), triphenylphosphine (63 mg, 0.48 mmol, 4.0 equiv), phthalimide (27 mg, 0.36 mmol, 3.0 equiv) were dissolved in dry THF (3 ml). The reaction mixture was cooled at 0 °C with ice bath and diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (47 μ l, 0.48 mmol, 4.0 equiv) was added dropwise. The mixture was allowed to reach rt and stirred for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was chromatographed on silica gel with cyclohexane/EtOAc (95:5 to 80:20 v/v) as eluent to afford the title compound (18 mg, 70 %) as yellowish syrup.

Formula: C₂₃H₂₅NO₆

Molecular weight: 411.45 g/mol

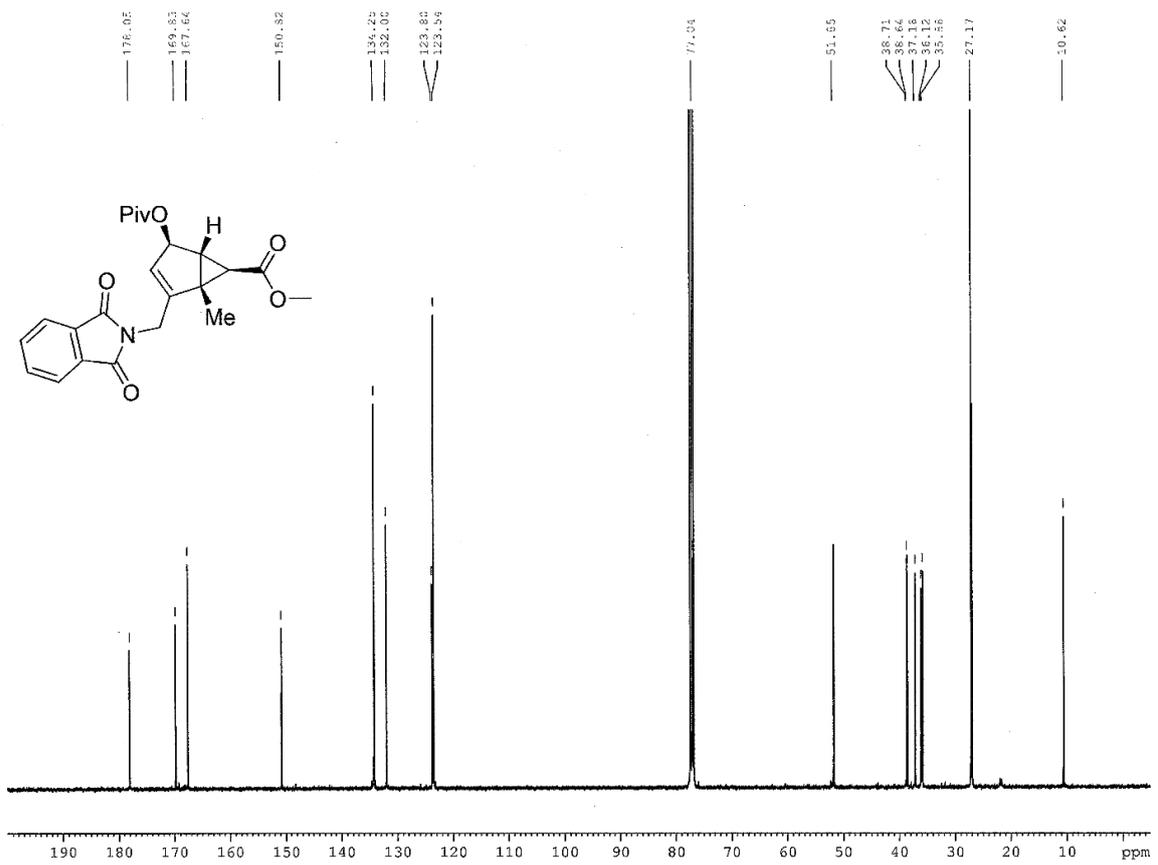
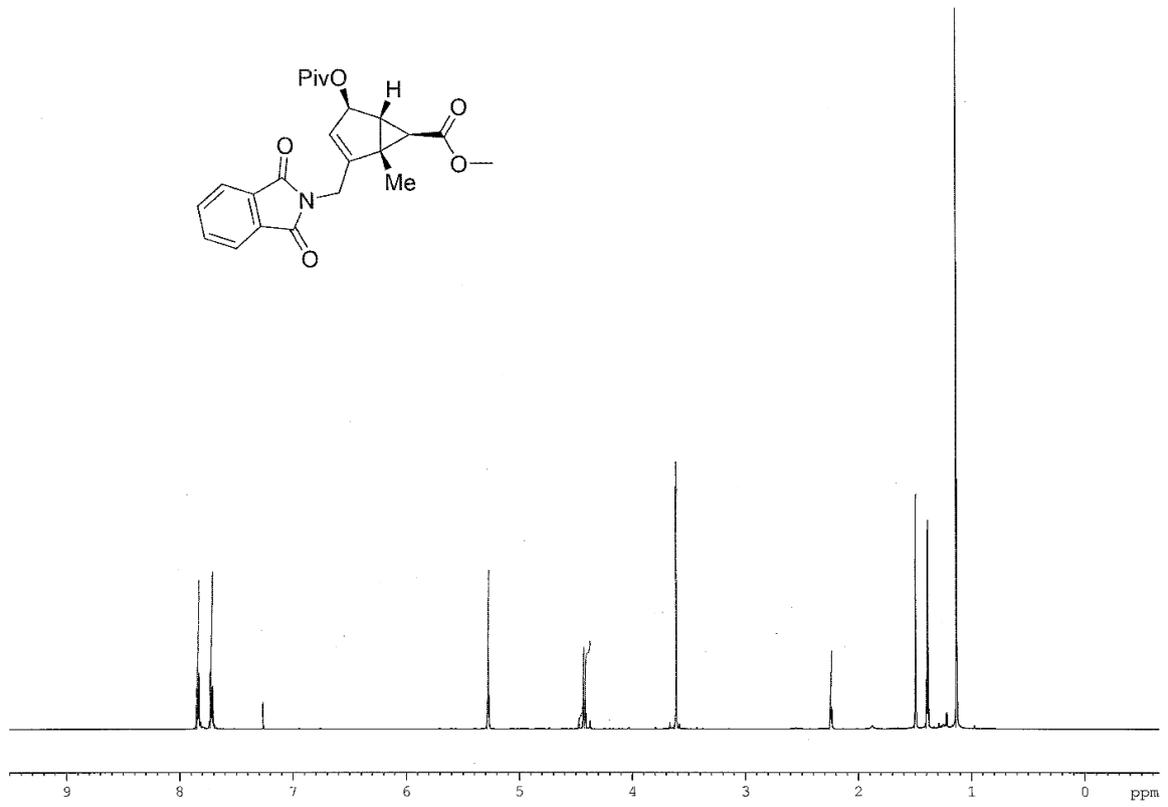
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.89-7.83 (m, 2H, Ar-H), 7.78-7.71 (m, 2H, Ar-H), 5.31-5.27 (m, 1H, H3 and H4), 4.46 (br d, 1H, $J_{2'-a-2'b} = 16.0$ Hz), 4.40 (br d, 1H, $J_{2'-a-2'b} = 16.0$ Hz), 3.62 (s, 3H, COOCH₃), 2.25 (dd, 1H, $J_{5-6} = 3.5$ Hz, $J_{5-3} = 1.0$ Hz, H5), 1.50 (s, 3H, CH₃), 1.41 (d, 1H, $J_{6-5} = 3.5$ Hz, H6), 1.15 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 178.1 (CO C(CH₃)₃), 169.8 (COOCH₃), 167.6 (2 Ar-CO), 150.8 (C2), 134.3 (2 Ar-C), 132.0 (2 Ar-C), 123.8 (C3), 123.5 (2 Ar-C), 77.0 (C4), 51.8 (COOCH₃), 38.7 (C1), 38.6 (COC(CH₃)₃), 37.2 (C6), 36.1 (C5), 35.9 (C2'), 27.2 (COC(CH₃)₃), 10.6 (C1')

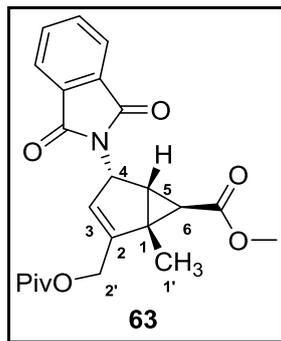
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₂₃H₂₅NO₆Na 434.1580; Found 434.1588.

IR v (cm⁻¹): 2980 (C-H), 1774 (2 C=O phthalimide), 1719 (2 C=O ester), 1467, 1423, 1387, 1276, 1233, 1152, 1108, 716.

[α]_D²⁰ -42 (c 1.7, DCM).



Methyl (1*R*,2*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-1-methyl-2-(pivaloyloxymethyl)-4-[*N*-phtalimido]bicyclo[3.1.0] hex-2-ene-6-carboxylate (63)



Compound **70b** (70 mg, 0.31 mmol, 1.0 equiv), triphenylphosphine (260 mg, 1.24 mmol, 4.0 equiv), phtalimide (109 mg, 0.93 mmol, 3.0 equiv) were dissolved in dry THF (3 ml). The reaction mixture was cooled at 0 °C with ice bath and diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (195 μ l, 1.24 mmol, 4.0 equiv) was added dropwise. The mixture was allowed to reach rt and stirred for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was chromatographed on silica gel with cyclohexane/EtOAc (95:5 to 80:20 v/v) as eluent to afford the title compound (90 mg, 85 %) as yellowish syrup.

Formula: C₂₃H₂₅NO₆

Molecular weight: 411.45 g/mol

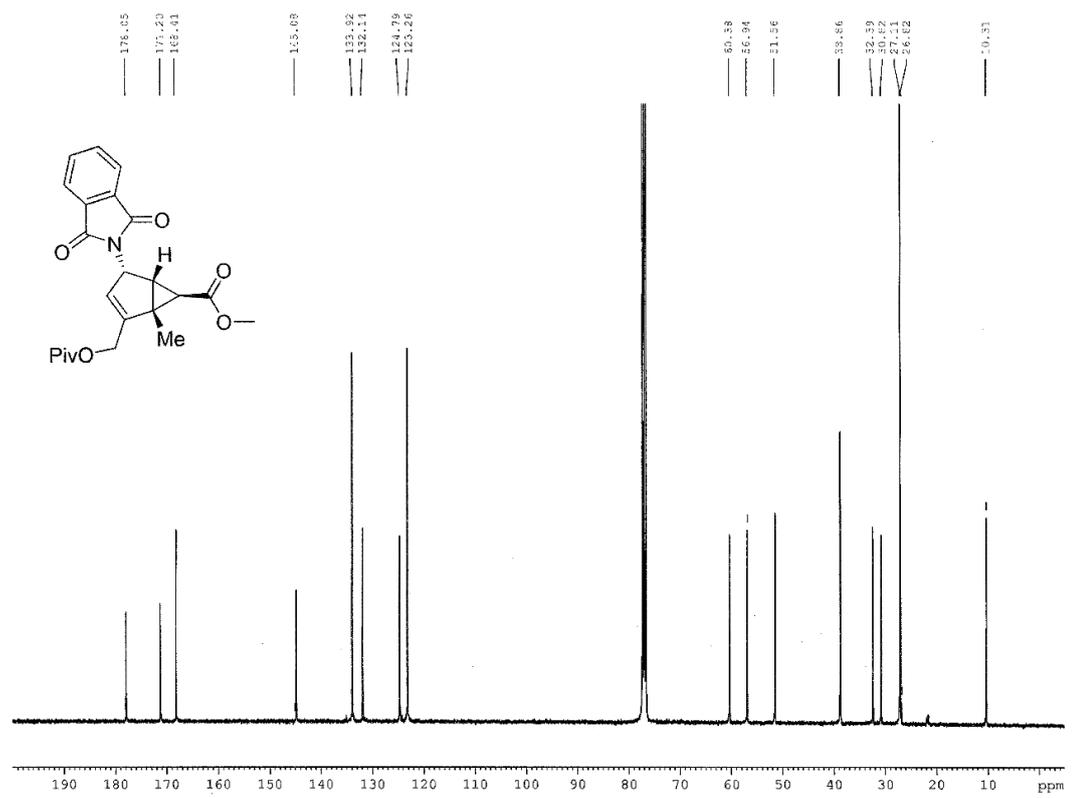
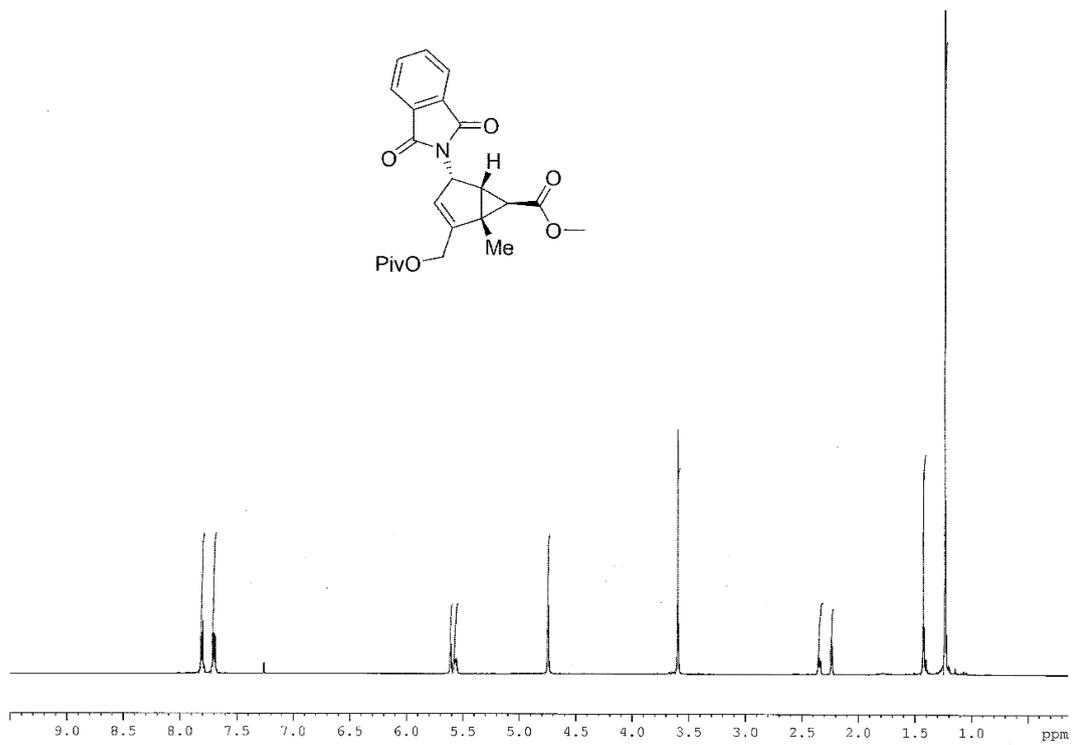
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.83-7.78 (m, 2H, Ar-H), 7.73-7.67 (m, 2H, Ar-H), 5.63-5.59 (m, 1H, H3), 5.59-5.54 (m, 1H, H4), 4.76-4.73 (t, 2H, $J_{2'-3} = J_{2'-4} = 2.0$ Hz, H2'), 3.60 (s, 3H, COOCH₃), 2.37 (ddd, 1H, $J_{5-4} = 6.0$ Hz, $J_{5-6} = 3.5$ Hz, $J_{5-3} = 1.0$ Hz, H5), 2.24 (d, 1H, $J_{6-5} = 3.5$ Hz, H6), 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.23 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 178.1 (CO(CH₃)₃), 171.2 (COOCH₃), 168.4 (2 Ar-CO), 145.1 (C2), 133.9 (2 Ar-C), 132.1 (2 Ar-C), 124.8 (C3), 123.3 (2 Ar-C), 60.4 (C2'), 56.9 (C4), 51.6 (COOCH₃), 38.9 (COC(CH₃)₃), 32.4 (C6), 30.8 (C5), 27.1 (COC(CH₃)₃), 26.8 (C1), 10.5 (C1').

HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₂₃H₂₅NO₆Na 434.1580; Found 434.1573.

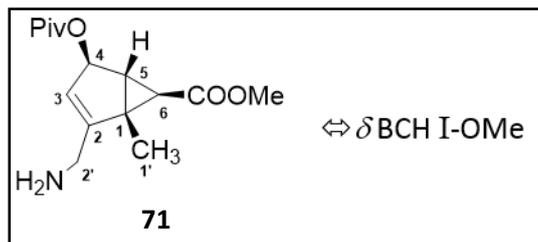
IR v (cm⁻¹): 2975 (C-H), 1773 (2 C=O phtalimide), 1716 (2 C=O ester), 1481, 1467, 1439, 1389, 1363, 1312, 1284, 1154, 975, 878, 719.

[α]_D²⁰ -21 (c 1.7, DCM).



3. Synthesis of tripeptides

Methyl (1*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-(aminomethyl)-1-methyl-4-(pivaloyloxy)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (**71**)



Procedure A:

Hydrazine monohydrate (18 μ l, 0.21 mmol, 1.0 equiv) was added to a stirred solution of compound **62** (100 mg, 0.21 mmol, 1.0 equiv) in EtOH (1.5 ml). The reaction mixture was stirred for 30 min at rt. The precipitate was removed by suction and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 96:4 v/v) as eluent to give **71** (yellowish oil, 48 mg, 71 %).

Procedure B:

Ethane-1,2-diamine (80 μ l, 1.22 mmol, 5.0 equiv) was added to a stirred solution of compound **62** (100 mg, 0.24 mmol, 1.0 equiv) in mixture of *n*-PrOH/H₂O (1.5 ml, 7:3 v/v). The reaction mixture was stirred for 2 h at rt. The solvent was removed under reduced pressure. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 96:4 v/v) as eluent to give **71** (yellowish oil, 48 mg, 71 %).

Formula: C₁₅H₂₃NO₄

Molecular weight: 281.35 g/mol

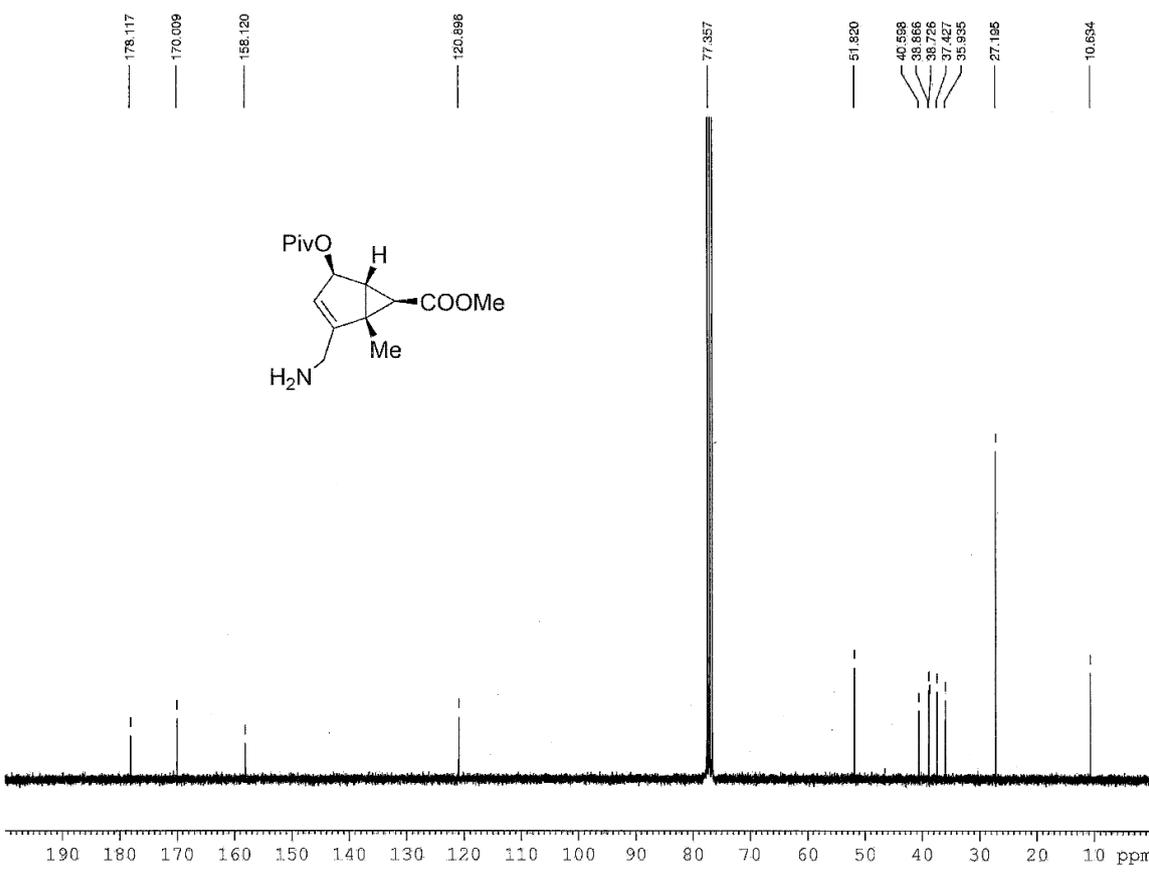
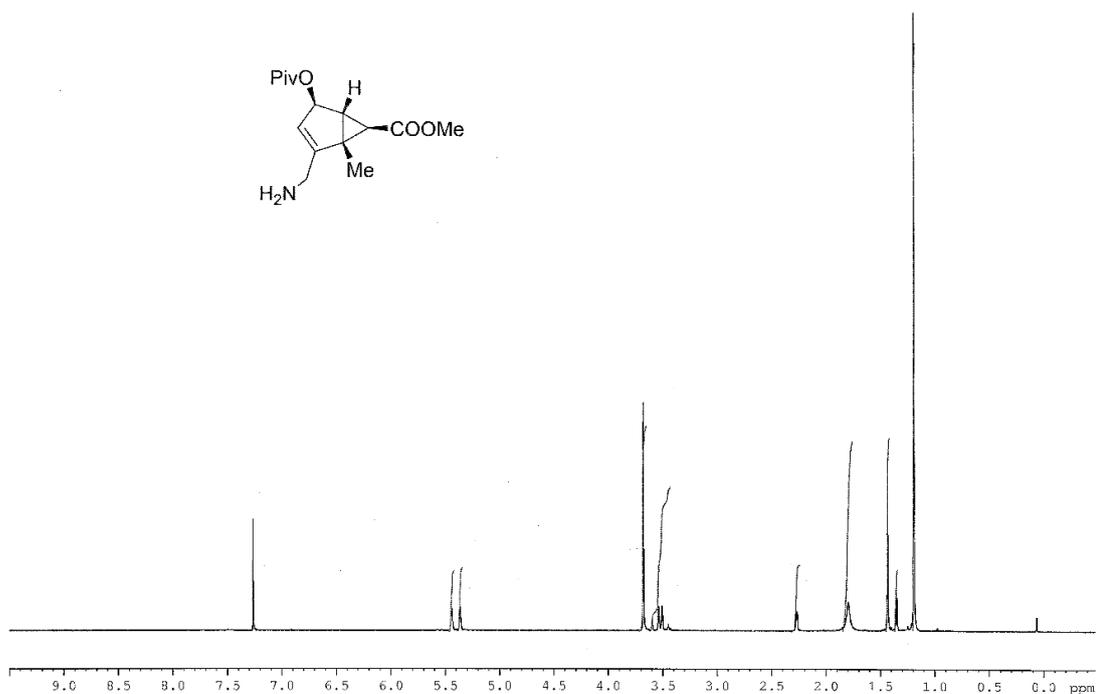
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.46-5.42 (m, 1H, H3), 5.38-5.34 (m, 1H, H4), 3.68 (s, 3H, COOCH₃), 3.57 (br d, 1H, $J_{2'a-2'b} = 17.0$ Hz, H2'a), 3.47 (dt, 1H, $J_{2'a-2'b} = 17.0$ Hz, $J_{2'b-3} = J_{2'b-4} = 2.0$ Hz, H2'b), 2.27 (dd, 1H, $J_{5-6} = 4.0$ Hz, $J_{5-3} = 1.5$ Hz, H5), 1.79 (br s, 2H, NH₂), 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.38 (d, 1H, $J_{6-5} = 4.0$ Hz, H6), 1.19 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, CDCl₃): 178.1 (COC(CH₃)₃), 170.0 (COOCH₃), 158.1 (C2), 120.9 (C3), 77.4 (C4), 51.8 (COOCH₃), 40.6 (C2'), 38.9 (C1), 38.7 (COC(CH₃)₃), 37.4 (C6), 35.9 (C5), 27.2 (COC(CH₃)₃), 10.6 (C1').

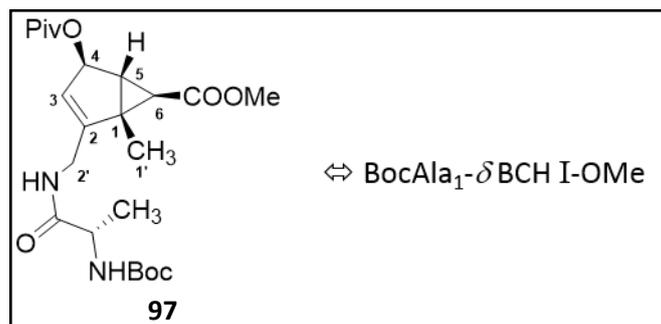
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₁₅H₂₃NO₄Na 304.1525; Found 304.1515.

IR v (cm⁻¹): 3384 (NH), 2957, 2975, 2934 (C-H), 1721 (2 C=O ester), 1152.

[α]_D²⁵ -223 (c 1.2, CHCl₃).



Methyl (1*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-(((2*S*)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]propanamido)methyl)-1-methyl-4-(pivaloyloxy)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (97)



(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-alanine (56 mg, 0.30 mmol, 2.0 equiv), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (77 μ l, 0.45 mmol, 3.0 equiv), then 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) (108 mg, 0.29 mmol, 1.9 equiv) were added at rt to a stirred solution of compound **71** (42 mg, 0.15 mmol, 1.0 equiv) in dry DMF (2ml). The reaction mixture was stirred for 3 h at rt. The mixture was treated with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (5 ml). The product was extracted with DCM three times (5 ml). The combined organic layers were washed with a solution of hydrochloric acid 1 M (5 ml), a saturated aqueous solution of sodium hydrogen carbonate (3x5 ml), water (5 ml), dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was removed *in vacuo*. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 99.6:0.04 v/v) as eluent to afford the title compound (42 mg, 62 %) as colorless oil.

Formula: C₂₃H₃₆N₂O₇

Molecular weight: 452.55 g/mol

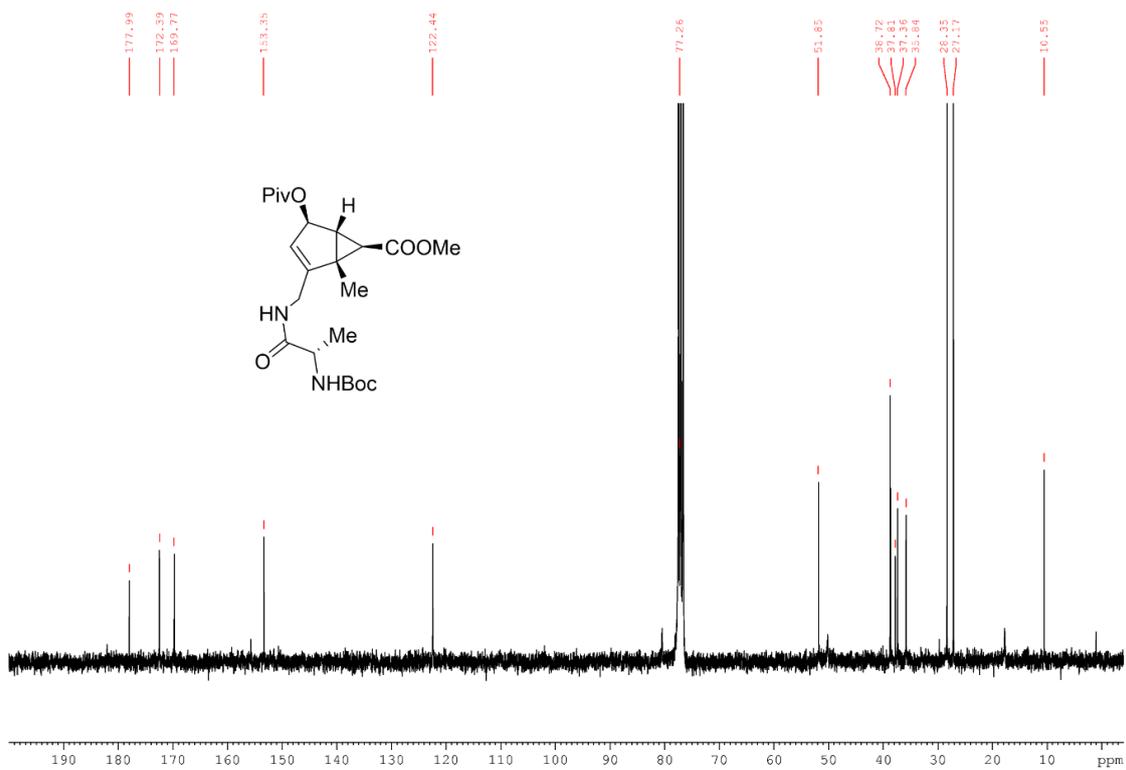
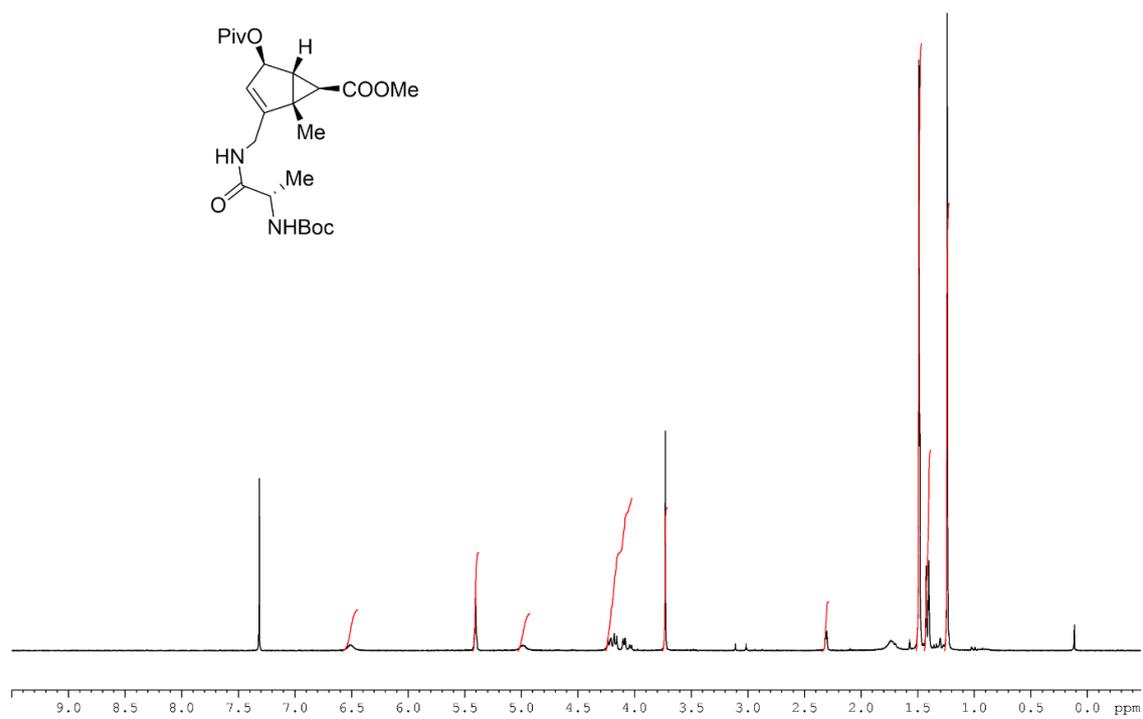
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.50 (br s, 1H, NH), 5.34 (s, 2H, H3 and H4), 4.93 (br s, 1H, NH A1), 4.23-4.09 (m, 2H, H2'a and H α A1), 4.09-3.96 (m, 1H, H2'b), 3.67 (s, 3H, COOCH₃), 2.26 (dd, 1H, $J_{5-6} = 3.5$ Hz, $J_{5-3} = 1.0$ Hz, H5), 1.44 (s, 12H, OC(CH₃)₃ and CH₃), 1.36 (d, 3H, $J_{H\beta A1-H\alpha A1} = 7.0$ Hz, H β A1), 1.35 (d, 1H, $J_{6-5} = 3.5$ Hz, H6), 1.17 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, CDCl₃): 178.0 (COC(CH₃)₃), 172.4 (CONH), 169.8 (COOCH₃), 155.8 (COOC(CH₃)₃), 153.4 (C2), 122.4 (C3), 80.6 (OC(CH₃)₃), 77.3 (C4), 51.9 (COOCH₃), 50.1 (C α A1), 38.7 (COC(CH₃)₃ and C1), 37.8 (C2'), 37.4 (C6), 35.8 (C5), 28.4 (OC(CH₃)₃), 27.1 (COC(CH₃)₃), 17.8 (C β A1), 10.6 (C1').

