



HAL
open science

Synthèse et évaluation d'aminosucres, inhibiteurs de fucosidases

Carine Chevrier

► **To cite this version:**

Carine Chevrier. Synthèse et évaluation d'aminosucres, inhibiteurs de fucosidases : structure de base pour la conception d'inhibiteurs de fucosyltransférases. Chimie. Université de Haute Alsace, 2003. Français. NNT : 2003MULH0728 . tel-01262011

HAL Id: tel-01262011

<https://hal.science/tel-01262011>

Submitted on 26 Jan 2016

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.

*« Toutes nos connaissances
passées, présentes et à venir
ne sont rien au regard de ce
nous ne saurons jamais. »*

Ergueni Aleksandrovitch Evtouchenka

*A Papa, Maman,
Nathalie et Sandrine*

A Christophe

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de chimie bio-organique à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse.

Je tiens à remercier le professeur Céline Tarnus et le docteur Albert Defoin pour m'avoir accueillie dans leur équipe durant ces années enrichissantes. Merci à vous deux pour m'avoir fait partagé une partie de votre savoir et pour m'avoir aidé à renforcer mon caractère.

Céline, merci pour l'initiation à la biochimie, pour les diverses discussions que nous avons eues ainsi que pour ton rôle « d'assistante sociale » dans les moments un peu moins faciles qui surviennent lors d'une thèse.

Albert, merci pour votre encadrement omniprésent et vos conseils, pour votre gentillesse, pour les sorties en montagne et pour le sifflet incessant qui dispense le labo de radio.

Que Madame Solladié-Cavallo et Messieurs Badet et Eustache veuillent bien recevoir mes remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier Mme Christiane Strehler pour son aide lors des séparations HPLC et pour son dynamisme, ainsi que Mme Renée Baron pour avoir été ma « maman » de labo.

Merci Anna pour les heures d'enseignement passées avec toi, pour ton soutien et nos nombreuses discussions.

Didier...., sans toi la RMN n'aurait pas été aussi amusante ! Merci pour ton aide précieuse dans l'analyse des spectres et pour ton humeur bretonne.

Quant à toi, Stéphane, merci pour ton amitié, pour ton aide en RMN et surtout pour tous les dépannages informatiques !!!

Merci à Sébastien et Vincent pour avoir égayé le labo de leur présence lors de ma dernière année de thèse. A vous de prendre la relève ! Et n'oubliez pas de ranger le labo...

Je remercie très sincèrement toute l'équipe de l'UMR pour la bonne ambiance de travail, les conseils de chacun, en particulier ceux de Philippe, et tous les souvenirs que je garderai de ces trois années. Je citerai notamment Théo, pour sa gentillesse, Vincent, Sabine et Pierre pour leur sympathie.

La miss !!! Mais non Estelle, je ne t'ai pas oubliée...Merci pour m'avoir finalement très rapidement intégrée dans ton harem ! Merci pour ces trois années partagées, ton soutien et ton amitié dans les moments difficiles comme dans ceux de joie.

Je ne saurais oublier mes parents et mes sœurs qui m'ont aidée et soutenue, chacun à leur façon, au long de toutes ces années d'études. Et bien sur, merci à Christophe pour m'avoir assisté et pour avoir supporté mes humeurs changeantes avec toujours autant d'affection.

Avant propos	
<i>Liste des abréviations</i>	1
<i>Numérotation des atomes des molécules</i>	3
<i>Index des molécules</i>	4
Synopsis	10
Introduction générale	11
1. Structures et fonctions des glycosides	11
<i>Les glycoprotéines</i>	13
<i>Les glycolipides</i>	13
2. Projet de recherche	15
<i>Aminosucre en série tétrose: choix d'un inhibiteur de fucosidase</i>	15
<i>Synthèse en série L-Lyxose</i>	15
<i>Fonctionnalisation de la nitroène</i>	16

Partie I: La famille des glycosyl-hydrolases: choix d'un inhibiteur puissant de fucosidase de mammifère

Etat des connaissances

1. Les différentes classes de glycosyl-hydrolases	20
2. Mécanisme catalytique	21
3. Les inhibiteurs de glycosidases	22
4. Inhibiteurs d'α-L-fucosidase	25

Aminosucre en série tétrose: choix d'un inhibiteur puissant de fucosidase

1. Les différentes stratégies de synthèse des aminosucre	30
2. Synthèse des aminosucre en série érythrose et ribose	31
3. Synthèse des aminosucre en série thréose	31
4. Inhibition de glycosidase in vitro: Choix d'un inhibiteur puissant de fucosidase	36
<i>Etudes de stabilité</i>	36
<i>Etudes de sélectivité</i>	38
<i>Bilan: Activité inhibitrice des tétroses</i>	41
5. Conclusion	43

Partie II: Conception d'inhibiteurs de fucosyltransférases

Importance physiologique des fucosyltransférases: processus de migration cellulaire

1. Phénomène d'extravasation	46
2. Les sélectines et leurs ligands	48
<i>Les différentes sélectines</i>	48
<i>Les ligands des sélectines</i>	49
3. L'acide sialyle Lewis x: SLex	50
<i>Structure et biosynthèse du SLex</i>	50

<i>Interactions sélectines- SLe^x</i>	51
<i>Inhibition des interactions SLe^x - sélectines</i>	53
Mimes de SLe ^x	53
Autres analogues du SLe ^x	54
Inhibition de la biosynthèse du SLe ^x	54

Les fucosyltransférases

1. Une classe particulière de glycosyltransférase	55
2. Mécanisme catalytique	57
3. Revue des inhibiteurs	59

Inhibiteurs de fucosyltransférases: vers la synthèse d'analogues de GDP-fucose

Synthèse en série L-lyxose

1. La nitrone: synthèse et propriétés	64
<i>Méthodes de préparation des nitrones</i>	64
<i>Propriétés des nitrones</i>	69
Les réductions	70
Addition d'un nucléophile	70
La cyclo-addition 1,3-dipolaire	71
2. Synthèse de la nitrone en série L-lyxose	72
<i>Schéma rétrosynthétique</i>	72
<i>Protection du D-ribose</i>	73
<i>Formation du groupe méthyle</i>	73
Bromation de l'alcool	74
Élimination du brome	74
Autres alternatives	76
<i>Débenzylation de la position anomérique</i>	77
<i>Insertion de l'azote: Formation de l'oxime</i>	78
<i>Formation de la nitrone</i>	78
Préparation à la cyclisation intramoléculaire	78
Cyclisation et inversion du méthyle	79
Seconde voie de synthèse	81
<i>Vers l'obtention de l'aminosucré</i>	82
<i>Déprotection des amino-sucres</i>	83
3. Activité inhibitrices sur l'α-L-fucosidase	84
4. Conclusion	86

Fonctionnalisation de la nitrone

1. Réaction de cyclo-addition 1,3-dipolaire	89
<i>Les dipôles</i>	89
<i>Mécanisme</i>	90
<i>Séréochimie</i>	91
2. Fonctionnalisation de la nitrone par cyclo-addition 1,3-dipolaire	92
<i>Greffages de chaînes à deux carbones</i>	92
Isomérisation en esters	95
Formation d'acide et d'alcool	97
Formation d'acides hydroxamiques	98
Mise en valeur de la synthèse d'acide hydroxamique	99
<i>Greffage de chaînes phosphates</i>	101
Cyclo-addition 1,3-dipolaire	101
Ouverture des adduits bicycliques	103

Déshydroxylation	104
<i>Conclusion</i>	106
3. Fonctionnalisation de la nitrone par substitution nucléophile	107
<i>Greffage de chaînes carbonées</i>	107
<i>Greffage de chaînes phosphorées</i>	108
Substitution directe	108
Substitution par un lithien du méthyle phosphonate	111
Formation du dérivé pyrophosphate	111
<i>Conclusion</i>	112
4. Inversion de configuration en position anomérique	113
<i>Méthode d'inversion pour les composés dérivés des substitutions nucléophiles</i>	113
<i>Méthode d'inversion pour les composés dérivés des cyclo-additions 1,3-dipolaires</i>	116
<i>Conclusion</i>	117
5. Tests enzymatiques	117
<i>Résultats préliminaires sur la fucosyltransférase III</i>	117
<i>Inhibition de l'α-L-fucosidase</i>	118

Conclusion générale

Partie III: Parties expérimentales

Partie expérimentales: chimie

1. Généralités	125
2. Partie expérimentale: synthèse en série tétrose	127
<i>Synthèse en série L-thréose</i>	127
<i>Synthèse en série D-thréose</i>	130
3. Partie expérimentale: synthèse en série L-lyxose	133
<i>Synthèse de la nitrone à partir du ribitol</i>	135
<i>Synthèse de la nitrone en série L-lyxose</i>	137
4. Partie expérimentale: fonctionnalisation de la nitrone	149
<i>Synthèse du réactif</i>	149
<i>Cycloadditions 1,3-dipolaire</i>	149
<i>Synthèse des esters</i>	153
<i>Synthèse des dérivés des esters</i>	157
<i>Synthèse d'acides hydroxamiques</i>	161
<i>Cycloadditions 1,3-dipolaire avec les composés phosphorés</i>	169
<i>Synthèse des produits phosphorés dérivés de la cycloaddition</i>	172
<i>Synthèse par substitutions nucléophiles</i>	179
<i>Synthèse du dérivé pyrophosphate</i>	188
<i>Inversion de la position pseudo-anomérique</i>	190

Partie expérimentales: tests enzymatiques

1. Généralités	192
<i>Inhibiteur compétitif</i>	192
<i>Evaluation du pouvoir inhibiteur</i>	193
Définitions	193
Représentations graphiques	193
2. Essais enzymatiques	195
<i>Les glycosidases</i>	195
Description générale	195
Mode opératoire	195

Etude de stabilité	196
<i>La fucosyltransférase III</i>	196
Description générale	196
Mode opératoire	197

Bibliographie	201
----------------------	-----

Liste des abréviations

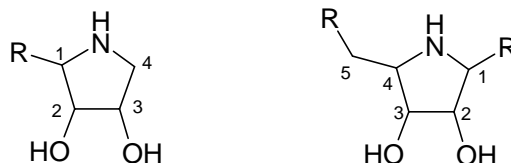
GDP	guanosine diphosphate
GDP-fucose	guanosine diphosphate β -L-fucose
GMP	guanosine monophosphate
FucT	fucosyltransférase
$\alpha(1,3)$ FucT	$\alpha(1\rightarrow3)$ -fucosyltransférase
sLe ^x	sialyl Lewis x
sLe ^a	sialyl Lewis a
BE	<i>bovine epididymis</i> , thymus de bovin
BK	<i>bovine kidney</i> , rein de bovin
HL	<i>human liver</i> , foie humain
HP	<i>human placenta</i> , placenta humain
MeOH	méthanol
Cyclo	cyclohexane
AcOEt	acétate d'éthyle
AcOH	acide acétique
AcOK	acétate de potassium
EtOH	éthanol
iPr ₂ O	éther diisopropylique
iPrOH	alcool isopropylique
CH ₂ Cl ₂	dichlorométhane
THF	tétrahydrofurane
CH ₃ CN	acétonitrile
Et ₂ O	éther diéthylique
Py	pyridine
CHCl ₃	chloroforme
CDCl ₃	chloroforme deutérié
D ₂ O	eau lourde
Bn	benzyle
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
Me	méthyle, CH ₃
Ni/Ra	nickel de Raney
Pd/C	palladium sur charbon actif
AIBN	2,2'-azobisisobutyronitrile
P ₂ O ₅	pentaoxyde de phosphore
TBS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
DBU	diazabicyclo-undécène
<i>m</i> -CPBA	acide <i>méta</i> -chloroperbenzoïque
TBAF	fluorure de tétrabutylammonium
Ms	mésyle
h	heure
min	minute
aq.	aqueux
eq.	équivalent
c	concentration

t.a.	température ambiante
conc.	concentré
Rdt	rendement
Quant	quantitatif
R_f	rapport frontal
M	masse molaire
F	point de fusion
déc.	décomposition
CCM	chromatographie sur couche mince
HPLC	chromatographie liquide haute-pression
ν	longueur d'onde
ϵ	constante diélectrique
IC ₅₀	concentration en inhibiteur conduisant à 50% d'inhibition
K_i	constante d'inhibition
Do	densité optique
RMN	résonance magnétique nucléaire
	s: singulet, sl: singulet large, d: doublet, t: triplet, q: quadruplet, quint.: quintuplet,
nOe	effets Overhauser nucléaires

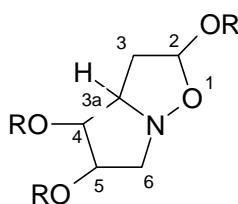
Numérotation des atomes des molécules

La numérotation des composés sera réalisée comme suit:

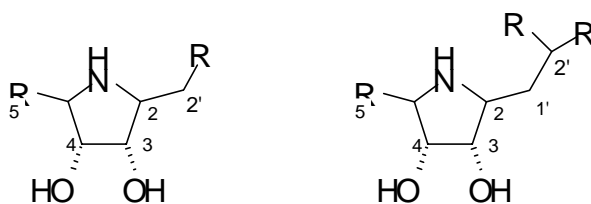
Numérotation des aminosucre:



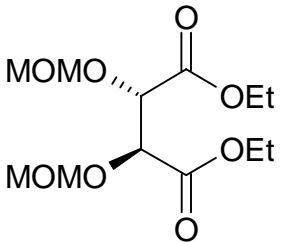
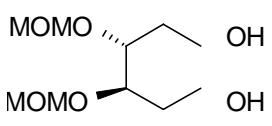
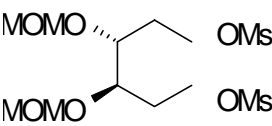
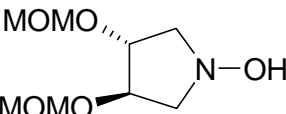
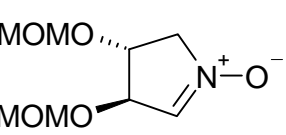
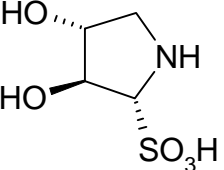
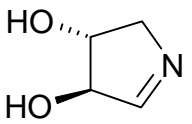
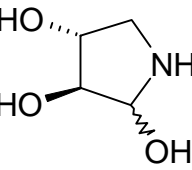
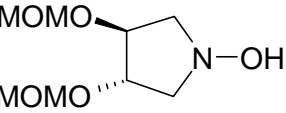
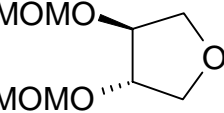
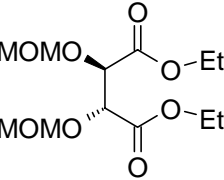
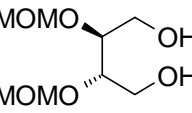
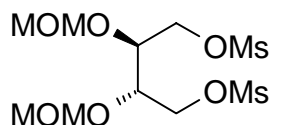
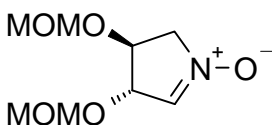
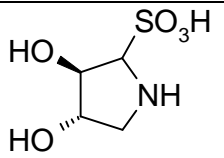
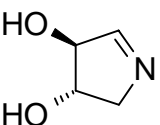
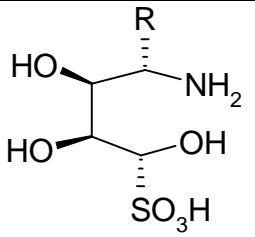
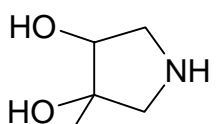
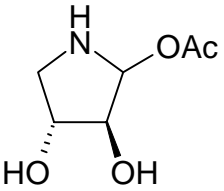
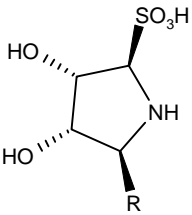
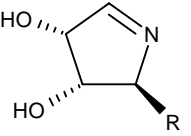
Numérotation des adduits bicycliques:



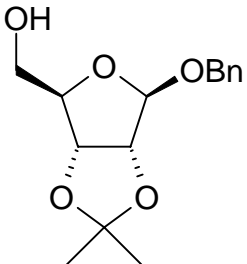
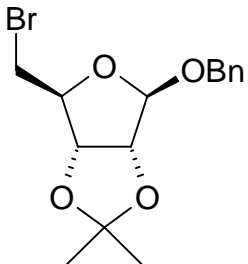
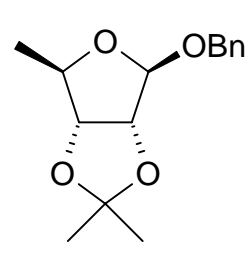
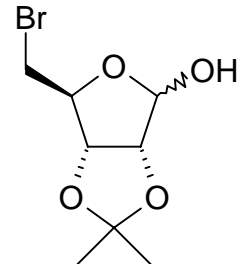
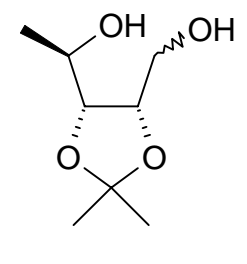
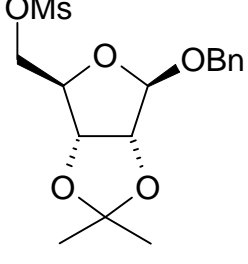
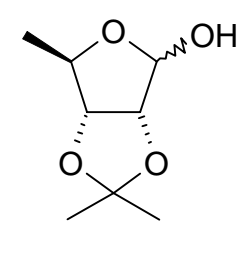
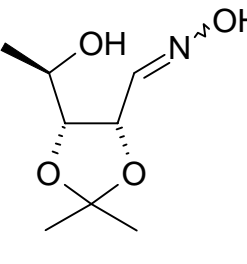
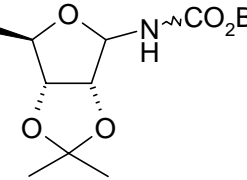
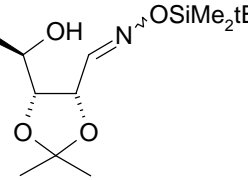
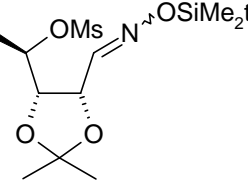
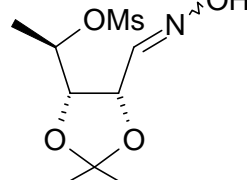
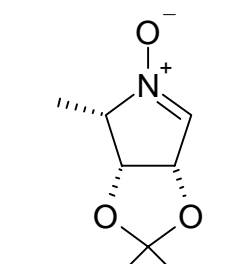
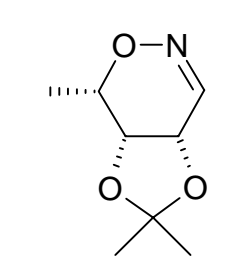
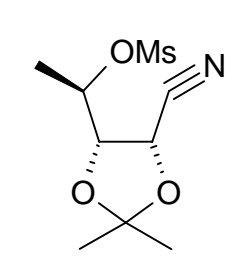
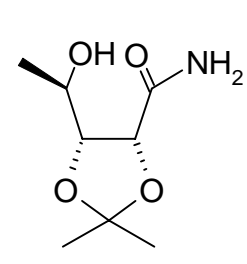
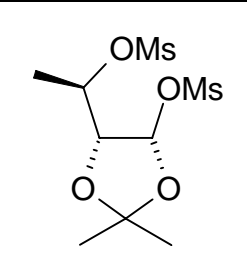
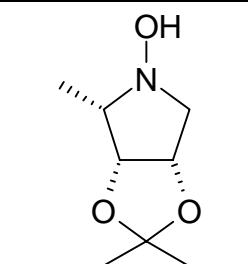
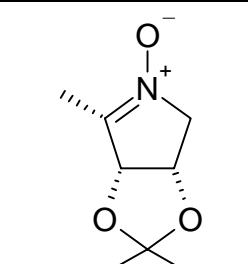
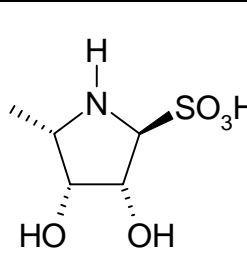
Numérotation des dérivés des adduits bicycliques:

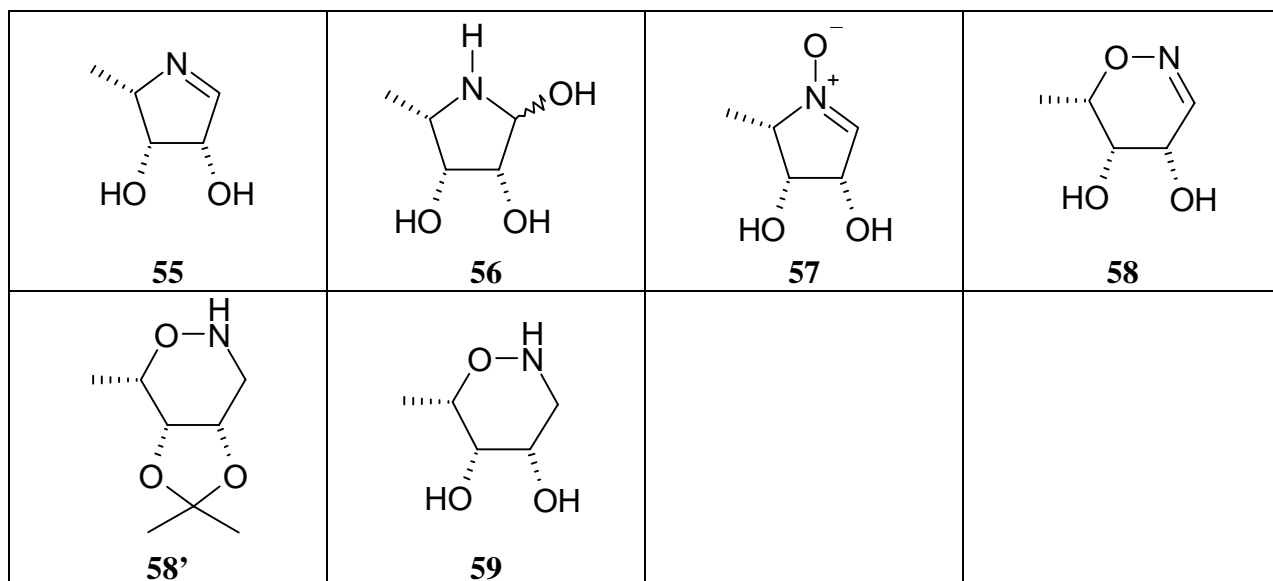


Récapitulatif des produits en série tétrose

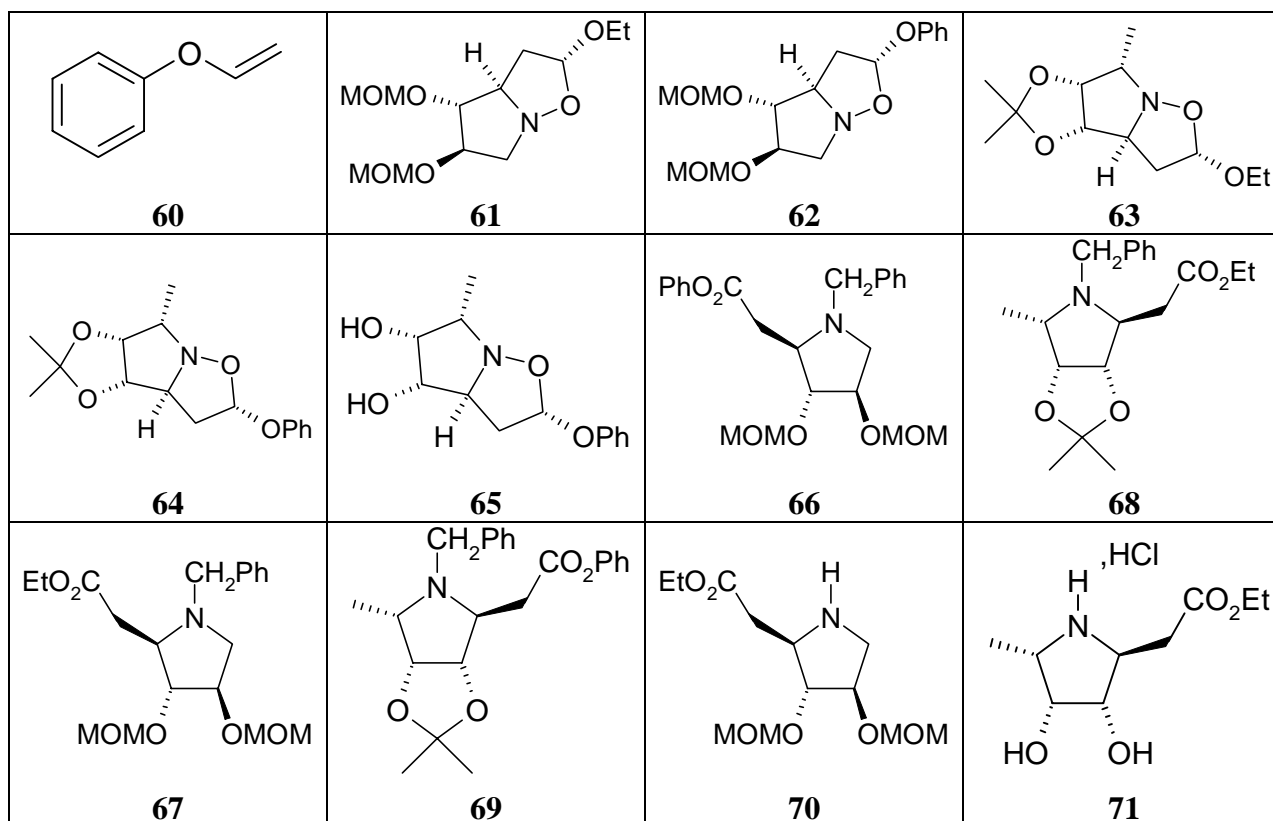
 <p>12</p>	 <p>13</p>	 <p>15</p>	 <p>9</p>
 <p>17</p>	 <p>18</p>	 <p>10</p>	 <p>19</p>
 <p>20</p>	 <p>21</p>	 <p>23</p>	 <p>24</p>
 <p>25</p>	 <p>26</p>	 <p>27</p>	 <p>28</p>
 <p>29</p>	 <p>31</p>	 <p>32</p>	 <p>L-6</p>
 <p>L-7</p>			

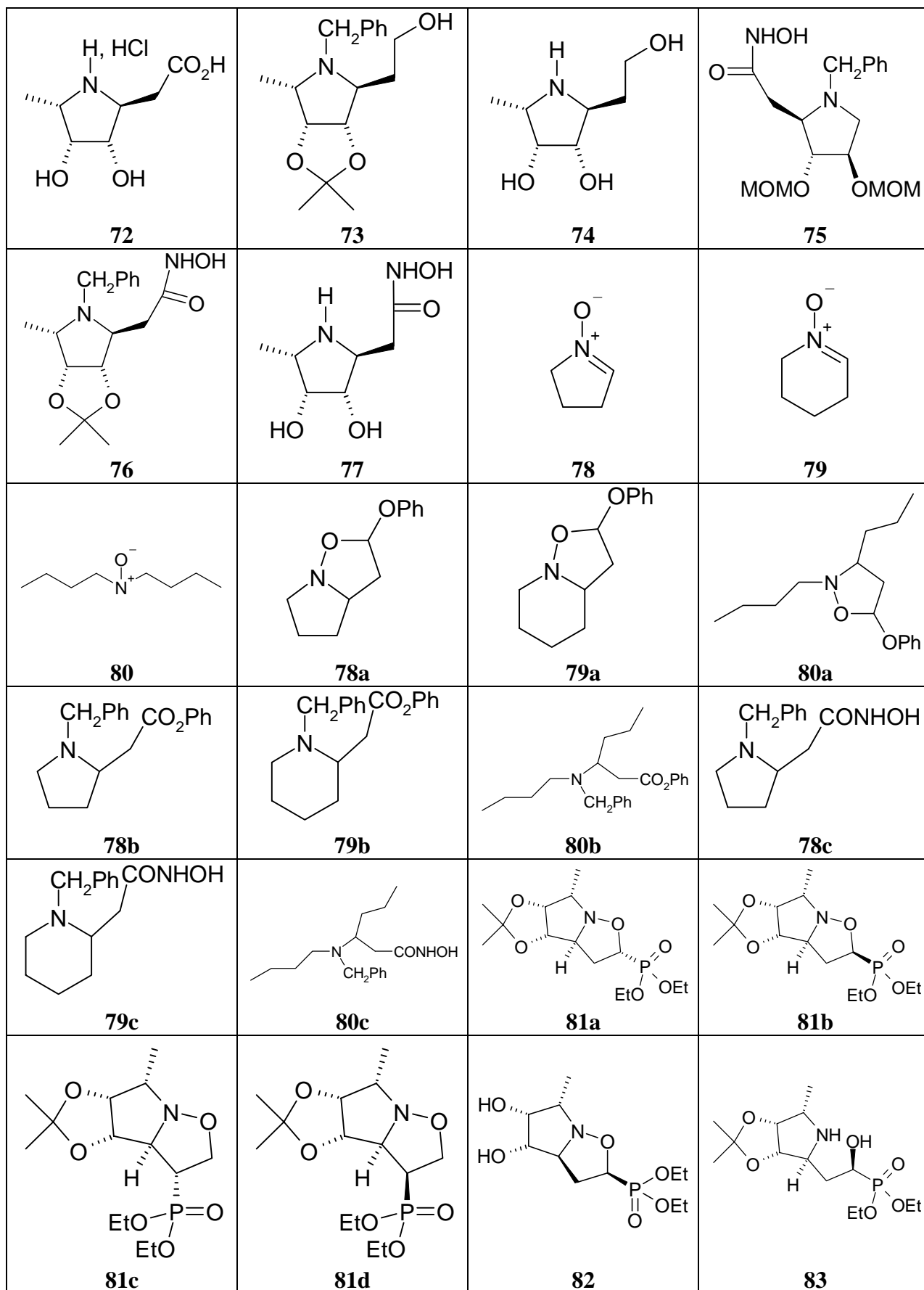
Récapitulatif des produits en série lyxose

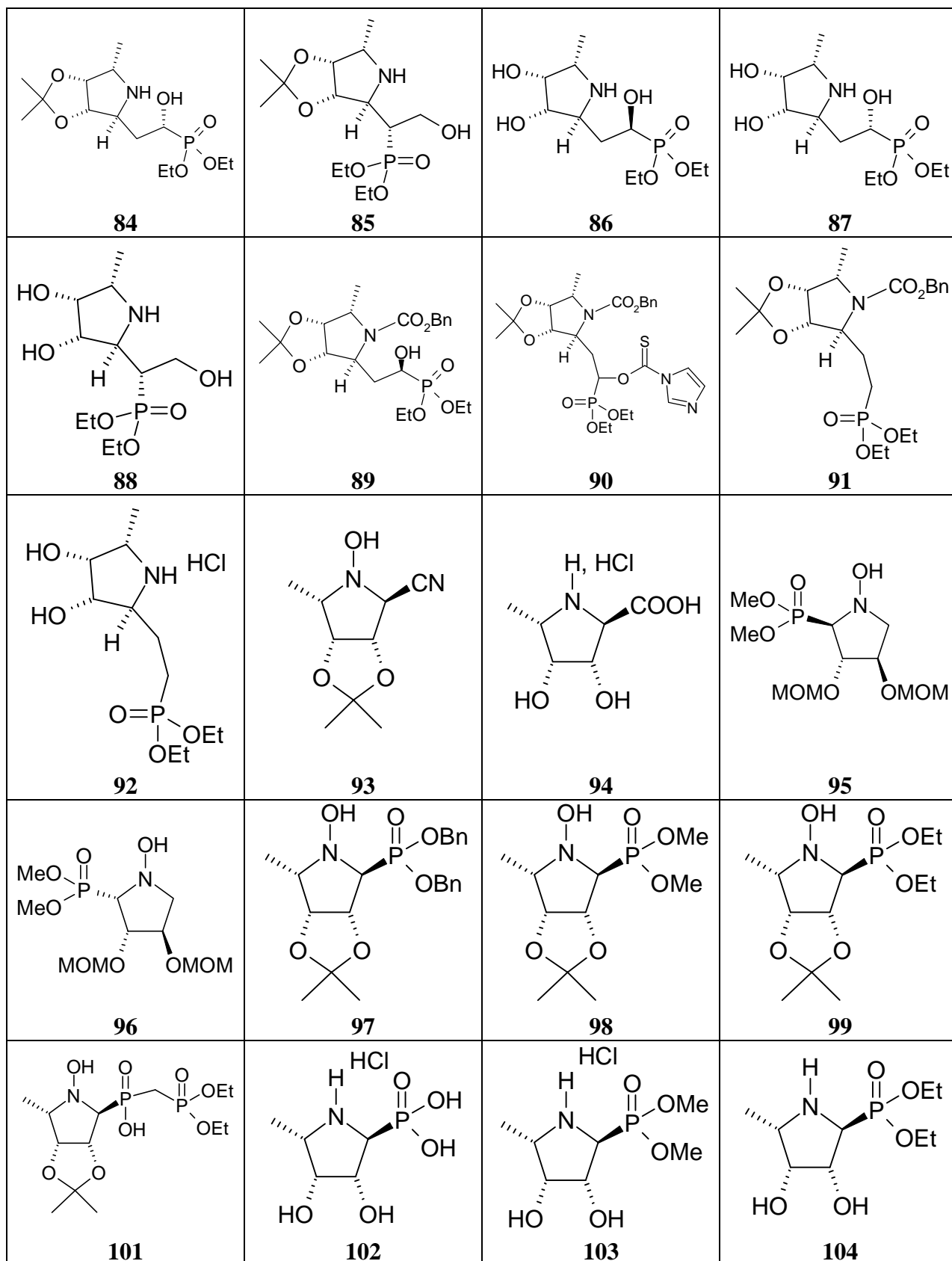
 <p>35</p>	 <p>36</p>	 <p>37</p>	 <p>38</p>
 <p>39</p>	 <p>40</p>	 <p>41</p>	 <p>42</p>
 <p>43</p>	 <p>44</p>	 <p>45</p>	 <p>46</p>
 <p>47</p>	 <p>48</p>	 <p>49</p>	 <p>50</p>
 <p>51</p>	 <p>52</p>	 <p>53</p>	 <p>54</p>

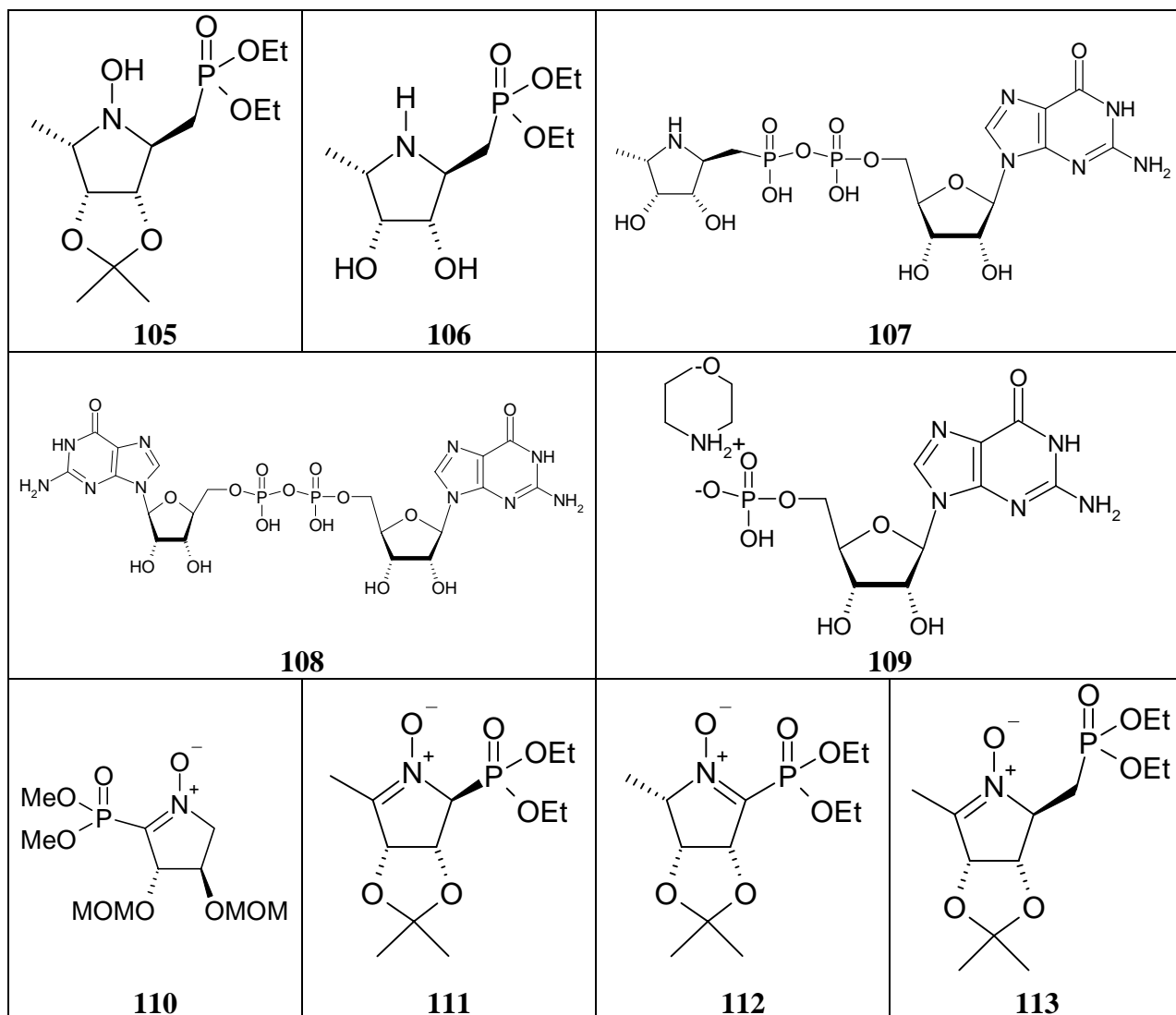


Récapitulatif des produits de greffage









Ce travail de thèse est un projet qui s'inscrit dans la thématique du laboratoire et il fut initié par Muriel Joubert. Il a pour objectif de synthétiser des inhibiteurs de fucosyltransférase, agents anti-inflammatoires potentiels.

La phase initiale de ce processus d'inflammation fait appel un ligand saccharidique, l'acide sialyl Lewis x (SLe^x), dont la biosynthèse semble faire intervenir une fucosyltransférase particulière de type VII. Cette réaction enzymatique utilise un donneur de fucose, la guanosinediphosphate- β -L-fucose ou GDP-fucose. Le fucose est alors transféré sur un trisaccharide afin de former le SLe^x. Nous avons choisi de concevoir des analogues stables du donneur de fucose afin d'inhiber l'activité catalytique des fucosyltransférases.

Nous nous sommes inspirés des composés aminés de sucres, déjà synthétisés au laboratoire.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la famille des glycosidases et à la sélectivité de leurs inhibiteurs. Nous nous sommes plus particulièrement fixés sur la détermination et la synthèse d'un type d'inhibiteur idéal pour l' α -L-fucosidase. Cette enzyme est notre modèle pour la reconnaissance des aminosucres synthétisés.

Dans un second temps, nous avons créé une nouvelle voie de synthèse, d'un puissant inhibiteur de fucosidase afin de conduire à une structure de base facilement fonctionnalisable en vue de synthétiser des inhibiteurs potentiels de fucosyltransférase. Cette synthèse nous a conduit un intermédiaire clé: une nitrone en série L-lyxose.

La chimie autour de cette nitrone a alors été développée pour donner accès à différents greffages de chaînes carbonées ou phosphonates. Les propriétés réactionnelles de la nitrone ont été mises à profit pour réaliser des cyclo-additions 1,3-dipolaires ou des substitutions nucléophiles. Ces deux méthodologies nous permettent d'obtenir une série de différents produits dont il sera nécessaire d'inverser la position pseudo-anomérique afin d'obtenir des analogues de GDP- β -L-fucose.

Tous les produits obtenus seront testés sur les deux classes d'enzymes: l' α -L-fucosidase et la fucosyltransférase.

1. Structures et fonctions des glycosides

Les glycosides, matière première de nos travaux, constituent une grande famille de molécules du vivant. Ce sont des biopolymères composés d'enchaînements de monosaccharides ou "sucres" liés par une liaison glycosidique. Selon la longueur de la chaîne constituée, nous parlerons de disaccharide (deux unités), d'oligosaccharides (quelques unités) ou encore de polysaccharides (avec des masses molaires pouvant largement dépasser le million de daltons) (schéma I.0).

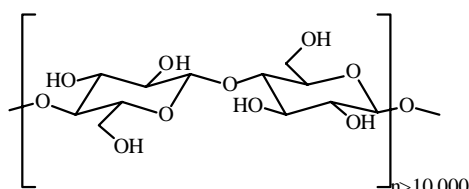


Schéma I.0. Exemple d'un polysaccharide: la cellulose.

Les sucres simples constituent une classe de molécules possédant une très grande variabilité structurale (schéma I.1).