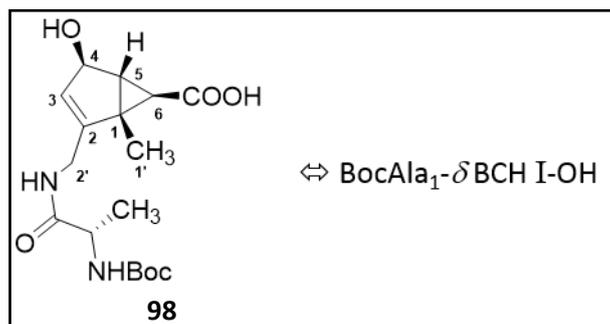
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₂₃H₃₆N₂O₇Na 475.2420; Found 475.2412.

IR v (cm⁻¹): 3316 (2 NH), 2997, 2934, 2910 (C-H), 1723 (2 C=O ester), 1664 (C=O amide, C=O carbamate), 1520, 1152.

[α]_D²⁵ -105 (c 0.7, CHCl₃).



(1*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-((2*S*)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]propanamido)methyl)-4-hydroxy-1-methylbicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylic acid (98**)**



Lithium hydroxide monohydrate (20 mg, 0.48 mmol, 6.0 equiv) was added to a stirred solution of compound **97** (36 mg, 0.08 mmol, 1.0 equiv) in mixture of MeOH/H₂O/THF (2.5 ml, 1:0.5:1 v/v). The reaction mixture was stirred for 5 h at rt. The solution was evaporated under reduce pressure to remove organic solvents. Then the residual aqueous solution was acidified until pH = 1-2 with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (3 ml). The product was extracted with EtOAc (5 ml) four times. The combined organic layers were washed with water (5 ml), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 97:3 v/v) with acetic acid 1% (v/v) as eluent to give a white solid (16 mg, 57 %).

Formula: C₁₇H₂₆N₂O₆

Molecular weight: 354.40 g/mol

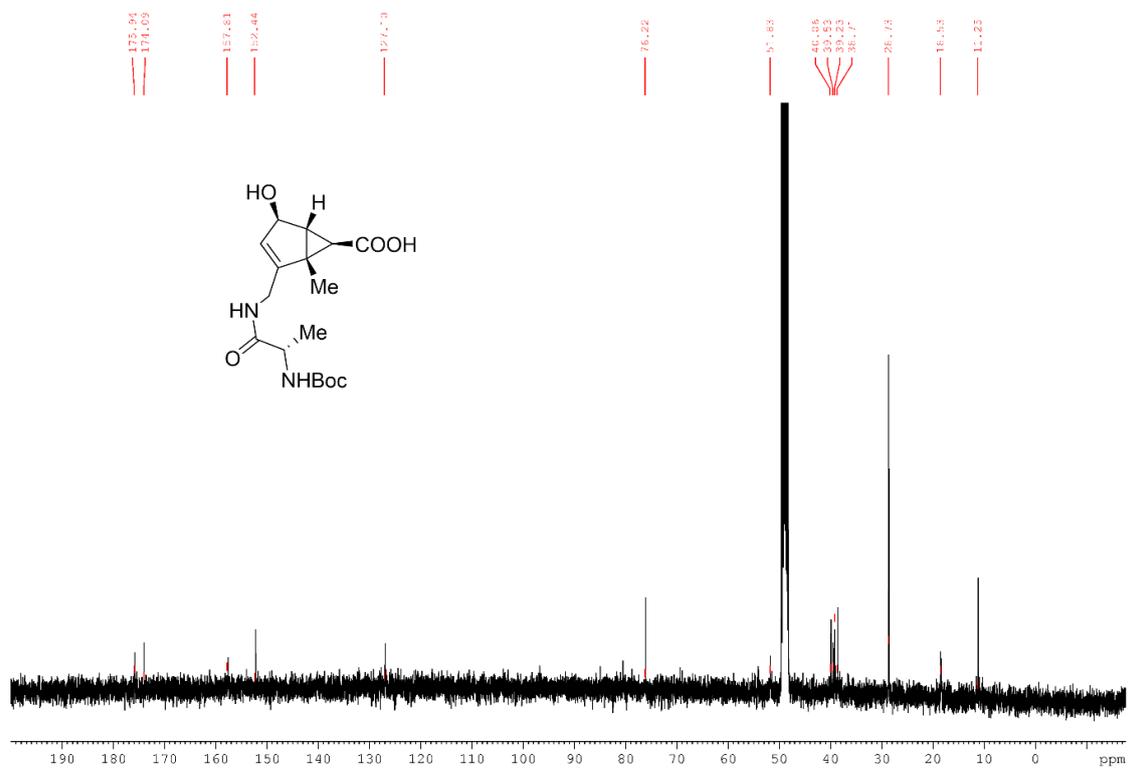
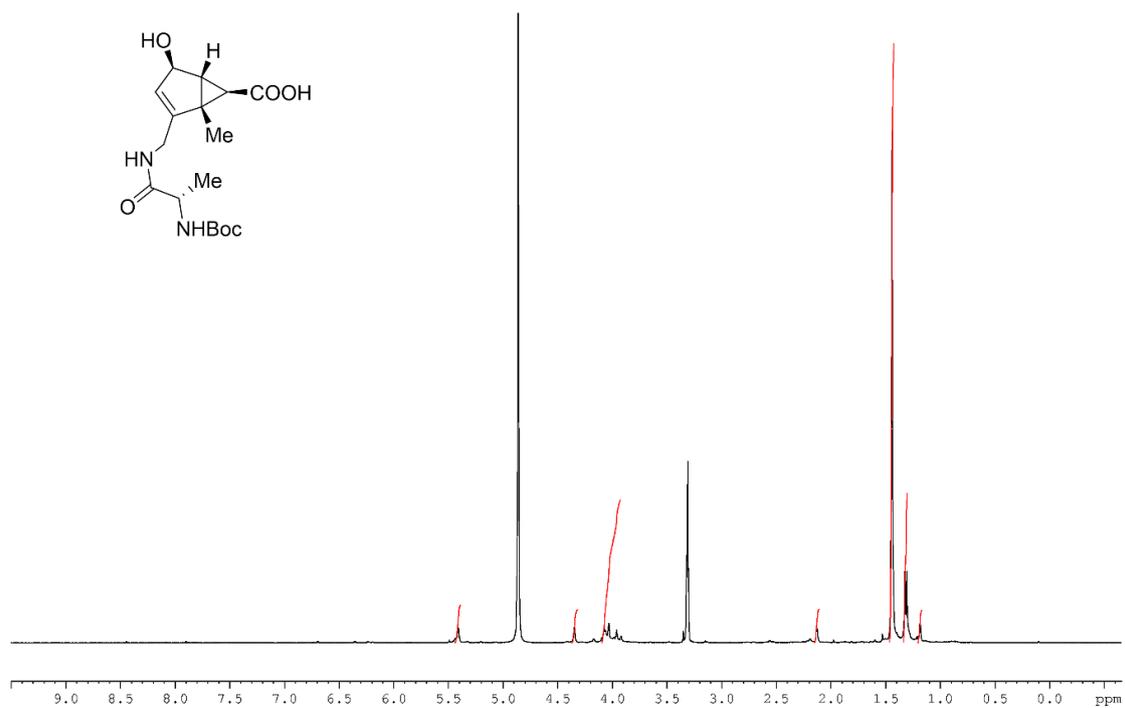
¹H-NMR (400 MHz, MeOD-*d*4): δ 5.41 (br s, 1H, H3), 4.35 (br s, 1H, H4), 4.05-3.95 (m, 2H, H2'a and H α A1), 3.95 (br d, 1H, $J_{2'a-2'b}$ = 17.0 Hz, H2'b), 2.13 (dd, 1H, J_{5-6} = 3.5 Hz, J_{5-3} = 1.5 Hz, H5), 1.44 (s, 12H, OC(CH₃)₃ and CH₃), 1.32 (d, 3H, $J_{H\beta A1-H\alpha A1}$ = 7.0 Hz, H β A1), 1.19 (d, 1H, J_{6-5} = 3.5 Hz, H6).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, MeOD-*d*4): 175.9 (C=O), 174.0 (C=NH), 157.8 (C=OOC(CH₃)₃), 152.4 (C2), 127.1 (C3), 80.6 (OC(CH₃)₃), 76.2 (C4), 51.8 (C α A1), 40.1 (C1), 39.5 (C5), 39.2 (C6), 38.7 (C2'), 28.7 (OC(CH₃)₃), 18.5 (C β A1), 11.3 (C1').

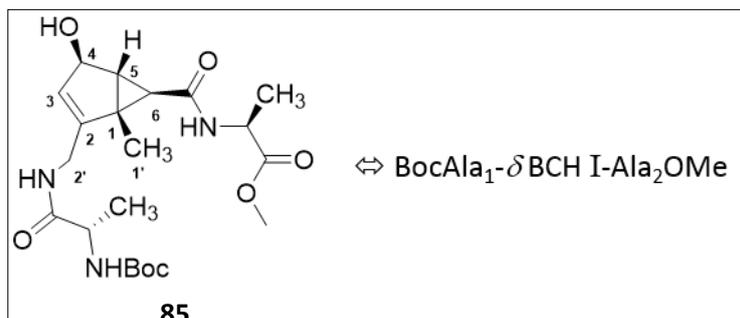
HRMS (ESI) m/z: [M-H]⁺ Calcd for C₁₇H₂₅N₂O₆ 353.1713; Found 353.1717.

IR v (cm⁻¹): 3392 (C=O, 2 NH, OH), 2924, 2855 (C-H), 1657 (C=O acide, C=O amide, C=O carbamate), 1527, 1250, 1167.

[α]_D²³ -74 (c 0.61, MeOH).



Methyl (2S)-2-[(1R,4R,5R,6R)-2-[(2S)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propanamido]methyl]-4-hydroxy-1-methylbicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxamide]propanoate (85)



(S)-1-methoxy-1-oxopropan-2-aminium chloride (14 mg, 0.10 mmol, 3.0 equiv), DIPEA (29 μ l, 0.17 mmol, 5.0 equiv), then HATU (20 mg, 0.05 mmol, 1.5 equiv) were added to a stirred solution of compound **98** (12 mg, 0.03 mmol, 1.0 equiv) in dry DMF (1.5 ml). The reaction mixture was stirred for 3 h at 45 °C. The mixture was treated with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (1 ml). The product was extracted with DCM three times (5 ml). The combined organic layers were washed with a solution of hydrochloric acid 1 M (5 ml), water (5 ml), then dried over magnesium sulfate, filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 96:4 v/v) as eluent to afford the title compound (9 mg, 61 %) as colorless oil.

Formula: C₂₁H₃₃N₃O₇

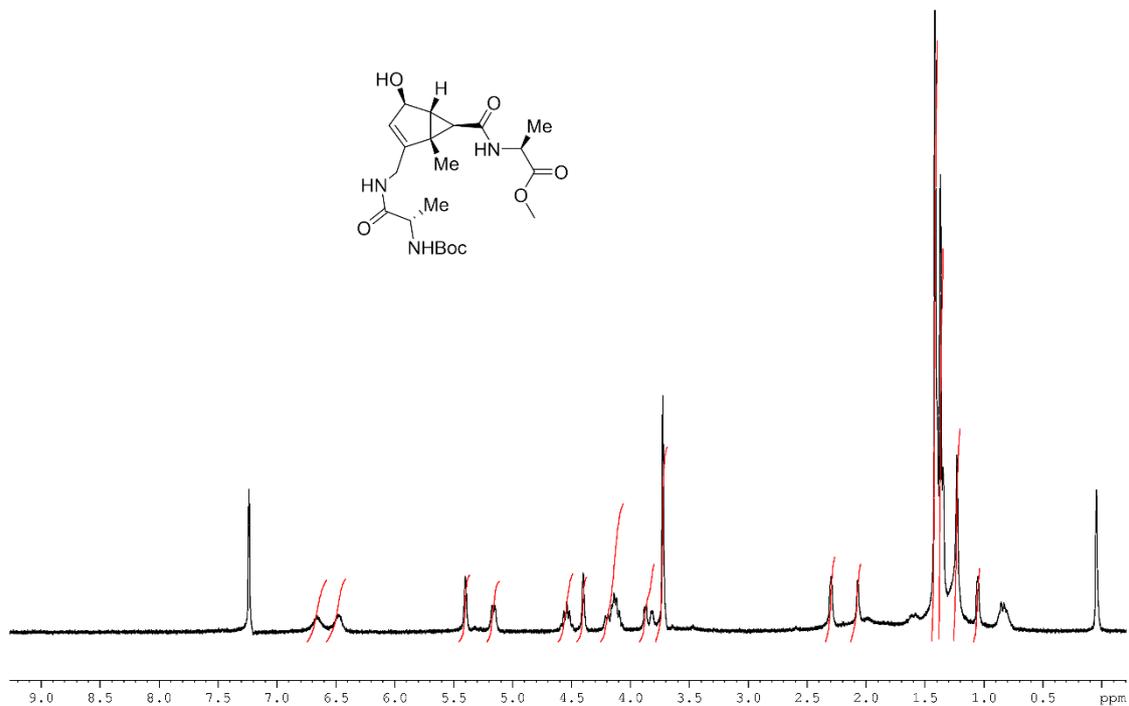
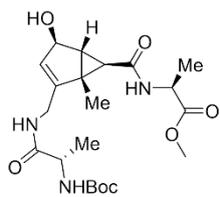
Molecular weight: 439.51 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.68 (br s, 1H, NH A2), 6.50 (br s, 1H, NH δ BCH I), 5.42 (br s, 1H, H3), 5.15 (br d, 1H, $J_{\text{NH}A1-\text{H}\alpha A1} = 7.0$ Hz, NH A1), 4.52 (br q, 1H, $J_{\text{H}\alpha A2-\text{H}\beta A2} = 7.0$ Hz, H α A2), 4.42 (br s, 1H, H4), 4.26-4.07 (m, 2H, H α A1 and H2'a), 3.87 (d m, 1H, $J_{2'b-2'a} = 17.0$ Hz, H2'b), 3.75 (s, 3H, COOCH₃), 2.32 (br s, 1H, H5), 1.67 (br s, 1H, OH), 1.40 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 1.42 (s, 6H, H β A1 and H β A2), 1.25 (s, 3H, CH₃), 1.08 (br s, 1H, H6).

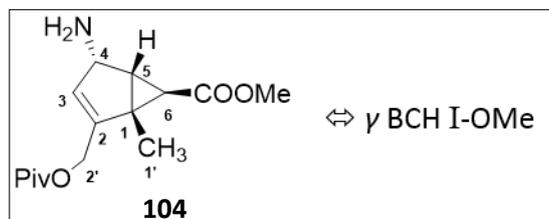
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₂₁H₃₃N₃O₇Na 462.2216; Found 462.2224.

IR v (cm⁻¹): 3328 (OH, 3 NH), 2926, 2854 (C-H), 1742 (C=O ester), 1709 (C=O carbamate), 1691 (C=O amide), 1669 (C=O amide), 1528, 1457, 1368, 1251, 1164.

[α]_D²³ -13 (c 0.45, CHCl₃).



Methyl (1*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-4-amino-1-methyl-2-[(pivaloyloxy)methyl]bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (104)



Procedure A:

Hydrazine monohydrate (16 μ l, 0.21 mmol, 1.0 equiv) was added to a stirred solution of compound **63** (89 mg, 0.21 mmol, 1.0 equiv) in EtOH (1.5 ml). The reaction mixture was stirred for 30 min at rt. The precipitate was removed by suction and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 96:4 v/v) as eluent to give a yellowish oil (44 mg, 65 %).

Procedure B:

Ethane-1,2-diamine (80 μ l, 1.20 mmol, 5 equiv) was added to a stirred solution of compound **63** (100 mg, 0.24 mmol, 1.0 equiv) in mixture of *n*-PrOH/H₂O (1.5 ml, 7:3 v/v). The reaction mixture was stirred for 2 h at rt. The solvent was removed under reduced pressure. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 96:4 v/v) as eluent to give a yellowish oil (43 mg, 63 %).

Formula: C₁₅H₂₃NO₄

Molecular weight: 281.35 g/mol

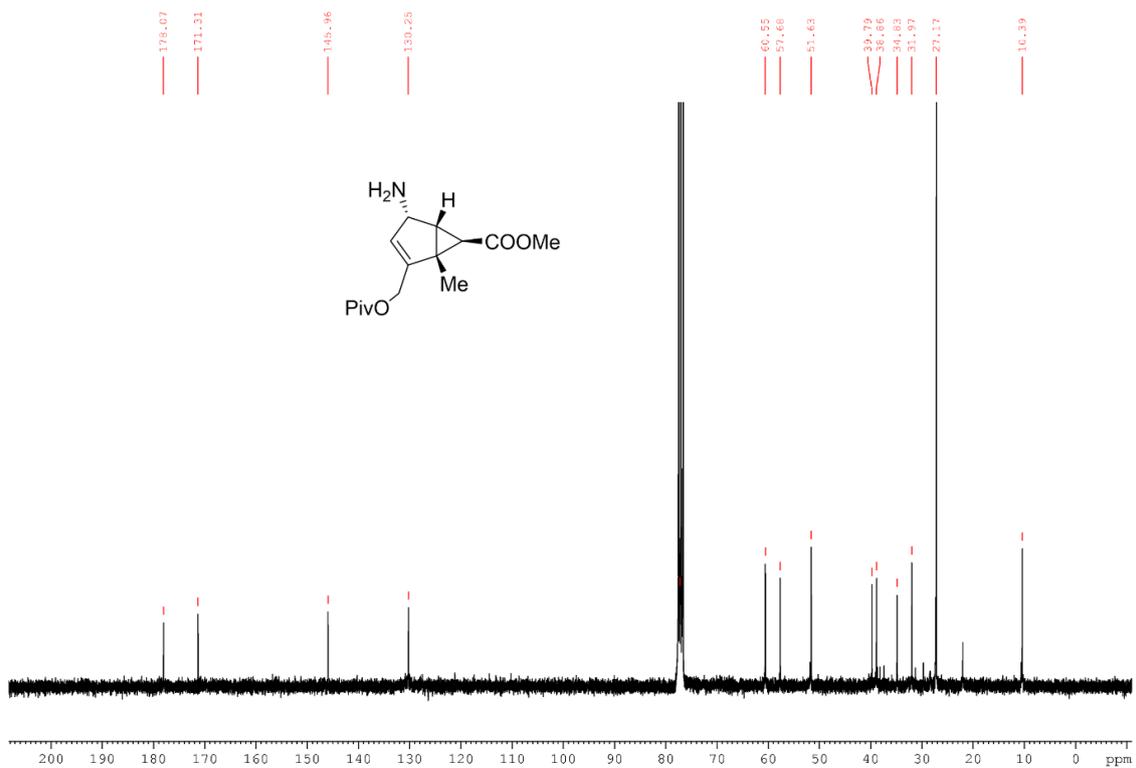
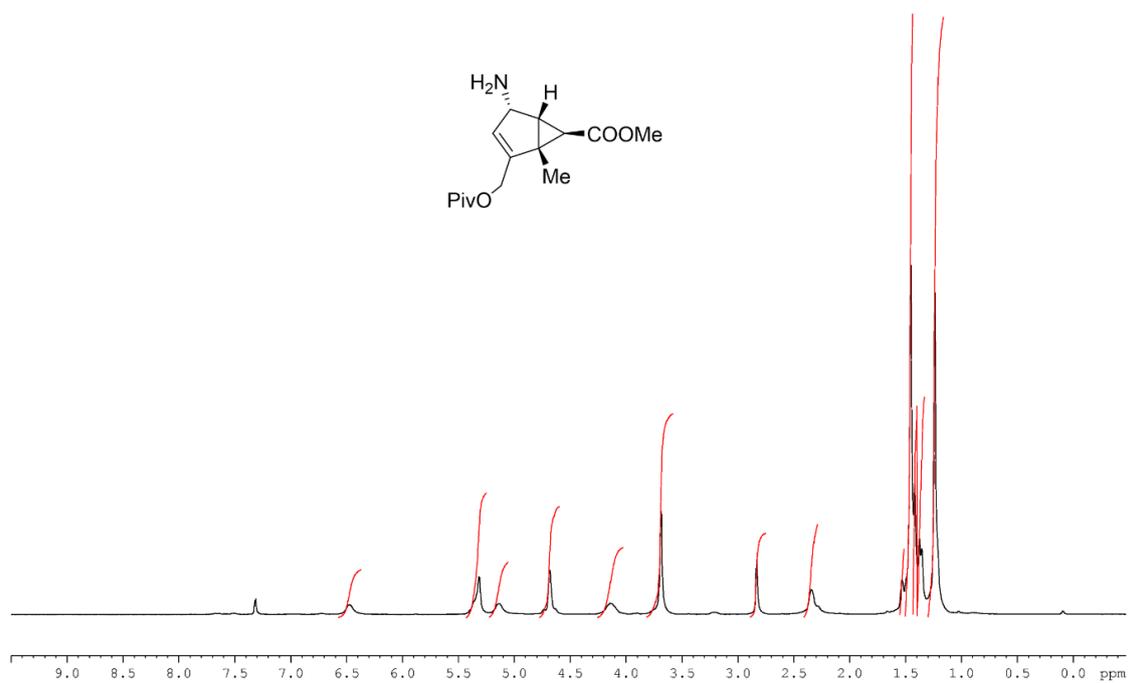
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.29 (br s, 1H, H₃), 4.72-4.53 (br s, 2H, H₂'), 4.45 (br s, 1H, H₄), 3.66 (s, 3H, COOCH₃), 2.53 (br s, 2H, NH₂), 2.20 (br s, 1H, H₅), 1.53 (s, 1H, H₆), 1.37 (s, 3H, CH₃), 1.21 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 178.1 (COC(CH₃)₃), 171.3 (COOCH₃), 146.0 (C₂), 130.3 (C₃), 77.4 (C₄), 60.6 (C₂'), 57.7 (C₄), 51.6 (COOCH₃), 39.8 (C₁), 38.9 (COC(CH₃)₃), 34.8 (C₆), 32.0 (C₅), 27.2 (COC(CH₃)₃), 10.4 (C₁').

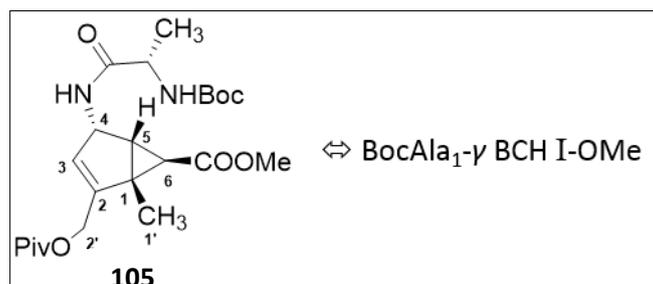
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₁₅H₂₃NO₄Na 304.1525; Found 304.1514.

IR v (cm⁻¹): 3372 (NH), 2958, 2934, 2876 (C-H), 1724 (2 C=O ester), 1438, 1280, 1235, 1155.

[α]_D²¹ -100 (c 0.8, CHCl₃).



Methyl (1*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-4-((2*S*)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]propanamido)-1-methyl-2-[(pivaloyloxy)methyl]bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylate (105)



(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-alanine (52 mg, 0.28 mmol, 2.0 equiv), DIPEA (77 μ l, 0.42 mmol, 3.0 equiv), then HATU (101 mg, 0.27 mmol, 1.9 equiv) were added to a stirred solution of compound **104** (40 mg, 0.14 mmol, 1.0 equiv) in dry DMF (2ml). The reaction mixture was stirred for 3 h at rt. The mixture was treated with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (5 ml). The product was extracted with DCM three times (5 ml). The combined organic layers were washed with a solution of hydrochloric acid 1 M (5 ml), a saturated aqueous solution of sodium hydrogen carbonate (3x5 ml), water (5 ml), then dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was removed *in vacuo*. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 99.6:0.04 v/v) as eluent to afford the title compound (40 mg, 62 %) as colorless oil.

Formula: C₂₃H₃₆N₂O₇

Molecular weight: 452.55 g/mol

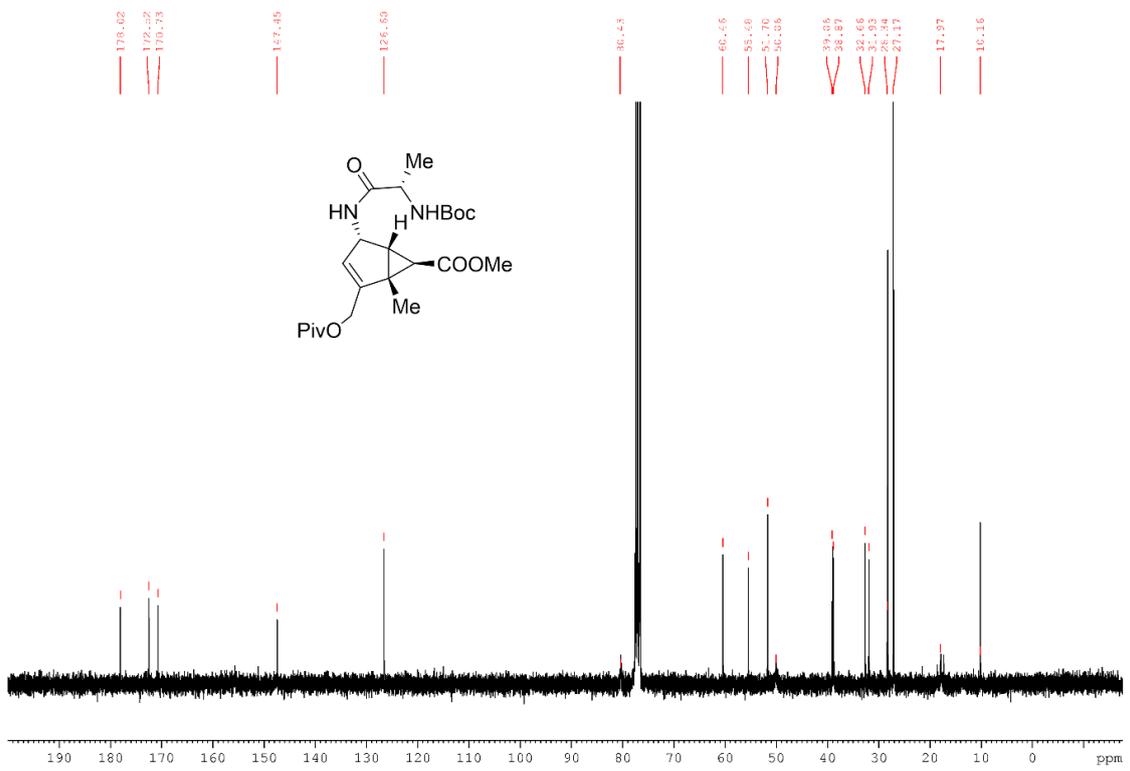
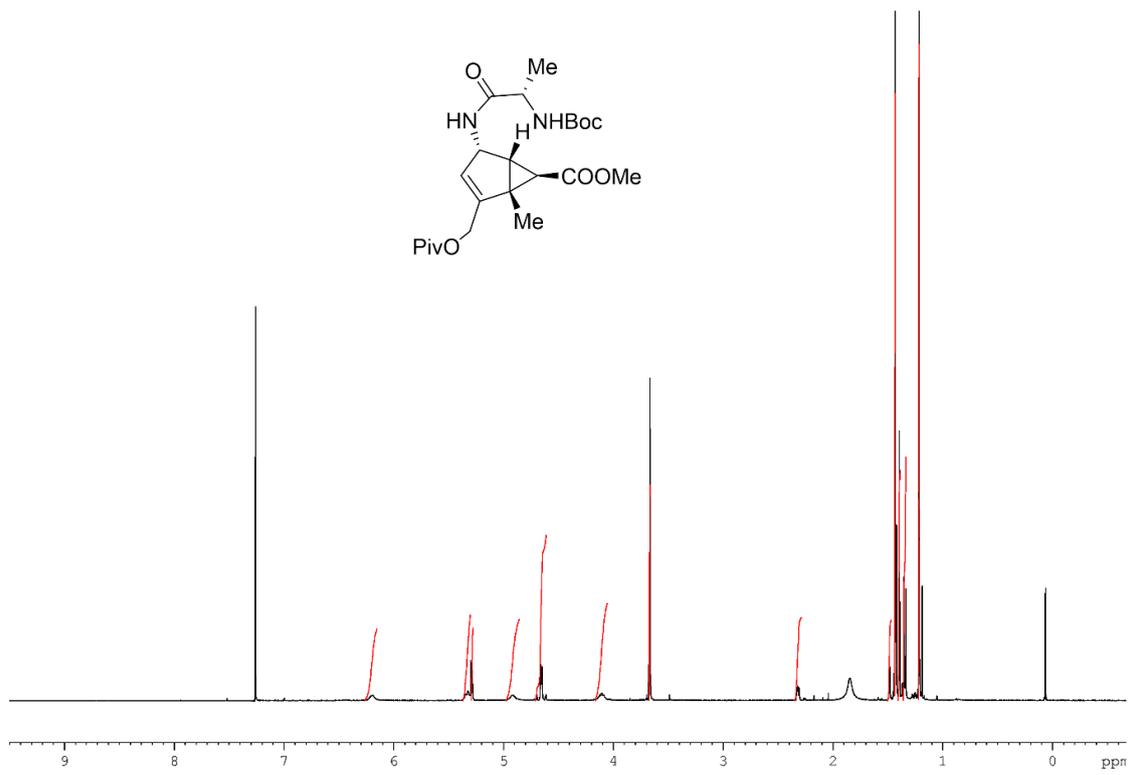
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.21 (br s, 1H, NH), 5.39-5.31 (br m, 1H, H₄), 5.26 (s, 1H, H₃), 4.92 (br s, 1H, NH A1), 4.72-4.60 (2 br d, 2H, H₂'), 4.20-4.05 (br m, 1H, H α A1), 3.68 (s, 3H, COOCH₃), 2.32 (ddd, 1H, $J_{5-4} = 6.0$ Hz, $J_{5-6} = 4.0$ Hz, $J_{5-3} = 1.0$ Hz, H₅), 1.50 (d, 1H, $J_{6-5} = 4.0$ Hz, H₆), 1.40 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 1.39 (s, 3H, CH₃), 1.35 (d, 3H, $J_{H\beta A1-H\alpha A1} = 7.0$ Hz, H β A1), 1.22 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (75 MHz, CDCl₃): 178.0 (CO C(CH₃)₃), 172.5 (CONH), 170.7 (COOCH₃), 155.6 (COOC(CH₃)₃), 147.5 (C₂), 126.6 (C₃), 80.6 (OC(CH₃)₃), 60.5 (C₂'), 55.5 (C₄), 51.7 (COOCH₃), 50.1 (C α A1), 39.1 (C₁), 38.9 (COC(CH₃)₃), 32.7 (C₆), 31.9 (C₅), 28.3 (OC(CH₃)₃), 27.3 (COC(CH₃)₃), 17.9 (C β A1), 10.2 (C₁').

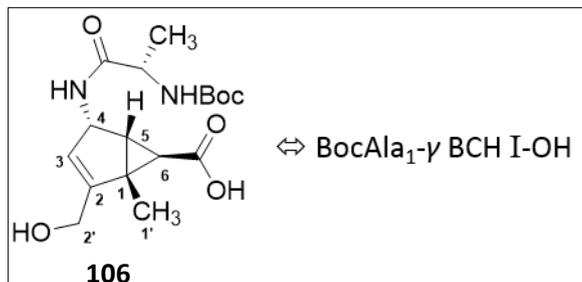
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₂₃H₃₆N₂O₇Na 475.2420; Found 475.2401.

IR v (cm⁻¹): 3310 (2 NH), 2976, 2935, 2877 (C-H), 1725 (2 C=O ester), 1659 (C=O amide, C=O carbamate), 1517, 1366, 1281, 1244, 1166.

[α]_D²¹ -58 (*c* 1.25, CHCl₃).



(1R,4S,5R,6R)-4-((2S)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]propanamido)-2-hydroxymethyl-1-methylbicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carboxylic acid (106**)**



Lithium hydroxide monohydrate (15 mg, 0.36 mmol, 6.0 equiv) was added to a stirred solution of compound **105** (25 mg, 0.06 mmol, 1.0 equiv) in mixture of MeOH/H₂O/THF (2.5 ml, 1:0.5:1 v/v). The reaction mixture was stirred for 5 h at rt. The solution was evaporated under reduce pressure to remove organic solvents. Then the residual aqueous solution was acidified until pH = 1-2 with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (3 ml). The product was extracted with EtOAc (5 ml) four times. The combined organic layers were washed with water (5 ml), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 97:3v/v) with acetic acid 1% (v/v) as eluent to give a white solid (11 mg, 57 %).

Formula: C₁₇H₂₆N₂O₆

Molecular weight: 354.40 g/mol

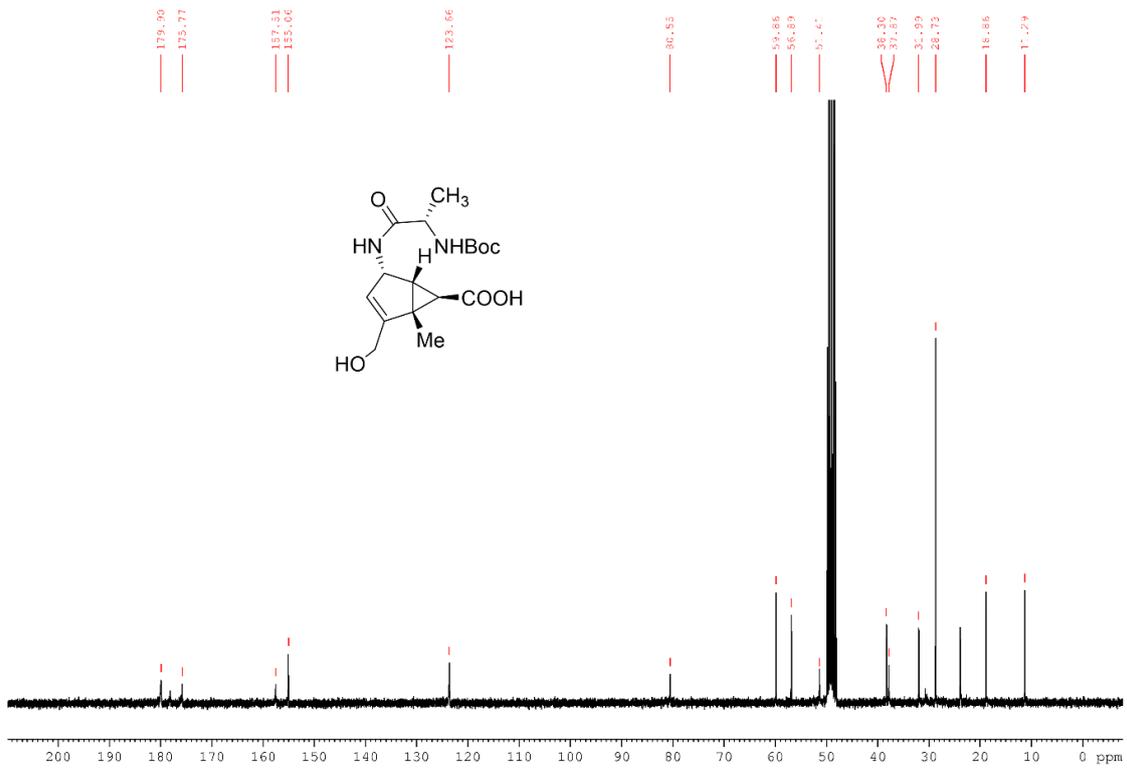
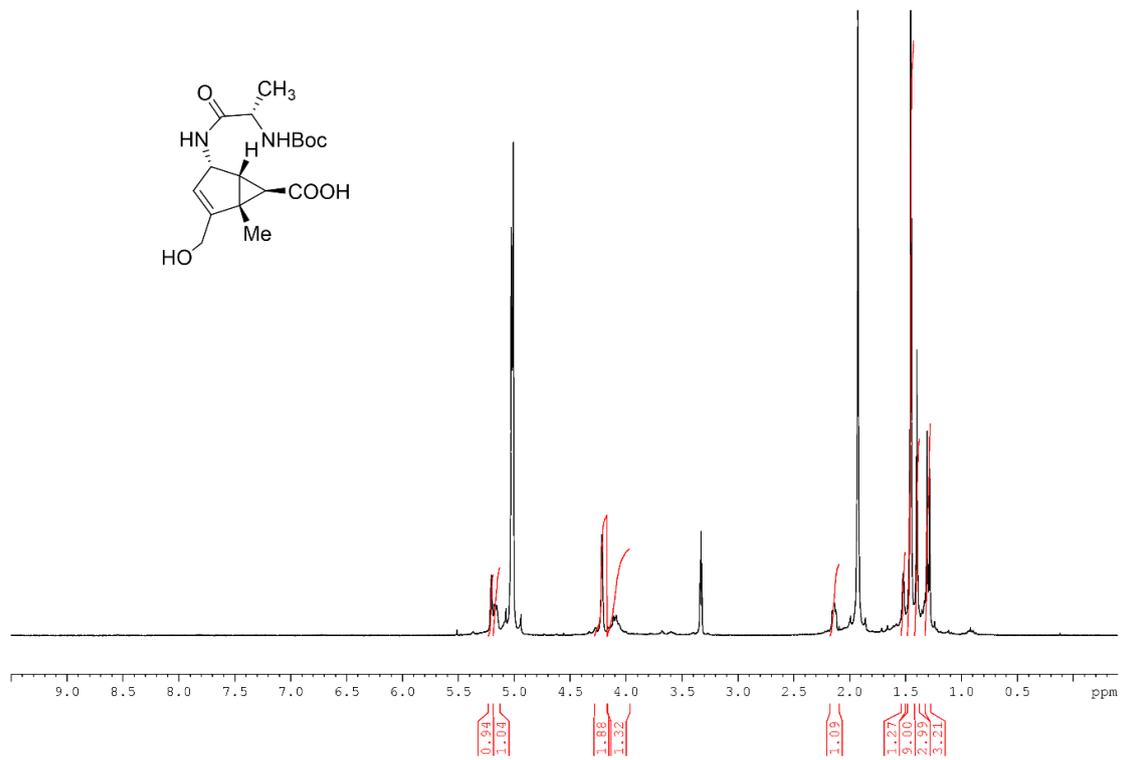
¹H-NMR-(400 MHz, MeOD-*d*4): δ 5.18 (s, 1H, H3), 5.15 (d m, 1H, *J*₄₋₅ = 6.0 Hz, 1H, H4), 4.30-4.10 (2 dm, 2H, *J*_{2'-α-2'b} = 16.0 Hz, H2'), 4.12-3.99 (br q, 1H, *J*_{HαA1-HβA1} = 7.0 Hz, Hα A1), 2.15-2.08 (m, 1H, H5), 1.53-1.47 (m, 1H, H6), 1.45 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.29 (d, 3H, *J*_{HβA1-HαA1} = 7.0 Hz, Hβ A1).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, MeOD-*d*4): 179.9 (C=OOH), 175.8 (C=ONH), 157.5 (C=OOC(CH₃)₃), 155.1 (C2), 123.7 (C3), 80.6 (OC(CH₃)₃), 59.9 (C2'), 56.9 (C4), 50.1 (Cα A1), 38.3 (C5), 37.9 (C1), 32.0 (C6), 28.7 (OC(CH₃)₃), 18.9 (Cβ A1), 11.3 (C1').

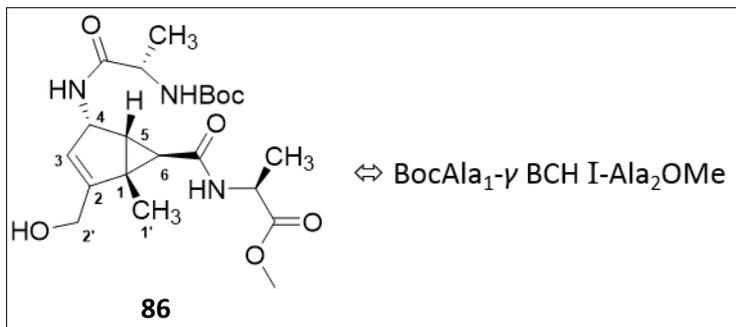
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₁₇H₂₆N₂O₆Na 377.1689; Found 377.1702.

IR ν (cm⁻¹): 3388 (COOH, 2 NH, OH), 2936, 2981, 2509 (C-H), 1708 (C=O acide, C=O carbamate), 1639 (C=O amide), 1444, 1207.

[α]_D²³ -36 (c 0.75, MeOH).



Methyl (2S)-2-[(1R,4S,5R,6R)-4-[(2S)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]propanamido]-2-(hydroxymethyl)-1-methylbicyclo[3.1.0]hex-2-ene-6-carbonyl]propanoate (86)



(*S*)-1-methoxy-1-oxopropan-2-aminium chloride (11 mg, 0.08 mmol, 3.0 equiv), DIPEA (22 μ l, 0.13 mmol, 5.0 equiv), then HATU (15 mg, 0.04 mmol, 1.5 equiv) were added to a stirred solution of compound **106** (9 mg, 0.03 mmol, 1.0 equiv) in dry DMF (1 ml). The reaction mixture was stirred for 3 h at 45 °C. The mixture was treated with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (1 ml). The product was extracted with DCM three times (5 ml). The combined organic layers were washed with a solution of hydrochloric acid 1 M (5 ml), water (5 ml), then dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 96:4 v/v) as eluent to afford the title compound (7 mg, 62 %) as colorless oil.

Formula: C₂₁H₃₃N₃O₇

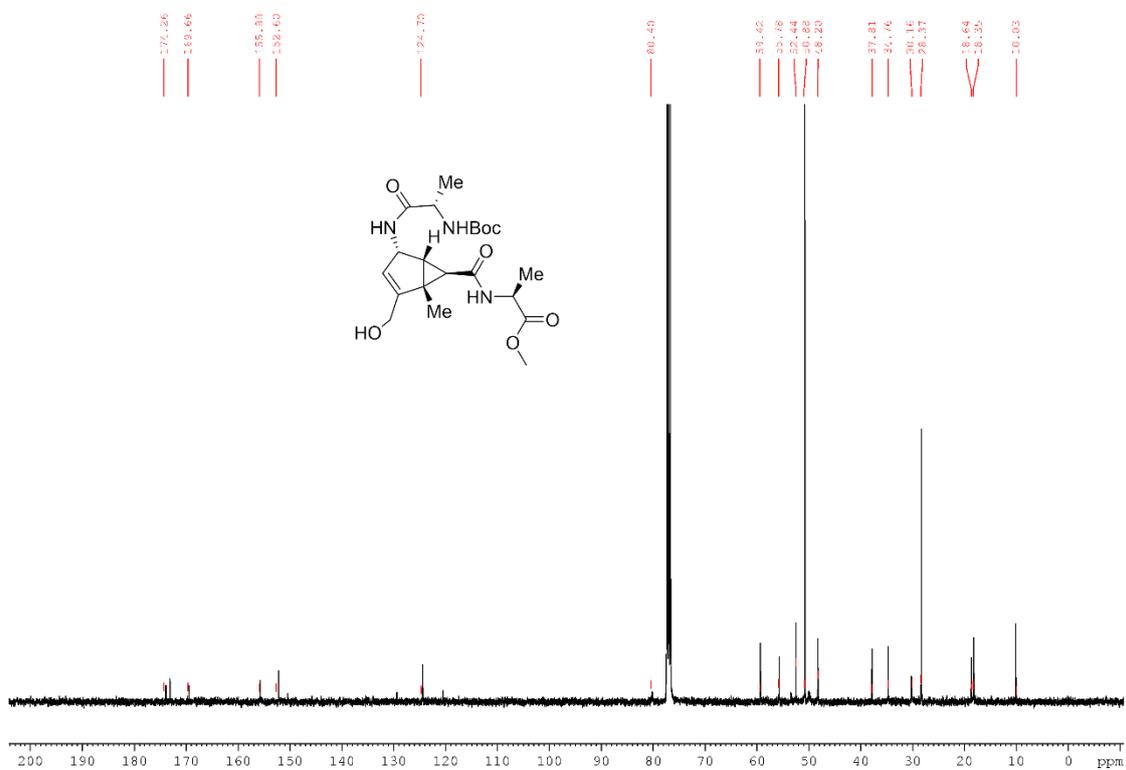
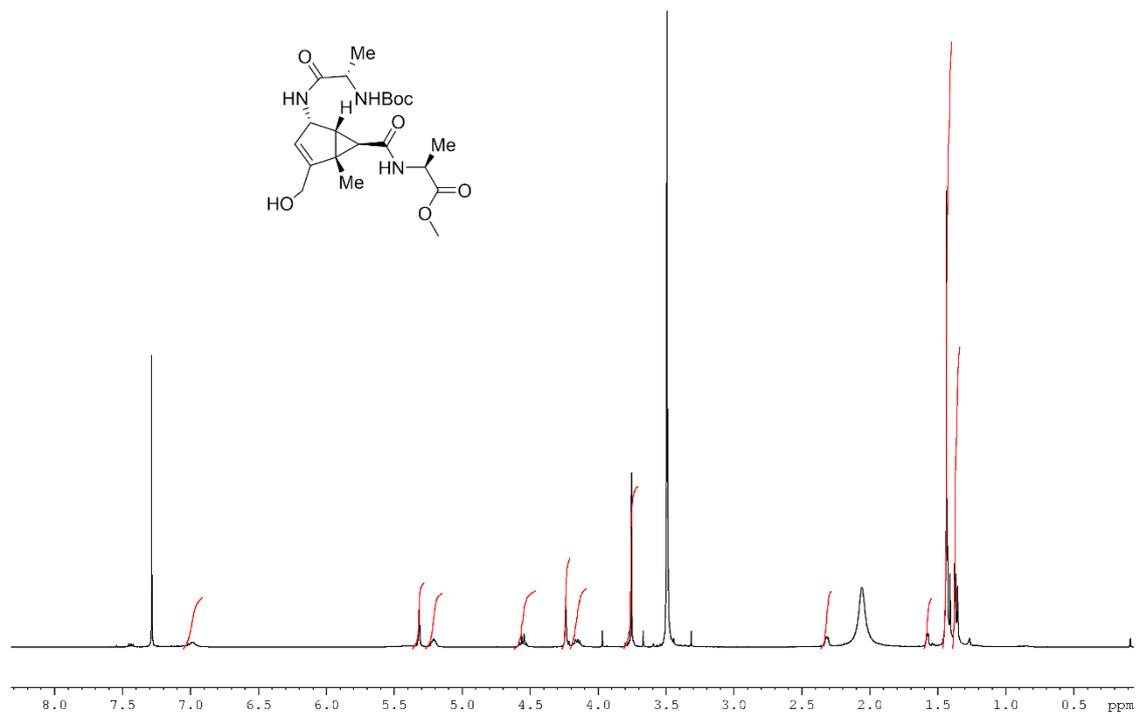
Molecular weight: 439.51 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.96 (s, 1H, NH), 5.30 (s, 1H, H₃), 5.25-5.13 (m, 1H, H₄), 4.52 (br q, 1H, $J_{H\alpha A2-H\beta A2} = 7.0$ Hz, H α A2), 4.22 (s, 2H, H_{2'}), 4.18-4.09 (m, 1H, H α A1), 3.73 (s, 3H, COOCH₃), 2.29 (dd, 1H, $J_{5-4} = 6.0$ Hz, $J_{5-6} = 3.5$ Hz, H₅), 2.02 (br s, 1H, OH), 1.55 (d, 1H, $J_{6-5} = 3.5$ Hz, H₆), 1.41 (s, 9H, COOC(CH₃)₃), 1.39 (d, 3H, $J_{H\beta A1-H\alpha A1} = 7.0$ Hz, H β A2), 1.35 (s, 3H, CH₃), 1.34 (d, 3H, $J_{H\beta A1-H\alpha A1} = 7.0$ Hz, H β A1).

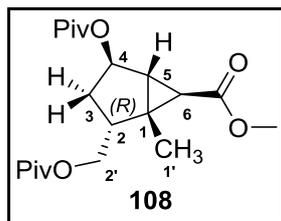
¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 174.3 (CONH), 173.2 (CONH), 169.7 (COOMe), 155.9 (COOC(CH₃)₃), 152.6 (C₂), 124.7 (C₃), 80.4 (OC(CH₃)₃), 59.4 (C_{2'}), 55.8 (C₄), 52.4 (OCH₃), 50.9 (C α A2), 48.2 (C α A1), 37.8 (C₁), 34.8 (C₆), 30.2 (C₅), 28.4 (OC(CH₃)₃), 18.6 (C β A1), 18.4 (C β A2), 10.0 (C_{1'}).

IR v (cm⁻¹): 3322 (OH, 3 NH), 2953, 2923 (C-H), 1722 (C=O ester), 1717 (C=O carbamate), 1665 (2 C=O amide), 1527, 1456, 1363, 1220, 1167.

[α]_D²³ -67 (c 0.20, CHCl₃).



Methyl (1*R*,2*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-1-methyl-4-(pivaloyloxy)-2-[(pivaloyloxy)methyl]bicyclo[3.1.0]hexane-6-carboxylate (108)



Compound **69** (100 mg, 0.27 mmol, 1.0 equiv) was solubilized in EtOH (5 ml). Hydrazine monohydrate (405 μ l, 5.40 mmol, 20 equiv) then hydrogen peroxide (360 μ l, 5.40 mmol, 20 equiv) were added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt. After 3 h, same amounts of reagents were added to the reaction mixture. This last procedure was repeated twice. The product was extracted with DCM four times (15 ml). The combined organic layers were washed twice with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (10 ml), water (10 ml), dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM as eluent to give a colorless film (95 mg, 95 %).

Formula: C₂₀H₃₂O₆

Molecular weight: 368.22 g/mol

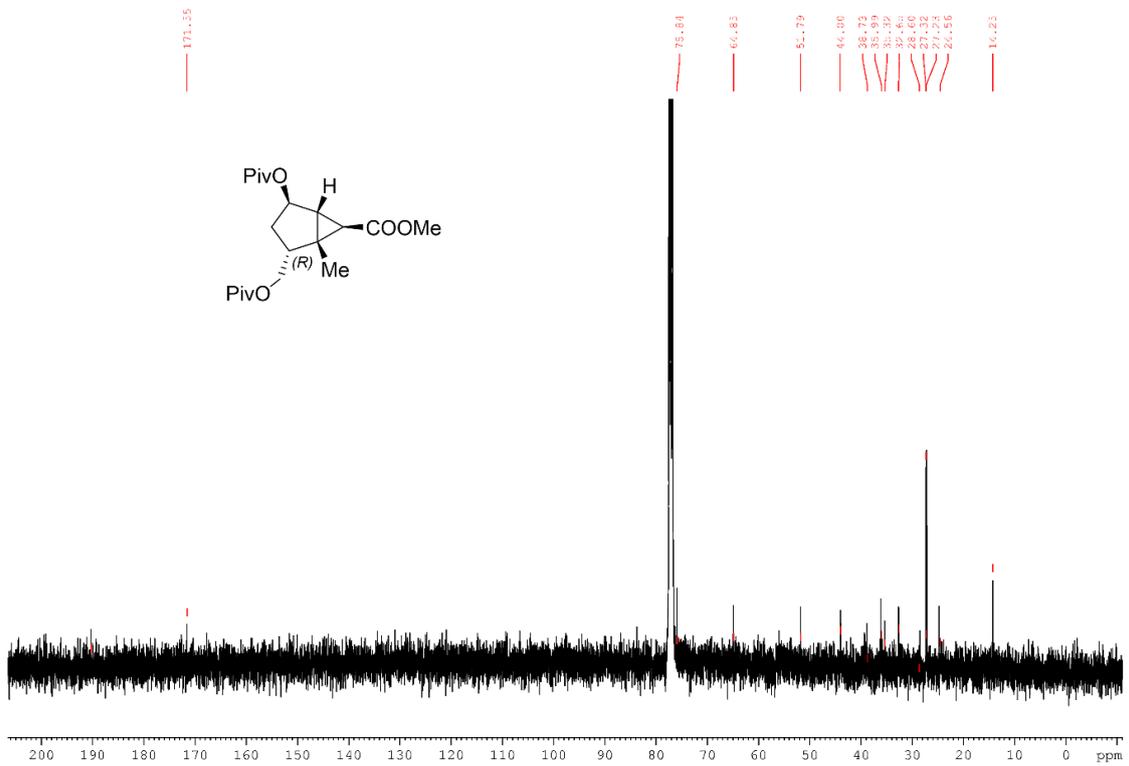
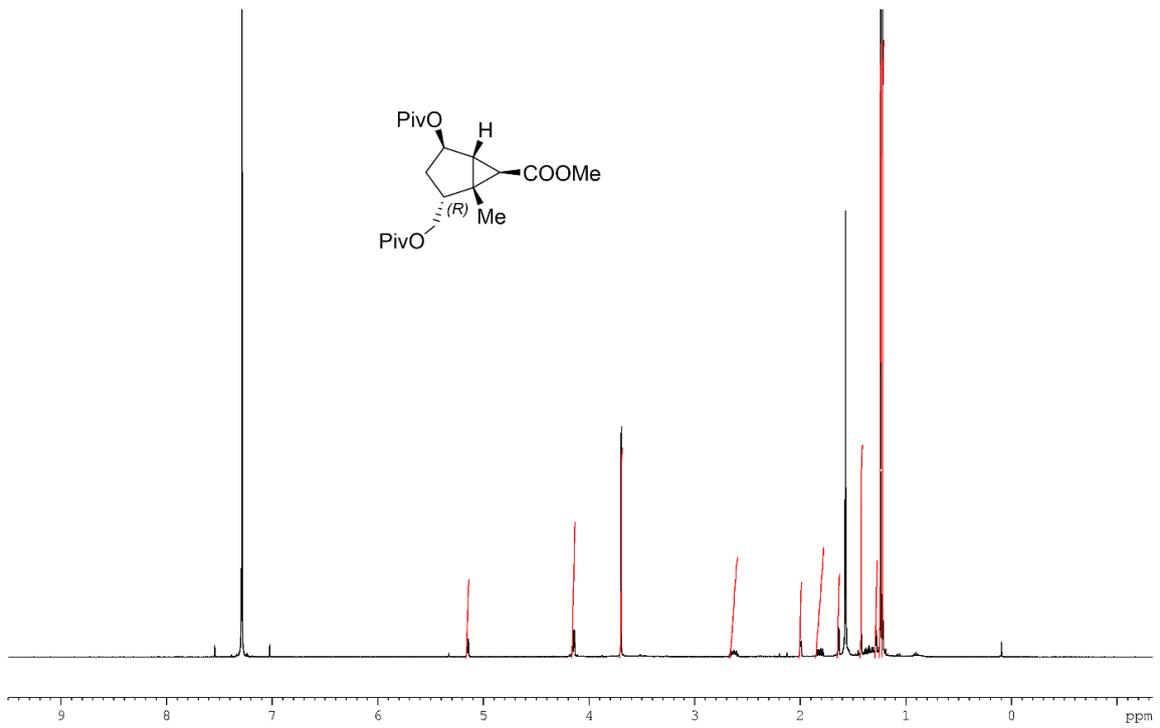
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.12 (br d, 1H, $J_{4-3b} = 5.0$ Hz, H4), 4.17-4.08 (2 dd, 2H, $J_{2'a-2} = 6.0$ Hz, $J_{2'b-2} = 6.5$ Hz, $J_{2'a-2'b} = 11.0$ Hz, H2'), 3.67 (s, 3H, COOCH₃), 2.65-2.55 (m, 1H, H2), 1.97 (br d, 1H, $J_{5-6} = 3.5$ Hz, H5), 1.79 (ddd, 1H, $J_{3a-3b} = 15.5$ Hz, $J_{3a-2} = 7.5$ Hz, $J_{3a-2'} = 1.5$ Hz, H3a), 1.61 (d, 1H, $J_{6-5} = 3.5$ Hz, H6), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.33 (ddd, 1H, $J_{3b-3a} = 15.5$ Hz, $J_{3b-2} = 11.0$ Hz, $J_{3b-4} = 5.0$ Hz, H3b), 1.21-1.19 (2s, 18H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 178.3 (COC(CH₃)₃), 171.6 (COOCH₃), 75.8 (C4), 64.9 (C2'), 51.7 (COOCH₃), 44.0 (C2), 38.7 (COC(CH₃)₃), 36.0 (C5), 35.3 (C1), 32.7 (C3), 27.3 (COC(CH₃)₃), 27.2 (COC(CH₃)₃), 24.6 (C6), 14.3 (C1').

HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₂₀H₃₂O₆Na 391.2097; Found 391.2083.

IR v (cm⁻¹): 2968, 2936, 2870 (C-H), 1729 (3 C=O ester), 1282, 1150.

[α]_D²³ +115 (c 0.05, CHCl₃).



Methyl (1*R*,2*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-(hydroxymethyl)-1-methyl-4-(pivaloyloxy)bicyclo[3.1.0]hexane-6-carboxylate (114a) and methyl (1*R*,2*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-4-hydroxy-1-methyl-2-((pivaloyloxy)methyl)bicyclo[3.1.0]hexane-6-carboxylate (114b)



Compound **108** (120 mg, 0.33 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry MeOH (5 ml). The reaction mixture was placed under argon atmosphere. 1 M solution of MeONa (326 μ l, 0.33 mmol, 1.0 equiv) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt for 2 h. The reaction was quenched with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (2 ml). The product was extract with DCM (3x10 ml). The combined organic layers were washed with water (10 ml), then dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was removed *in vacuo*. The crude product was chromatographed through silica gel column with cyclohexane/EtOAc (100 to 85:15 v/v) as eluent to afford compound **114a** as colorless syrup (62 mg, 68 %) and **110b** as colorless syrup (21 mg, 23 %). The overall yield of the reaction was 90 %.

Methyl (1*R*,2*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-(hydroxymethyl)-1-methyl-4-(pivaloyloxy)bicyclo[3.1.0]hexane-6-carboxylate (114a)

Formula: C₁₅H₂₄O₅

Molecular weight: 284.35 g/mol

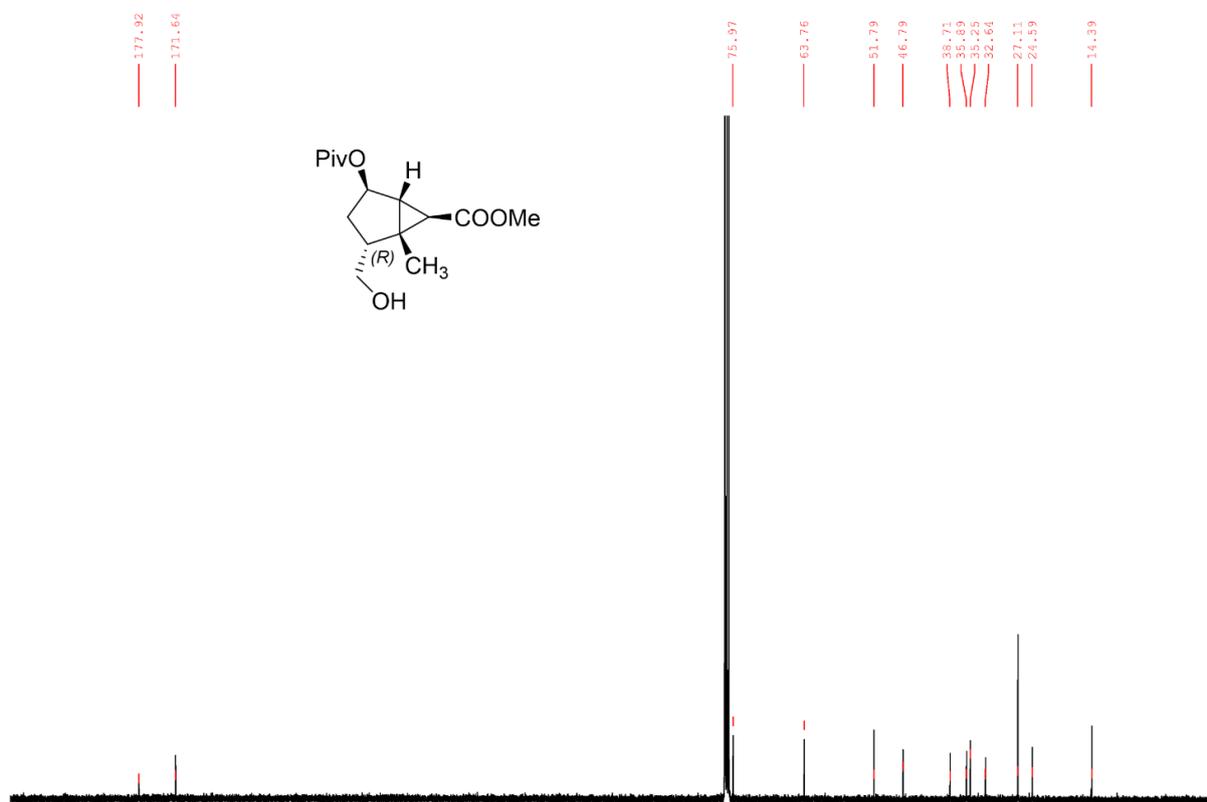
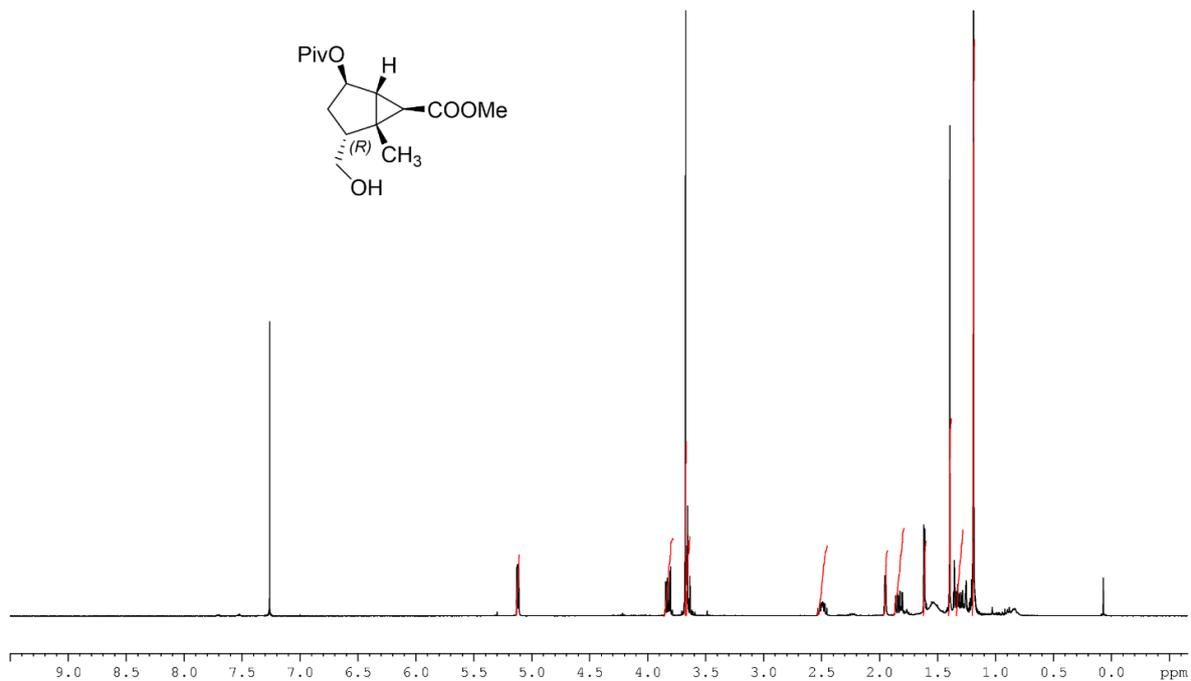
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.12 (br d, 1H, J_{4-3b} = 5.0 Hz, H4), 3.82(dd, 1H, $J_{2'a-2b'}$ = 10.5 Hz, $J_{2'a-2}$ = 5.5 Hz, H2'a), 3.67 (s, 3H, COOCH₃), 3.66 (dd, 1H, $J_{2'a-2b'}$ = 10.5 Hz, $J_{2'b-2}$ = 6.5 Hz, H2'b), 2.54-2.44 (m, 1H, H2), 1.95 (br d, 1H, J_{5-6} = 3.5 Hz, H5), 1.83 (ddd, 1H, J_{3a-3b} = 15.0 Hz, J_{3a-2} = 8.0 Hz, J_{3a-4} = 1.0 Hz, H3a), 1.61 (d, 1H, J_{6-5} = 3.5 Hz, H6), 1.50 (br s, 1H, OH), 1.39 (s, 3H, CH₃), 1.32 (ddd, 1H, J_{3b-3a} = 15.0 Hz, J_{3b-2} = 10.5 Hz, J_{3b-4} = 5.0 Hz, H3b), 1.19 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 177.9 (C=O(CO(CH₃)₃)), 171.6 (C=O(CH₃)), 76.0 (C4), 63.8 (C2'), 51.8 (COOCH₃), 46.8 (C2), 38.7 (CO(CH₃)₃), 35.9 (C5), 35.3 (C1), 32.6 (C3), 27.1 (COC(CH₃)₃), 24.6 (C6), 14.4 (C1').

HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₁₅H₂₄O₅Na 307.1521; Found 307.1518.

IR v (cm⁻¹): 3455 (OH), 2970, 2959, 2935, 2876 (C-H), 1727 (2 C=O ester), 1284, 1174, 1151.

[α]_D²³ +3 (c 1.15, CHCl₃).



Methyl (1R,2R,4R,5R,6R)-4-hydroxy-1-methyl-2-((pivaloyloxy)methyl)bicyclo[3.1.0]hexane-6-carboxylate (114b)

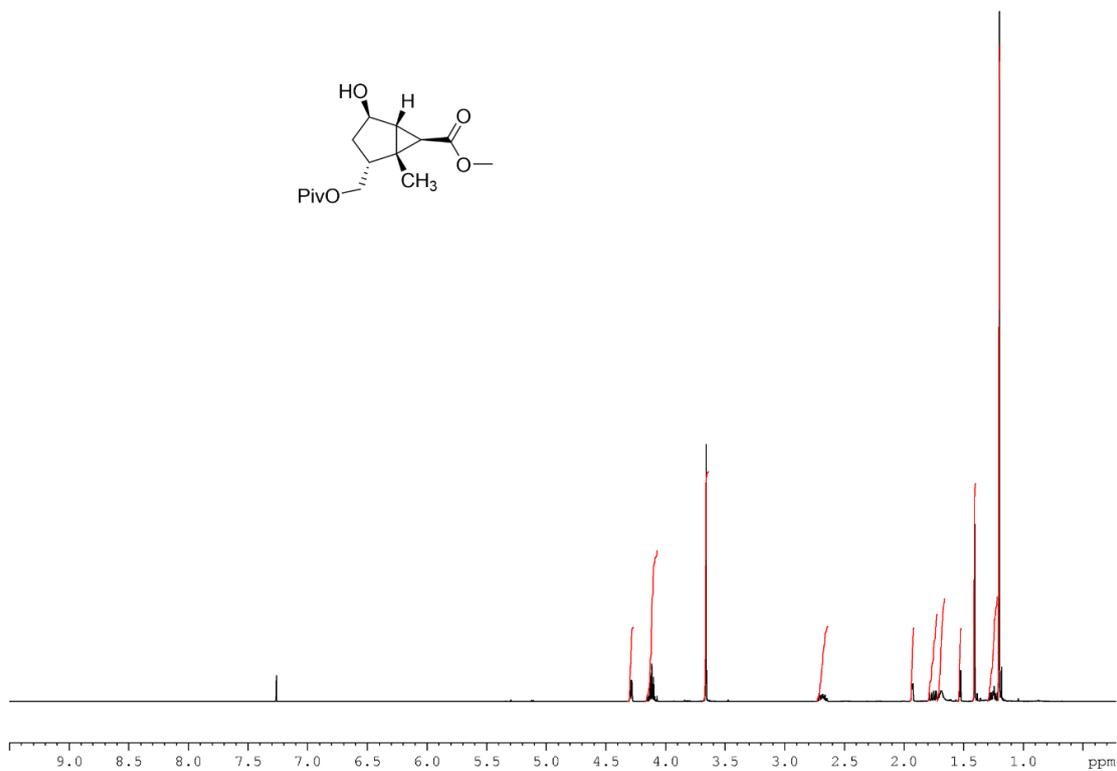
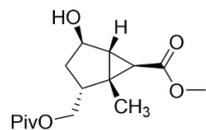
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.29 (br d, 1H, $J_{4-3b} = 5.0$ Hz, H4), 4.14 (dd, 1H, $J_{2'a-2b'} = 10.5$ Hz, $J_{2'a-2} = 5.5$ Hz, H2'a), 4.09 (dd, 1H, $J_{2'a-2b'} = 10.5$ Hz, $J_{2'b-2} = 6.5$ Hz, H2'b), 3.66 (s, 3H, COOCH₃), 2.75-2.62 (m, 1H, H2), 1.95 (br d, 1H, $J_{5-6} = 3.5$ Hz, H5), 1.76 (ddd, 1H, $J_{3a-3b} = 15.0$ Hz, $J_{3a-2} = 8.0$ Hz, $J_{3a-4} = 1.0$ Hz, H3a), 1.69 (br s, 1H, OH), 1.53 (d, 1H, $J_{6-5} = 3.5$ Hz, H6), 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.29-1.21 (ddd, 1H, $J_{3b-3a} = 15.0$ Hz, $J_{3b-2} = 10.5$ Hz, $J_{3b-4} = 5.0$ Hz, H3b), 1.20 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 178.6 (COC(CH₃)₃), 171.8 (COOCH₃), 73.3 (C4), 65.0 (C2'), 51.7 (COOCH₃), 43.4 (C2), 39.0 (COC(CH₃)₃), 38.8 (C5), 35.4 (C1), 35.3 (C3), 27.2 (COC(CH₃)₃), 24.8 (C6), 14.3 (C1').

HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₁₅H₂₄O₅Na 307.1521; Found 307.1532.

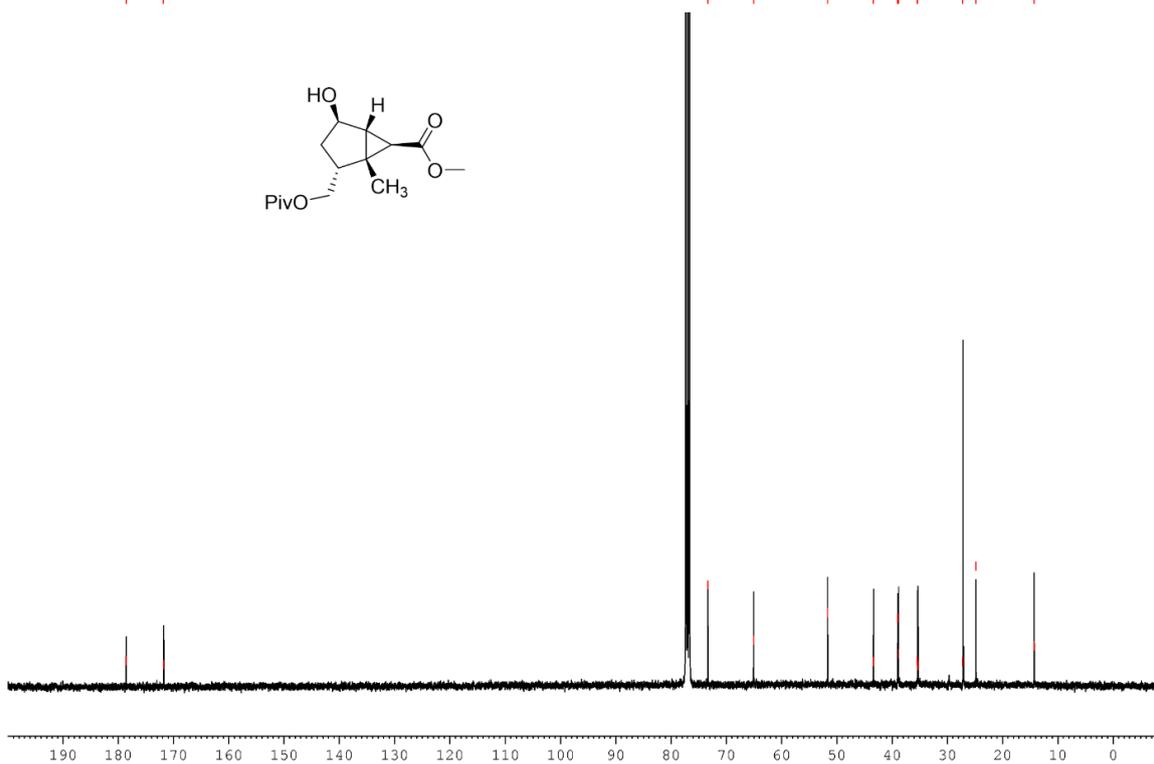
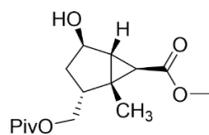
IR ν (cm⁻¹): 3462 (OH), 2957, 2911, 2876 (C-H), 1728 (2 C=O ester), 1286, 1220, 1176, 1157.

[α]_D²⁰-12 (c 1.72, CHCl₃).

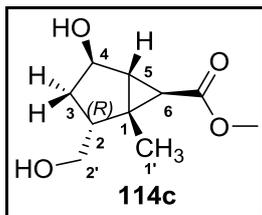


178.56
171.84

73.30
65.02
51.67
43.38
38.98
38.81
35.44
35.32
27.21
24.63
14.29



Methyl (1*R*,2*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-1-methylbicyclo[3.1.0]hexane-6-carboxylate (114c)



Compound **108** (30 mg, 0.08 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry MeOH (2.5 ml). The reaction mixture was placed under inert atmosphere. 1 M solution of MeONa (163 μ l, 0.16 mmol, 2.0 equiv) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 30min. The reaction was quenched with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (1 ml). The product was extract with EtOAc (2x5 ml). The combined organic layers were washed with water (5 ml), then dried over magnesium sulfate, then filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 97:3 v/v) as eluent to give a colorless film (13 mg, 80 %).

Formula: C₁₀H₁₆O₄

Molecular weight: 200.23 g/mol

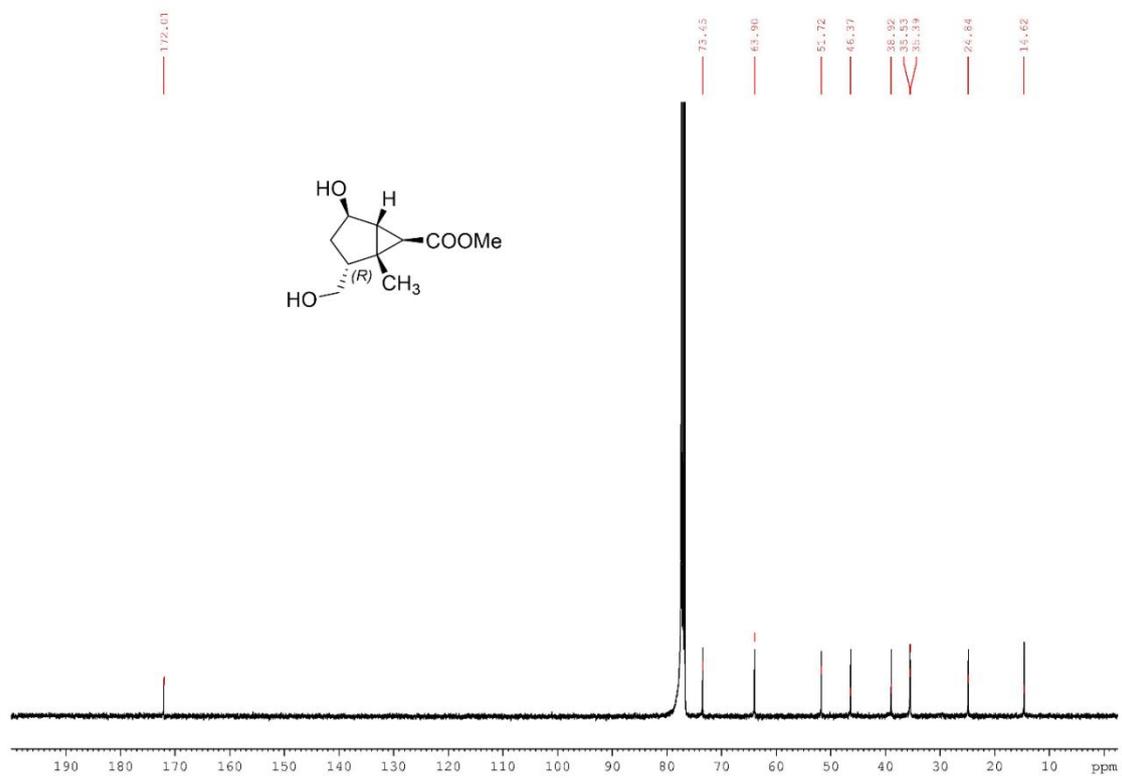
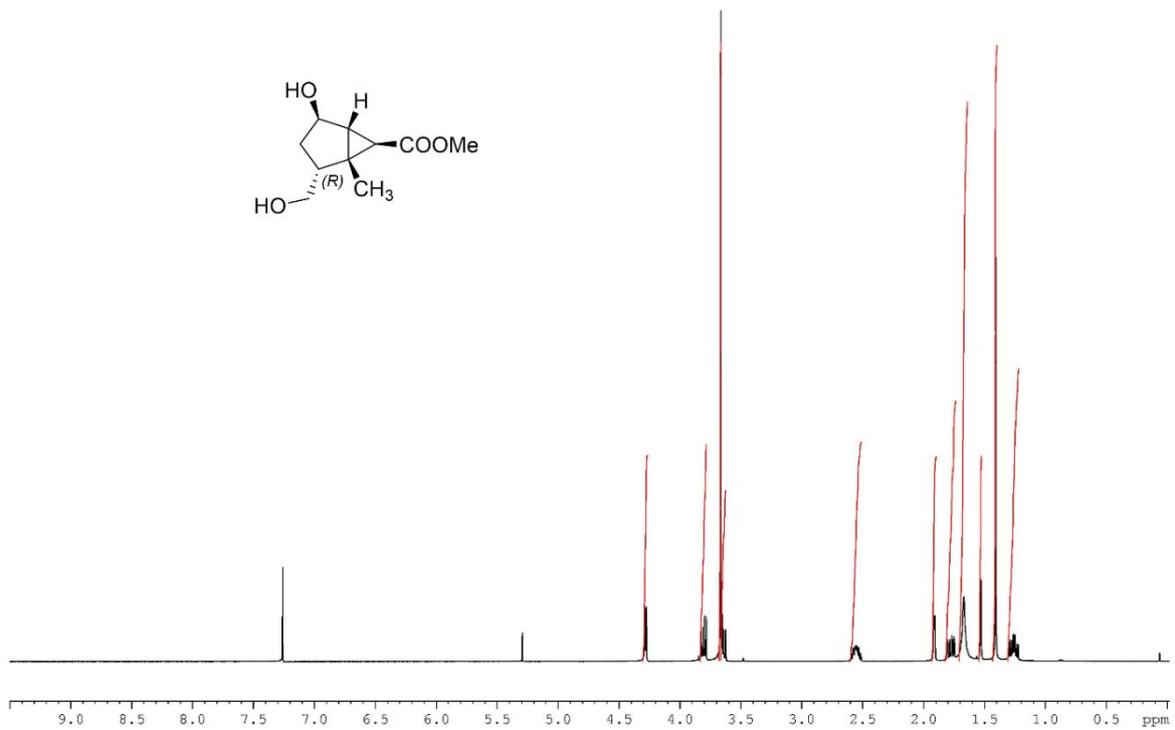
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.28 (d, 1H, J_{4-3b} = 5.0 Hz, H4), 3.81 (dd, 1H, $J_{2'a-2'b}$ = 11.0 Hz, $J_{2'a-2}$ = 5.5 Hz, H2'a), 3.67 (s, 3H, COOCH₃), 3.66-3.65 (m, 1H, H2'b), 2.61-2.51 (m, 1H, H2), 1.91 (d, 1H, J_{5-6} = 3.5 Hz, H5), 1.78 (ddd, 1H, J_{3a-3b} = 15.0 Hz, J_{3a-2} = 8.0 Hz, J_{3a-4} = 1.0 Hz, H3a), 1.67 (br s, 2H, 2 OH), 1.53 (d, 1H, J_{6-5} = 3.5 Hz, H6), 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.31-1.21 (m, 1H, H3b).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 172.0 (C=O), 73.5 (C4), 63.9 (C2'), 51.7 (COOCH₃), 46.4 (C2), 38.9 (C5), 35.5 (C3), 35.4 (C1), 24.8 (C6), 14.6 (C1').

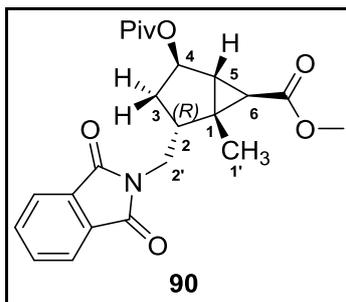
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₁₀H₁₆O₄Na 223.0946; Found 223.0932.

IR v (cm⁻¹): 3361 (2 OH), 2952, 2932, 2882 (C-H), 1714 (C=O ester), 1440, 1232, 1156, 1006.

[α]_D²⁰ -27 (c 0.50, MeOH).



Methyl (1*R*,2*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-1-methyl-4-(pivaloyloxy)-2-[(*N*-phthalimido)methyl]bicyclo[3.1.0] hexane-6-carboxylate (90)



Compound **114a** (50 mg, 0.18 mmol, 1.0 equiv), triphenylphosphine (185 mg, 0.70 mmol, 4.0 equiv), phthalimide (78 mg, 0.53 mmol, 3.0 equiv) were dissolved in dry THF (5 ml). The reaction mixture was cooled at 0 °C with ice bath and diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (138 μ l, 0.70 mmol, 4.0 equiv) was added dropwise. The mixture was allowed to reach rt and stirred for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was chromatographed on silica gel with cyclohexane/EtOAc (95:5 to 80:20 v/v) as eluent to afford the title compound (62 mg, 75 %) as yellowish syrup.

Formula: C₂₃H₂₇NO₆

Molecular weight: 413.47 g/mol

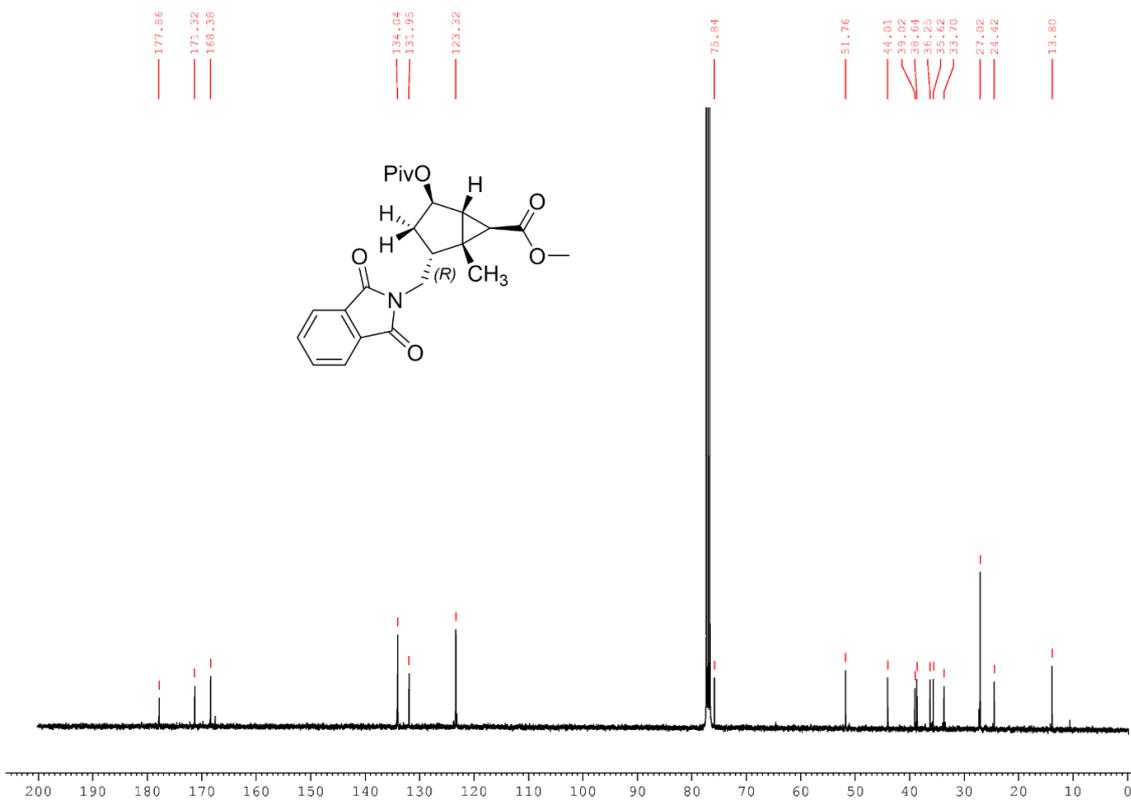
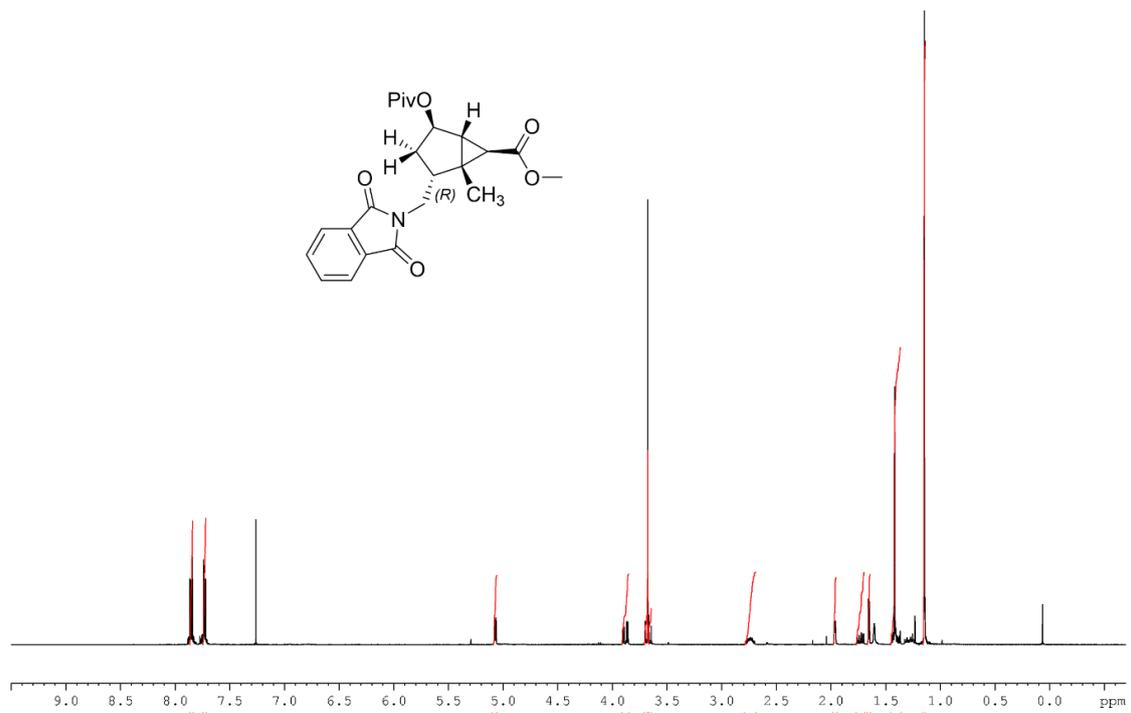
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.86-7.83 (m, 2H, Ar-H), 7.74-7.71 (m, 2H, Ar-H), 5.07 (d, 1H, J_{4-3} = 5.0 Hz, H4), 3.88 (dd, 1H, $J_{2'a-2'b}$ = 14.0 Hz, $J_{2'a-2}$ = 5.0 Hz, H2'a), 3.67 (dd, 1H, $J_{2'b-2'a}$ = 14.0 Hz, $J_{2'b-2}$ = 9.0 Hz, H2'b), 3.67 (s, 3H, COOCH₃), 2.80-2.68 (m, 1H, H2), 1.96 (d, 1H, J_{5-6} = 3.5 Hz, H5), 1.73 (ddd, 1H, J_{3a-3b} = 15.0 Hz, J_{3a-2} = 8.0 Hz, J_{3a-4} = 1.0 Hz, H3a), 1.65 (d, 1H, J_{6-5} = 3.5 Hz, H6), 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.46-1.35 (m, 1H, H3b), 1.20 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 177.9 (CO(CH₃)₃), 171.3 (COOCH₃), 168.4 (2 Ar-CO), 134.0 (2 Ar-C), 132.0 (2 Ar-C), 123.3 (2 Ar-C), 75.8 (C4), 51.8 (COOCH₃), 44.0 (C2), 39.2 (C2'), 38.6 (COC(CH₃)₃), 36.3 (C5), 35.6 (C1), 33.7 (C3), 27.0 (COC(CH₃)₃), 24.4 (C6), 13.8 (C1').