On dénombre alors:

- les pentoses et les hexoses
- les aldoses et les cétones
- la forme pyranosique ou furanosique
- la configuration α ou β
- les formes dérivées de sucres (désoxy-sucres, amino-sucres)

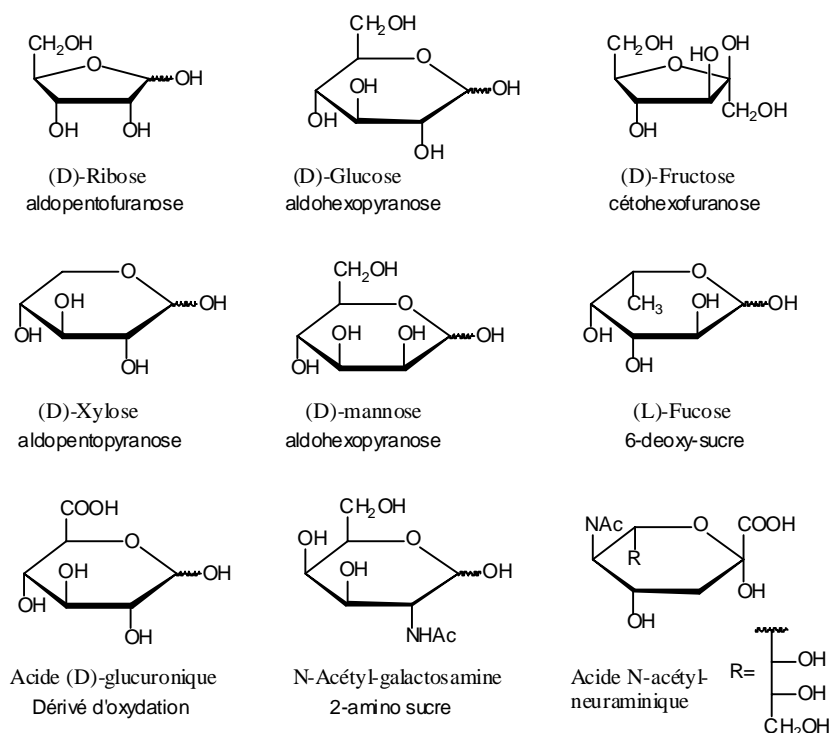


Schéma I.1. Exemples de diversité des sucres.

D'autre part, les liaisons glycosidiques peuvent être formées selon un grand degré de liberté entre le carbone anomérique du sucre et n'importe quel groupement hydroxyle d'un autre sucre, et ceci avec une configuration α ou β au niveau du carbone anomérique (schéma I.2).

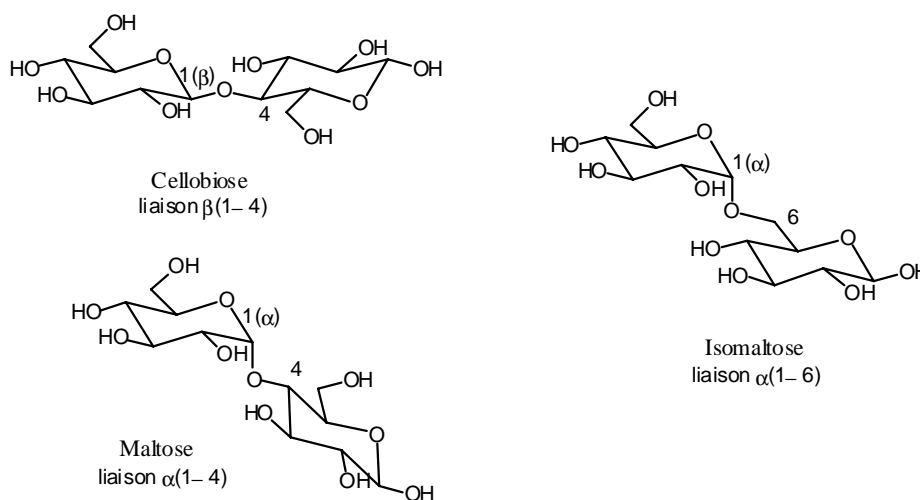


Schéma I.2. Exemples de liaisons glycosidiques.

Enfin, les liaisons glycosidiques peuvent se multiplier sur un même sucre, ce qui peut entraîner la formation de structures branchées aussi bien que linéaires et permet alors une grande variété structurale des composés (schéma I.3).

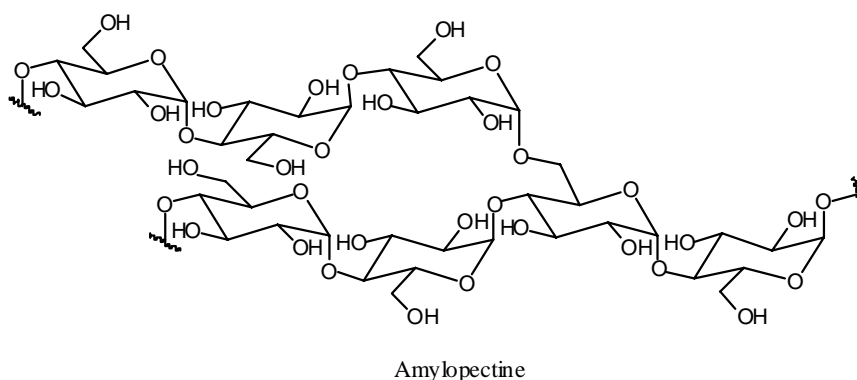


Schéma I.3. Exemple d'une structure branchée: l'amylopectine.

Cette grande diversité sous laquelle se retrouvent les glycosides dans la nature leur confère une multiplicité de rôles dans les systèmes biologiques.

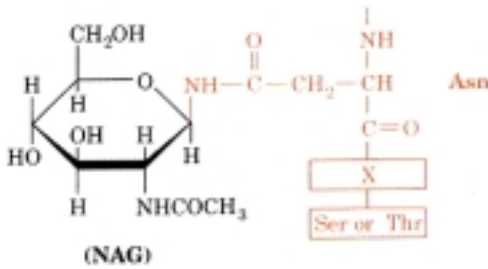
Ils sont d'importants intermédiaires métaboliques, composants structuraux de l'ADN et des parois des bactéries et sont étroitement liés à de nombreux lipides et protéines. Ils jouent un rôle particulier dans les interactions cellules-cellules et la communication cellulaire en intervenant comme ligands pour des liaisons spécifiques. Ils constituent également les réserves et les ressources énergétiques d'un organisme.

Donnons quelques exemples concernant les glycoprotéines et les glycolipides.

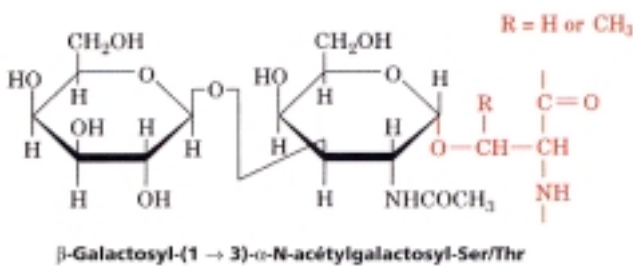
• **Les glycoprotéines**

Les oligosaccharides ont deux possibilités pour se lier directement aux protéines: les *N*-glycosylation et les *O*-glycosylation (schéma I.4). Ceci diversifie encore les propriétés structurales des oligosaccharides mais permet également d'élargir les fonctions physiologiques de ces derniers.

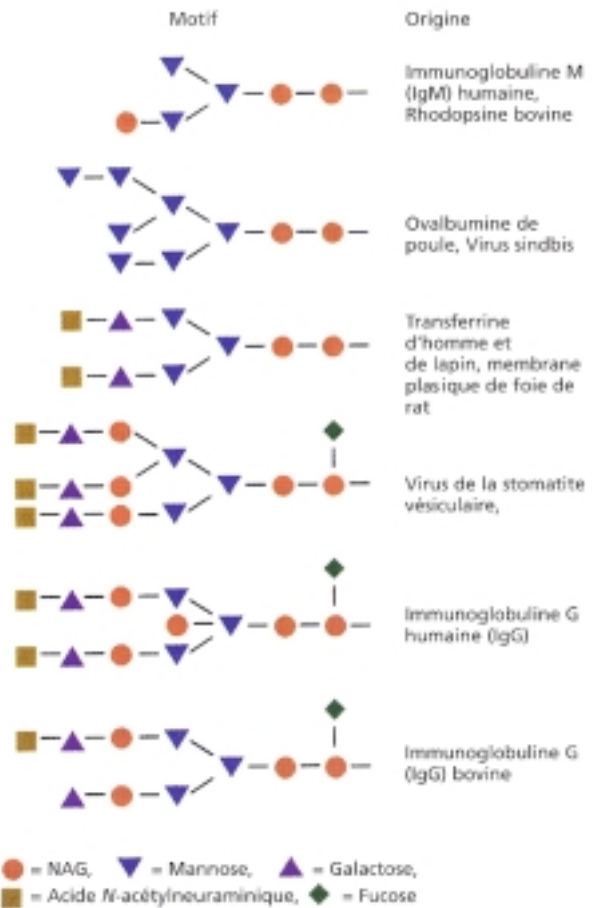
Les glycoprotéines sont essentiellement des constituants importants des membranes plasmiques et sont capables d'interagir au sein de systèmes de régulation ou de reconnaissance cellulaire.



Exemples de *N*-glycosylation (liés à Asn)



Exemples de *O*-glycosylation (liés au groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine)



Exemples d'utilisation en *N*-glycosylation

Schéma I.4. Exemples de glycoprotéines.

• **Les glycolipides**

Les glycolipides sont des constituants essentiels des membranes. Prenons l'exemple particulier des gangliosides, constituant complexe des sphingolipides (schéma I.5).

Ceux-ci forment une fraction significative des lipides cérébraux et ont un intérêt physiologique et médical considérable puisqu'ils peuvent entre autre être à l'origine de dégradation neurologique.¹

Notons également l'intérêt des sphingolipides dans la différenciation des groupes sanguins ABO.¹

2. Projet de recherche

Les travaux de cette thèse vont se diviser en deux grandes parties. Nous nous intéresserons tout d'abord aux enzymes qui hydrolysent les polysaccharides: les glycosidases. Puis dans une seconde partie, nous détaillerons les enzymes qui construisent les polysaccharides c'est-à-dire les glycosyltransférases. Les travaux sur ces dernières découleront directement des résultats observés avec les glycosidases, ces deux classes d'enzymes ayant en effet des points communs au niveau de leurs mécanismes catalytiques.

La présentation de ce travail se fera donc selon:

Partie I: La famille des glycosyl-hydrolases: Choix d'un puissant inhibiteur de fucosidases de mammifère

- I. Etats des connaissances
- II. Aminosucres en série tétrose

Partie II: Conception d'inhibiteurs de fucosyltransférases

- I. Importance physiologique des fucosyltransférases: processus de migration cellulaire
- II. Les fucosyltransférases
- III. Inhibiteurs de fucosyltransférases: vers la synthèse d'analogues de GDP-fucose

Regardons plus en détail les parties synthétiques de ce travail.

- **Aminosucres en série tétrose: choix d'un inhibiteur de fucosidase**

Nous sommes partis des aminosucres les plus simples, les tétroses, déjà synthétisé au laboratoire en série D- et L- aminoérythrose.

Afin de compléter cette série de composés, nous en avons synthétisé les isomères en séries D- et L-thréose. Ceci a été réalisé à partir de l'acide D- ou L-tartrique avec insertion de l'atome d'azote et cyclisation suivant le schéma rétrosynthétique I.6 suivant:

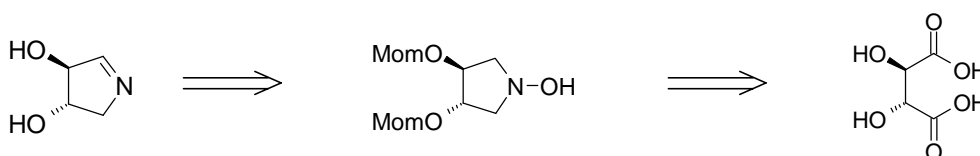


Schéma I.6. Schéma rétrosynthétique en série L-thréose.

Tous les produits de la série des tétroses ont été testés sur sept enzymes commerciales. La relation structure-activité que nous avons établie, nous a permis de définir des modèles de puissants inhibiteurs de glycosidases et de préciser la configuration la meilleure pour inhiber l' α -L-fucosidase.

- **Synthèse en série L-Lyxose**

Nous avons focalisé notre travail sur l'amino-L-lyxose et modifié la voie de synthèse connue au laboratoire afin de greffer à souhait cet aminosucre. Nous avons ainsi synthétisé le dérivé de type nitrone correspondant, qui est notre structure de base permettant de fonctionnaliser facilement la position anomérique assurant la transformation en analogue de GDP-fucose.

La première voie de synthèse réalisée a été conduite à partir du D-ribose en passant par un dérivé ribitol. Cette voie ne nous conduit qu'à l'isomère de la nitrone souhaitée (schéma I.7).

La seconde voie conduit à l'obtention de l'iminosucre souhaité à partir du D-ribose en passant par l'intermédiaire cyclique souhaité qu'est la nitrone (schéma I.7).

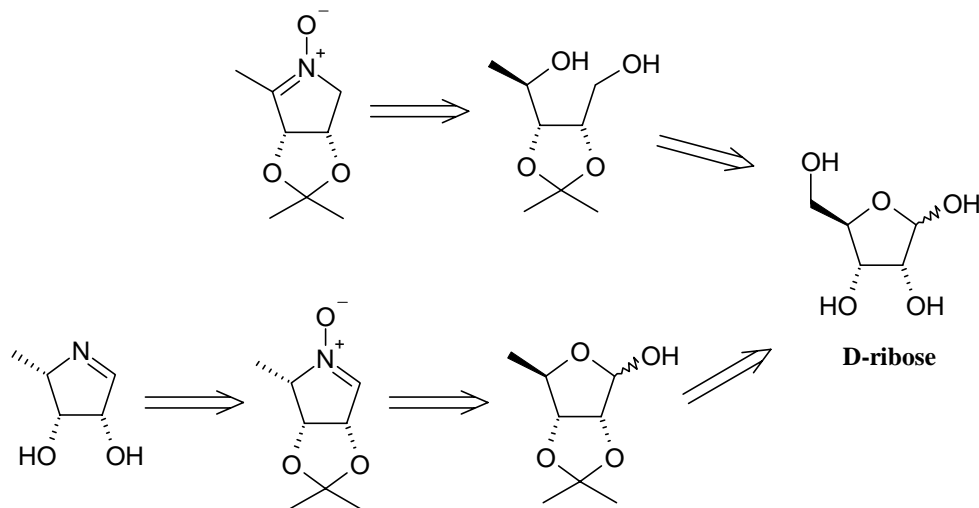


Schéma I.7. Schéma rétrosynthétique des voies de synthèse utilisées.

La nitrone ainsi que les produits secondaires obtenus lors de sa formation ont été testés sur l' α -L-fucosidase afin d'étudier leur activité en comparaison de celle de l' amino-L-lyxose.

• **Fonctionnalisation de la nitrone**

Ces structures nouvelles ont été obtenues à partir de la nitrone précédemment décrite. Un accent particulier a été mis sur la synthèse de chélatants métalliques (que l'on retrouve dans le site actif des fucosyltransférases) en substituant notre aminosucre par des dérivés phosphorés et des acides hydroxamiques.

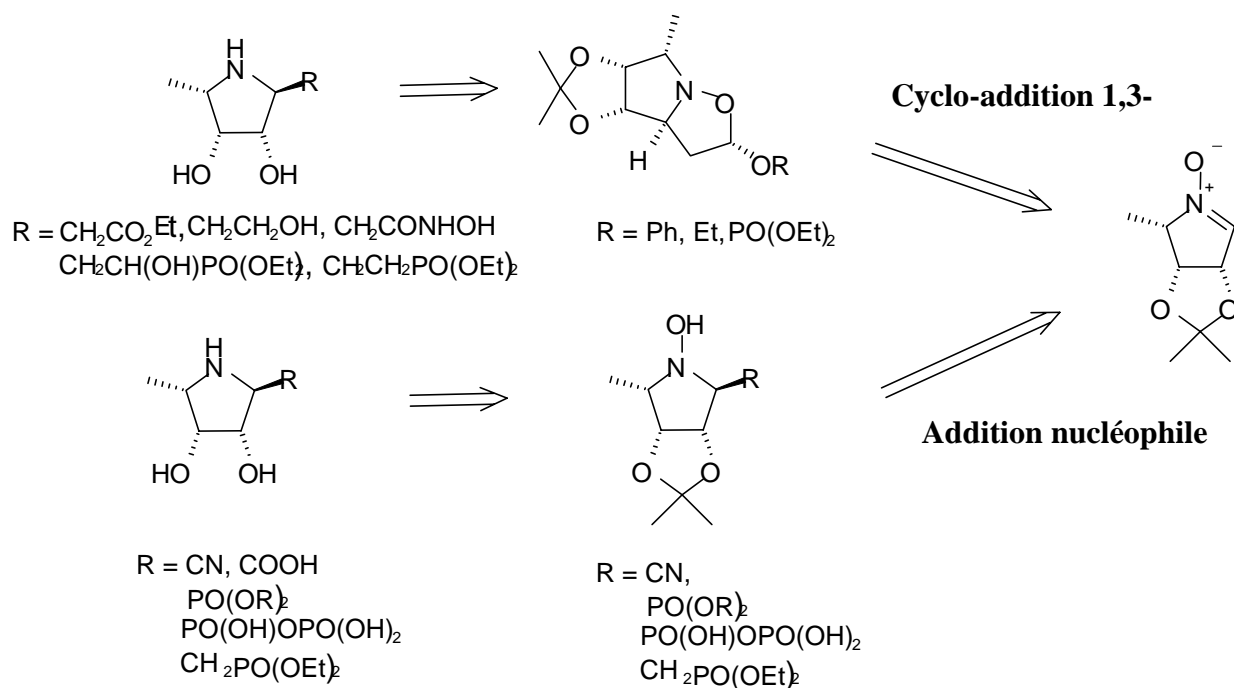


Schéma I.8. Schéma rétrosynthétique pour la fonctionnalisation de la nitrone.

Nous avons tout d'abord souhaité développer toutes les méthodes synthétiques (cyclo-addition 1,3-dipolaire et substitutions nucléophiles) autour de ces axes afin de l'appliquer par la suite à la synthèse d'analogues de GDP-fucose (schéma I.8). Nous avons par exemple mis au point une synthèse tout à fait nouvelle d'acide hydroxamique facile d'accès à partir d'une nitroène.

Le composé **A** comportant une chaîne guanosine diphosphate a été synthétisé en vue de mettre au point la chimie sur les couplages au phosphore et donc d'obtenir des analogues du GDP-fucose, donneurs de fucose non hydrolysables qui sont des inhibiteurs potentiels d' α -(1,3)- fucosyltransférase (schéma I.9).

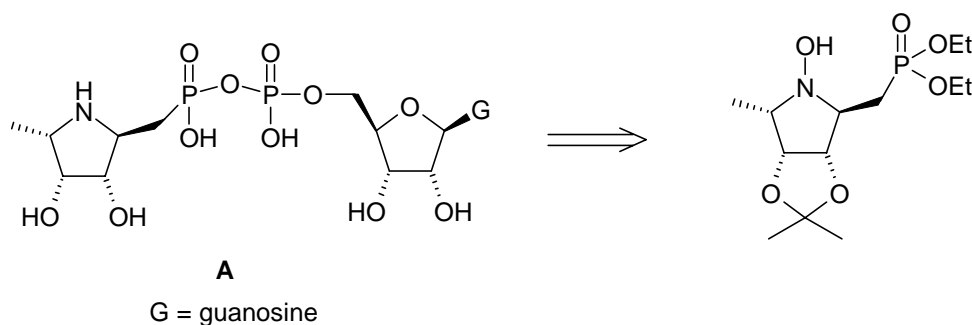


Schéma I.9. *Obtention du dérivé guanosine diphosphate.*

Plusieurs méthodes ont ensuite été réalisées afin d'inverser la configuration au niveau du carbone anomérique et d'obtenir des analogues de donneurs de fucose.

Tous les produits obtenus à partir de la nitroène ont aussi subi une estimation très préliminaire sur l' α -(1,3)- fucosyltransférase III (seule enzyme à notre disposition à ce jour) ainsi qu'une évaluation sur l' α -L-fucosidase.

**LA FAMILLE DES GLYCOSYL-HYDROLASES :
CHOIX D'UN INHIBITEUR PUISSANT DE
FUCOSIDASE DE MAMMIFERE**

ETATS DES CONNAISSANCES

**SYNTHESE DES AMINOSUCRES EN SERIE TETROSE : CHOIX D'UN
INHIBITEUR DE FUSIDASE**

ETATS DES CONNAISSANCES

- 1. Les différentes classes de glycosylhydrolases**
- 2. Mécanismes catalytiques**
- 3. Inhibiteurs de glycosidases**
- 4. Inhibiteurs d' α -L-fucosidase**

Avant de nous concentrer sur notre première cible, la fucosidase, nous allons énoncer quelques généralités sur la grande famille des glycosylhydrolases à laquelle elle appartient. Nous passerons également en revue les molécules inhibitrices les plus intéressantes de cette classe d'hydrolases.

Les glycosidases, ou glycosyl-hydrolases, catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques d'oligo- et de polysaccharides. Elles constituent une classe d'enzyme très abondante dans la nature et sont impliquées dans de nombreux processus du monde vivant. L'obtention d'inhibiteurs spécifiques de glycosidases présentent un intérêt biologique allant de la régulation du diabète jusqu'aux traitements anticancéreux.

1. Les différentes classes de glycosyl-hydrolases

Les glycosidases sont des enzymes de transfert de sucres et elles catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques.^{1,2} Ces enzymes sont spécifiques de la nature et de la configuration de la liaison glycosidique qu'elles vont hydrolyser.

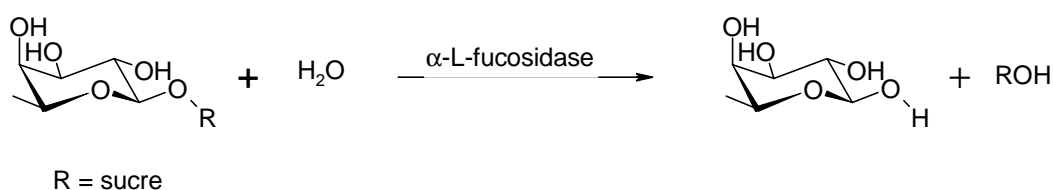
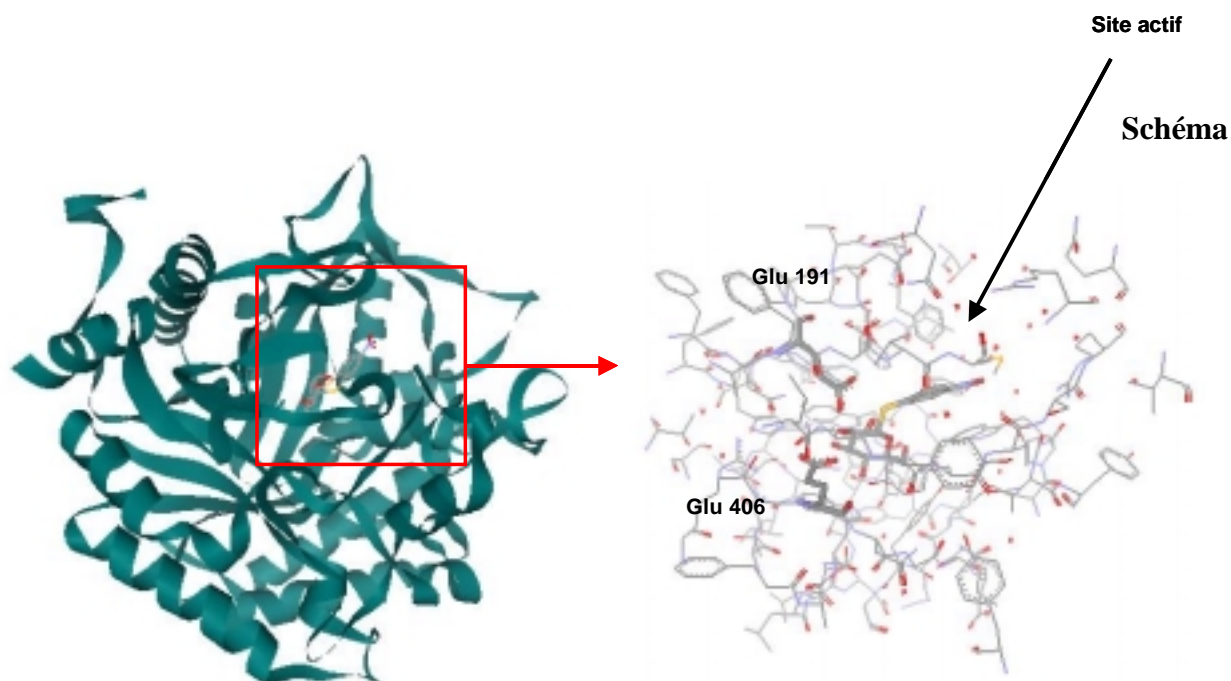


Schéma 1.1. Représentation schématique de l'action de l' α -L-fucosidase.

Par exemple, une α -L-fucosidase catalysera l'hydrolyse des liaisons α -fucosidiques alors qu'une β -mannosidase catalysera celle des liaisons β -mannosidiques (schéma 1.1).



1.2. Exemple de structure tridimensionnelle de glycosidase: la β -glucosidase de maïs complexée avec le para-nitrophényle- β -D-thioglucoside.

Les glycosidases peuvent être classées en deux catégories selon la position où elles exercent leur action catalytique sur le polysaccharide.³

- Les endo-glycosidases: elles coupent les liaisons glycosidiques en milieu de chaîne oligosaccharidiques.
- Les exo-glycosidases: elles hydrolysent spécifiquement les sucres non réducteurs en bout de chaîne.

Les glycosidases sont connues depuis très longtemps. Plus de 2000 structures primaires de glycosidases, répertoriées en 76 familles, ont été déterminées. La première structure aux rayons X a été déterminée en 1967 et a permis d'apprendre beaucoup sur les structures et les mécanismes d'action des glycosidases¹(schéma 1.2).

2. Mécanisme catalytique

Deux mécanismes d'action des glycosidases sont aujourd'hui décrits: ceux dit d'inversion et ceux dit de rétention de configuration.^{4,5,6}

Il existe des points communs pour les deux mécanismes:

- l'existence de deux groupes carboxylates dans le site actif de l'enzyme (en général des résidus aspartate et glutamate) impliqués dans un processus de catalyse générale acide-base. Le groupe carboxylate nucléophile posséderait un pKa de 3,5 et le groupe de catalyse acide un pKa de 7,3.⁷
- un état de transition similaire avec formation d'un ion oxocarbénium (hybridation sp^2), une charge partielle positive étant délocalisée sur la liaison endocyclique oxygène-carbone anomérique.

- Mécanisme avec inversion de configuration

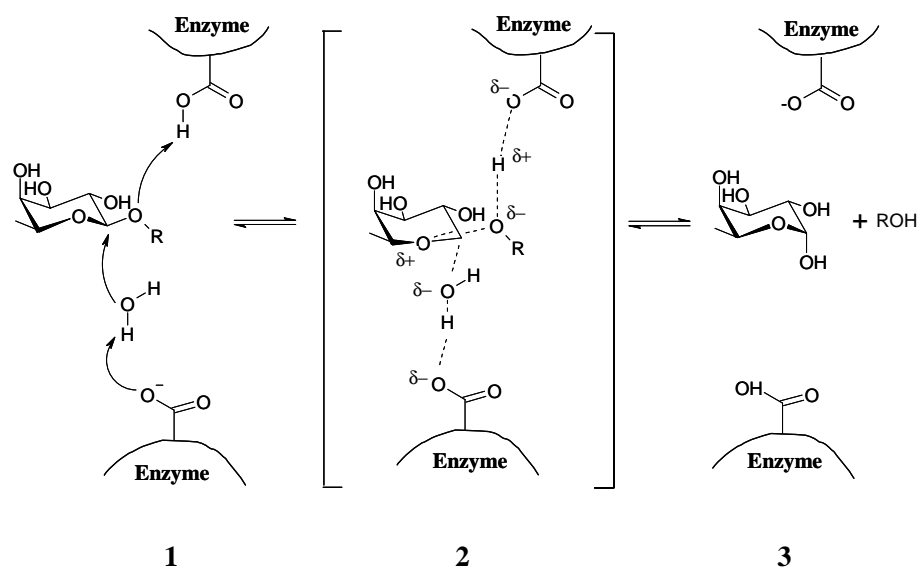


Schéma 1.3. Mécanisme catalytique par inversion de configuration.

1. Complexe de Michaelis-Menten
2. Intermédiaire d'état de transition postulé
3. Libération des produits

L'oxygène exocyclique en position anomérique, protoné par l'acide carboxylique, est déplacé par une molécule d'eau dont la nucléophilie est renforcée par le carboxylate basique.

Cette molécule d'eau nucléophile, attaque le carbone anomérique du substrat. Il en résulte une substitution avec inversion de configuration du sucre libéré via la formation d'un ion oxocarbénium de conformation demi-chaise. Les deux acides carboxyliques essentiels au processus catalytique sont distants d'environ 11 Å dans le site actif.

Ce type de glycosidase catalysera l'hydrolyse de liaisons glycosidiques de conformation α ou β (schéma 1.3).

Les fucosidases semblent appartenir à cette classe de glycosidases.

- **Mécanisme avec rétention de configuration**

Dans ce cas, la distance entre les deux groupes carboxylates est de 5,5 Å, il n'y a donc pas de molécule d'eau intermédiaire entre les deux fonctions, le carboxylate jouant le rôle direct de nucléophile.

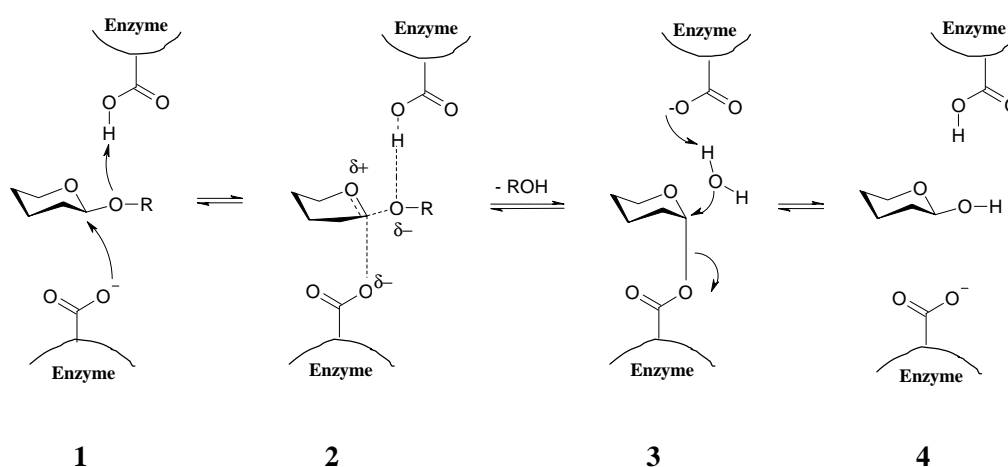


Schéma 1.4. Mécanisme d'action des glycosidases de rétention.^{4,5,6,8}

Comme précédemment, l'attaque nucléophile du carboxylate conduit à un intermédiaire covalent.

L'ensemble semble passer par un état de transition proche d'un ion oxocarbénium de configuration demi-chaise. L'intermédiaire covalent glycosyl-enzyme **3** qui s'ensuit est de configuration inverse du substrat de départ.

Une molécule d'eau, activée par catalyse basique, attaque alors le carbone anomérique de l'intermédiaire covalent et il y a hydrolyse de la liaison glycosyl-ester et libération du monosaccharide. Une seconde inversion est donc réalisée permettant une rétention de configuration. Il s'agit en fait d'un processus par double inversion. Ainsi au final, on observe une rétention de configuration du carbone anomérique du substrat hydrolysé (schéma 1.4).

3. Les inhibiteurs de glycosidases

De nombreux produits naturels isolés de plantes sont des inhibiteurs plus ou moins puissants de glycosidases.^{8,9} Avec les inhibiteurs synthétiques, on compte plusieurs centaines d'inhibiteurs de glycosidases connus à ce jour. Ces inhibiteurs ont plusieurs vertus thérapeutiques telles que l'inhibition des glycosidases digestives qui interviennent par exemple dans le traitement du diabète, de l'hyperglycémie ou encore dans l'action anti-appétante. Ils peuvent également intervenir dans les problèmes liés au cancer, à la réponse immunitaire ou permettre de combattre les infections virales comme le virus de la grippe.¹⁰ Dans un domaine si vaste, nous ne citerons que quelques structures importantes afin de situer

notre travail. Notons deux exemples de composés utilisés dans le traitement du diabète: l'acarbose^{10,11} commercialisé en Allemagne en 1990 sous le nom de GlucobayTM ou encore le voglibose¹² vendu au Japon sous le nom de BasenTM. De même, citons un antiviral à action anti-grippale, inhibiteur de la neuraminidase: le zanamivir est commercialisé sous le nom de RelenzaTM par la compagnie Glaxo-Wellcome (schéma 1.5).

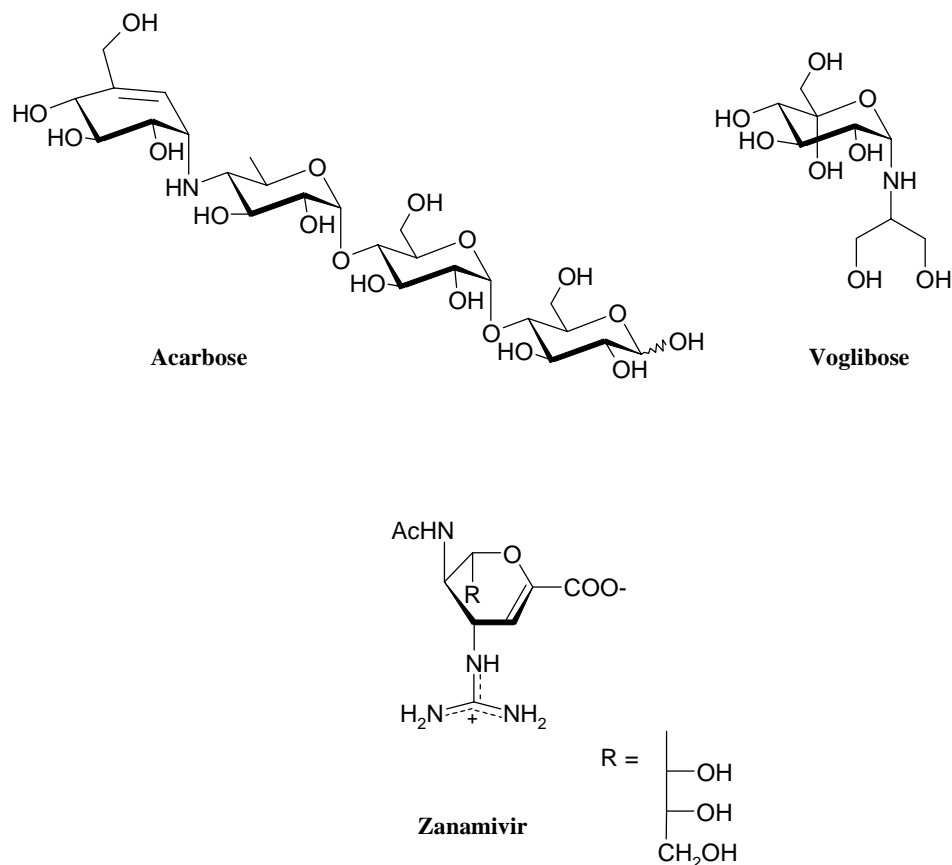


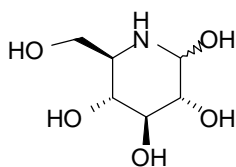
Schéma 1.5. Exemples de composés utilisés dans le traitement du diabète et de la grippe.

Il existe une grande diversité et différentes classes d'inhibiteurs de glycosidases que nous pouvons retrouver dans des revues récentes.^{10,13,14,15} Nous ne mentionnerons qu'un panel non exhaustif des structures les plus intéressantes en balayant succinctement ces différentes classes.

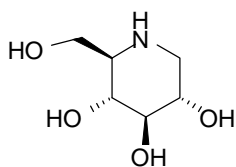
Ces inhibiteurs se divisent en deux grandes classes composées respectivement de dérivés monocycliques et de dérivés bicycliques.

Les composés monocycliques comprennent les composés oxygénés comme les lactones ou les amidines qui sont des produits synthétiques. Mais les catégories les plus représentées sont les pipéridines, les pyrrolidines et les carbasucres (schéma 1.6).

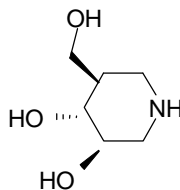
Les pipéridines



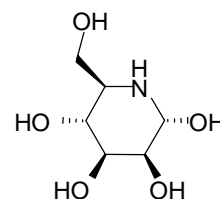
Nojirimycine



Désoxynojirimycine (DNJ)

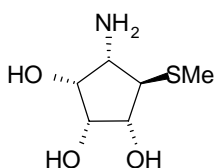


Isofagomine

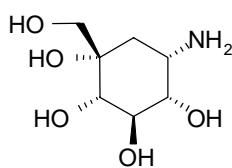


Manno-nojirimycine

Les carbasucres

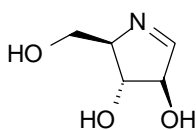


Mannostatine

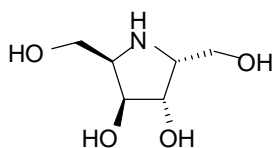


Valiolamine

Les pyrrolidines



Nectrisine



2R,5R-Dihydroxyméthyl-3R,4R-dihydroxypyrrolidine
(DMDP)

Schéma 1.6. Exemples de dérivés monocycliques.

En ce qui concerne les dérivés bicycliques, on peut retrouver les indolizidines, les pyrrolizidines, les nortropanes, les quinolizidines ou encore les composés bicycliques insaturés (schéma 1.7).

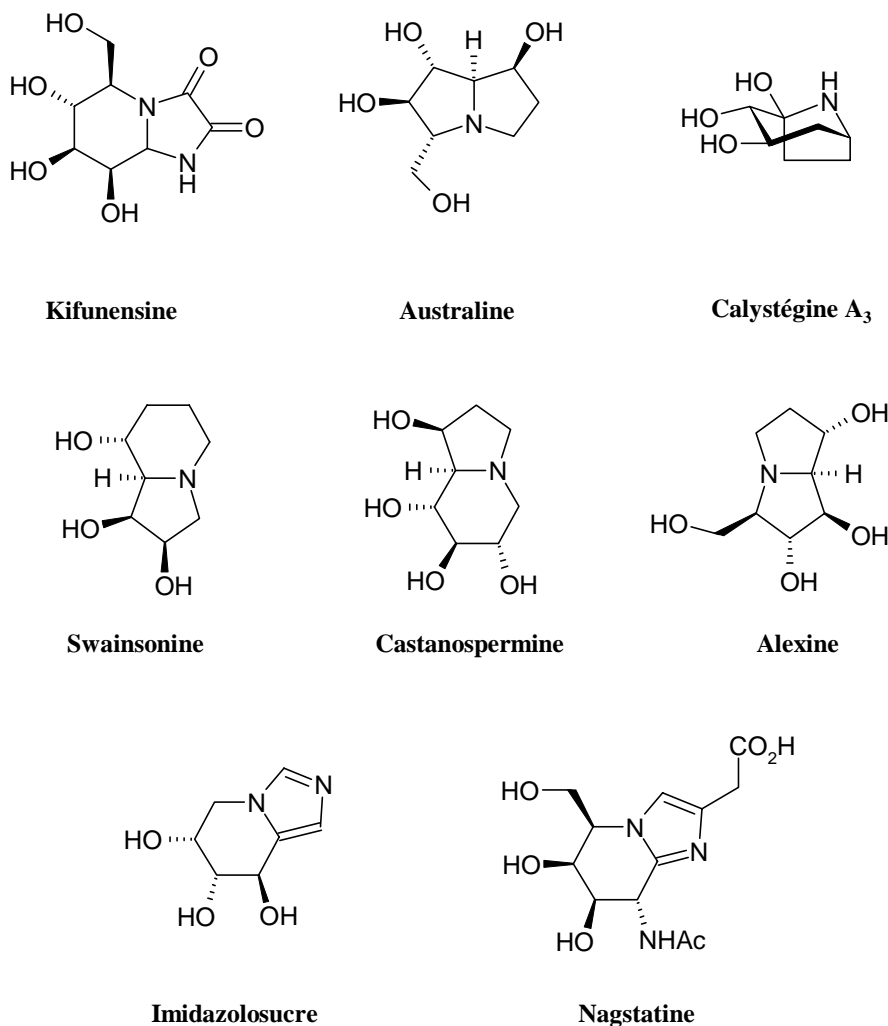


Schéma 1.7. Exemples d'inhibiteurs bicycliques.