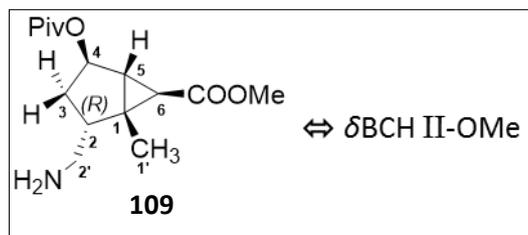
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₂₃H₂₇NO₆Na 436.1736; Found 436.1726.

IR v (cm⁻¹): 2972, 2935, 2876 (C-H), 1773 (2 C=O phthalimide), 1712 (2 C=O ester), 1436, 1396, 1370, 1281, 1226, 1151, 720.

[α]_D²⁰ -43 (c 1.85, DCM).



Methyl (1*R*,2*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-(aminomethyl)-1-methyl-4-(pivaloyloxy)bicyclo[3.1.0]hexane-6-carboxylate (109)



Hydrazine monohydrate (10 μ l, 0.12 mmol, 1.0 equiv) was added to a stirred solution of compound **90** (50 mg, 0.12 mmol, 1.0 equiv) in EtOH (1 ml). The reaction mixture was stirred for 30 min at rt. The precipitate was removed by suction and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 94:6 v/v) as eluent to give a yellowish oil (31 mg, 90 %).

Formula: C₁₅H₂₅NO₄

Molecular weight: 283.37 g/mol

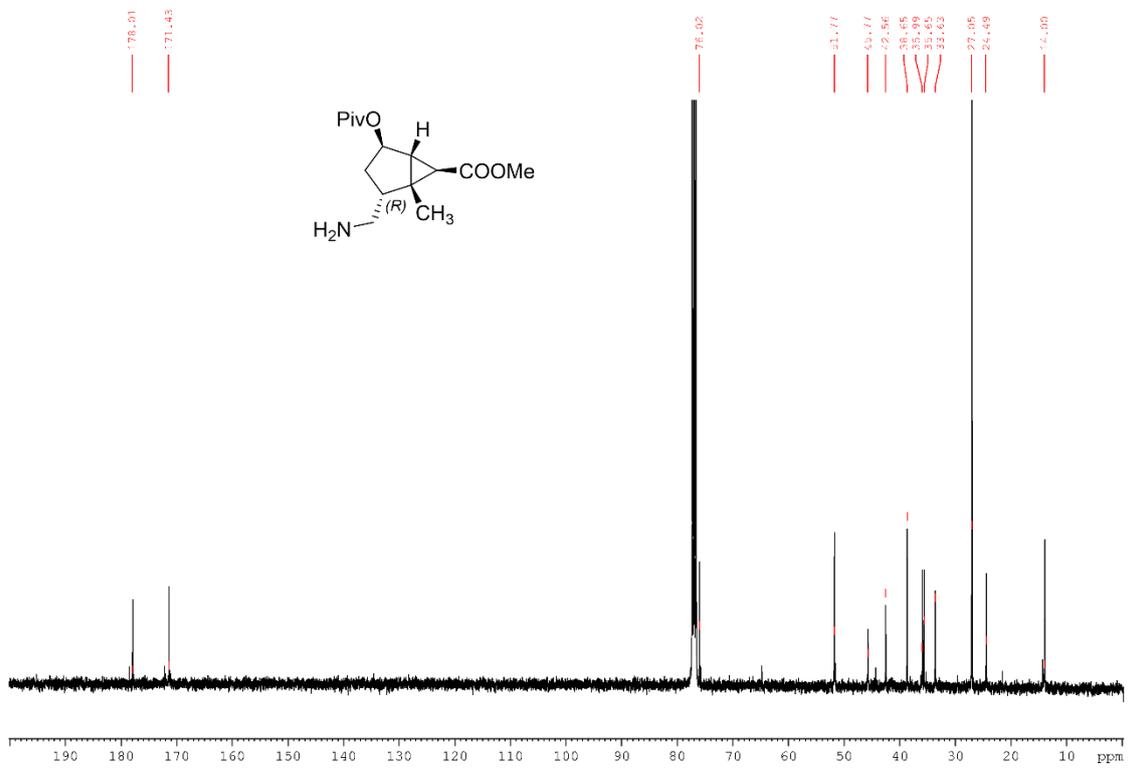
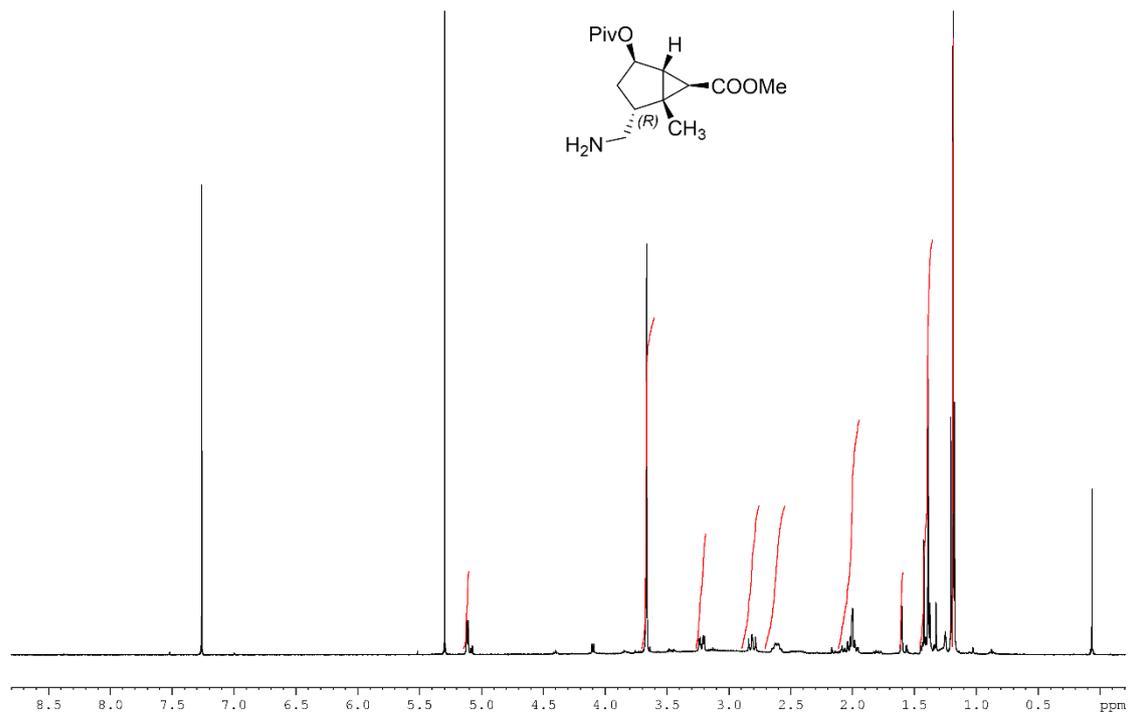
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.11 (d, 1H, J_{4-3} = 5.0 Hz, H4), 3.66 (s, 3H, COOCH₃), 3.22 (dd, 1H, $J_{2'a-2'b}$ = 12.5 Hz, $J_{2'a-2}$ = 4.0 Hz, H2'a), 2.81 (dd, 1H, $J_{2'b-2'a}$ = 12.5 Hz, $J_{2'b-2}$ = 10.0 Hz, H2'b), 2.67-2.56 (m, 1H, H2), 2.10-1.94 (m, 1H, H3a), 2.0 (d, 1H, J_{5-6} = 3.5 Hz, H5), 1.60 (d, 1H, J_{6-5} = 3.5 Hz, H6), 1.46-1.37 (m, 1H, H3b), 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.19 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 178.0 (COC(CH₃)₃), 171.4 (COOCH₃), 76.0 (C4), 51.8 (COOCH₃), 45.8 (C2), 42.6 (C2'), 38.7 (COC(CH₃)₃), 36.0 (C5), 35.7 (C1), 33.6 (C3), 27.1 (COC(CH₃)₃), 24.5 (C6), 14.0 (C1').

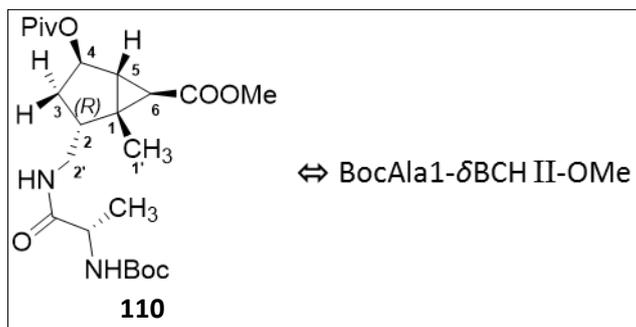
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₁₅H₂₅NO₄Na 306.1681; Found 306.1674.

IR v (cm⁻¹): 2959 (NH), 2929, 2911, 2873 (C-H), 1726 (2 C=O ester), 1440, 1283, 1153.

[α]_D²⁰ -15 (c 0.96, CHCl₃).



Methyl (1*R*,2*R*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-(((2*S*)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]propanamido)methyl)-1-methyl-4-(pivaloyloxy)bicyclo[3.1.0]hexane-6-carboxylate (110)



(*tert*-butoxycarbonyl)-L-Alanine (53 mg, 0.28 mmol, 2.0 equiv), DIPEA (72 μ l, 0.42 mmol, 3.0 equiv), then HATU (97 mg, 0.25 mmol, 1.8 equiv) were added to a stirred solution of compound **109** (40 mg, 0.14 mmol, 1.0 equiv) in DMF (2 ml). The reaction mixture was stirred for 3 h at rt. The mixture was treated with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (5 ml). The product was extracted with DCM three times (5 ml). The combined organic layers were washed with a solution of hydrochloric acid 1 M (5 ml), a saturated aqueous solution of sodium hydrogen carbonate (3x5 ml), water (5 ml), dried over magnesium sulfate and filtered. The solvent was removed *in vacuo*. The crude product was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 99.5:0.05 v/v) as eluent to give a colorless oil (40 mg, 62 %).

Formula: C₂₃H₃₈N₂O₇

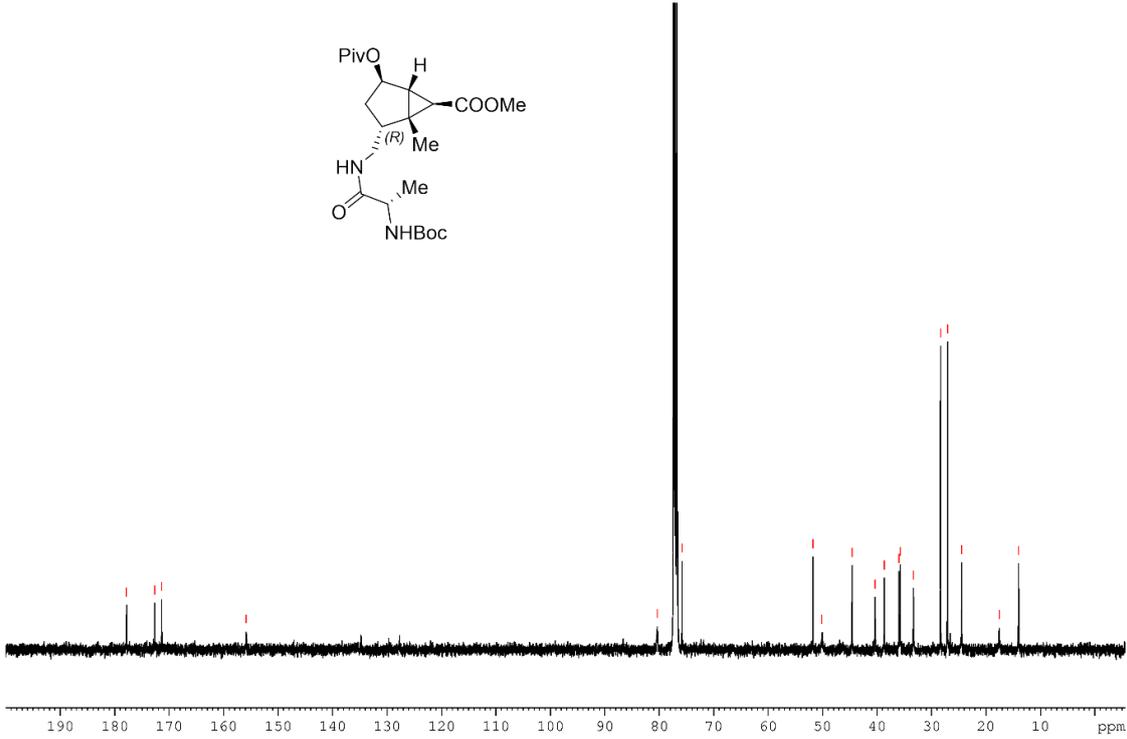
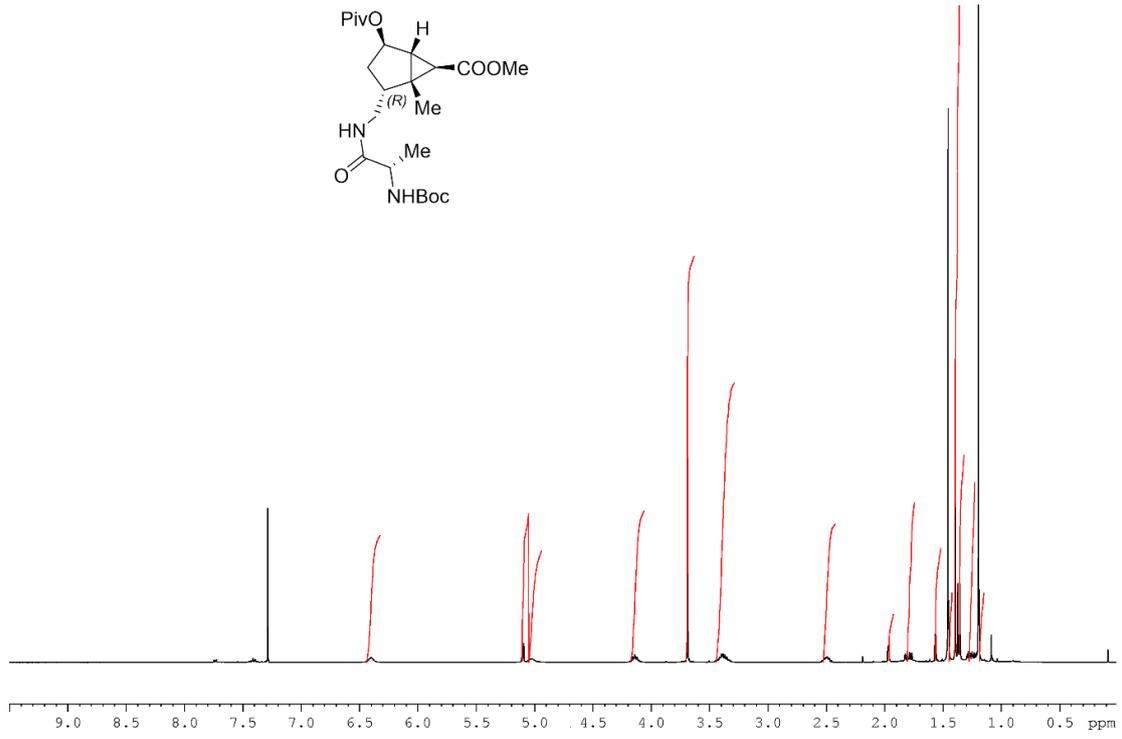
Molecular weight: 454.56 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.38 (br s, 1H, NH δ BCH II), 5.07 (d, 1H, J_{4-3b} = 5.0 Hz, H4), 5.0 (br s, 1H, NH A1), 4.16-4.07 (m, 1H, H α A1), 3.67 (s, 3H, COOCH₃), 3.44-3.28 (m, 2H, H2'), 2.53-2.42 (m, 1H, H2), 1.94 (d, 1H, J_{5-6} = 3.5 Hz, H5), 1.77 (dd, 1H, J_{3a-3b} = 15.0 Hz, J_{3a-2} = 7.5 Hz, H3a), 1.54 (d, 1H, J_{6-5} = 3.5 Hz, H6), 1.43 (s, 9H, COOC(CH₃)₃), 1.37 (s, 3H, CH₃), 1.34 (d, 3H, $J_{CH3A1-H\alpha A1}$ = 7.0 Hz, H β A1), 1.28-1.19 (m, 1H, H3b), 1.17 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

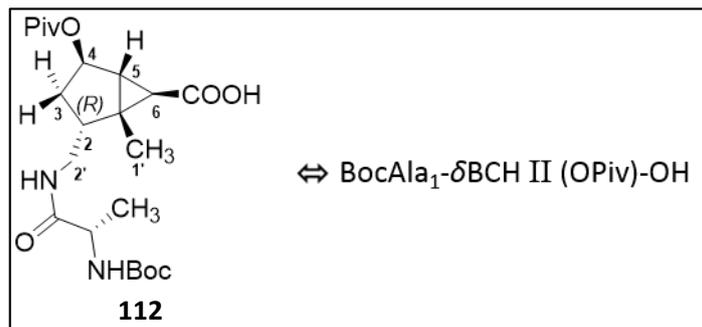
¹³C{¹H}-NMR (100 MHz, CDCl₃): 177.9 (COC(CH₃)₃), 172.7 (CONH), 171.6 (COOCH₃), 156.0 (COOC(CH₃)₃), 80.4 (COOC(CH₃)₃), 75.9 (C4), 53.9 (COOCH₃), 50.2 (C α A1), 44.6 (C2), 40.4 (C2'), 38.7 (COOC(CH₃)₃), 36.0 (C5), 35.9 (C1), 33.4 (C3), 28.4 (COOC(CH₃)₃), 27.2 (COC(CH₃)₃), 24.6 (C6), 17.7 (CH₃ A1), 14.0 (C1').

IR v (cm⁻¹): 3322 (2 NH), 2976, 2933, 2875 (C-H), 1725 (2 C=O ester, C=O carbamate), 1662 (C=O amide), 1171, 1152.

[α]_D²⁰ -80 (c 0.16, CHCl₃).



(1R,2R,4R,5R,6R)-2-((2S)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propanamido)methyl)-1-methyl-4-(pivaloxy)bicyclo[3.1.0]hexane-6-carboxylic acid (112**)**

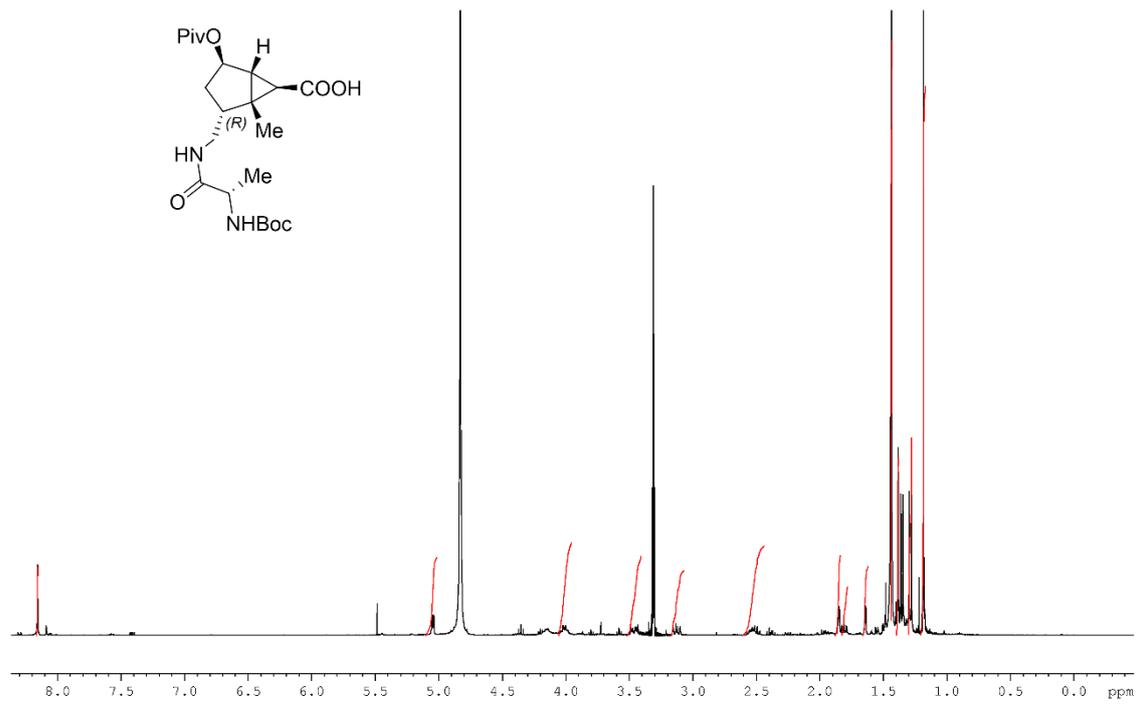


Lithium hydroxide monohydrate (19 mg, 0.46 mmol, 6.0 equiv) was added to a stirred solution of compound **110** (35 mg, 0.08 mmol, 1.0 equiv) in mixture of MeOH/water/THF (2.5 ml, 1:0.5:1, v/v). The reaction mixture was stirred for 5 h at rt. The organic layer was removed under reduce pressure and the aqueous layer was acidified until pH = 1-2 with a solution of hydrochloric acid 1 M (3 ml). The product was extracted with EtOAc (4x5 ml). The combined organic layers were washed with water (5 ml), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH 1% AcOH (100 to 96:4 v/v) as eluent to afford the title compound (11 mg, 57 %) as a yellow oil.

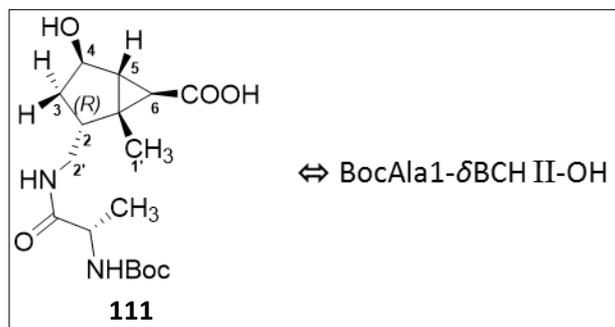
Formula: C₂₂H₃₆N₂O₇

Molecular weight: 440.54 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, MeOD-*d*4): δ 8.18 (br s, 1H, COOH), 5.04 (d, 1H, *J*_{4-3b} = 5.0 Hz, H4), 4.10-3.98 (m, 1H, H_{αA1}), 3.48 (dd, 1H, *J*_{2'a-2'b} = 13.5 Hz, *J*_{2'a-2} = 5.0 Hz, H2'a), 3.15 (dd, 1H, *J*_{2'b-2'a} = 13.5 Hz, *J*_{2'b-2} = 9.0 Hz, H2'b), 2.61-2.46 (m, 1H, H2), 1.87 (d, 1H, *J*₅₋₆ = 3.5 Hz, H5), 1.86-1.79 (m, 1H, H3a), 1.66 (d, 1H, *J*₆₋₅ = 3.5 Hz, H6), 1.46 (s, 9H, COOC(CH₃)₃), 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.43-1.36 (m, 1H, H3b), 1.31 (d, 3H, *J*_{CH3A1-H_{αA1}} = 7.0 Hz, H_B A1), 1.20 (s, 9H, COC(CH₃)₃).



(1R,2R,4R,5R,6R)-2-((2S)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propanamido)methyl)-4-hydroxy-1-methylbicyclo[3.1.0]hexane-6-carboxylic acid (111**)**



Lithium hydroxide monohydrate (11 mg, 0.26 mmol, 6.0 equiv) was added to a stirred solution of compound **110** (20 mg, 0.04 mmol, 1.0 equiv) in mixture of MeOH/water/THF (2.5 ml, 1:0.5:1, v/v). The reaction mixture was stirred for 5 h at 40 °C. The organic layer was removed under reduce pressure and the aqueous layer was acidified until pH = 1-2 with a solution of hydrochloric acid 1 M (2 ml). The product was extracted with EtOAc (4x5 ml). The combined organic layers were washed with water (5 ml), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH 1% AcOH (100 to 96:4 v/v) as eluent to afford the title compound (8 mg, 57 %) as a white film.

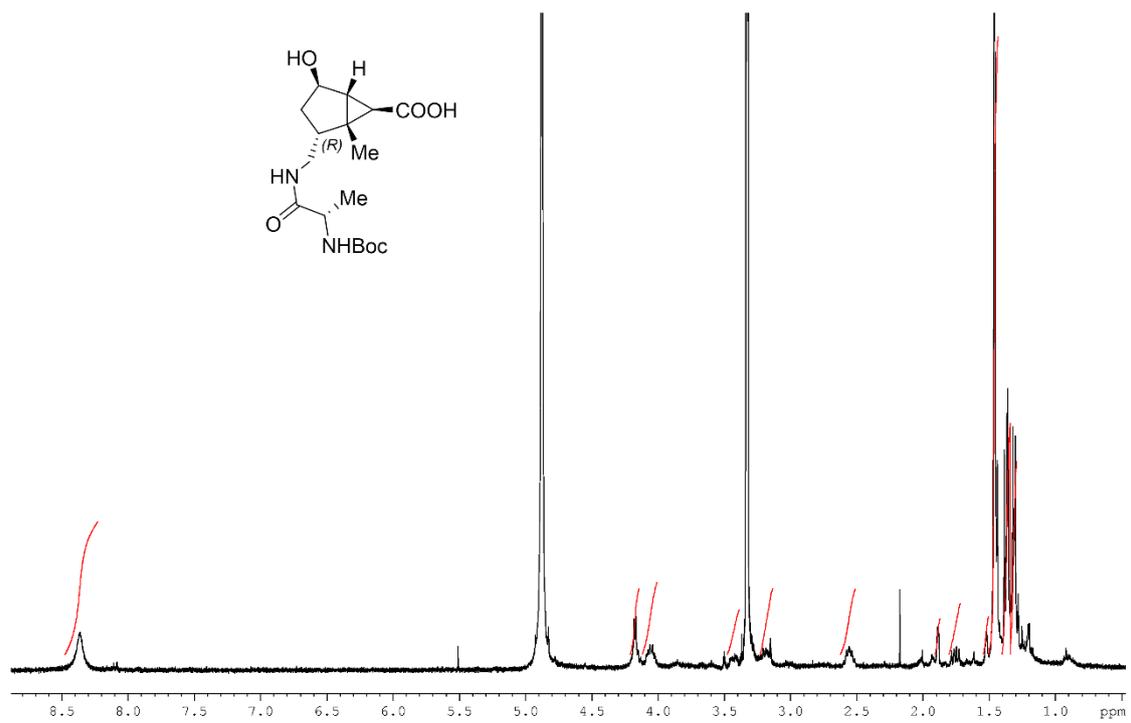
Formula: C₁₇H₂₈N₂O₆

Molecular weight: 356.42 g/mol

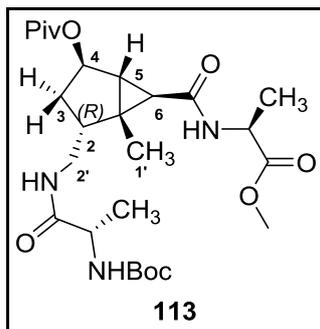
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.36 (br s, 1H, COOH), 4.17 (d, 1H, *J*_{4-3b} = 5.0 Hz, H4), 4.11-4.00 (m, 1H, H_αA1), 3.48-3.38 (m, 1H, H2'a), 3.23-3.14 (m, 1H, H2'b), 2.63-2.48 (m, 1H, H2), 1.89 (d, 1H, *J*₅₋₆ = 3.5 Hz, H5), 1.76 (dd, 1H, *J*_{3a-3b} = 15.0 Hz, *J*_{3a-2} = 8.0 Hz, H3a), 1.52 (d, 1H, *J*₆₋₅ = 3.5 Hz, H6), 1.46 (s, 9H, COOC(CH₃)₃), 1.39 (s, 3H, CH₃), 1.34-1.27 (m, 1H, H3b), 1.31 (d, 3H, *J*_{CH3A1-H_αA1} = 7.0 Hz, H_βA1).