Nous arrêtons là notre revue relatives aux inhibiteurs de glycosidases afin de nous concentrer sur notre première cible: les inhibiteurs de fucosidases.

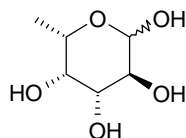
4. Inhibiteurs d' α -L-fucosidase

Notre recherche s'est plus spécifiquement tournée dans un premier temps vers l'inhibition de l' α -L-fucosidase, c'est pourquoi nous détaillerons un peu plus cette enzyme et ses inhibiteurs dans ce paragraphe.

L' α -L-fucosidase est une *exo*-glycosidase dont le mécanisme rejoint celui des glycosidases à rétention décrit précédemment (cf schéma 1.4). Elle est peu sélective quant au type de liaison glycosidique à hydrolyser: elle catalyse l'hydrolyse des unités L-fucose liées en α -(1,2), α -(1,3), α -(1,4) et α -(1,6).

La structure des fucosidases de mammifères n'est pas encore connue à ce jour. Cependant, Henrissat et coll. ont très récemment déterminé la structure aux rayons X de l' α -fucosidase *Thermotoga maritima*, ainsi qu'une structure aux rayons X de cette fucosidase complexée avec le fucose (Protein Data Bank, fichiers en attente). Malheureusement, la structure n'est pas encore accessible au public scientifique.

Les chercheurs s'intéressent depuis plusieurs années à synthétiser des analogues du L-fucose **1** dans le but d'inhiber les fucosidases.



1. *L-fucose.*

Les schémas 1.8, 1.9 et 1.10 suivants présentent une liste d'analogues non exhaustive des inhibiteurs les plus puissants. Les composés sont tous testés sur des α -L-fucosidases de mammifères qui peuvent-être d'origine différente.

Il existe trois grandes catégories d'analogues: les analogues non dérivés d'aminosucres, les pipéridines et les pyrrolidines qui sont des analogues d'aminosucres.

Pour les différents analogues non dérivés d'aminosucres, les constantes d'inhibition sont de l'ordre du micromolaire, ce ne sont pas les inhibiteurs les plus puissants (schéma 1.8).

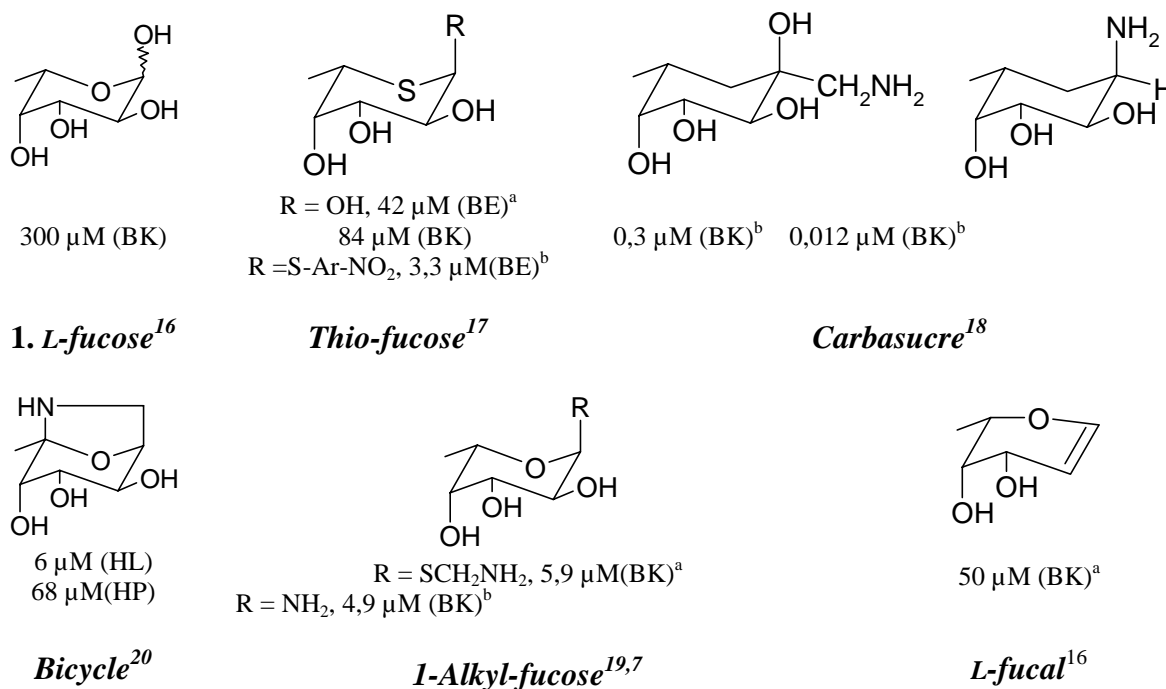


Schéma 1.8. Analogues non dérivés d'aminosucres inhibiteurs d' α -L-fucosidase.

a. pH = 5,5; b. pH = 6,0; c. pH = 6,8.

BK (Bovine Kidney) = rein de bovin, BE (Bovine Epididymis) = lépididyme de bovin

HP (Human Placenta) = placenta humain, HL (Human Liver) = foie humain

Les analogues pipéridiniques quant à eux incluent les inhibiteurs les plus actifs avec des constantes d'inhibition de l'ordre du nanomolaire. Les premiers inhibiteurs synthétiques d' α -L-fucosidase, la désoxyfucono-jirimicine (**DFJ**, **2**)²¹ et la homofucono-jirimicine (**HFJ**, **3**)²² sont toujours parmi les inhibiteurs les plus puissants. D'autres analogues^{23,24,25,26} présentent des inhibitions similaires, par contre la fucoamidrazone²⁷ ou les pipéridines dont le groupement méthyle est absent ou de configuration opposée ont une inhibition bien plus

faible de l'ordre du micromolaire. Il en est de même pour les dérivés d'aminosucres à sept chaînons²⁸ (schéma 1.9).

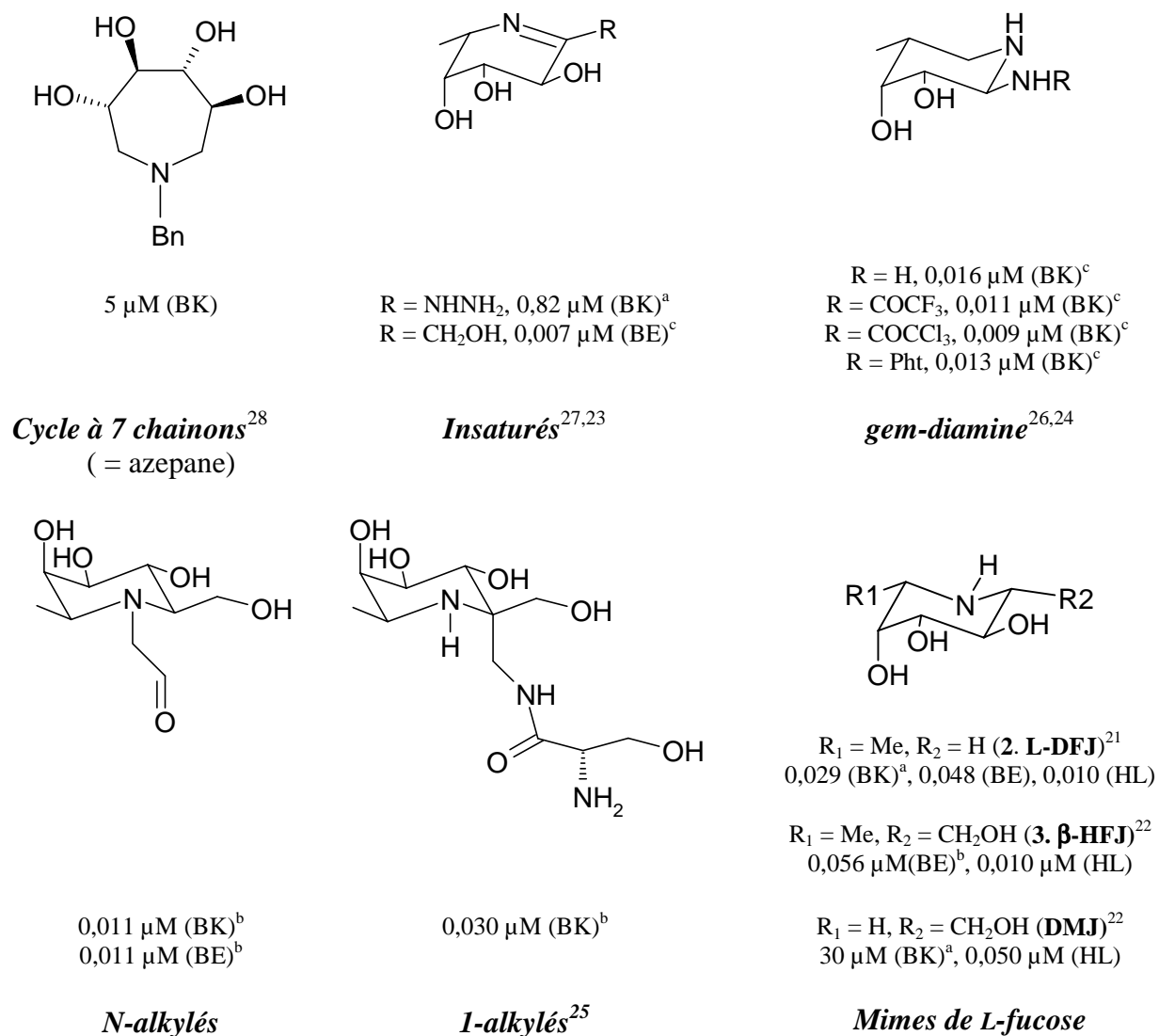


Schéma 1.9. Analogues pipéridiniques inhibiteurs d' α -L-fucosidase.

a. pH = 5,5; b. pH = 6,0; c. pH = 6,8.

BK (Bovine Kidney) = rein de bovin, BE (Bovine Epididymis) = lépididyme de bovin

HP (Human Placenta) = placenta humain, HL (Human Liver) = foie humain

Les analogues pyrrolidiniques sont un peu moins puissants avec pourtant de bonnes valeurs de l'ordre du micromolaire^{29,30,31,32} et certains dérivés comme l'imine amino-L-lyxose³³ ont même des valeurs proches du nanomolaire (schéma 1.10).

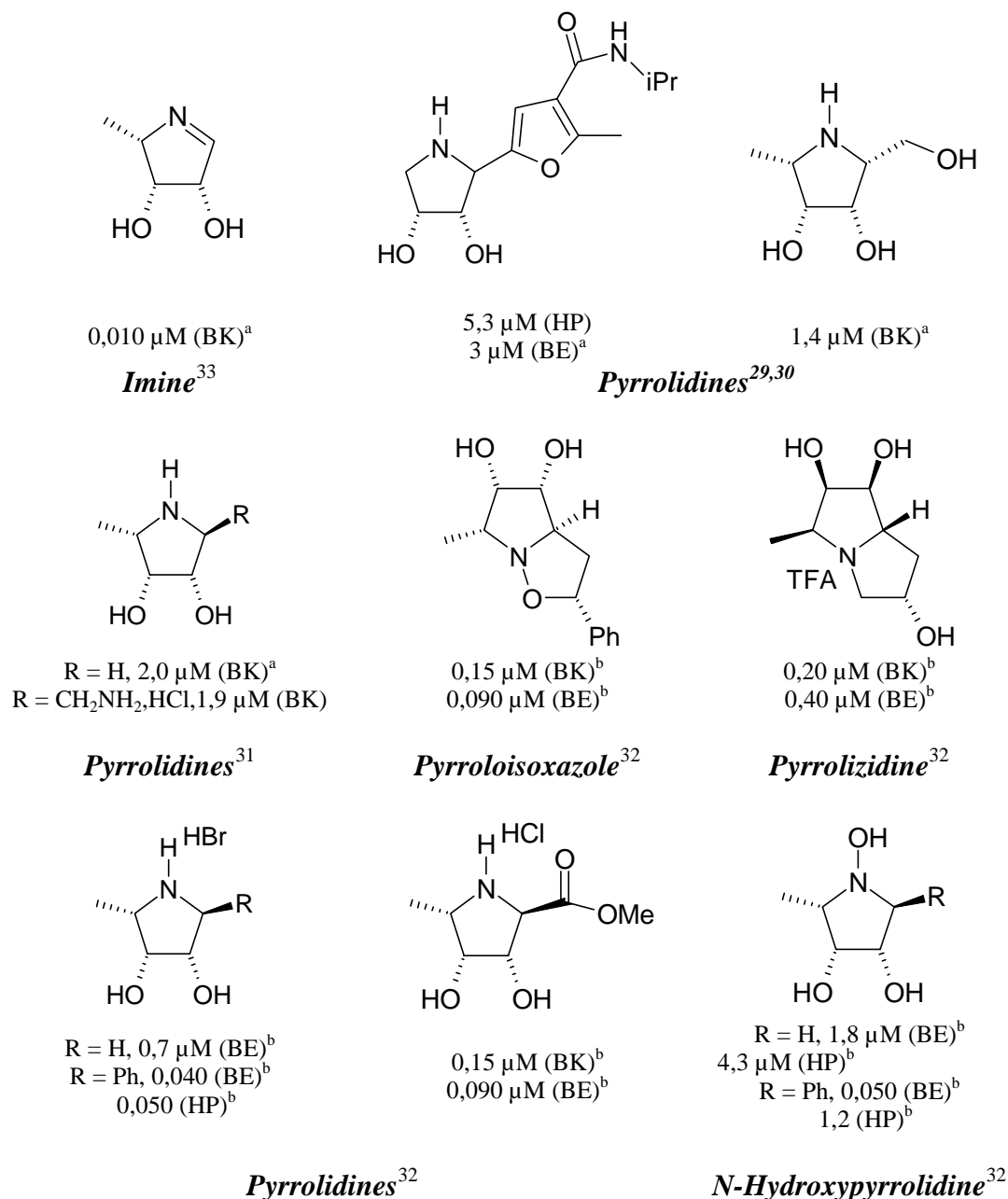


Schéma 1.10. Analogues pyrrolidiniques inhibiteurs d' α -L-fucosidase.

a. pH = 5,5; b. pH = 6,0; c. pH = 6,8

BK (*Bovine Kidney*) = rein de bovin, BE (*Bovine Epididymis*) = lépididyme de bovin

HP (*Human Placenta*) = placenta humain, HL (*Human Liver*) = foie humain

SYNTHÈSE DES AMINOSUCRES EN SÉRIE TÉTROSE : CHOIX D'UN INHIBITEUR DE FUCOSIDASE

1. Les différentes stratégies de synthèse des aminosucres
2. Synthèse des aminosucres en série érythrose et ribose
3. Synthèse des aminosucres en série thréose
4. Inhibition de glycosidase *in vitro* : choix d'un inhibiteur puissant de fucosidase
 - Etude de stabilité
 - Etude de sélectivité
 - Bilan : activités inhibitrices des tétroses

Après cette courte revue, intéressons nous au savoir faire de notre laboratoire dans le domaine des aminosucre et concentrons nous sur les aminopentoses.

Il est bien établi aujourd'hui que les amino-pentoses sont de bons inhibiteurs de glycosidases, ceux-ci mimant parfaitement l'intermédiaire oxocarbénium qui se forme au cours de la réaction enzymatique.^{34,35,6} Ces aminosucre sont en effet en équilibre avec la forme imine qui est l'équivalent azoté de l'ion oxocarbénium. Afin d'établir une relation structure-activité entre ces différents cycles et différentes enzymes, en particulier l' α -L-fucosidase, nous avons poursuivi la synthèse des composés en série D- et L-thréose.

1. Les différentes stratégies de synthèse des aminosucre

La synthèse d'amino-analogues de saccharide repose sur diverses méthodologies qui assurent la configuration des différents centres chiraux.

Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, ces composés peuvent être synthétisés par réaction d'hétéro-Diels-Alder, ce qui permet d'introduire l'atome d'azote facilement en créant de plus les centres asymétriques souhaités.

Notons que dans la littérature d'autres méthodologies ont été développées faisant appel par exemple à des réactions enzymatiques où les centres asymétriques sont créés au fur et à mesure.³⁶

Ces composés peuvent également être obtenus à partir de produits naturels chiraux tels que des sucres, des acides aminés ou l'acide tartrique. La méthode proposée à partir des sucres naturels est avantageuse car il est possible de choisir le sucre de départ en fonction de la configuration des carbones asymétriques que l'on désire. Plusieurs méthodes permettent d'introduire l'atome d'azote comme par exemple l'addition d'une fonction azoture,^{37,38} la formation d'amine^{39,40} ou d'hydroxylamine.⁴¹

C'est cette dernière méthode que nous avons choisie pour synthétiser les composés en série L- et D-thréose.

2. Synthèse des aminosucre en série érythrose et ribose

Afin de situer nos travaux de synthèse, rappelons le premier schéma de synthèse établi au laboratoire par mes prédécesseurs et en particulier par J. B. Behr afin d'obtenir les dérivés en série érythrose^{33,42,43} (schéma 1.11).

Les composés chiraux ont été synthétisés par réaction de Diels-Alder sur le *N*-diényl-L-pyroglytamate de tertiobutyle. Les aminosucre finaux sont obtenus par traitement sous atmosphère de SO₂ à partir des diols **5a,b** dans l'eau à 60 °C. Cette réaction se fait en présence d'acide para-toluène sulfonique. La synthèse de ces aminosucre a été réalisée avec un rendement global pour l'adduit sulfitique de 41 à 63 % pour la série L-érythrose et de 21 % pour la série L-ribose à partir du *N*-diényl-L-pyroglytamate.

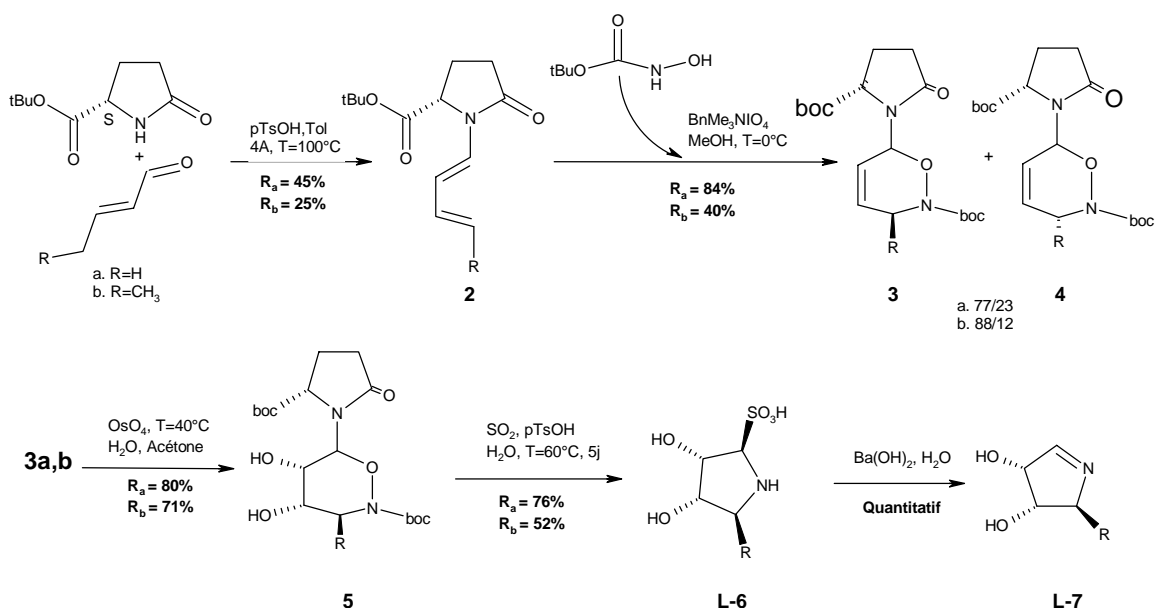


Schéma 1.11. Schéma de synthèse des aminosucre en série L-érythrose et L-ribose.

3. Synthèse des aminosucre en série thréose

La synthèse des aminosucre en série L- et D-tétrose fait appel à la stratégie de synthèse partant de produits naturels chiraux. Cette méthodologie est bien décrite dans la littérature.

La synthèse qui débute à partir de l'ester de l'acide (S, S)-D-tartrique **8**, se poursuit par l'insertion de l'azote, afin d'obtenir l'aminosucres **10** qui est réalisée grâce à l'intermédiaire de type hydroxylamine **9** (schéma 1.12).

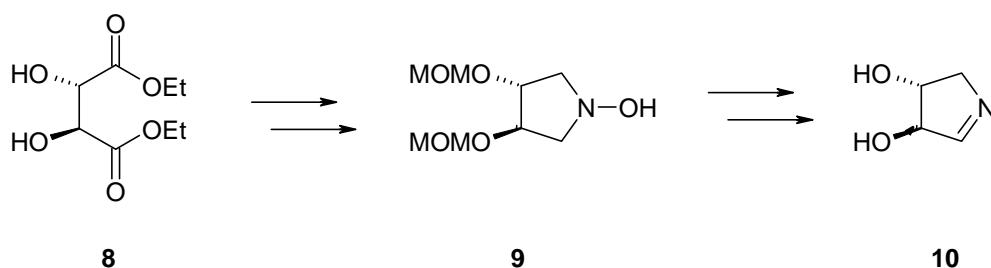


Schéma 1.12. Schéma de synthèse en série D.

Dans un premier temps, nous décrivons la synthèse en série D, celle des produits en série L étant identique mais avec l'énantiomère de l'acide (R,R)-L-tartrique comme produit de départ.

- **Insertion de l'atome d'azote**

La protection des hydroxyles du D-tartrate d'éthyle **8**, sous forme de groupement MOM, s'effectue dans le diméthoxyméthane **11** en présence d'anhydride phosphorique⁴⁴ (schéma 1.13). Cette réaction est rapide et permet d'obtenir le produit protégé **12** avec un rendement quantitatif.

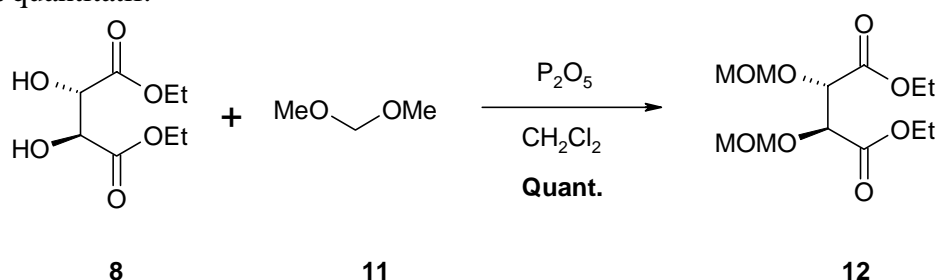


Schéma 1.13. Protection des hydroxyles.

Les produits obtenus sont en accord avec la littérature.^{44,45}

L'étape suivante est la réduction des esters, réalisée par action d'hydruide de lithium aluminium sur le composé protégé **12** (schéma 1.14).

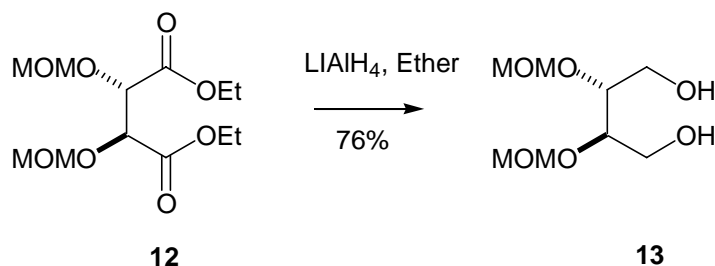


Schéma 1.14. Réduction des esters.

Comme précédemment, nous avons utilisé les stratégies de Mc Caig⁴⁵ et Dulphy⁴⁴. Après recristallisation dans l'éther isopropylique, nous obtenons le diol **13** avec un rendement de 76 %.

L'étape ultérieure est l'activation des hydroxyles par formation de mésylates. La formation du dimésylate est effectuée par action de chlorure de méthanesulfonyle **14** en présence de triéthylamine.⁴⁵ Les réactifs sont additionnés à 0 °C car la réaction est exothermique. Cette réaction très rapide, nous permet d'obtenir après 1 heure, le dimésylate **15** avec un rendement quantitatif (schéma 1.15).

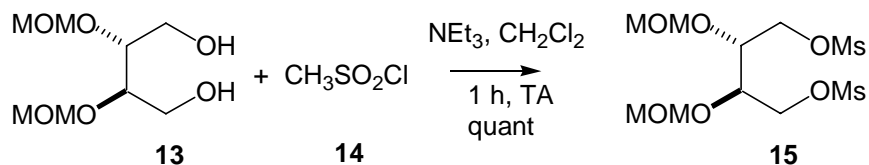


Schéma 1.15. Métylation des hydroxyles.

Le mécanisme de la mésylation est détaillé dans le schéma suivant (schéma 1.16).

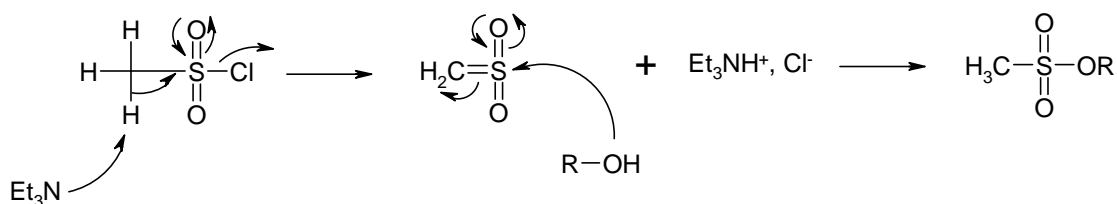


Schéma 1.16. Mécanisme de la mésylation.

- **Insertion de l'azote: formation d'hydroxylamine**

Dans notre cas, l'insertion de l'azote s'est effectuée par la formation d'une hydroxylamine suivant la méthode de Brandi.⁴¹ L'hydroxylamine **9** a été préparée à partir du dérivé dimésylé **15** par action de chlorhydrate d'hydroxylamine **16** dans la triéthylamine à reflux (schéma 1.17).

Cette méthode nous permet d'obtenir l'hydroxylamine avec un rendement de 93 % après recristallisation dans l'éther isopropylique. Notons que nous n'observons la formation que d'un seul composé, la pyrrolidine et pas de cycle à 6 chaînons.

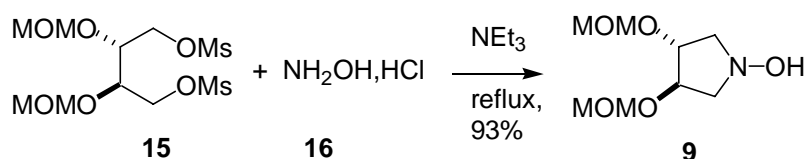


Schéma 1.17. Formation de l'hydroxylamine.

Le mécanisme de formation de l'hydroxylamine est détaillé dans le schéma ci-dessous (schéma 1.18)

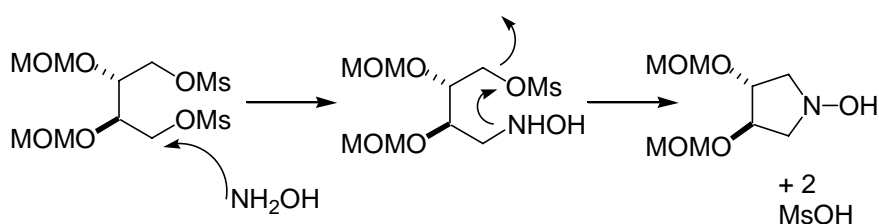


Schéma 1.18. Mécanisme de formation de l'hydroxylamine.

- **Formation de l'aminosucré**

La formation de l'imine passe par une première étape d'oxydation de l'hydroxylamine. Celle-ci est oxydée en présence d'oxyde de mercure jaune.⁴⁶ Il se forme alors très rapidement la nitrone **17** correspondante avec un rendement de 97 % (schéma 1.19).

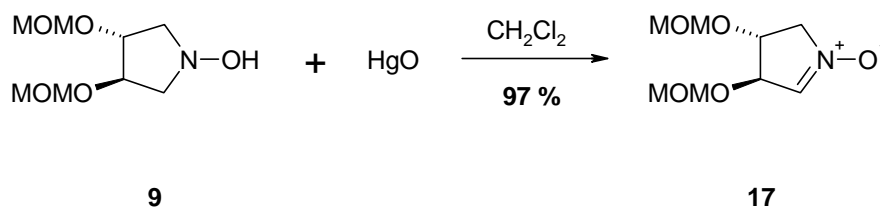


Schéma 1.19. Formation de la nitrone: amino-sucre N-oxydé.

Le produit **17** est en accord avec les nitrones décrites dans la littérature qu'elles soient obtenues par oxydation à l'oxyde de sélénium⁴⁷ ou par un peroxyde.⁴⁸ Cette nitrone est un intermédiaire très important dans la suite de nos travaux puisqu'elle nous servira de composé modèle pour mettre au point les greffages des différentes chaînes intervenant dans la partie II.

La nitrone possède en effet le même degré d'oxydation que l' amino-sucre.

Une hydrolyse en présence de SO₂ (déjà développée au laboratoire) de la nitrone **17** donne formation de l'adduit sulfite **18** qui en solution dans l'eau est en équilibre entre ces deux formes anomères α et β dans des proportions 75/25 (schéma 1.20). L'intérêt d'utiliser du dioxyde de soufre est de réduire la liaison nitrone N-O et de cliver dans le même temps les groupes protecteurs.

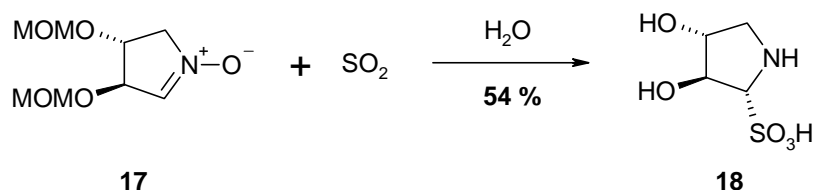


Schéma 1.20. Formation de l'adduit sulfite.

Cette réaction réalisée à température ambiante est longue (deux jours) et forme l'adduit sulfite avec un rendement de 54 %. Ce sera donc le rendement limitant de notre voie de synthèse.

L'aminosucre **10** est alors obtenu très facilement par mise en solution aqueuse en présence de baryte de l'adduit sulfite **18**. Il est obtenu en équilibre entre sa forme majoritaire imine **10**, amino alcool **19** et dimérique (schéma 1.21). Les proportions relatives de chaque forme dépendent de la température et de la concentration du produit en solution.

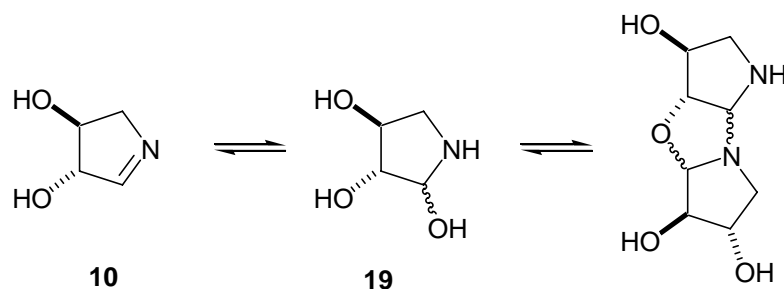


Schéma 1.21. Équilibre entre les trois formes de l'aminosucre.

Cette voie de synthèse nous permet donc d'obtenir l'adduit sulfitique et l'aminosucrose en série D-thréose avec un rendement de 37 % à partir de l'ester de l'acide tartrique.

- **Synthèse en série L-thréose**

La synthèse en série L a été conduite de la même manière. Les réactions sont reproductibles et nous obtenons les mêmes rendements pour chaque réaction. Toutefois dans ce cas, l'hydroxylamine **20** a été isolée avec un rendement de 82 %. La formation de 5 % d'un produit secondaire, le 2,3-bis-(méthoxyméthoxy)furane **21**, est observée (schéma 1.22).

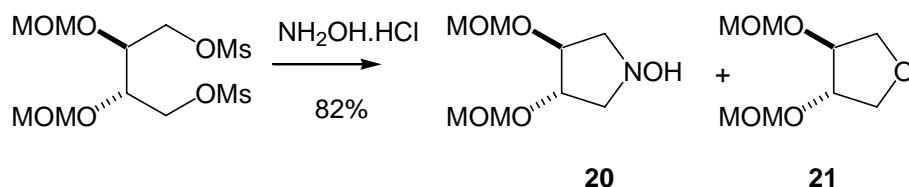


Schéma 1.22. Formation de l'hydroxylamine en série L-thréose.

Les données spectroscopiques de ce produit sont en accord avec la littérature^{44,49} et en particulier avec la cyclisation de Dulphy⁴⁴ (schéma 1.23).

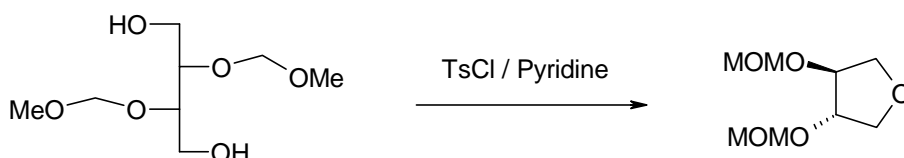


Schéma 1.23. Cyclisation de Dulphy.

Les dérivés dimésylés sont particulièrement instables, un groupement mésyle peut être facilement éliminé et ainsi donner lieu à une cyclisation (schéma 1.24).

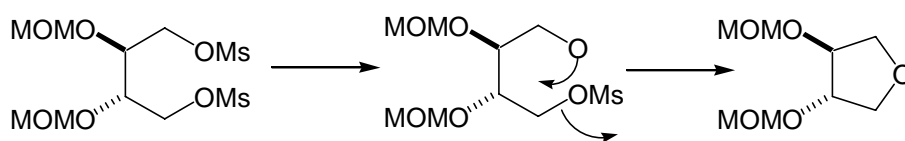


Schéma 1.24. Formation du dérivé secondaire.

Nous obtenons ainsi le dérivé adduit sulfitique **27** et l'imine **28** en série L en six ou sept étapes avec un rendement global de 33 % (schéma 1.25).

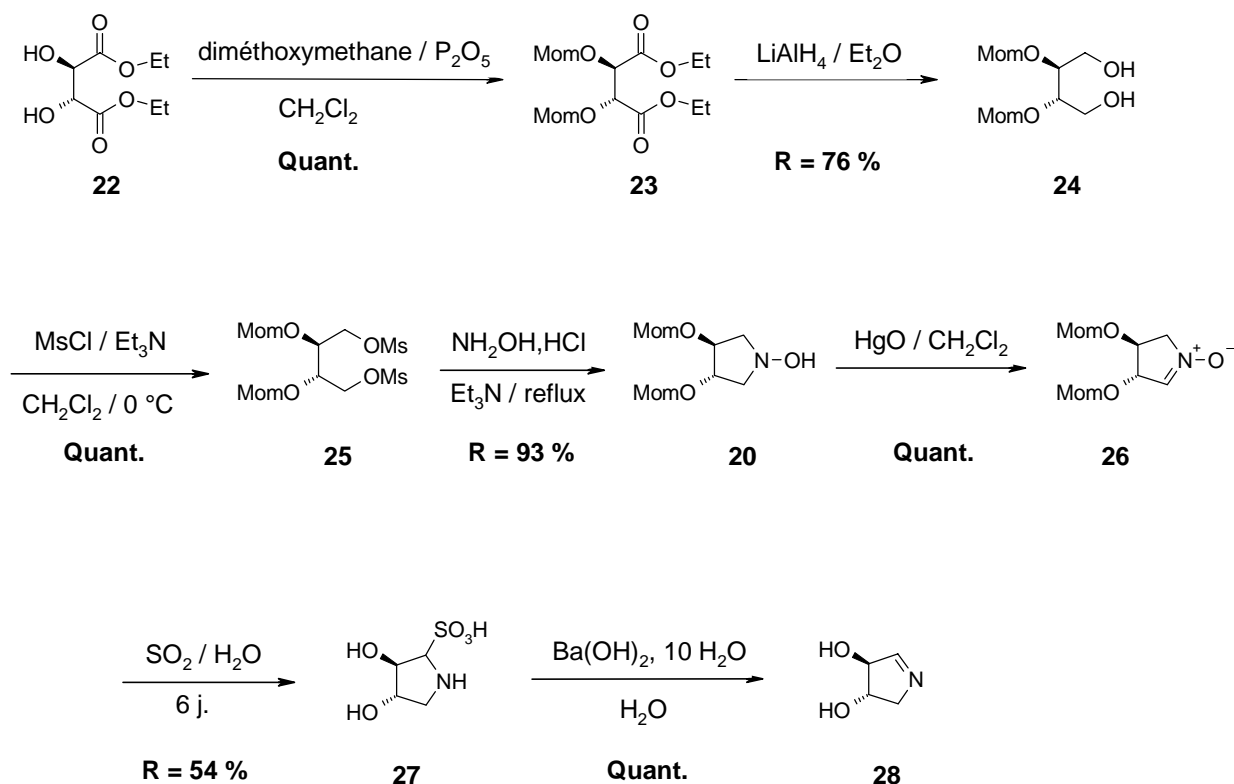


Schéma 1.25. Schéma récapitulatif de la synthèse en série L.

4. Inhibition de glycosidase *in vitro*: Choix d'un inhibiteur puissant de fucosidase

Les composés en série érythrose et thréose ont donc été évalués sur sept enzymes commerciales afin de définir leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l' α -L-fucosidase et de déterminer leur spécificité vis-à-vis d'autres glycosidases commerciales. Notons que tous les aminosucre que nous avons testés sont des inhibiteurs de type compétitif.

Avant de mener à bien ces essais, nous avons effectué des études de stabilités de nos molécules dans les conditions expérimentales requises pour les tests *in vitro*.

- **Etudes de stabilité**

Ces aminosucre de par leur structure sont des composés réactifs. Nous prendrons comme exemple l'étude que nous avons faite en série tétrorse. Nous avons évalué la stabilité des composés en série L-érythrose et L-ribose dans les conditions expérimentales utilisées pour réaliser nos essais enzymatiques (cf. partie III, parties expérimentales: tests enzymatiques).

Cette étude a été réalisée simultanément par cinétique enzymatique et par RMN afin de corréler les résultats.

- **Série érythrose et ribose**

Les études ont été réalisées dans les différents tampons utilisés pour les essais enzymatiques et en particulier dans le tampon Hepes qui est non nucléophile (schéma 1.26).

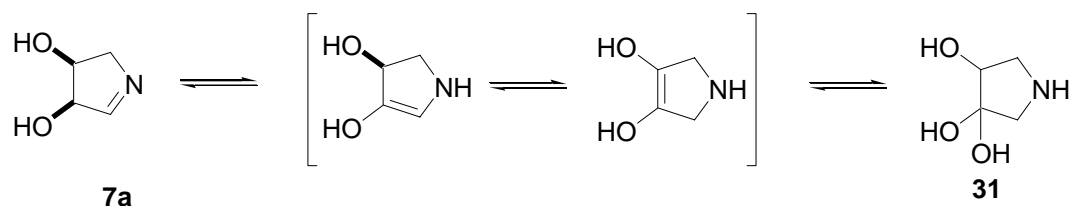


Schéma 1.29. Isomérisation irréversible de l'aminosucré en série L-érythrose en présence d'un tampon phosphate à pH = 7.

- **Série thréose**

L'étude a été complétée en série thréose. On remarque alors pour les adduits sulfoniques, la présence de deux espèces, en proportion 70/30, dans le tampon acétate alors qu'il n'y en a qu'une seule, c'est-à-dire l'adduit lui-même, à pH = 7 en tampon phosphate.

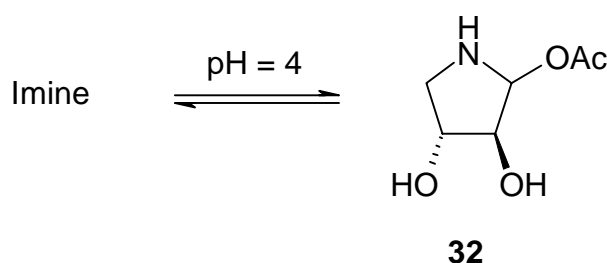


Schéma 1.30. Espèce formée depuis l'imine à pH = 4 en série thréose.

En ce qui concerne les aminosucres, comme pour les composés en série érythrose la forme imine est majoritaire à pH = 8. Mais à pH = 4, elle se transforme réversiblement en une seule espèce majoritaire, probablement **32** (schéma 1.30). La basification à pH = 8–10 par de la baryte redonne le mélange imine/dimère initial.

Nous pouvons donc conclure d'après cette étude que les espèces qui sont évaluées *in vitro* sont stables dans les conditions expérimentales utilisées.