IR ν (cm⁻¹): 3253, 3308 (COOH, OH, 2 NH), 2969, 2920, 2854 (C-H), 1660 (C=O acide, C=O carbamate), 1636 (C=O amide), 1541, 1367, 1248, 1167.

[α]_D²⁵ -29 (c 0.17, MeOH).



Methyl (2S)-2-[(1R,2R,4R,5R,6R)-2-[(2S)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propanamido]methyl]-1-methyl-4-(pivaloyloxy)bicyclo[3.1.0]hexane-6-carboxamide]propanoate (113)



(S)-1-methoxy-1-oxopropan-2-aminium chloride (10 mg, 0.07 mmol, 3.0 equiv), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (19 μ l, 0.11 mmol, 5.0 equiv), then 1-[*bis*(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) (13 mg, 0.03 mmol, 1.5 equiv) were added to a stirred solution of compound **112** (10 mg, 0.02 mmol, 1.0 equiv) in DMF (1.5 ml). The reaction mixture was stirred for 3h at 45 °C. The mixture was treated with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (1 ml). The product was extracted with DCM (3x5 ml). The combined organic layers were washed with a solution of hydrochloric acid 1 M (5 ml), water (5 ml), dried over magnesium sulfate, then filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 96:4 v/v) as eluent to afford the title compound (6 mg, 58 %) as a colorless oil.

Formula: C₂₆H₄₃N₃O₈

Molecular weight: 525.31 g/mol

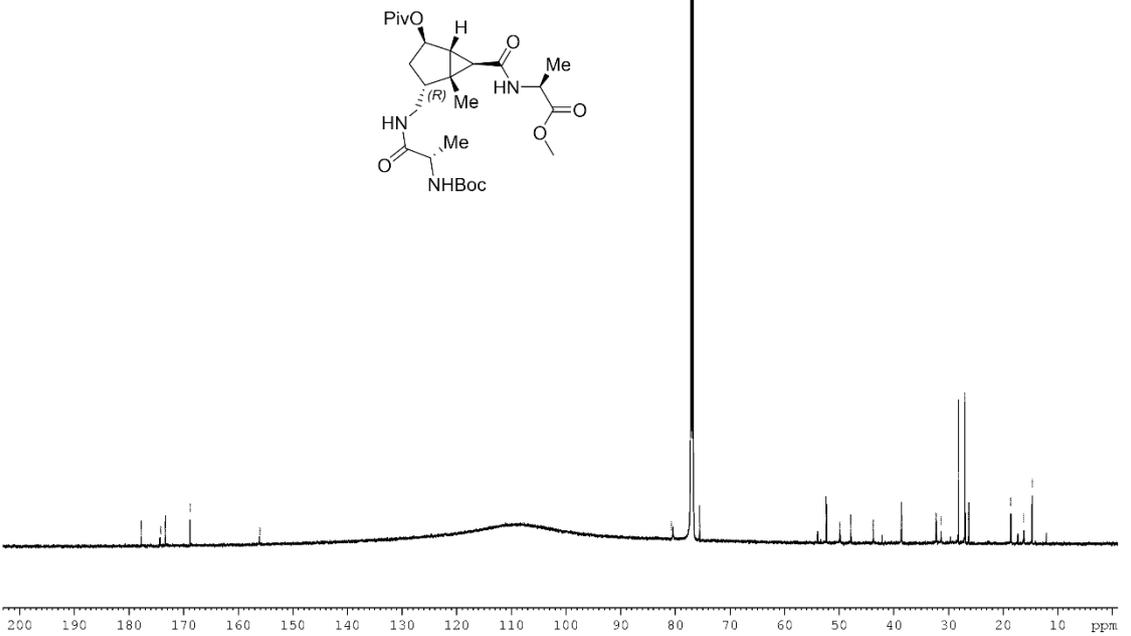
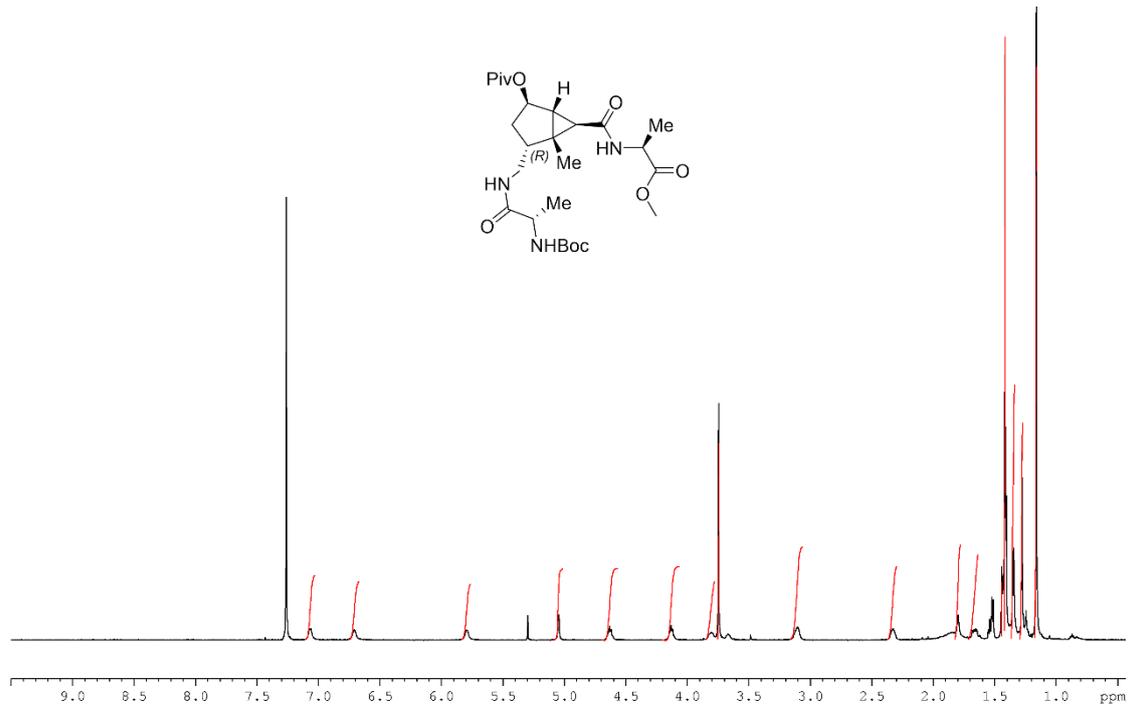
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.0 (br d, 1H, $J_{\text{NH}A2-\text{H}\alpha A2} = 7.5$ Hz, NH A2), 6.71 (br s, 1H, NH δ BCH II), 5.80 (br s, 1H, NH A1), 5.05 (d, 1H, $J_{\text{H}4-\text{H}3a} = 4.5$ Hz, H4), 4.63 (br q, 1H, $J_{\text{H}\alpha A2-\text{H}\beta A2} = 7.0$ Hz, H α A2), 4.13 (br q, 1H, $J_{\text{H}\alpha A1-\text{H}\beta A1} = 7.0$ Hz, H α A1), 3.85-3.77 (m, 1H, H2'a), 3.75 (s, 3H, COOCH₃), 3.16-3.06 (m, 1H, H2'b), 2.39-2.29 (m, 1H, H2), 1.8 (br s, 1H, H5), 1.66 (dd, 1H, $J_{\text{H}3a-\text{H}3b} = 14.0$ Hz, $J_{\text{H}3a-\text{H}2} = 7.0$ Hz, H3a), 1.44 (d, 1H, $J_{6-5} = 2.5$ Hz, H6), 1.41 (s, 12H, COO(CCH₃)₃ and H β A2), 1.35 (d, 4H, $J_{\text{H}\beta A1-\text{H}\alpha A1} = 7.0$ Hz, H β A1 and H3b), 1.28 (s, 3H, CH₃), 1.16 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

¹³C{¹H}-NMR (150 MHz, CDCl₃): 177.7 (CO(C(CH₃)₃)), 174.2 (CONH), 173.4 (CONH), 168.8 (COOCH₃), 156.0 (COO(C(CH₃)₃)), 80.7 (COOC(CH₃)₃), 75.5 (C4), 52.4 (COOCH₃), 50.0 (C α A1), 47.9 (C α A2), 43.8 (C2), 38.7 (C2' and COC(CH₃)₃), 32.3 (C3 and C1), 31.4 (C5), 28.2 (COO(CCH₃)₃), 27.0 (COC(CH₃)₃), 26.4 (C6), 18.6 (CH₃ A2), 16.3 (CH₃ A1), 14.7 (C1').

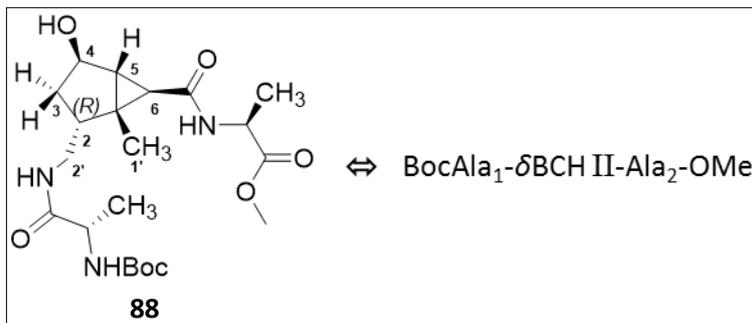
HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₂₆H₄₃NO₈Na 548.2948; Found 548.2947.

IR v (cm⁻¹): 3302 (3 NH), 2977, 2929, 2874 (C-H), 1723 (2 C=O ester, C=O carbamate), 1657 (2 C=O amide), 1534, 1456, 1367, 1283, 1247, 1158.

[α]_D²⁰ -10 (c 0.13, CHCl₃).



Methyl (2S)-2-[(1R,2R,4R,5R,6R)-2-[(2S)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propanamido)methyl]-4-hydroxy-1-methylbicyclo[3.1.0]hexane-6-carboxamide]propanoate (88)



(S)-1-methoxy-1-oxopropan-2-aminium chloride (5 mg, 0.03 mmol, 3.0 equiv), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (10 μ l, 0.06 mmol, 5.0 equiv), then 1-[*bis*(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) (6 mg, 0.02 mmol, 1.5 equiv) were added to a stirred solution of compound **111** (4 mg, 0.01 mmol, 1.0 equiv) in DMF (1 ml). The reaction mixture was stirred for 3 h at 45 °C. The mixture was treated with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (1 ml). The product was extracted with DCM (3x5 ml). The combined organic layers were washed with a solution of hydrochloric acid 1 M (5 ml), water (5 ml), dried over magnesium sulfate, then filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The crude was chromatographed through silica gel column with DCM/MeOH (100 to 95:5 v/v) as eluent to afford the title compound (2 mg, 44 %) as a colorless oil.

Purification and characterization are in progress.

III. Molecular Modelling

1. Molecular Dynamics

Peptides were built and typed with the CHARMM force field in the Discovery Studio package. A water cluster was added (300 to 400 water molecules) and the resulting solvated peptides were submitted to a standard dynamic cascade with default parameters, including energy minimization (Steepest Descent with maximum 1000 steps and RMS gradient of 1.0, followed by Adopted Basis NR with maximum 2000 steps and RMS gradient 0.1), equilibration (2 ns) and production at 300K (2 fs time steps). Typically, for each peptide, 5000 conformations were saved over 50 ns production times. For analysis, all the conformations were first superposed on their rigid bicyclohexene (or bicyclohexane) core structure. For sampling, 500 conformations were extracted from the trajectory, starting either from conformation 1 or from conformation 5. Two properties were monitored for the 500 conformations: intramolecular hydrogen bond formation and distance $d(C\alpha_1-C\alpha_4) \leq 7.0 \text{ \AA}$. These were calculated and expressed as percentages, and plotted in excel. For peptide BocAla₁- δ BCHII-Ala₂OMe, an additional 100 ns simulation was achieved and analyzed.

2. DFT calculations

2.1. Selection of starting conformations

A conformational search on peptides BocAla₁- δ BCHI-Ala₂OMe, BocAla₁- δ BCHII-Ala₂OMe and BocAla₁- γ BCHI-Ala₂OMe was carried out with the method "Random Search" implemented in Discovery Studio²³⁹. The energy threshold for conformer selection was set to 5 kcal/mol. Default parameters were used, except the following: the maximum number of conformations was set to 100000, small increments in torsion angles were set (30° for sp³-sp³ and sp³-sp² bonds), and an additional energy minimization step was included. This minimization step used the Smart Minimizer algorithm with the GBMV model for water solvent, with a dielectric constant set to 80, a maximum of 1000 steps and a RMS of 0.1 Å. The RMSD cutoff for final selection of conformers was set to 1 Å. The three lowest energy conformers of each peptide were selected for further DFT geometry optimization and energy calculations.

2.2. DFT geometry optimization and energy calculations

The geometries of the three selected conformers of each peptide BocAla₁- δ BCHI-Ala₂OMe, BocAla₁- δ BCHII-Ala₂OMe and BocAla₁- γ BCHI-Ala₂OMe were further optimized by DFT calculations using the B3LYP functional with the 6-31+G(d) basis set, in GAMESS²⁴⁵. Two independent sets of calculation were done, in vacuum and in water with the PCM solvation model. Default parameters were chosen, except for QMTTOL = 10⁻⁵. IR frequencies were systematically calculated. The absence of imaginary frequencies confirmed the identification of energy minima. The thermal Gibbs free energy corrections were systematically computed at 298.15 K. The conformer populations for each peptide were calculated using the Boltzmann equation, from the sum of electronic (including the solvation energy in the case of water) and thermal free energies. Graphical representations were done with Discovery Studio.

Bibliographie

- [1] Sawyers, C. Targeted cancer therapy. *Nature* **2004**, *432*, 294-297
- [2] Otani, N.; Minami, S.; Yamoto, M.; Shikone, T.; Otani, H.; Nishiyama, R.; Otani, T.; Nakano, R. The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 3845-3851
- [3] Tonnesen, M. G.; Feng, X.; Clark, R. A. F. Angiogenesis in Wound Healing. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *5*, 40-46
- [4] http://www.utc.fr/~mastermq/public/publications/qualite_et_biomedical/UTC/master_mts/2004-2005/projets/dasilva_hantzo_saillant/dasilva_hantzo_saillant.html consulté le 12/10/2018
- [5] Ribatti, D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leuk. Res.* **2009**, *33*, 638-644
- [6] Gacche, R N.; Meshram, R. J. Angiogenic factors as potential drug target: efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1846*, 161-179
- [7] Goldmann, E. The growth of malignant disease in man and the lower animals, with special reference to the vascular system. *Proc. Royal Acad. Med.* **1908**, *1*, 1-13
- [8] Ehrmann, R. L.; Knott, M. Choriocarcinoma: Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch-Studied by light and electron microscopy. *J. Natl. Cancer Inst.* **1968**, *41*, 1329-1341
- [9] Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-1186
- [10] Hanahan, D.; Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **1996**, *86*, 353-364
- [11] Baeriswyl, V.; Christofori, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 329-337
- [12] Bergers, G.; Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 401-410
- [13] <http://www.angioworld.com> consulté le 12/10/2018
- [14] Carmeliet, P.; Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **2000**, *407*, 249-257
- [15] Jain, R. K.; Di Tomaso, E.; Duda, D. G.; Loeffler, J. S.; Sorensen, A. G.; Batchelor, T. T. Angiogenesis in brain tumours. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 610-622
- [16] Bidart, M.; Berger, F.; Pelletier, L. Anti-angiogenic therapies: from theory to practice. *Ann. Biol. Clin.* **2013**, *71*, 527-535
- [17] Kamiya, K.; Konno, H.; Tanaka, T.; Baba, M.; Matsumoto, K.; Sakaguchi, T.; Yukita, A.; Asano, M.; Suzuki, H.; Arai, T.; Nakamura, S. Antitumor effect on human gastric cancer and induction of apoptosis by vascular endothelial growth factor neutralizing antibody. *Jpn. J. Cancer Res.* **1999**, *90*, 794-800
- [18] Shaheen, R. M.; Tseng, W. W.; Vellagas, R.; Liu, W.; Ahmad, S. A.; Jung, Y. D.; Reinmuth, N.; Drazan, K. E.; Bucana, C. D.; Hicklin, D. J.; Ellis, L. M. Effects of an antibody to vascular endothelial growth factor

receptor-2 on survival, tumor vascularity, and apoptosis in a murine model of colon carcinomatosis. *Int. J. Oncology* **2001**, *18*, 221-226

[19] Liu, Y.; Poon, R. T.; Li, Q.; Kok, T. W.; Lau, C.; Fan, S. T. Both antiangiogenesis and angiogenesis independent effects are responsible for hepatocellular carcinoma growth arrest by tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 3691-3699

[20] Schmitz, V.; Wang, L.; Barajas, M.; Gomar, C.; Prieto, J.; Qian, C. Treatment of colorectal and hepatocellular carcinomas by adenoviral mediated gene transfer of endostatin and angiostatin-like molecule in mice. *Gut* **2004**, *53*, 561-567

[21] Oba, K.; Konno, H.; Tanaka, T.; Baba, M.; Kamiya, K.; Ohta, M.; Kaneko, T.; Shouji, T.; Igarashi, A.; Nakamura, S. Prevention of liver metastasis of human colon cancer by selective matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166. *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 45-51

[22] Senger, D. R.; Galli, S. J.; Dvorak, A. M.; Perruzzi, C.A.; Harvey, V. S.; Dvorak, H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **1983**, *219*, 983-985

[23] Brown, L. F.; Berse, B.; Jackman, R. W.; Tognazzi, K.; Manseau, E. J.; Dvorak, H. F.; Senger, D. R. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Am. J. Pathol.* **1993**, *143*, 1255-1262

[24] Keck, P. J.; Hauser, S. D.; Krivi, G.; Sanzo, K.; Warren, T.; Feder, J.; Connolly, D. T. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **1989**, *246*, 1309-1312

[25] Leung, D. W.; Cachianes, G.; Kuang, W. J.; Goeddel, D. V.; Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **1989**, *246*, 1306-1309

[26] Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 273-286

[27] Cébe-Suarez, S.; Zehnder-Fjällman, A.; Ballmer-Hofer, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 601-615

[28] Koch, S.; Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, 1-21

[29] Shibuya, M. VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomol. Ther.* **2014**, *22*, 1-9

[30] Koch, S.; Tugues, S.; Li, X.; Gualandi, L.; Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. J.* **2011**, *437*, 169-183

[31] Hicklin, D. J.; Ellis, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 1011-1027

[32] Park, J. E.; Chen, H. H.; Winer, J.; Houck, K. A.; Ferrara, N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25646-25654

[33] Luttun, A.; Tjwa, M.; Moons, L.; Wu, Y.; Angelillo-Scherrer, A.; Liao, F.; Nagy, J. A.; Hooper, A.; Priller, J.; De Klerck, B.; Compennolle, V.; Daci, E.; Bohlen, P.; Dewerchin, M.; Herbert, J. M.; Fava, R.; Matthys, P.; Carmeliet, G.; Collen, D.; Dvorak, H. F.; Hicklin, D. J.; Carmeliet, P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 831-840

- [34] Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 653-660
- [35] Eriksson, A.; Cao, R.; Pawliuk, R.; Berg, S. M.; Tsang, M.; Zhou, D.; Fleet, C.; Tritsarlis, K.; Dissing, S.; Leboulch, P.; Cao, Y. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 99-108
- [36] Fischer, C.; Jonckx, B.; Mazzone, M.; Zacchigna, S.; Loges, S.; Pattarini, L.; Chorianopoulos, E.; Liesenborghs, L.; Koch, M.; De Mol, M.; Autiero, M.; Wyns, S.; Plaisance, S.; Moons, L.; van Rooijen, N.; Giacca, M.; Stassen, J. M.; Dewerchin, M.; Collen, D.; Carmeliet, P. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* **2007**, *131*, 463-475
- [37] Zhang, F.; Tang, Z.; Hou, X.; Lennartsson, J.; Li, Y.; Koch, A. W.; Scotney, P.; Lee, C.; Arjunan, P.; Dong, L.; Kumar, A.; Rissanen, T. T.; Wang, B.; Nagai, N.; Fons, P.; Fariss, R.; Zhang, Y.; Wawrousek, E.; Tansey, G.; Raber, J.; Fong, G. H.; Ding, H.; Greenberg, D. A.; Becker, K. G.; Herbert, J. M.; Nash, A.; Yla-Herttuala, S.; Cao, Y.; Watts, R. J.; Li, X. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2009**, *106*, 6152-6157
- [38] Mäkinen, T.; Veikkola, T.; Mustjoki, S.; Karpanen, T.; Catimel, B.; Nice, E. C.; Wise, L.; Mercer, A.; Kowalski, H.; Kerjaschki, D.; Stacker, S. A.; Achen, M. G.; Alitalo, K. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J.* **2001**, *20*, 4762-4773
- [39] Alitalo, K.; Tammela, T.; Petrova, T. V. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* **2005**, *438*, 946-953
- [40] Kärpänen, T.; Heckman, C. A.; Keskitalo, S.; Jeltsch, M.; Ollila, H.; Neufeld, G.; Tamagnone, L.; Alitalo, K. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J.* **2006**, *20*, 1462-1472
- [41] Muller, Y. A.; Christinger, H. W.; Keyt, B. A.; De Vos, A. M. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure* **1997**, *5*, 1325-1338
- [42] Takahashi, H.; Shibuya, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci.* **2005**, *109*, 227-241
- [43] Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* **2004**, *25*, 581-611
- [44] Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* **2004**, *9*, 2-10
- [45] Ferrara, N.; Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 4-25
- [46] Stuttfeld, E.; Ballmer-Hofer, K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 915-922
- [47] Shibuya, M.; Claesson-Welsh, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* **2006**, *312*, 549-560

- [48] Waltenberger, J.; Claesson-Welsh, L.; Siegbahn, A.; Shibuya, M.; Heldin, C. H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 26988-26995
- [49] Gille, H.; Kowalski, J.; Li, B.; LeCouter, J.; Moffat, B.; Zioncheck, T. F.; Pelletier, N.; Ferrara, N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3222-3230
- [50] Kanno, S.; Oda, N.; Abe, M.; Terai, Y.; Ito, M.; Shitara, K.; Tabayashi, K.; Shibuya, M.; Sato, Y. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* **2000**, *19*, 2138-2146
- [51] Rahimi, N.; Dayanir, V.; Lashkari, K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16986-16992
- [52] Kou, R.; SenBanerjee, S.; Jain, M. K.; Michel, T. Differential regulation of vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR) revealed by RNA interference: Interactions of VEGFR-1 and VEGFR-2 in endothelial cell signaling. *Biochemistry* **2005**, *44*, 15064-15073
- [53] Hiratsuka, S.; Maru, Y.; Okada, A.; Seiki, M.; Noda, T.; Shibuya, M. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1207-1213
- [54] Fan, F.; Wey, J. S.; McCarty, M. F.; Belcheva, A.; Liu, W.; Bauer, T. W.; Somcio, R. J.; Wu, Y.; Hooper, A.; Hicklin, D. J.; Ellis, L. M. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* **2005**, *24*, 2647-2653
- [55] Ebos, J. M.; Bocci, G.; Man, S.; Thorpe, P. E.; Hicklin, D. J.; Zhou, D.; Jia, X.; Kerbel, R. S. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol. Cancer Res.* **2004**, *2*, 315-326
- [56] Karkkainen, M. J.; Haiko, P.; Sainio, K.; Partanen, J.; Taipale, J.; Petrova, T. V.; Jeltsch, M.; Jackson, D. G.; Talikka, M.; Rauvala, H.; Betsholtz, C.; Alitalo, K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 74-80
- [57] Fukumura, D.; Duda, D. G.; Munn, L. L.; Jain, R. K. Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. *Microcirculation* **2010**, *17*, 206-225
- [58] Achen, M. G.; Mann, G. B.; Stacker, S.A. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *Br. J. Cancer* **2006**, *94*, 1355-1360
- [59] Hirakawa, S.; Kodama, S.; Kunstfeld, R.; Kajiyama, K.; Brown, L. F.; Detmar, M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 1089-1099
- [60] Hlatky, L.; Hahnfeltdt, P.; Folkman, J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 883-893
- [61] Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **2005**, *307*, 58-62

- [62] Timke, C.; Zieher, H.; Roth, A.; Hauser, K.; Lipson, K. E.; Weber, K. J.; Debus, J.; Abdollahi, A.; Huber, P. E. Combination of vascular endothelial growth factor receptor/platelet-derived growth factor receptor inhibition markedly improves radiation tumor therapy. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 2210-2219
- [63] Dallas, N. A.; Fan, F.; Gray, M. J.; Van Buren, G.; Lim, S. J.; Xia, L.; Ellis, L. M. Functional significance of vascular endothelial growth factor receptors on gastrointestinal cancer cells. *Cancer Metastasis Rev.* **2007** *26*, 433-441
- [64] Site internet des essais cliniques menés dans le monde (<http://clinicaltrials.gov>) consulté le 12/10/2018
- [65] Fan, F.; Schimming, A.; Jaeger, D.; Podar, K. Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *J. Oncol.* **2012**, *2012*, 1-16
- [66] Yang, X.; Zhang, X. F.; Lu, X.; Jia, H. L.; Liang, L.; Dong, Q. Z.; Ye, Q. H.; Qin, L. X. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Hepatology* **2014**, *59*, 1874-1885
- [67] Gautier, B.; Goncalves, V.; Diana, D.; Di Stasi, R.; Teillet, F.; Lenoir, C.; Huguenot, F.; Garbay, C.; Fattorusso, R.; D'Andrea, L.D.; Vidal, M.; Inguibert, N. Targeting the proangiogenic VEGF-VEGFR protein-protein interface with drug-like compounds by in silico and in vitro screening. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4428-4440
- [68] Wang, L.; Gagey-Eilstein, N.; Broussy, S.; Reille-Seroussi, M.; Huguenot, F.; Vidal, M.; Liu, W. -Q. Design and Synthesis of C-Terminal Modified Cyclic Peptides as VEGFR1 Antagonists. *Molecules* **2014**, *19*, 15391-15407
- [69] Reille-Seroussi, M.; Gaucher, J. F.; Desole, C.; Gagey-Eilstein, N.; Brachet, F.; Broutin, I.; Vidal, M.; Broussy, S. Vascular endothelial growth factor peptide ligands explored by competition assay and isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* **2015**, *54*, 5147-5156
- [70] Wang, L.; Zhou, L.; Reille-Seroussi, M.; Gagey-Eilstein, N.; Broussy, S.; Zhang, T.; Ji, L.; Vidal, M.; Liu, W. -Q. Identification of peptidic antagonists of vascular endothelial growth factor receptor 1 by scanning the binding epitopes of its ligands. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 6598-6606
- [71] Fairbrother, W. J.; Christinger, H. W.; Cochran, A. G.; Fuh, G.; Keenan, C. J.; Quan, C.; Shriver, S. K.; Tom, J. Y. K.; Wells, J. A.; Cunningham, B. C. Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site. *Biochemistry* **1998**, *37*, 17754-17764
- [72] Pan, B.; Li, B.; Russell, S. J.; Tom, J. Y. K.; Cochran, A. G.; Fairbrother, W. J. Solution structure of a phage-derived peptide antagonist in complex with vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Biol.* **2002**, *316*, 769-787
- [73] Reille-Seroussi, M. Thèse de doctorat, Université de Pharmacie, Paris Descartes **2014**
- [74] Wang, Z. A.; Ding, X. Z.; Tian, C.-L.; Zheng, J.-S. Protein/peptide secondary structural mimics: design, characterization, and modulation of protein-protein interactions. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 61599-61609
- [75] Pelay-Gimeno, M.; Glas, A.; Koch, O.; Grossmann, T. N. Structure-based design of inhibitors of protein-protein interactions: mimicking peptide binding epitopes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 8896-8927