- **Etudes de sélectivité**

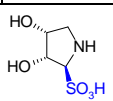
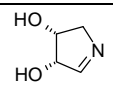
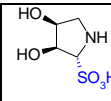
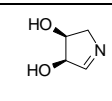
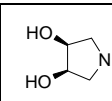
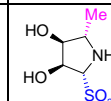
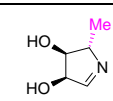
Les résultats d'inhibition des aminosucres en série L-érythrose, L-ribose et D- et L-thréose sont consignés dans les tableaux suivants (tableaux 1.1 et 1.2). Afin d'avoir une vue plus complète de nos résultats, nous avons joint à ce tableau les résultats d'inhibition en série D-érythrose, ces composés ayant déjà été synthétisés au laboratoire.³³

- **Aminosucres en série érythrose**

L'aminosucré **L-7a** ainsi que son adduit sulfonique correspondant **L-6a** en série érythrose montre des propriétés inhibitrices intéressantes sur les diverses glycosidases testées. Des constantes d'inhibition de l'ordre du micro au nanomolaire ont été obtenues pour la β -D-glucosidase, l' α -D-mannosidase, l' α -D- et la β -D-galactosidase. Par contre, aucune autre activité inhibitrice vis-à-vis des autres glycosidases testées n'a été obtenue.

Les composés en série D-érythrose inhibent seulement l' α -D-mannosidase et l' α -L-fucosidase, cette série étant donc plus sélective face aux enzymes testés que la série L.

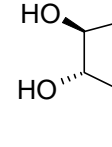
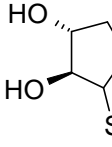
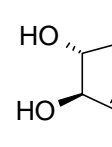
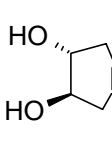
Aminosucre en série tétrose

% à [I] = 1 mM Ki (en µM)	Série 4-Amino érythrose					Série 4-Amino ribose	
							
	D	D	L-6a	L-7a	(b)	L-6b	L-7b
α -D-Glucosidase <i>Brewers Yeast</i> (pH = 7)	20%	IC ₅₀ = 15 µM (a)	3% 18%	nd nd	ni	nd nd	12% 40%
β -D-Glucosidase <i>Almonds</i> (pH = 5)	10%	20%	0,5	0,3	600	0,3	0,2
α -D-Mannodidase <i>Jack Beans</i> (pH = 4,5)	1	20	1	2	800	2	0,05
β -D-Mannosidase <i>Snail acetone powder</i> (pH = 4)	28%	nd	11%	nd	ni	nd	2%
α -D-Galactosidase <i>Green coffee bean</i> (pH = 6,5)	24%	nd	0,2 0,2	0,1 0,2	ni	0,1 0,2	0,1 0,15
β -D-Galactosidase <i>Escherichia coli</i> (pH = 7)	15%	55%	0,2 0,06	0,3 0,2	41 %	0,3 0,2	30 40
α -L-Fucosidase <i>Bovine Kidney</i> (pH = 5,5)	4	3	50%	nd	ni	nd	40%

(a) IC₅₀ pour [S] = Km = 5 mM (b) Amine décrite par Vogel⁵¹

Inhibitions réalisées dans le tampon Hepes

Tableau 1.1. Inhibition des glycosidases par les composés en série érythrose et L-ribose.

% at [I] = 1 mM Ki (µM)	Série thréose			
				
	L-28	D-18	D-10	D ^(b)
α -D-Glucosidase <i>Brewers Yeast</i> (pH = 7)	29 %	0,5	2	43 %
β -D-Glucosidase <i>Almonds</i> (pH = 5)	10 %	IC ₅₀ = 178 ^(a)	IC ₅₀ = 200	6 %
α -D-Mannodidase <i>Jack Beans</i> (pH = 4,5)	7 %	5	5	ni
β -D-Mannosidase <i>Snail acetone powder</i> (pH = 4)	28 %	ni	50 %	9 %
α -D-Galactosidase <i>Green coffee bean</i> (pH = 6,5)	35 %	30 %	40 %	27 %
β -D-Galactosidase <i>Escherichia coli</i> (pH = 7)	18 %	20 %	nd	20 %
α -L-Fucosidase <i>Bovine Kidney</i> (pH = 5,5)	40 %	nd	nd	nd

(a) IC₅₀ at [S] = Km = 1,3 mM (b) Amine réalisée par C. Buchberger³³

Tableau 1.2. Inhibition des glycosidases par les composés en série thréose.

• **Aminosucre en série thréose**

Les composés en série thréose nous permettent d'étudier l'influence de la configuration des hydroxyles en position 3 et 4 vis-à-vis des enzymes étudiées.

Les composés en série L n'ont aucune propriété inhibitrice sur les sept enzymes. Par contre nous obtenons pour les analogues en série D de puissantes inhibitions d' α -D-mannosidase et de faibles inhibitions de la β -D-glucosidase.

Les aminosucre de la série D sont aussi puissants que la nectrisine⁵² (schéma 1.31) sur l' α -D-mannosidase ($IC_{50} = 5 \mu M$ et $IC_{50} = 3 \mu M$ respectivement). Par contre vis-à-vis de l' α -D-glucosidase, la nectrisine est un inhibiteur plus actif ($IC_{50} = 0,5 \mu M$ et $IC_{50} = 0,04 \mu M$ pour la nectrisine). Ceci indique donc que le groupement $-CH_2OH$ est important pour la reconnaissance dans le site actif de l' α -D-glucosidase mais pas pour l' α -D-mannosidase.

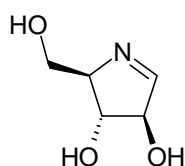


Schéma 1.31. La nectrisine.

• **Importance du groupement méthyle**

Les composés en série L-ribose nous permettent d'étudier l'influence du groupement méthyle. Nous remarquons que la sélectivité vis-à-vis des enzymes ne change pas significativement. Cependant, l'ajout du méthyle augmente l'activité de 20 à 40 fois sur l' α -D-mannosidase. Nous obtenons ainsi pour cette enzyme particulière un inhibiteur aussi puissant que ceux décrits dans la littérature tels que la mannostatine A et ses dérivés,^{53,54} le méthylamino-pentacyclitol⁵⁴ ou encore la swainsonine⁵⁵ (schéma 1.32).

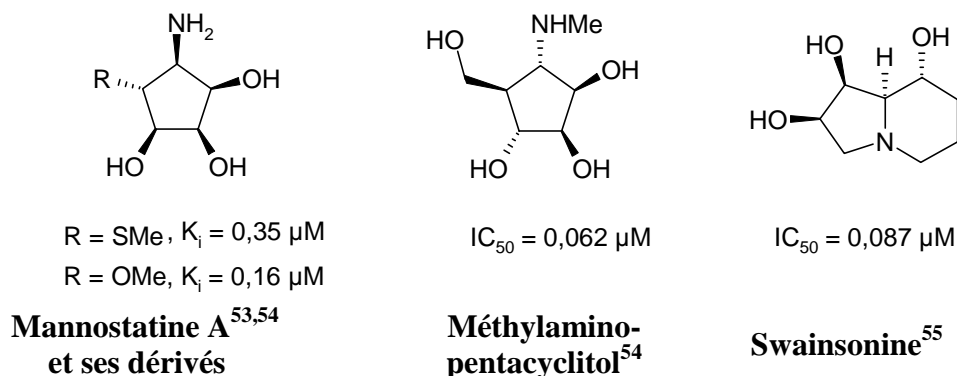


Schéma 1.32. Inhibiteurs d' α -D-mannosidase.

• **Comparaison imine –adduit sulfite**

Notons que nous obtenons dans presque tous les cas des résultats similaires pour les deux espèces adduit sulfite et imine. Une hypothèse très intéressante est que l'aminosucré correspondant soit généré à partir de l'adduit sulfite dans le site actif de l'enzyme. Il y

aurait alors libération de SO_2 et finalement ce serait la même espèce qui serait testée (schéma 1.33).

Notons enfin que l'imine semble mimer parfaitement l'intermédiaire oxocarbénium.

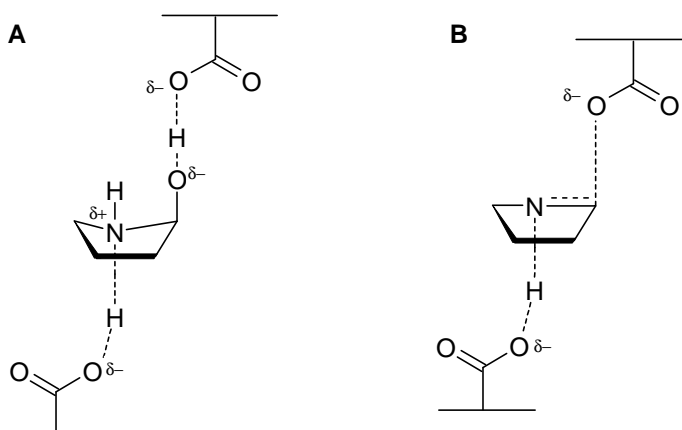


Schéma 1.33. Modèles possibles de liaison avec l'amino-sucre dans le site actif de l'enzyme. (A) Avec l'espèce amino-alcool, (B) avec l'espèce imine.

- **Bilan: Activité inhibitrice des tétroses**

Comme nous l'avons vu précédemment, les tétroses sont de bons inhibiteurs de glycosidases avec des valeurs d'inhibition de l'ordre du micromolaire voire du nanomolaire. Cependant, on peut remarquer qu'en substituant les tétroses de façon judicieuse, il est possible d'augmenter l'affinité de ces molécules pour un enzyme donné.

Notons par exemple, la comparaison de l'imine **10** avec la nectrisine (schéma 1.31). Lors de l'ajout du groupement $-\text{CH}_2\text{OH}$ pour la nectrisine, la reconnaissance de celle-ci est améliorée d'un facteur cinquante vis-à-vis de l' α -D-glucosidase.

Nous pouvons préciser ce concept sur une enzyme qui nous intéresse plus particulièrement pour la suite de nos travaux, l' α -L-fucosidase.

Suite aux résultats obtenus en série tétrose, nous pouvons conclure que seuls les produits en série D-érythrose inhibent l' α -L-fucosidase avec des valeurs de constantes d'inhibition de l'ordre du micromolaire. Ceci nous indique que les hydroxyles en position 3 et 4 doivent être en position cis et donc de configuration du D-érythrose pour inhiber cette enzyme. Ces composés en série D-érythrose présentent alors en plus du site basique (atome d'azote intracyclique), trois substituants importants: les deux fonctions hydroxyles et la fonction imine.

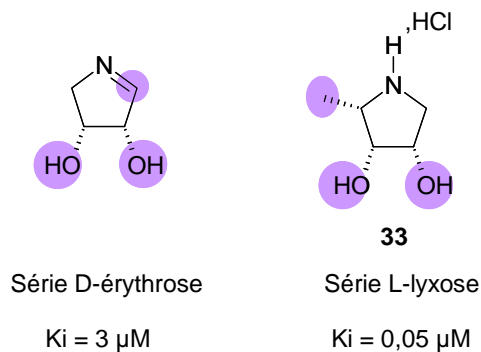


Schéma 1.34. Composés comportant trois fonctions de reconnaissance.

Si nous comparons l'imine en série D-érythrose avec la pyrrolidine **33**⁵⁶ qui comporte également trois groupes essentiels à la reconnaissance, nous mettons alors en avant l'importance d'un groupement méthyle porté par un carbone de configuration S comme dans le fucose. Ainsi des composés ayant une configuration similaire à celle du L-fucose et donc des produits en série L-lyxose seront de bons inhibiteurs d' α -L-fucosidase (schéma 1.34).

Si ces composés comportant trois éléments de reconnaissance sont comparés avec des composés de même configuration mais avec un site de reconnaissance supplémentaire, nous remarquons que l'inhibition vis-à-vis de l' α -L-fucosidase est augmentée d'un facteur 5 à 30 environ (schéma 1.35).

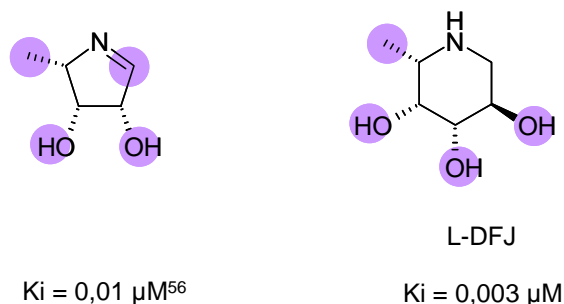


Schéma 1.35. Composés avec quatre fonctions de reconnaissance.

De même, si un groupe essentiel à la reconnaissance est encore ajouté afin d'atteindre cinq substituants de reconnaissance importants, la constante d'inhibition diminue encore d'un facteur 10. Ainsi le composé **33**⁵⁶ (la fuconojirimycine) est un excellent inhibiteur d' α -L-fucosidase (schéma 1.36).

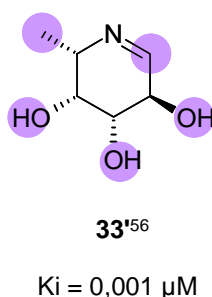


Schéma 1.36. Composés avec cinq fonctions de reconnaissance en série L-fucose: L-fuconojirimycine.

Ainsi un aminosucre à six chaînons serait une structure idéale pour inhiber la fucosidase. Il serait alors possible d'améliorer une inhibition en substituant un composé qui a déjà une bonne configuration pour être reconnu par l'enzyme.

En ce qui concerne l' α -L-fucosidase, nous pouvons conclure que les aminosucre en série L-lyxose et L-fucose, comportant un méthyle du même côté du plan que les hydroxyles, seront les meilleurs modèles de base ayant une très bonne reconnaissance vis-à-vis de la fucosidase.

Au point de vue synthétique, la synthèse du composé en série L-lyxose sera plus aisée et c'est donc la solution que nous retiendrons.

5. Conclusion

Nous avons donc préparé de façon simple et avec de bons rendements des aminosucre en série tétrorse. Ces composés ont montré de bonnes propriétés inhibitrices vis-à-vis des enzymes testées et ainsi nous avons pu mettre en avant une relation structure-activité afin d'inhiber les glycosidases et en particulier l' α -L-fucosidase.

Les glycosidases seront d'autant mieux inhibées si le nombre de substituants essentiels à la reconnaissance est augmenté c'est-à-dire si de simples aminosucre sont substitués de façon judicieuse.

Ainsi, pour inhiber l' α -L-fucosidase, les aminosucre devront au moins comporter un groupement méthyle et des groupements hydroxyles qui seront dans la même configuration spatiale.

Ayant ainsi établi un modèle d'inhibiteur d' α -L-fucosidase, nous allons maintenant nous atteler à développer un concept chimique permettant de transformer ces molécules en analogues de GDP-fucose non hydrolysable pour obtenir des inhibiteurs potentiels d' α -(1,3)-fucosyltransférase.

PARTIE II

CONCEPTION D'INHIBITEURS DE FUCOSYLTRANSFÉRASES

**IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUE DES FUCOSYLTRANSFERASES :
PROCESSUS DE MIGRATION CELLULAIRE**

LES FUCOSYLTRANSFERASES

**INHIBITEURS DE FUCOSYLTRANSFERASES : VERS LA SYNTHÈSE
D'ANALOGUES DE GDP-FUCOSE**

IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUE DES FUCOSYLTRANSFERASES : PROCESSUS DE MIGRATION CELLULAIRE

- 1. Phénomènes d'extravasation**
- 2. Les sélectines et leurs ligands**
 - **Les différentes sélectines**
 - **Les ligands des sélectines**
- 3. L'acide sialyl Lewis x**
 - **Structure et biosynthèse du SLe^x**
 - **Interactions sélectines-SLe^x**
 - **Inhibitions des interactions sélectines-SLe^x**

Les oligosaccharides sont synthétisés par les glycosyltransférases. A chaque sucre lié de façon spécifique correspond une glycosyltransférase unique.

Nous nous sommes intéressés à une famille de glycosyltransférases: les fucosyltransférases qui interviennent dans la synthèse d'un tétrasaccharide jouant un rôle important dans la reconnaissance cellulaire. La synthèse d'analogues de GDP-fucose (donneur de sucre lors du processus catalytique) devrait nous permettre d'inhiber l' α -(1,3)-fucosyltransférase.

Ces travaux ont pour objectif d'interférer avec les processus biologiques de type inflammatoire ou la migration des cellules.

1. Phénomène d'extravasation

La migration des cellules immunitaires (leucocytes, lymphocytes, neutrophiles, ...) des vaisseaux sanguins, où elles circulent en permanence, vers un tissu endommagé est un processus essentiel au bon fonctionnement de notre système immunitaire. Cependant un recrutement et un influx trop important de leucocytes sur le site blessé peuvent avoir des effets néfastes pour l'organisme. En effet, les cellules normales peuvent être endommagées, causant alors une inflammation. Les inhibiteurs adéquats qui permettent la régulation du phénomène de la migration cellulaire peuvent être considéré comme des agents anti-inflammatoires. Ils permettent de lutter contre des désordres ponctuels tels que les chocs cardiaques, les crises d'asthmes ou une « maladie de reperfusion » (intervenant lors d'interventions chirurgicales ou de greffes d'organes). Mais ils peuvent également être efficaces pour des maladies d'ordres chroniques telles que le psoriasis et l'arthrite chronique. De plus, ce phénomène de migration cellulaire intervient au niveau des cellules cancéreuses et dans le développement des métastases.

Il s'agit d'un processus en plusieurs étapes où les leucocytes circulant dans les vaisseaux sanguins adhèrent à la paroi endothéliale pour la traverser afin de rejoindre le site blessé ou infecté. Ces différentes étapes sont finement régulées ce qui nous laisse différentes opportunités pour essayer d'interférer avec ces mécanismes⁵⁷. Nous nous intéresserons au processus de contrôle par les molécules dites « d'adhésion », présentes à la surface des leucocytes, de l'endothélium et de leurs ligands respectifs de type oligosaccharidique.

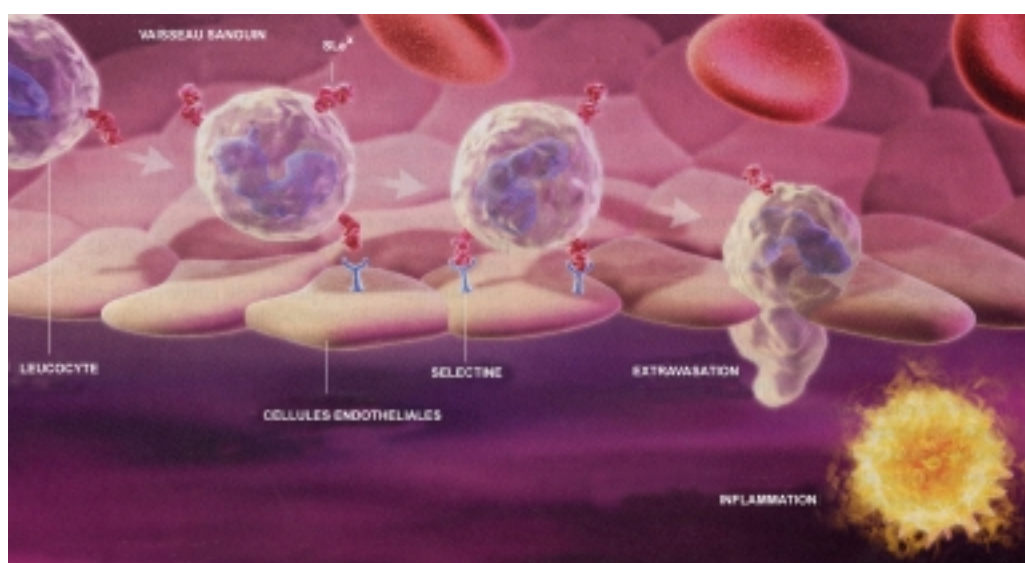
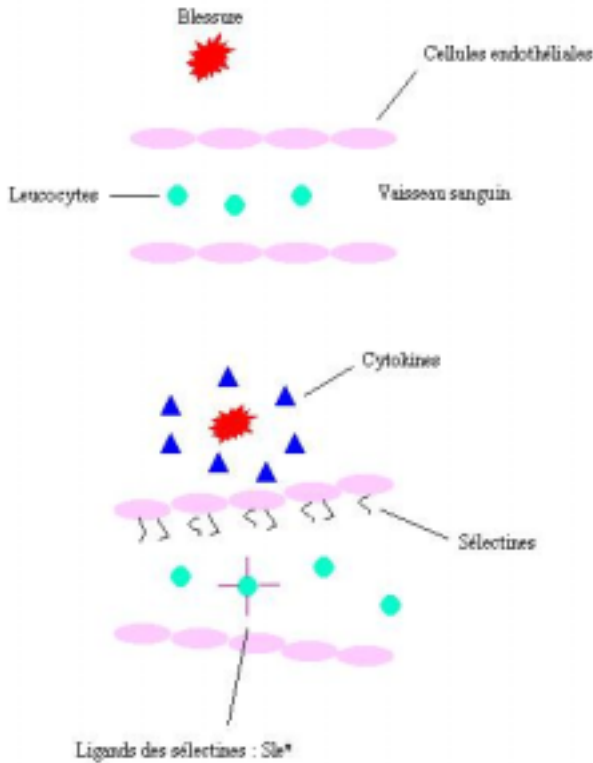


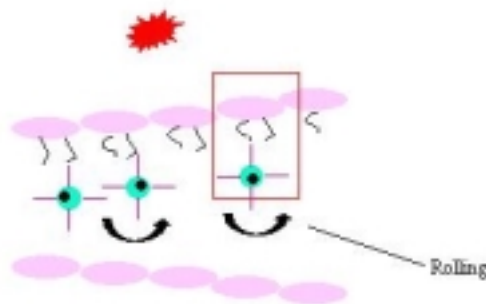
Schéma 2.1. Illustration du phénomène d'extravasation lors d'un processus inflammatoire⁵⁸.