- [76] Robinson, J. A.; DeMarco, S.; Gombert, F.; Moehle, K.; Obrecht, D. The design, structures and therapeutic potential of protein epitope mimetics. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 944-951
- [77] Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. The future of peptide-based drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 136-147
- [78] Groß, A.; Hashimoto, C.; Sticht, H.; Eichler, J. Synthetic Peptides as Protein Mimics. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2016**, *3*, 211-226
- [79] Liskamp, R. M.; Rijkers, D. T.; Kruitzer, J. A.; Kemmink, J. Peptides and proteins as a continuing exciting source of inspiration for peptidomimetics. *ChemBioChem.* **2011**, *12*, 1626-1653
- [80] Grauer, A.; König, B. Peptidomimetics-A versatile route to biologically active compounds. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *30*, 5099-5111
- [81] Jiao, D.; Russell, K. C.; Hruby, V. J. Locally constrained tyrosine analogues with restricted side chain dynamics. *Tetrahedron* **1993**, *17*, 3511-3520
- [82] Shimamoto, K.; Ishida, M.; Shinozaki, H.; Ohfuné, Y. Synthesis of four diastereomeric L-2-(carboxycyclopropyl)glycines. Conformationally constrained L-glutamate analogs. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4167-4176
- [83] Ko, E.; Liu, J.; Burgess, K. Minimalist and universal peptidomimetics. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4411-4421
- [84] Hirschmann, R.; Nicolaou, K. C.; Pietranico, S.; Leahy, E. M.; Salvino, J.; Arison, B.; Cichy, M. A.; Spoons, P. G.; Shakespeare, W. C.; De novo design and synthesis of somatostatin non-peptide peptidomimetics utilizing β -D-glucose as a novel scaffolding. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 12550-12568
- [85] Hirschmann, R.; Sprengeler, R. A.; Kawasaki, T.; Leahy, J. W.; Shakespeare, W. C.; Smith, A. B. The first design and synthesis of a steroidal peptidomimetic. The potential value of peptidomimetics in elucidating the bioactive conformation of peptide ligands, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9699-9701
- [86] Mowery, B. P.; Prasad, V.; Kenesky, C. S.; Angeles, A. R.; Taylor, L. L.; Feng, J. -J.; Chen, W. -L.; Lin, A.; Cheng, F. -C.; Smith, A. B.; Hirschmann, R. Catechol: A minimal scaffold for non-peptide mimetics of the i+1 and i+2 positions of β -turns. Application to somatostatin. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4397-4400.
- [87] Hill, D. J. Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S. A field guide to foldamers. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893-4011
- [88] Zhou, Z.; Deng, C.; Abbas, C.; Didierjean, C.; Averlant-Petit, M. -C.; Bodiguel, J.; Vanderesse, R.; Jamart-Gregoire, B. Synthesis and structural characterization of 2:1 [α /aza]-oligomers. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 7643-7650
- [89] Chingle, R.; Proulx, C.; Lubell, W. D. Azapeptide synthesis methods for expanding side-chain diversity for biomedical applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 1541-1556
- [90] Chatterjee, J.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H. N-methylation of peptides: a new perspective in medicinal chemistry. *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 1331-1342
- [91] Rivera, D. G.; Vasco, A. V. Echemendia, R.; Concepcion, O.; Perez, C. S.; Gavin, J. A.; Wessjohann, L. A. A multicomponent conjugation strategy to unique N-steroidal peptides: first evidence of the steroidal nucleus as a β -turn inducer in acyclic peptides. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 13150-13161

- [92] Zukauskaitė, A.; Moretto, A.; Peggion, C.; De Zotti, M.; Sackus, A.; Formaggio, F.; De Kimpe, N.; Manginckx, S. Synthesis and conformational study of model peptides containing N-substituted 3-aminoazetidone-3-carboxylic acids. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *11*, 2312-2321
- [93] Cativiela, C.; Ordonez, M. Recent progress on the stereoselective synthesis of cyclic quaternary alpha-amino acids. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1-63
- [94] Albericio, F.; Arvidson, Per I.; Bisetty, K.; Giralt, E.; Govender, T.; Jali, S.; Kongsaree, P.; Kruger, H. G.; Prabpai, S. Synthetic mimetics of protein secondary structure domains. *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *71*, 125-130
- [95] Trabocchi, A.; Scarpi, D.; Guarna, A. Structural diversity of bicyclic amino acids. *Amino Acids* **2008**, *34*, 1-24
- [96] Kitagaki, J.; Shi, G.; Miyauchi, S.; Murakami, S.; Yang, Y. Cyclic depsipeptides as potential cancer therapeutics. *Anticancer Drugs* **2015**, *26*, 259-271
- [97] Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. β -Peptides: from structure to function. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219-3232
- [98] Park, K. -H.; Kurth, M. J. *Cyclic amino acid derivatives*. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8629-8659
- [99] Kiss, L.; Fülöp, F. Synthesis of carbocyclic and heterocyclic β -aminocarboxylic acids. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1116-1169
- [100] Mansawat, W.; Vilaivan, C.; Balazs, A.; Aitken, D. J. Vilaivan, T. Pyrrolidinyl peptide nucleic acid homologues: effect of ring size on hybridization properties. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1440-1443
- [101] Declerck, V.; Aitken, D. J. Strategic C to N replacement in β -peptides: atomic level control of helical folding. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 8793-8800
- [102] Alauddin, M.; Gloaguen, E.; Brenner, V.; Tardivel, B.; Mons, M.; Zehnacker-Rentien, A.; Declerck, V.; Aitken, D. J. Intrinsic folding proclivities in cyclic β -peptide building blocks: configuration and heteroatom effects analyzed by conformer-selective spectroscopy and quantum chemistry. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 16479-16493
- [103] Yamanaka, T.; Ohkubo, M.; Kato, M.; Kawamura, Y.; Nishi, A.; Hosokawa, T. An efficient synthesis of cyclic β -amino acid derivatives as β -turn mimetics. *Synlett* **2005**, *4*, 631-634
- [104] Fülöp, F.; Martinek, T.; Toth, G. K. Application of alicyclic β -amino acids in peptide chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 323-334
- [105] Memeo, M. G.; Bovio, B.; Quadrelli, P. RuO₄-catalyzed oxidation reactions of isoxazolino-2-azanorbornane derivatives: a short-cut synthesis of tricyclic lactams and peptidomimetic γ -amino acids. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 1907-1914
- [106] North, M. Incorporation of conformationally constrained β -amino acids into peptides. *J. Peptide Sci.* **2000**, *6*, 301-313
- [107] Bucci, R.; Bonetti, A.; Clerici, F.; Contini, A.; Nava, D.; Pellegrino, S.; Tessaro, D.; Gelmi, M. L. Tandem Tetrahydroisoquinoline-4-carboxylic Acid/ β -alanine as a new construct able to induce a flexible turn. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 10822-10831

- [108] Avenozza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Rodriguez, F. Incorporation of Ahc into model dipeptides as an inducer of a beta-turn with a distorted amide bond. Conformational analysis. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4241-4249
- [109] Grygorenko, O. O. Bicyclic β -amino acids. *Tetrahedron* **2015**, *33*, 5169-5216
- [110] Ordonez, M.; Cativiela, C.; Romero-Estudillo, I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2016**, *27*, 999-1055
- [111] Trabocchi, A.; Menchi, G.; Guarna, F.; Machetti, F.; Scarpi, D.; Guarna, A. Design, synthesis, and applications of 3-Aza-6,8-Dioxabicyclo[3.2.1]Octane-based scaffolds for peptidomimetic chemistry. *Synlett* **2006**, *3*, 331-353
- [112] Cordero, F. M.; Pisaneschi, F.; Batista, K. M.; Valenza, S.; Machetti, F.; Brandi, A. A new bicyclic dipeptide isostere with pyrrolizidinone skeleton. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 856-867
- [113] Legrand, B.; Mathieu, L.; Lebrun, A.; Andriamanarivo, S.; Lisowski, V.; Masurier, N.; Zirah, S.; Kang, Y. K.; Martinez, J.; Maillard, L. T. Thiazole-based γ -building blocks as reverse-turn mimetic to design a gramicidin S analogue: conformational and biological evaluation. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6713-6720
- [114] Grison, C.; Coutrot, P.; Genève, S.; Didierjean, C.; Marraud, M. Structural investigation of "cis" and "trans" vinylogous peptides: cis-vinylog turn in folded cis-vinylogous peptides, an excellent mimic of the natural β -Turn. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10753-10764
- [115] Freidinger, R. M.; Veber, D.F.; Hirschmann, R.; Paegle, L. M. Lactam restriction of peptide conformation in cyclic hexapeptides which alter rumen fermentation. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, *16*, 464-470
- [116] Bourguet, C. B.; Claing, A.; Laporte, S. A.; Hébert, T. E.; Chemtob, S.; Lubell, W. D. Synthesis of azabicycloalkane amino acid and azapeptide mimics and their application as modulators of the prostaglandin F₂ α receptor for delaying preterm birth. *Can. J. Chem.* **2014**, *92*, 1031-1040
- [117] Godina, T. A.; Lubell, W. D. Mimics of peptide turn backbone and side-chain geometry by a general approach for modifying azabicyclo[5.3.0]alkane amino Acids. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5846-5849
- [118] Ramana Rao, M. H. V.; Pinyol, E.; Lubell, W. D. Rigid dipeptide mimics: synthesis of enantiopure C6-functionalized pyrrolizidinone amino acids. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 736-743
- [119] Bittermann, H.; Böcker, F.; Einsiedel, J.; Gmeiner, P. A highly practical RCM approach towards a molecular building kit of spirocyclic reverse turn mimics. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6315-6322
- [120] Vartak, A. P.; Johnson, R. Concerted synthesis of a spirobicyclic type-VI β -turn mimic of Pro-Pro-Pro-NH₂. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 983-986
- [121] Sacchetti, A.; Silvani, A.; Lesma, G.; Pilati, T. Phe-Ala-based diazaspicyclic lactam as nucleator of type II' β -turn. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 833-839
- [122] Breuning, M.; Häuser, T.; Mehler, C.; Däschlein, C.; Strohmman, C.; Oechsner, A.; Braunschweig, H. Enantioselective synthesis of tricyclic amino acid derivatives based on a rigid 4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]decane skeleton. *Beilstein J. Org. Chem.* **2009**, *5*, 1-5
- [123] Li, X.; Yang, D. Peptides of aminoxy acids as foldamers. *Chem. Commun.* **2006**, *0*, 3367-3379
- [124] Gruner, S. A.; Locardi, E.; Lohof, E.; Kessler, H. Carbohydrate-based mimetics in drug design: sugar amino acids and carbohydrate scaffolds. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 491-514

- [125] Jensen, K. J.; Brask, J. Carbohydrates in peptide and protein design. *Biopolymers* **2005**, *80*, 747-761
- [126] Simone, M. I.; Soengas, R.; Newton, C. R.; Watkin, D. J.; Fleet, G. W. J. Branched tetrahydrofuran α,α -disubstituted- δ -sugar amino acid scaffolds from branched sugar lactones: a new family of foldamers? *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 5761-5765
- [127] Hirschmann, R. F.; Nicolaou, K. C.; Angeles, A. R.; Chen, J. S.; Smith, A. B. The β -D-glucose scaffold as a β -turn mimetic. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1511-1520
- [128] Pellegrino, S.; Tonali, N.; Kaffy, J.; Taverna, M.; Contini, A.; Taylor, M.; Allsop, D.; Gelmi, M. L.; Ongerì, S. β -Hairpin mimics containing a piperidine-pyrrolidine scaffold modulate the β -amyloid aggregation process preserving the monomer species. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1295-1302
- [129] Moriuchi, T.; Hirao, T. Highly ordered structures of peptides by using molecular scaffolds. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 294-301
- [130] Bag, S. S.; Jana, S.; Yashmeen, A.; De, S. Triazolo- β -aza- ϵ -amino acid and its aromatic analogue as novel scaffolds for β -turn peptidomimetics. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5242-5245
- [131] Vahdati, L.; Fanelli, R.; Bernadat, G.; Correia, I.; Lequin, O.; Ongerì, S.; Piarulli, U. Synthesis and conformational studies of a stable peptidomimetic β -hairpin based on a bifunctional diketopiperazine turn inducer. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 3250-3258
- [132] Berthet, M.; Lebrun, A.; Martel, A.; Cheviet, T.; Martinez, J. Oxa-diketopiperazines: Access and Conformational Analysis of Potential Turn Inducers. *ChemistrySelect* **2017**, *2*, 5824-5827
- [133] Eguchi, M.; Lee, M. S.; Nakanishi, H.; Stasiak, M.; Lovell, S.; Kahn, M. Solid-phase synthesis and structural analysis of bicyclic β -turn mimetics incorporating functionality at the i to $i + 3$ positions. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12204-12205
- [134] Smith, A. B.; Charnley, A. K.; Hirschmann, R. Pyrrolinone-Based Peptidomimetics. "Let the Enzyme or Receptor be the Judge". *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 180-193
- [135] Greco, A.; Tani, S.; De Marco, R.; Gentilucci, L. Convenient synthesis of the antibiotic linezolid via an oxazolidine-2,4-dione intermediate derived from the chiral building block isoserine. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 13390-13404
- [136] Ko, E.; Burgess, K. Pyrrole-based scaffolds for turn mimics. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 980-983
- [137] Whitby, L.; Ando, Y.; Setola, V.; Vogt, P. K.; Roth, B. L.; Boger, D. L. Design, synthesis, and validation of a β -turn mimetic library targeting protein-protein and peptide-receptor interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10184-10194
- [138] Kokan, Z.; Glasovac, Z.; Elenkov, M. M.; Gredicak, M.; Jeric, I.; Kirin, S. I. "Backdoor induction" of chirality: asymmetric hydrogenation with rhodium(I) complexes of triphenylphosphane-substituted β -turn mimetics. *Organometallics* **2014**, *33*, 4005-4015
- [139] Martie, S.; Labib, M.; Shipman, P. O.; Kraatz, H. -B, Ferrocene-peptido conjugates: From synthesis to sensory applications. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7264-7290
- [140] Li, F.; Rodriguez, K. B.; Phillips, C.; Seidel, R. W.; Garcia, E. S.; Sander, W. *J. Phys. Chem. B.* **2013**, *117*, 3560-3571

- [141] Miller, S. J.; Blackwell, H. E.; Grubbs, R. H. Application of ring-closing metathesis to the synthesis of rigidified amino acids and peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9606-9614
- [142] Lin, H.; Jiang, Y.; Hu, K.; Zhang, Q.; He, C.; Wang, T.; Li, Z. An in-tether sulfilimine chiral center induces β -turn conformation in short peptides. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *14*, 9993-9999
- [143] Larregola, M.; Lequin, O.; Karoyan, P.; Guianvarc'h D.; Lavielle, S. β -Amino acids containing peptides and click-cyclized peptide as β -turn mimics: a comparative study with 'conventional' lactam- and disulfide-bridged hexapeptides. *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 632-643
- [144] Rua, F.; Bousset, S.; Parella, T.; Diez-Perez, V. B.; Giralt, E.; Ortuno, R. M. Self-assembly of a cyclobutane β -tetrapeptide to form nanosized structures. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3643-3645
- [145] Mondal, S.; Gazit, E. The Self-Assembly of Helical Peptide Building Blocks. *ChemNanoMat.* **2016**, *2*, 323-332
- [146] Gopalan, R. D.; Del Borgo, M. P.; Mechler, A. I.; Perlmutter, P.; Aguilar, M. -I. Geometrically precise building blocks: the self-assembly of β -peptides. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 1417-1423
- [147] Robinson, J. A. Protein epitope mimetics as anti-infectives. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 379-386
- [148] Ruiz-Gomez, G.; Tyndall, J. D. A.; Pfeiffer, B.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. Update 1 of: Over one hundred peptide-activated G protein-coupled receptors recognize ligands with turn structure. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, PR1-41
- [149] Mendez-Samperio, P. Peptidomimetics as a new generation of antimicrobial agents: current progress. *Infect. Drug. Resist.* **2014**, *7*, 229-237
- [150] Fernandez, D.; Torres, E.; Aviles, F. X.; Ortuno, R. M.; Vendrell, J. Cyclobutane-containing peptides: evaluation as novel metalloprotease inhibitors and modelling of their mode of action. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3824-3828
- [151] Witkin, J. M.; Ornstein, P. L.; Mitch, C. H.; Li, R.; Smith, S. C.; Heinz, B. A.; Wang, X. -S.; Xiang, C.; Carter, J. H.; Anderson, W. H.; Li, X.; Broad, L. M.; Pasqui, F.; Fitzjohn, S. M.; Sanger, H. E.; Smith, J. K.; Catlow, J.; Swanson, S.; Monn, J. A. In vitro pharmacological and rat pharmacokinetic characterization of LY3020371, a potent and selective mGlu2/3 receptor antagonist. *Neuropharmacology* **2017**, *115*, 100-114
- [152] Gokhale, A.; Weldeghiorghis, T. K.; Taneja, V.; Satyanarayanajois, S. D. Conformationally constrained peptides from CD2 to modulate protein-protein interactions between CD2 and CD58. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5307-5319
- [153] Seebach, D.; Gardiner, J. β -peptidic peptidomimetics. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1366-1375
- [154] Dictionnaire de l'Académie de Pharmacie
- [155] Bianco, A. Studies in natural products Chemistry, *Elsevier Science* **1990**, *7*, 439-497
- [156] Boros, C. A.; Stermitz, F. R. Iridoids. An Updated Review, Part II. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1055-1147
- [157] Dinda, B.; Debnath, S.; Harigaya, Y. Naturally occurring iridoids. A review, part 1. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 159-222
- [158] Dinda, B.; Debnath, S.; Banik, R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An updated review, part 4. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 803-833

- [159] Ludwig, H. Rhinanthin. *Arch. Pharm.* **1868**, *186*, 64
- [160] Bourquelot, E.; Herissey, C. Studies in Natural Products Chemistry. *R. Acad. Sc.* **1902**, *134*, 1441-1443
- [161] Grimshaw, J.; Juneja, H. R. Structure of aucubin. *Chem. And. Ind.* **1960**, 656-657
- [162] Karrer, P.; Schmid, H. Über die Konstitution des Aucubins. *Helv. Chim. Acta* **1976**, *29*, 525-552
- [163] Uda, H.; Murayama, M.; Kabuki, K.; Fujise, S. Structure of Aucubin, a glycoside from *Aucuba japonica*. *Nippon Kagaku Zasshi* **1960**, *81*, 677-678
- [164] Markovic, D.; Barboux, C.; Salle de Chou, Y.; Bettach, J.; Grougnet, R.; Deguin, B. Centrifugal partition chromatography: an efficient tool to access highly polar and unstable synthetic compounds on a large scale. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 63254-63259
- [165] Chaslot, M. Thèse de doctorat, Université de Pharmacie, Paris Descartes **1955**
- [166] Darrow, K.; Deane Bowers, M. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **1997**, *25*, 1-11
- [167] Morgan, E.; Wilson, I.; Meth-Cohn, O.; Barton, D.; Koji, N. Insect hormones and insect chemical ecology. In *Comprehensive Natural Products Chemistry. Pergamon: Oxford* **1999**, 263-375
- [168] Barton, D.; Meth-Cohn, O.; Mori, K.; Nakanishi K. *Comprehensive Natural Products Chemistry. In Comprehensive Natural Products Chemistry. Ed. Elsevier: Amsterdam* **1999**, *8*, 302-307
- [169] Reudler Talsma, J. H.; Biere, A.; Harvey, J. A.; van Nouhuys, S. Oviposition cues for a specialist butterfly–plant chemistry and size. *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 1202-1212
- [170] Hirayama, C.; Konno, K.; Nakamura, M.; Yasui, H. Enzymatic activation of oleuropein: A protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, *96*, 9159-9164
- [171] Opitz, S. E. W.; Jensen, S. R.; Müller, C. Sequestration of glucosinolates and iridoid glycosides in sawfly species of the genus *Athalia* and their role in defense against ants. *J. Chem. Ecol.* **2010**, *36*, 148-157
- [172] Ghisalberti, E. L. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine* **1998**, *5*, 147-163
- [173] Che, Q. M.; Koike, K.; Li, Y.; Metori, K.; Sato, T.; Takahashi, S. The promoting effects of geniposidic acid and aucubin in *Eucommia ulmoides* OLIVER leaves on collagen synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **1998**, *21*, 1306-1310
- [174] Chang, I. M.; Ryu, J. C.; Park, Y. C.; Yun, H. S.; Yang, K. H. Protective activities of aucubin against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Drug Chem. Toxicol.* **1983**, *6*, 443-453
- [175] Xue, H.-Y.; Jin, L.; Jin, L.-J.; Li, X.-Y.; Zhang, P.; Ma, Y.-S.; Lu, Y.-N.; Xia, Y.-Q.; Xu, Y.-P. Aucubin prevents loss of hippocampal neurons and regulates antioxidative activity in diabetic encephalopathy rats. *Phytotherapy Res.* **2009**, *23*, 980-986
- [176] Xue, H. Y.; Lu, Y. N.; Fang, X. M.; Xu, Y. P.; Gao, G. Z.; Jin, L. Neuroprotective properties of aucubin in diabetic rats and diabetic encephalopathy rats. *J. Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 9311-9318

- [177] Xue, H.-Y.; Gao, G.-Z.; Lin, Q.-Y.; Jin, L.-J.; Xu, Y.-P. Protective effects of aucubin on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells. *Phytotherapy Res.* **2012**, *26*, 369-374
- [178] Ho, J. N.; Lee, Y. H.; Park, J. S.; Jun, W. J.; Kim, H. K.; Hong, B. S.; Shin, D. H.; Cho, H. Y. Protective Effects of Aucubin Isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-Induced Oxidative Stress in Human Skin Fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1244-1248
- [179] Chang, I.-M. Antiviral activity of aucubin against hepatitis B virus replication. *Phytotherapy Res.* **1997**, *11*, 189-192
- [180] Davini, E.; Javarone, C.; Trogolo, C.; Aureli, P.; Pasolini, B. Quantitative isolation and antimicrobial activity of the aglycone of aucubin. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 24202-2422
- [181] Isiguro, K.; Yamaki, M.; Takagi, S.; Ikeda, Y.; Kawakami, I.; Nose, T. Studies on iridoid-related compounds. IV. Antitumor activity of iridoid aglycones. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2375-2379
- [182] Bartholomaeus, A.; Ahokas, J. Inhibition of P-450 by aucubin: is the biological activity of aucubin due to its glutaraldehyde-like aglycone? *Toxicol. Lett.* **1995**, *80*, 75-83
- [183] Frederiksen, S.; Stermitz, F. R. Pyridine monoterpene alkaloid formation from iridoid glycosides. A novel PMTA dimer from geniposide. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 41-46
- [184] Masao, H.; Yukio, K.; Kazuyo, I.; Yue-Zhong, S.; Qing-Ming, C.; Tsuneo, N.; Kyoichi, K. Transformation of aucubin to new pyridine monoterpene alkaloids, aucubinines A and B, by human intestinal bacteria. *Phytother. Res.* **1990**, *4*, 66-70
- [185] Birch, A. J.; Grimshaw, J.; Juneja, H. R. Aucubin. *J. Chem. Soc.* **1961**, 5194-5198
- [186] Bianco, A.; Guiso, M.; Iavarone, C.; Passacantilli, P.; Trogolo, C. Iridoids. XXIV. Linaride (10-deoxyaucubin), a new iridoid from *Linaria muralis*. *Gazz. Chim. Ital.* **1977**, *107*, 83-85
- [187] Davini, E.; Iavarone, C.; Mataloni, F.; Trogolo, C. Conversion of aucubin to a useful Corey lactone analog for the synthesis of 11-methyl PGA₂. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2089-2091
- [188] Bonini, C.; Di Fabio, R. Synthesis of a Corey's lactone analogue from the iridoid Aucubin. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 5199-5200
- [189] Jensen, S. R.; Kirk, O.; Nielsen, B. J. Application of the vilsmeier formylation in the synthesis of 11-C-13 labeled iridoids. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1949-1954
- [190] Weinges, K.; Schick, H.; Ziegler, H. J. Preparation of kingiside from aucubin. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *8*, 1623-1626
- [191] Weingnes, K.; Ziegler, H. J. Palladium-katalysierte substitution an hexaacetylaucubin. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 109-111
- [192] Cachet, X. Thèse de doctorat, Université Paris-Descartes, Paris **2000**
- [193] Tixidre, A. Thèse de 3^{ème} cycle, Université Paris-Sud, Orsay **1980**
- [194] Bianco, A.; Passacantilli, P.; Nicoletti, M.; Alves De Lima, R. Iridoids in equatorial and tropical flora—III : Isolation and partial synthesis of 6-epiaucubin a new glucosidic iridoid. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 359-362
- [195] Cachet, X.; Deguin, B.; Koch, M.; Makhlof, K.; Tillequin, F. Homochiral rigid γ -amino acid glycosides from aucubin. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 400-402

- [196] Rakotondramasy, V. C.; Laschiazza, R.; Lecso-Bornet, M.; Koch, M.; Tillequin, F.; Deguin, B. Regioselective and stereospecific amination of iridoids: conversion of aucubin into aminoside antibiotic analogues. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 19-23
- [197] Rakotondramasy, V. C. Thèse de doctorat, Université Paris-Descartes, Paris **2005**
- [198] Tixidre, A.; Rolland, Y.; Gamier, J.; Poisson, J. Aucubin, a source of prostanoid synthons-New hemisynthetic pathway. *Heterocycles* **1982**, *19*, 253-256
- [199] Weingnes, K.; Ziegler, H. J.; Mauer, W.; Schmidbauer, S. B. Chemie und stereochemie der iridoide, XIX. Zwei einfache EPC-synthesen mit chemischem beweis der absoluten konfiguration von (+)-mitsugashiwa-lacton aus (S)-(-)-citronellol und aucubin. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 1029-1031
- [200] Rosendal, S.; Kirk, O.; Nielsen, B. J. Application of the vilsmeier formylation in the synthesis of 11-13C labelled iridoids. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1949-1954
- [201] Lemus, C.; Koch, M.; Michel, S.; Deguin, B. Influence of solvents and catalysts on the formation and hydrolysis of polyfunctional enoxysilanes derived from aucubin. *ARKIVOC* **2014**, *iii*, 184-196
- [202] Carnevale, G.; Davini, E.; Iavarone, C.; Trogolo, C. Organomercury chemistry of iridoid glucosides. 1. Chemoselective hydroxymercuration-demercuration of aucubin: a cheaper and efficient approach to epimeric isoeucommiols and 6,7-bis(hydroxymethyl)-cis-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-7-enes. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5343-5345
- [203] Berdini, R.; Bianco, A.; Guiso, M.; Marini, E.; Nicoletti, M.; Passacantilli, P.; Righi, G. Isolation and partial synthesis of 7, 8-dehydro-6 β , 10-dihydroxy-11-noriridomyrmecin, a methylcyclopentanoid monoterpene from *Scrophularia canina*. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1400-1403
- [204] Le Quesne, P. W. Structures and stereochemistry of some halogeno-derivatives of aucubin. *J. Chem. Soc. C: Organics* **1968**, 1661-1663
- [205] Bernini, R.; Davini, E.; Iavarone, C.; Trogolo, C. Synthesis of a Corey lactone analog from the iridoid glucoside aucubin and its utilization in the synthesis of a new 12-epi-PGF 2α modified at C-11. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4600-4603
- [206] Wendt, M. W.; Haegele, W.; Simonitsch, E.; Schmid, H. Zur Struktur des Aucubins. (Vorläufige Mitteilung). *Helv. Chim. Acta* **1960**, *43*, 1440-1443
- [207] Berkowitz, W. F.; Sasson, I.; Sampathkumar, P. S.; Hrabie, K.; Choudhry, S.; Pierce, D. Chiral prostanoid intermediates from aucubin. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 1641-1644
- [208] Mouriès, C. Thèse de doctorat, Université Paris Descartes, Paris **2003**
- [209] Czernecki, S.; Georgoulis, C.; Stevens, C.L.; Vijayakumaran, K. Pyridinium dichromate oxidation. Modifications enhancing its synthetic utility. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1699-1702
- [210] Haines, A. H. *Comprehensive Organic Synthesis* **1991**, *7*, 437-448.
- [211] Cachet, X.; Deguin, B.; Tillequin, F.; Rolland, Y.; Koch, M. Synthesis of functionalized bicyclo[3.1.0]hexanes from aucubin: an access to fused aminocyclopentitols. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2812-2822
- [212] McKillop, A.; Hunt, J. D.; Kienzle, F.; Bigham, E.; Taylor, E. C. Thallium in organic synthesis. XXXII. Oxidative rearrangement of olefins using thallium (III) nitrate (TTN). *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 3635

- [213] Kaye, A.; Reese, C. B.; Neidle, S. Glycal Ethers as Starting Materials in C-Nucleoside Synthesis. *Nucleosides & Nucleotides* **1988**, *7*, 609-612
- [214] Sahara, Y.; Ichikawa, M.; Hildreth, J. E.; Ichikawa, Y. Synthesis of sulfated β -1,6-linked oligosaccharide mimetics: A novel potent inhibitor of HIV replication. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2549-2552
- [215] Moriarty, R. M.; Prakash, O.; Duncan, M. P.; Vaid, R. K.; Rani, N. Oxidation of some olefinic compounds using iodosobenzene. *J. Chem. Res. Synop.* **1996**, 432-433
- [216] Mouriès, C.; Rakotondramasy, V. C.; Libot, F.; Koch, M.; Tillequin, F. Deguin, B.; Synthesis and cytotoxicity of a novel iridoid glucoside derived from aucubin. *Chem. Biodiversity* **2005**, *2*, 695-703
- [217] Mouriès, C.; Deguin, B.; Koch, M.; Tillequin, F. Stereoselective conversion of aucubin into polyfunctionalized tetrahydro1H-cyclopenta[c]furan glucosides. *Helv. Chim. Acta* **2003** *86*, 147-156
- [218] Lemoine, H.; Markovic, D.; Deguin, B. Mild and chemoselective lactone ring-opening with (TMS)ONa. Mechanistic studies and application to sweroside derivatives. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4358-4366
- [219] Chiaroni, A.; Riche, C.; Cachet, X.; Deguin, B.; Koch, M.; Tillequin, F. (1S,4R,5R,6R)-6-Methoxycarbonyl-4-pivaloyloxy-2-(pivaloyloxymethyl)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene-1-carboxylic acid. *Acta Cryst.* **2000**, *56*, 358-359
- [220] Cachet, X.; Deguin, B.; Koch, M.; Tillequin, F.; Koch, M.; Chiaroni, A. Synthesis and structural assignment of functionalized 8,9-azatricyclo[4.4.0.0^{1,5}]decane: a new tricyclic system including the pyridazine Ring. *Heterocycles* **2002**, *57*, 523-528
- [221] Iwashima, M.; Okamoto, K.; Iguchi, K. Clavirins, a new type of marine oxylipins with growth-inhibitory activity from the Okinawan soft coral, *Clavularia viridis*. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6455-6459
- [222] Rakotondramasy, V. C.; Mouriès, C.; Cachet, X.; Neghra, A.; El Mourabet, M.; Tillequin, F.; Koch, M.; Deguin, B. A novel series of cytotoxic iridoid glucosides derived from aucubin: design, synthesis and structure-activity relationships. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2314-2320
- [223] Shirakawa, S.; Suzuki, M.; Furuta, K.; Noyori, R.; Sasaki, H.; Kikuchi, Y.; Kita, T.; Yamori, T.; Sawada, J.; Kojima, M.; Hazato, A.; Kurozumi, S.; Fukushima, M.; Fukushima, S.; Takeuchi, Y.; Kishimoto, S.; Yamashita, S.; Uetsuki, K. Antitumor activity, optimum administration method and pharmacokinetics of 13,14-dihydro-15-deoxy-deoxy-Delta⁷-prostaglandin A1 methyl ester (TEI-9826) integrated in lipid microspheres (Lipo TEI-9826). *Anti-Cancer Drugs* **2001**, *12*, 221-234
- [224] Aoyagi, T.; Hamada, M.; Kojiri, K.; Morishima, H.; Nagai, M.; Takeuchi, T.; Umezawa, H.; Yamamoto, T. Mannostatins A and B: New inhibitors of ALPHA-D-mannosidase, produced by *Stereptovercillium verticillus* var. *quintum* ME3-AG3: Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 883-889
- [225] Aoyagi, T.; Iitaka, Y.; Kojiri, K.; Morishima, H.; Nakamura, H.; Yamamoto, T. Structure determination of mannostatins A and B. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1008-1011
- [226] Berecibar, A.; Grangjean, C.; Siriwardena, A. Synthesis and biological activity of natural aminocyclopentitol glycosidase inhibitors: mannostatins, trehazolin, allosamidins, and their analogues. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 779-844

- [227] Mouriès, C.; Deguin, B.; Lamari, F.; Foglietti, M.-J.; Tillequin, F.; Koch, M. Homochiral rigid γ -amino acid glycosides from aucubin. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1083-1086
- [228] Vamvakides, A. *Ann. Pharm. Fr.* **1998**, *56*, 26-30
- [229] Yogeewari, P.; Ragavendran, J. V.; Sriram, D. An update on GABA analogs for CNS drug discovery. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* **2006**, *1*, 113-118
- [230] Pratima, A.; Nikalje, G.; Girbane, A. GABA modulating agents: A brief review. *Asian J. Biol. Sci.* **2011**, *4*, 201-220
- [231] Wang, Z.; Silverman, R. B. Syntheses and evaluation of fluorinated conformationally restricted analogues of GABA as potential inhibitors of GABA aminotransferase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2242-2252
- [232] Jimeno, C.; Pericàs, M. A.; Wessel, H. P.; Alker, A.; Müller, K. Two distinct conformations of GABA locked by embedding in the bicyclo[3.1.0]hexane core structure. *Chem. Med. Chem.* **2011**, *6*, 1792-1795
- [233] Callahan, J. F.; Newlander, K. A.; Burgess, J. L.; Eggleston, D. S.; Nichols, A.; Wong, A.; Huffman, W. F. The use of γ -turn mimetics to define peptide secondary structure. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3479-3488
- [234] El-Mourabet, M. Thèse de doctorat, Université Paris-Descartes, Paris **2011**
- [235] Loury, N. Thèse de doctorat, Université Paris-Descartes, Paris **2005**
- [236] Li, Y.; Zhao, Y.; Zhang, Y. M.; Wang, M. J.; Sun, W. J. X-ray crystal structure of iridoid glucoside aucubin and its aglycone. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 2270-2273
- [237] Venkatachalam, C. M. Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436
- [238] Chou, K. C. Prediction of tight turns and their types in proteins. *Anal. Biochem.* **2000**, *286*, 1-16
- [239] Discovery Studio BIOVIA. *Discovery Studio Client v17*. San Diego: Dassault Systèmes **2017**
- [240] Lewis, P. N.; Momany, F. A.; Scheraga, H. A. Chain reversals in proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 211-229
- [241] Richardson, J. S. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein. Chem.* **1981**, *34*, 167-339
- [242] Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. Turns in peptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1-109
- [243] Lindorff-Larsen, K.; Maragakis, P.; Piana, S.; Eastwood, M. P.; Dror, R. O.; Shaw, D. E. Systematic validation of protein force fields against experimental data. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32131
- [244] Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623-11627
- [245] Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A. General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347-1363

- [246] Dormoy, J.-R. Synthesis of L-3,4-didehydroproline: favoured orientation in the key-step elimination reaction. *Synthesis* **1982**, 753
- [247] Newman, S. G.; Bryan, C. S.; Perez, D.; Lautens, M. The use of bromotrichloromethane in chlorination reactions. *Synthesis* **2011**, 342-346
- [248] Krishnamurthy, S.; Brown, H. Facile reduction of alkyl tosylates with lithium triethylborohydride. An advantageous procedure for the deoxygenation of cyclic and acyclic alcohols. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3064-3066
- [249] Hua, D. ; Venkataraman, S. ; Ostrander, R. ; Sinai, G. ; McCann, P. ; Coulter, M. ; Xu, M. Asymmetric synthesis of (+)-hirsutene. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 507-515
- [251] Pettit, G.; van Tamelen, E. Desulfurization with Raney nickel. *Organic Reactions* **1962**, *12*, 356-529
- [251] Shiina, J.; Oikawa, M.; Nakamura, K.; Obata, R.; Nishiyama, S. Synthesis of pinguisane-type sesquiterpenoids acutifolone A, pinguisenol, and bisacutifolones by a Diels-Alder dimerization reaction. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5190-5197
- [252] De Kanta, S. Pr(OTf)₃ as an efficient and recyclable catalyst for chemoselective thioacetalization of aldehydes. *Synthesis* **2004**, *17*, 2837-2840
- [253] Firouzabadi, H.; Iranpoor, N.; Amani, K. Heteropoly acids as heterogeneous catalysts for thioacetalization and transthoacetalization reactions. *Synthesis* **2002**, 59-62
- [254] De Bellefon, C. Le nickel de Raney. *L'Act. Chim.* **2000**, *44*, 69-70
- [255] Han, O.; Shih, Y.; Liu, L.-D.; Liu, H.-W. On the mechanism of sodium cyanoborohydride reduction of tosylhydrazones. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2105-2108
- [256] Miller, V.; Yan, D.-Y.; Weigel, T.; Han, O.; Liu, H.-W. Studies of the mechanistic diversity of sodium cyanoborohydride reduction of tosylhydrazones. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4175-4188
- [257] Kabalka, G.; Baker, J. New mild conversion of ketones to the corresponding methylene derivatives. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1834-18353
- [258] Kragol, G.; Benko, I.; Muharemspahic, J.; Mlinaric. Majerski, K. A cyclopropyl-homoallyl rearrangement accompanying the borane-mediated reduction of tosylhydrazones. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2622-2625
- [259] Fujita, M.; Hiyama, T. Fluoride ion-catalyzed reduction of aldehydes and ketones with hydrosilanes. Synthetic and mechanistic aspects and an application to the threo-directed reduction of α -substituted alkanones. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5405-5415
- [260] Zhao, X.-X.; Zhang, P.; Guo, Z.-X. K₂CO₃-activated hydrosilylation: from redistribution of polymethylhydrosiloxane to selectively reduction of aldehydes and ketones. *ChemistrySelect* **2017**, *2*, 7670-7677
- [261] Kursanov, D.; Parnes, Z.; Loim, N. Applications of ionic hydrogenation to organic synthesis. *Synthesis* **1974**, 633-651
- [262] Carey, F.; Tremper, H. Carbonium ion-silane hydride transfer reactions. III. Cyclopropylmethyl cations. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 2967-2972

- [263] Li, J.; Peng, J.; Bai, Y.; Chen, L. Rapid selective defunctionalization of the carbonyl group of α , β -unsaturated ketones with trialkoxysilane/ ZnX_2 . *Phosphorus sulfur silicon. Relat. Elem.* **2011**, *186*, 1621-1625
- [264] Chandrasekhar, S.; Raji Reddy, C.; Nagendra Babu, B. Rapid defunctionalization of carbonyl group to methylene with polymethylhydrosiloxane- $B(C_6F_5)_3$. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9080-9082
- [265] Gevorgyan, V.; Rubin, M.; Liu, J.-X.; Yamamoto, Y. A direct reduction of aliphatic aldehyde, acyl chloride, ester, and carboxylic functions into a methyl group. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1672-1675
- [266] Bajracharya, G.; Nogami, T.; Jin, T.; Matsuda, K.; Gevorgyan, V.; Yamamoto, Y. Reduction of Carbonyl Function to a Methyl Group. *Synthesis* **2004**, *2*, 308-311
- [267] Myers, A.; Movassaghi, M.; Zheng, B. Preparation of the reagent *o*-Nitrobenzenesulfonylhydrazide. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8572-8573
- [268] Sen, S. E.; Roach, S. L. A convenient two-step procedure for the synthesis of substituted Allylic amines from allylic alcohols. *Synthesis* **1995**, 756-758
- [269] Osby, J. O.; Martin, M. G.; Ganem, B. An exceptionally mild deprotection of phthalimides. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2093-2096
- [270] Hünig, S.; Müller, H.; Thier, W. The chemistry of diimide. *Angew. Chem. Internat. Edit.* **1965**, *4*, 271-382
- [271] Pasto, D.; Taylor, R. Reduction with diimide. *Organic Reaction* **1991**, *40*, 91-155
- [272] Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis I: Synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154
- [273] Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. Use of niium salt-based coupling reagents in peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683
- [274] Valeur, E.; Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631
- [275] Mahalakshmi, R.; Raghothama, S.; Balaram, P. NMR analysis of aromatic interactions in designed peptide β -hairpins. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1125-1138
- [276] Jeannotte, G.; Lubell, W. D. Large Structural Modification with Conserved Conformation: Analysis of $\Delta 3$ -Fused Aryl Prolines in Model β -Turns. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14334-14335
- [277] Awada, H.; Grison, C. M.; Charnay-Pouget, F.; Baltaze, J. -P.; Brisset, F.; Guillot, R.; Robin, S.; Hachem, A.; Jaber, N.; Naoufal, D.; Yazbeck, O.; Aitken, D. J. Conformational Effects through Hydrogen Bonding in a Constrained γ -Peptide Template: From Intraresidue Seven-Membered Rings to a Gel-Forming Sheet Structure. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 4819-4828
- [278] Ke, D.; Zhan, C.; Li, X.; Li, A. D. Q.; Yao J. The urea-dipeptides show stronger H-bonding propensity to nucleate β -sheetlike assembly than natural sequence. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8269-8276
- [279] Li, J.; Sha, Y. A convenient synthesis of amino acid methyl esters. *Molecules* **2008**, *13*, 1111-1119

Liste des figures

- Figure 1: Angiogenèse: développement de nouveaux vaisseaux sanguins
- Figure 2: Déséquilibre de la balance angiogénique
- Figure 3: Passage de la tumeur de l'état dormant à un état plus invasif
- Figure 4: Normalisation vasculaire au cours d'un traitement anti-angiogénique
- Figure 5: Représentation schématique des ligands de la famille du VEGF et de ses récepteurs
- Figure 6: Structure cristalline du VEGF-A
- Figure 7: Représentation schématique du mécanisme d'activation des récepteurs VEGFRs
- Figure 8: Les récepteurs et les voies de signalisations impliqués dans l'angiogenèse
- Figure 9 : Principaux mécanismes d'actions des molécules anti-angiogéniques ciblant le VEGF
- Figure 10: VEGF en interaction avec son récepteur VEGFR-1
- Figure 11: Peptide v107 en interaction avec le VEGF
- Figure 12: Peptide v114 modifié
- Figure 13 : Schéma représentant les différentes stratégies
- Figure 14: Comparaison ligand flexible et ligand rigide
- Figure 15 : Représentation de contraintes induisant un coude β
- Figure 16: Amino-acides naturels bi-substitués en β
- Figure 17: Amino-acides non naturels substitués en β
- Figure 18: Proline et dérivés
- Figure 19: Représentation des modifications les plus communes du squelette des peptides
- Figure 20: Représentation d'un azapeptide
- Figure 21: Oligomère α /aza/ α
- Figure 22: Analogue de semi-carbazole
- Figure 23: Représentation d'un azatide
- Figure 24: Représentation de N-méthyl peptide
- Figure 25: Peptido-stéroïde
- Figure 26: Représentation d'un peptoïde
- Figure 27: Représentation d' α -amino acide tetrasubstitué cyclique
- Figure 28: Trishocubane amino acide
- Figure 29: α amino acides bicycliques
- Figure 30: Représentation d'acides aminés β , γ et δ
- Figure 31: Amino acides β cycliques

Figure 32: Amino acide cyclique allant du cycloheptane au cyclononane

Figure 33: Amino acides bicycliques β

Figure 34: Amino acides spirocycliques

Figure 35: Amino acides γ cycliques

Figure 36: Aza-dioxo-bicyclo[3.2.1]octane (à gauche), bicyclo[4.2.1] et [5.2.1] (au centre) et polycyclique aza-dioxo-bicyclo[3.2.1]octane (à droite)

Figure 37: Squelette pyrrolizidinone

Figure 38: Hétérocyle de la série 4-amino(méthyl)-1,3-thiazole-5-carboxylique (ATCs)

Figure 39: Résidu vinylogue cis

Figure 40: Amino acides δ cycliques énantio-purs

Figure 41: Lactame de Freidinger

Figure 42: Azabicyclo[4.3.0]nonanone (à gauche), azabicyclo[5.3.0]décanone et azabicyclo[3.3.0]octanone (à droite)

Figure 43: Spiro-lactames

Figure 44: Azatricyclo[5.2.1.0]décanone

Figure 45: Représentation d'aminooxy acides α , β et γ

Figure 46: Saccharides amino acides à partir de dérivé furanoïde

Figure 47: Saccharides amino acides à partir de dérivé pyranoïde

Figure 48: Squelette pipéridine-pyrrolidine

Figure 49: Espaceurs aromatiques

Figure 50: Série triazolo-amino acide aromatique (à gauche) et série triazolo-amino acide aliphatique (à droite)

Figure 51: Dicétopipérazine (à gauche), oxa-dicétopipérazine (au centre) et tetrahydro pyrazino[1,2-a]pyrimidine-dione (à droite)

Figure 52: Motif pyrrolinone (à gauche) et motif oxazolide-2-one (à droite)

Figure 53: Dérivé pyrrole

Figure 54: Dérivé pyrrolidine

Figure 55: Mime de coude β développé par Kirin (à gauche) et peptido-ferrocène (à droite)

Figure 56: Représentation d'une séquence rétro-inverse

Figure 57: Travaux de Grubbs (à gauche), de Li (au centre) et de Lavielle (à droite)

Figure 58: Différentes application basés sur les β -peptides

Figure 59: Les domaines d'applications des peptidomimétiques

Figure 60: Amino-acide bicyclo[3.1.0]hexane développé par Eli Lilly

Figure 61: Nomenclature usuelle (à gauche) et nomenclature IUPAC (à droite)

Figure 62: Aucuboside 1 (à gauche) et Aucuba japonica Thumb. (à droite)

Figure 63: Réductions des groupements hydroxyles à partir de l'aucuboside
Figure 64: Réduction des acétates allyliques à partir de peracétylaucuboside
Figure 65: Sous-produit obtenu par Weinges et al.
Figure 66: Couplage de Tsuji-Trost à partir du peracétylaucuboside
Figure 67: Réaction de benzylation de l'aucuboside et du dihydroaucuboside
Figure 68: Réaction de pivaloylation de l'aucuboside
Figure 69: Réaction d'acétylation de l'aucuboside
Figure 70: Déprotection des acétates par hydrolyse acide modérée
Figure 71: Déprotection sélective des acétates par le cyanure de potassium
Figure 72: Réaction de silylation à partir de l'aucuboside
Figure 73: Réduction sous atmosphère d'hydrogène des double liaisons de l'aucuboside
Figure 74: Hydrogénolyse des acétates allyliques et réduction de la double liaison C₇=C₈
Figure 75: Réaction de Vilsmeier sur le peracétylaucuboside
Figure 76: Motifs oxépanes
Figure 77: Réaction d'hydroxy-mercuration/démercuration
Figure 78: Réaction d'oxythallation/déthallation
Figure 79: Formation d'halo-éthers et halo-acétates
Figure 80: Formation de bromohydrines et bromolactones
Figure 81: Formation de iodolactol en présence de TTI
Figure 82: Synthèse de iodolactols puis de iodolactones à partir de dérivé de l'aucuboside
Figure 83 : Motifs cyclopenta[1.2]furane et bicyclo[3.1.0]hex-2-ène
Figure 84: Réarrangement oxydatif d'oléfine dihydropyranique
Figure 85: Contraction du cycle dihydropyranique du perpivaloylaucuboside
Figure 86: Mécanisme expliquant la formation du squelette cyclopenta[1,2-c]furane
Figure 87: Différentes méthodes pour obtenir le motif cyclopenta[1,2-c]furane
Figure 88 : Mécanisme réactionnel expliquant la formation du motif cyclopenta[1,2-c]furane
Figure 89 : Mécanisme réactionnel expliquant la formation de la lactone α,β -insaturée
Figure 90: Mécanisme réactionnel expliquant la formation du bicyclo[3.1.0]hex-2-ène
Figure 91: Structure Chemdraw et représentation ORTEP du composé 53
Figure 92: Composés obtenus à partir de la réactivité de l'aucuboside
Figure 93: Analogues cytotoxiques possédant un dérivé cyclopentènone
Figure 94: Monostatines et leur analogue aminocyclopentitol contraint
Figure 95: γ -amino-acides glycosylés contraints
Figure 96: γ -amino-acides contraints, analogue de GABA
Figure 97: châssis moléculaires chiraux

Figure 98: Fonctionnalisation de la fonction amine à partir du châssis 61

Figure 99: Schéma résumant la synthèse de 62 et 63 réalisée à grande échelle

Figure 100: Fonctionnalisation de la fonction amine à partir du châssis 62

Figure 101: Représentation du peptide v114 avec le logiciel Discovery Studio

Figure 102: Coude β formé à partir de quatre acides aminés

Figure 103: Coude α formé à partir de cinq acides aminés

Figure 104: δ et γ amino-acides bicyclo[3.1.0]hex-2-ène

Figure 105: Peptides modèles avec le N-ter acétylé et le C-ter amidifié

Figure 106: Peptides modèles protégés au niveau du N-ter et du C-ter

Figure 107: Procédure pour réaliser la dynamique moléculaire

Figure 108: Cluster issu de l'analyse par RMSD

Figure 109: Représentation de la liaison hydrogène et des distances $C_{\alpha i} \rightarrow C_{\alpha i+3}$ du peptide 87

Figure 110: Représentation de la liaison hydrogène et des distances $C_{\alpha i} \rightarrow C_{\alpha i+3}$ du peptide 85

Figure 111: Représentation de la liaison hydrogène et des distances $C_{\alpha i} \rightarrow C_{\alpha i+3}$ du peptide 86

Figure 112: Représentation de la liaison hydrogène et des distances $C_{\alpha i} \rightarrow C_{\alpha i+3}$ du peptide 88

Figure 113: Représentation de la liaison hydrogène et des distances $C_{\alpha i} \rightarrow C_{\alpha i+3}$ du peptide 89

Figure 114 : Représentation des pseudo coudes observés

Figure 115: Conformations dans l'eau du peptide 85

Figure 116: Conformations dans l'eau du peptide 88

Figure 117: Conformations dans l'eau du peptide 89

Figure 118: Synthons clés de la synthèse

Figure 119: Voie de synthèse à l'échelle semi-industrielle du synthon 69

Figure 120 : Mécanisme réactionnel expliquant la formation du perpivaloylaucuboside

Figure 121: Mécanisme réactionnel expliquant la formation des iodolactols

Figure 122: Mécanisme réactionnel expliquant la formation des iodolactones

Figure 123: Formation du bicyclo[3.1.0]hex-2-ène

Figure 124: Alkylation de la fonction acide carboxylique

Figure 125: Obtention du composé 69

Figure 126: Mécanisme réactionnel expliquant la formation du dérivé iodé par la variante de la réaction de Mitsunobu

Figure 127 : Alkylation par le (triméthylsilyl)diazométhane

Figure 128: Mécanisme d'alkylation par le (triméthylsilyl)diazométhane

Figure 129: Lactone 91 formée lors du passage de 66 à 69

Figure 130: Essais de réduction du composé 66

Figure 131: Formation d'un bon nucléofuge (tosylate à gauche et mésylate à droite)

Figure 132 : Réduction via la formation d'un thioacétal

Figure 133: Réduction via la formation d'une tosylhydrazone

Figure 134: Réduction de la tosylhydrazone par un borane

Figure 135: Mécanisme expliquant la réduction de la tosylhydrazone par le catécholborane

Figure 136: Réduction de la tosylhydrazone par NaBH_3CN

Figure 137: Mécanisme expliquant la réduction de la tosylhydrazone par le NaBH_3CN

Figure 138: Réduction par un hydrure de silicium

Figure 139: Mécanisme impliqué dans la réduction d'un dérivé carbonyle par le PMHS en présence de $\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_3$

Figure 140 : Peptides modèles à synthétiser

Figure 141: Réaction de déprotection des esters pivaliques

Figure 142: Obtention des précurseurs 62 et 63

Figure 143: Voie de synthèse du peptide 85

Figure 144: Condition classique du laboratoire pour déprotéger le phtalimide

Figure 145: Variation de la procédure standard du laboratoire pour retirer le phtalimide

Figure 146: Déprotection du phtalimide à l'aide du NaBH_4 puis d'acide acétique

Figure 147: Déprotection du phtalimide à l'aide d'éthylène di-amine

Figure 148: Déprotection du phtalimide à l'aide d'hydrazine

Figure 149: Couplage peptidique entre l'alanine Boc et l'amine du bicyclo[3.1.0]hex-2-ène

Figure 150: Double saponifications des esters méthylique et pivalique

Figure 151: Couplage peptidique entre l'acide du bicyclo[3.1.0]hex-2-ène et l'amine de l'alanine methyl ester

Figure 152: Voie de synthèse du peptide 86

Figure 153: Réduction de la double liaison en présence d'un catalyseur métallique et sous atmosphère de dihydrogène

Figure 154: Mécanisme réactionnel de la réduction de la double liaison par le diimide

Figure 155: Structure Chemdraw et représentation ORTEP de la pyridazinone 107

Figure 156: Réduction de la double liaison en présence d'hydrazine et d'un oxydant

Figure 157: Effets NOE prouvant l'obtention du diastéréoisomère R du composé 108 (RMN 2D NOESY)

Figure 158: Première voie de synthèse du peptide 88

Figure 159: Réduction du composé 71 avec le couple hydrazine/eau oxygénée

Figure 160: Effets NOE prouvant l'obtention du diastéréoisomère R du composé 110 (RMN 2D NOESY)

Figure 161 : Composé obtenu lors de l'étape de saponification

Figure 162 : Peptide 113

Figure 163 : Nouvelle voie de synthèse pour obtenir 88

Figure 164 : Déprotection sélective au méthanolate de sodium

Figure 165: Schématisation de la synthèse peptidique sur support solide

Figure 166: Synthétiseur automatique de peptides

Figure 167: Agents de fluoration

Figure 168: Les carbodiimides

Figure 169: Les bons nucléophiles

Figure 170: Dérivés uroniums

Figure 171: Dérivés phosphoniums

Figure 172: Mécanisme expliquant la formation de l'ester activé

Figure 173: Fixation du premier acide aminé sur la résine

Figure 174: Déprotection du groupement protecteur

Figure 175: Mécanisme de clivage d'un groupement Fmoc

Figure 176: Représentation du protocole utilisé pour la synthèse peptidique sur support solide

Figure 177: Clivage des groupements protecteurs et de la résine

Figure 178: Etude de stabilité par RMN ^1H de nos composés en milieu acide

Figure 179: Amino-acides Fmoc à utiliser pour la synthèse peptidique

Figure 180: Schéma de synthèse pour la préparation de la stratégie Fmoc

Figure 181: Peptides modèles

Figure 182: Représentation graphique des déplacements chimiques des NH du peptide 85

Figure 183: Représentation graphique des déplacements chimiques des NH du peptide 113

Figure 184: Représentation graphique des déplacements chimiques des NH du peptide 85

Figure 185: Effets NOE impliquant le proton H_6 (RMN 2D NOESY)

Figure 186: Amino-acides ortho-nosyle à utiliser pour la synthèse peptidique

Figure 187: Schéma de synthèse pour la préparation des acides aminés 118 et 119

Liste des tableaux

- Tableau 1: Principales molécules anti-angiogéniques approuvées par la FDA
- Tableau 2: Teneur en aucuboside en fonction du mois de collecte à partir des parties aériennes fraîches
- Tableau 3: Ratio entre les iodolactones 44a (4R) et 44b (4S) en fonction des réactifs utilisés pour former les iodolactols
- Tableau 4: Résultats obtenus avec les trois méthodes possibles
- Tableau 5: Valeurs des angles dièdres relevées pour les coudes β des peptides naturels
- Tableau 6: Valeurs des angles dièdres autorisés pour les coudes α dans les peptides naturels
- Tableau 7: Pourcentage des conformations contenant un coude β calculé par dynamique moléculaire
- Tableau 8: Pourcentage sur 100 ns de coude formé en fonction de la présence de la liaison hydrogène. (a) Pourcentage sur 200 ns
- Tableau 9: Pourcentage sur 100 ns de coude formé en fonction de la distance $C\alpha_i \rightarrow C\alpha_{i+3}$. (a) Pourcentage sur 200 ns
- Tableau 10: Pourcentage des conformations finales calculé par DFT à un niveau de théorie B3LYP/6-31+G(d)
- Tableau 11: Conditions réactionnelles pour la formation du dithiane
- Tableau 12: Conditions réactionnelles pour la réduction du thioacétal
- Tableau 13: Conditions réactionnelles pour la réduction de la tosylhydrazone par un borane
- Tableau 14: Conditions réactionnelles pour la réduction de la tosylhydrazone par NaBH_3CN
- Tableau 15: Conditions réactionnelles pour la réduction via un hydrure de silane/siloxane
- Tableau 16: Différentes conditions testées pour la réduction de la double liaison en présence d'un catalyseur métallique
- Tableau 17: Différentes conditions testées pour la réduction de la double liaison en présence d'hydrazine et d'un oxydant
- Tableau 18 : Conditions testées pour la réduction de la double liaison du composé 71
- Tableau 19 : Conditions testées pour la déprotection sélective du composé 108
- Tableau 20: Déplacements chimiques des NH du peptide 85
- Tableau 21: Déplacements chimiques des NH du peptide 109
- Tableau 22: Déplacements chimiques des NH du peptide 85

Titre : Conception de peptides présentant un coude β par des acides aminés γ et δ chiraux originaux issus d'un produit naturel

L'aucuboside, iridoïde naturel isolé en forte proportion à partir des parties aériennes d'*Aucuba japonica* Thumb. (Cornaceae), constitue une matière première chirale d'intérêt pour le chimiste, car sa génine présente quatre carbones asymétriques. La réactivité de la fonction éther d'énol permet le réarrangement du squelette iridoïde en squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène par une réaction de contraction de cycle.

A partir du squelette bicyclo[3.1.0]hex-2-ène, un amino acide γ et deux amino acides δ ont été synthétisés en dix étapes et utilisés dans la synthèse de trois tripeptides modèles. Complètement caractérisés par spectroscopie, leur capacité à induire des coudes β a été évaluée. Cette étude a été effectuée par dynamique moléculaire et par recherche conformationnelle pour générer un grand nombre de conformations permettant d'observer la présence ou l'absence de coude β . Pour les trois tripeptides modèles, l'énergie de conformations sélectionnées a été minimisée par DFT. Pour corroborer la modélisation moléculaire, une étude conformationnelle par des analyses spectroscopiques a été effectuée.

Les résultats obtenus expérimentalement et par l'étude *in-silico* ont permis d'identifier deux acides aminés prometteurs inducteurs de coude β .

De plus, la synthèse d'un amino acide sélectionné a été optimisée et réalisée à l'échelle multi-gramme pour permettre son emploi futur dans la synthèse d'un peptide ligand du VEGF.

Mots clés :

Aucuboside, Iridoïde, Bicyclo[3.1.0]hex-2-ène, Amino acides γ et δ , Peptides, Coude β , Héli-synthèse, Modélisation moléculaire

Title: Design of beta turn containing peptides with chiral original γ and δ amino acids obtained from a natural product

Aucubin, a natural iridoid isolated in large amount from aerial parts of *Aucuba japonica* Thumb. (Cornaceae), constitute an interesting chiral starting material for the chemist, because its aglycone contains four asymmetric carbons. The reactivity of the enol ether function allows the rearrangement of the iridoid skeleton into a bicyclo[3.1.0]hex-2-ene by ring contraction reaction.

From the bicyclo[3.1.0]hex-2-ene skeleton, one γ amino acid two δ amino acids and have been synthesized in ten steps and used in the synthesis of three model tripeptides. Completely characterized by spectroscopy, their capacity to induce β turns has been evaluated. This study has been achieved by molecular dynamics and by conformational search to generate a large number of conformations, to allow the detection of β turn. For the three model tripeptides, the energy of selected conformations has been minimized by DFT. To corroborate the molecular modelling results, a conformational study based on spectroscopic analysis has been achieved.

The results obtained by experimentally and by *in-silico* study allowed identifying two promising amino acids β turn inducers.

Moreover, the synthesis of one selected amino acid has been optimized and achieved on multi gram scale to allow its future use in the synthesis of a VEGF binding peptide.

Keywords:

Aucubin, Iridoid, Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, γ and δ amino acids, Peptides, β turn, Semi-synthesis, Molecular modelling