Le schéma ci-dessus représente ce phénomène de migration cellulaire dans son ensemble (schéma 2.1).

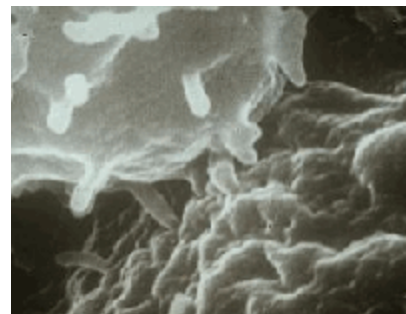
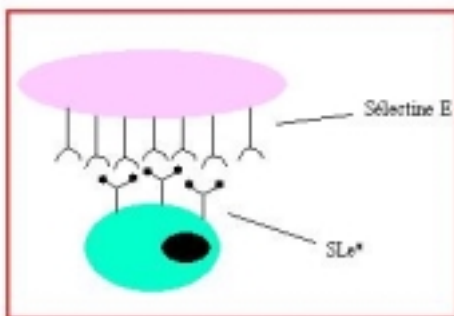
Les schémas ci-après détaillent toutes les étapes de ce processus^{57,59,60,61}.



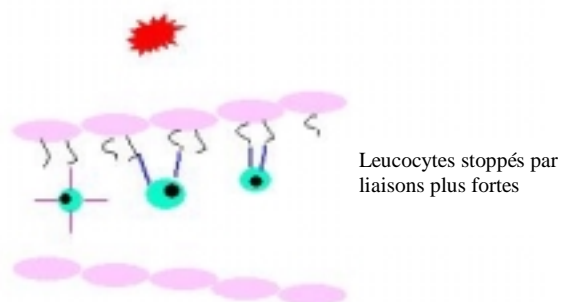
Le tissu endommagé initie le processus en libérant des cytokines qui ont alors deux effets. D'une part, elles stimulent la dilatation du vaisseau sanguin afin de ralentir le flux des cellules. D'autre part, elles stimulent l'endothélium qui exprime deux protéines, les sélectines E et P ainsi que les ligands des sélectines à la surface des leucocytes circulants.



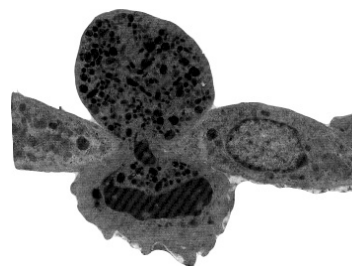
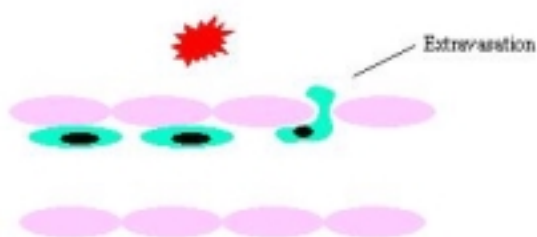
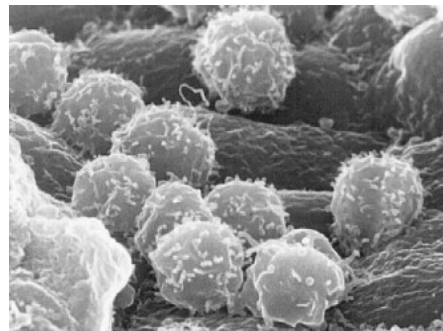
Les leucocytes se lient à la paroi endothéliale par l'intermédiaire des sélectines et de leurs ligands. Ces interactions sucres-protéines sont faibles et réversibles et permettent le ralentissement des leucocytes et une adhésion fragile qui conduit au roulement (ou « rolling ») des leucocytes le long de la paroi endothéliale.⁵⁷



Vue des interactions au microscope électronique.

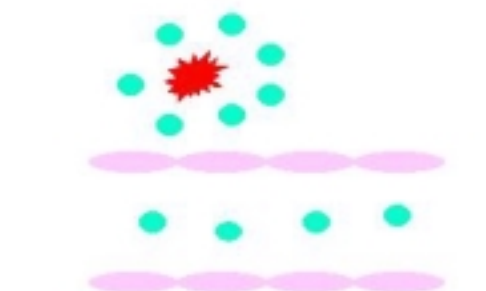


De nouvelles molécules d'adhésions, les intégrines, exprimées à la surface des leucocytes, induisent des interactions protéine-protéine plus fortes qui stoppent alors les cellules immunitaires.



Après avoir été stoppés, les leucocytes s'aplatissent et traversent la paroi endothéliale: ce phénomène est appelé l'extravasation.

Les leucocytes sont alors acheminés vers le site blessé grâce à des gradients chimiotactiques afin qu'ils puissent libérer les substances nécessaires à calmer le site blessé.



Dans la suite de notre travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la phase de ralentissement des leucocytes, assurée par des interactions faibles sucres-protéines.

2. Les sélectines et leurs ligands

- **Les différentes sélectines**

Les sélectines, découvertes en 1989⁶², sont des glycoprotéines transmembranaires calcium-dépendantes impliquées dans les phénomènes d'adhésion cellulaires.

On en dénombre trois^{63,64,65}:

- **Sélectine L**: elle est exprimée à la surface des **leucocytes** et est impliquée dans la circulation des lymphocytes aussi bien que dans le recrutement des leucocytes sur un site blessé.
- **Sélectine P**: elle est exprimée rapidement sur les **plaquettes** et les cellules endothéliales après la stimulation des cytokines.
- **Sélectine E**: elle est exprimée sur les **cellules endothéliales** activées et apparaît quelques heures après l'activation par les cytokines. Elle intervient dans les phénomènes d'inflammation et assure le roulement des leucocytes le long de la paroi endothéliale.

LES SELECTINES

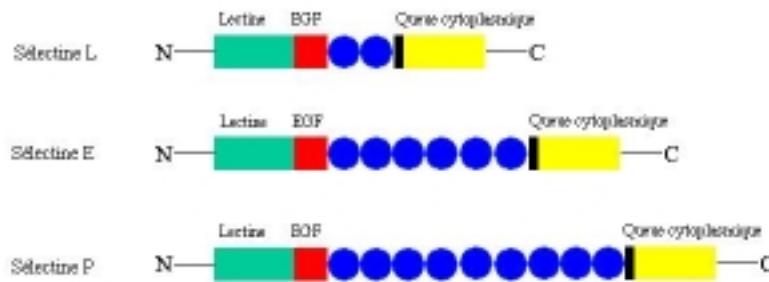


Schéma 2.2. Représentation structurale des sélectines à partir des données de séquence primaires.^{62,65,66,67}

• **Les ligands des sélectines**

Depuis la caractérisation des sélectines, un grand nombre de ligands ont été identifiés. Notons que la spécificité des sélectines pour leurs ligands n'est pas absolue (schéma 2.3.).¹¹

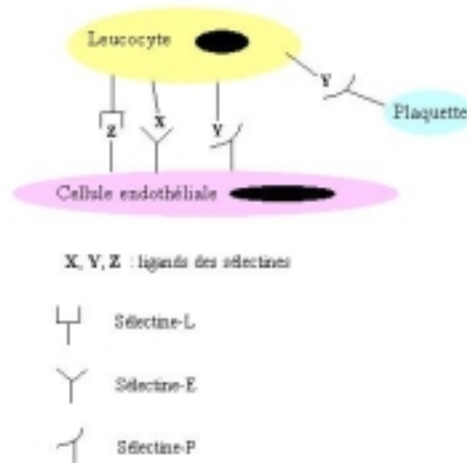


Schéma 2.3. Les sélectines et leurs ligands respectifs.⁶⁸

Le processus de migration cellulaire dans l'organisme est un processus complexe dont le fonctionnement précis n'est pas encore établi au niveau moléculaire, nous ne faisons qu'un état des connaissances.

Les ligands des sélectines sont des glycoprotéines. Ils sont reportés dans le tableau suivant (tableau 2.1.).⁶⁰

<i>Sélectine</i> (ancienne nomenclature)	<i>Exprimée</i>	<i>Petites molécules ligands</i>	<i>Glycoprotéines ligands</i>
E (ELAM-1) (ELAM-2)	En réponse à un signal de lésion	SLe ^x SLe ^x -SO ₃ ⁻ SLe ^a SLe ^a -SO ₃ ⁻	ESL-1 PGSL-1
L (LECAM-1) (gp90MEL) (LAM-1)	En permanence	SLe ^x Le ^x -SO ₃ ⁻ SLe ^a Le ^a -SO ₃ ⁻ Sulfatide Héparine sulfatée Fucoïdine Dextrane sulfaté	GlyCAM-1 CD34 MadCAM-1
P (CD62) (PADGEM) (GP140) (LECAM-3)	En réponse à un signal	SLe ^x SLe ^a Sulfatide Héparine Fucoïdine Dextrane sulfaté	PGSL-1

Tableau 1.1. Les différents ligands des sélectines.

Au travers de ces résultats, il apparaît que les sélectines peuvent se lier à plusieurs types d'oligosaccharides. Cependant, le tétrasaccharide nommé acide sialyle Lewis x (SLe^x: α -Sia-(2,3)- β -Gal-(1,4)- α -Fuc-(1,3)- β -GlcNac-1-R) a été identifié, dès 1991, comme étant un ligand essentiel des sélectines et en particulier de la sélectine E.

Notons cependant que des dérivés du SLe^x tels que son isomère l'acide sialyl Lewis a (SLe^a: α -Sia-(2,3)- β -Gal-(1,3)- α -Fuc-(1,4)- β -GlcNac1-R) ou encore le sialyl 6-sulfo Lewis x (α -Sia-(2,3)-(SO₄⁻6)- β -Gal-(1,4)- α -Fuc-(1,3)- β -GlcNac1-R) jouent également un rôle important dans le processus d'adhésion cellulaire⁶⁹.

Pour la suite de nos travaux, nous nous intéresserons plus particulièrement au SLe^x et à sa biosynthèse. En intervenant au niveau de la formation même de ce tétrasaccharide, il serait possible de réduire le recrutement des leucocytes et ainsi diminuer les phénomènes d'inflammation des tissus.

3. L'acide sialyle Lewis x: SLe^x

- **Structure et biosynthèse du SLe^x**

Le SLe^x est un tétrasaccharide qui a pour structure: acide *N*-acétyl-D-neuraminique- α (2→3)-D-galactose- β (1→4)-[D-fucose- α (1→3)]-*N*-acétyl-D-glucosamine où l'acide *N*-acétyl-D-neuraminique est l'acide sialique (schéma 2.4).

La biosynthèse de ce tétrasaccharide est assurée par trois glycosyltransférases qui agissent de manière bien définie. La β -(1,4)-galactosyltransférase greffe d'abord l'unité galactose sur la *N*-acétyl-D-glucosamine, puis l' α -(2,3)-sialyltransférase additionne l'acide neuraminique sur le galactose du disaccharide précédent et enfin l' α -(1,3)-fucosyltransférase vient ajouter l'unité L-fucose en position 3 de la *N*-acétyl-D-glucosamine (schéma 2.4).

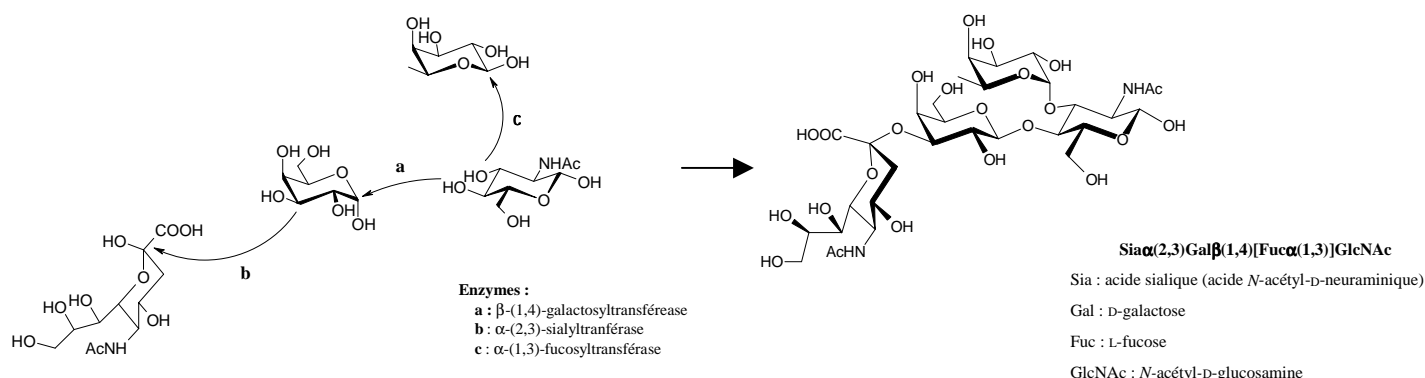


Schéma 2.4. Biosynthèse de l'acide sialyle Lewis x (SLe^x).

• **Interactions sélectines- SLe^x**

Les fonctions structurales essentielles de reconnaissance entre sélectines et SLe^x ont été déduites grâce à la résolution aux rayons X de la sélectine E, à la structure RMN du SLe^x lié à la sélectine E et ainsi qu'aux différentes études d'affinités des nombreux analogues synthétisés par le groupe de Wong.^{61,70}

En 1993, C-H. Wong et coll. postulent le modèle de reconnaissance suivant^{64,71}:

- l'interaction est multivalente
- intervention d'un ion calcium Ca^{2+}
- les éléments du SLe^x essentiels à la reconnaissance comprennent la fonction carbonyle de l'acide *N*-acétyl neuraminique, les hydroxyles 4 et 6 du galactose et particulièrement les 3 hydroxyles 3, 4 et 5 du fucose.

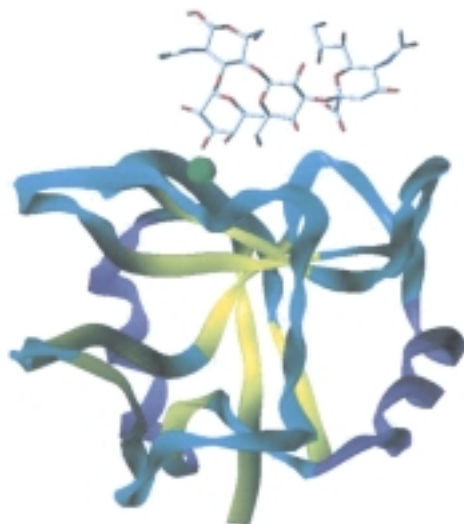


Schéma 2.5. Structure aux RX du SLe^x lié à la sélectine E ⁷².

Le résidu GlcNAc ne joue pas un rôle crucial pour la reconnaissance mais il est important pour la préorganisation des résidus du tétrasaccharide dans le site actif c'est-à-dire pour la conformation du tétrasaccharide⁶⁰.

Le schéma 2.5 représente la structure aux rayons X du SLe^x en liaison avec le domaine de la sélectine E. Le schéma 2.7 montre plus précisément les différentes interactions entre les résidus du SLe^x et le site actif de la sélectine E. Le schéma 2.6 résume les acides aminés qui

Comme nous l'avons vu précédemment, le fucose est une entité importante dans la reconnaissance SLe^x – sélectine puisque les trois groupes hydroxyle du fucose sont des sites de reconnaissance dans le site actif de la sélectine.

D'autre part, une pathologie génétique, appelée « syndrome de déficience d'adhésion des leucocytes de type II » (LAD II) prouve également l'importance du fucose.^{73,74,75,76,77} Cette maladie est causée par la perte totale des éléments qui permettent la fucosylation, comme par exemple, les ligands des sélectines. Cette maladie est donc caractérisée par une incapacité à recruter les cellules immunitaires vers les sites d'inflammation.

La connaissance de cette maladie et la reconnaissance du fucose par les sélectines nous confortent donc dans l'idée que le fucose est très important pour la migration cellulaire. De plus, l'analogie des états de transition pour les mécanismes des α -(1,3)-fucosyltransférases et de l' α -L-fucosidase nous permet de supposer que les inhibiteurs puissants de fucosidases peuvent être d'intéressants précurseurs des inhibiteurs des fucosyltransférases.

- **Inhibition des interactions SLe^x - sélectines**

Plusieurs approches ont été considérées dans la littérature. Nous allons brièvement les résumer.

- **Mimes de SLe^x**

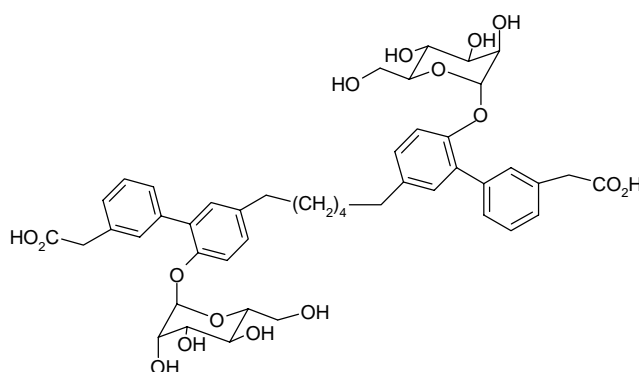


Schéma 2.8. TBC 1269.

Plusieurs groupes ont synthétisé des mimes de SLe^x^{17,18,19,20}. Certains analogues sont à base de sucre et leur structure est proche de celle du SLe^x avec des modifications de certains résidus. Ce sont également des molécules plus petites ne comportant qu'un, deux ou trois sucres. Par exemple, le TBC 1269 (schéma 2.8) synthétisé par Texas Biotech est un bon inhibiteur (6 à 50 fois plus actif que le SLe^x contre les sélectines E et P). Il est actuellement en étude clinique (phase II) comme anti-inflammatoire⁶³.

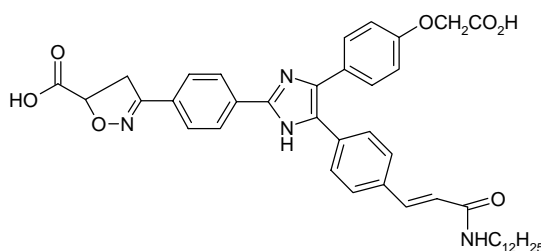


Schéma 2.9. Inhibiteur synthétisé par Ontogen Corporation.

Certains sont non saccharidiques, ce qui est avantageux car ils présentent une meilleure stabilité et permettent une meilleure biodisponibilité au sein de l'organisme. Par exemple, Ontogen Corporation a synthétisé un inhibiteur à base d'hétérocycles plus puissant vis-à-vis des sélectines E et P ($IC_{50} = 1,1 \mu M$)⁶³ que l'acide SLe^x ($IC_{50} = 5 mM$)⁷⁸ (schéma 2.9).

Beaucoup d'autres analogues ont été récemment synthétisés et présentent des constantes d'inhibitions de l'ordre du micromolaire.^{79,80,81,82}

- **Autres analogues du SLe^x**

D'autres travaux montrent l'inhibition des sélectines par des nucléotides polyanioniques, des peptides ou encore des produits naturels. Certains groupes s'intéressent également à inhiber le processus de sulfatation des ligands glycosylés des sélectines.⁶⁰

- **Inhibition de la biosynthèse du SLe^x**

Nous avons vu précédemment l'importance du résidu fucose, porté par le SLe^x, pour la reconnaissance par les sélectines. En inhibant la biosynthèse du SLe^x et plus particulièrement la dernière étape d'addition du fucose, nous pourrions alors modifier les interactions sélectine-SLe^x.

Beaucoup de groupes de recherche se sont intéressés à inhiber l'étape de sialylation et de fucosylation. Les résultats sont compilés dans une revue réalisée par O.R. Martin.⁸³

Pour notre part, nous nous intéresserons à l'étape finale de fucosylation catalysée par les fucosyltransférases.

LES FUCOSYLTRANSFERASES

- 1. Une classe particulière de glycosyltransferases**
- 2. Mécanisme catalytique**
- 3. Revues des inhibiteurs**

1. Une classe particulière de glycosyltransférase

Les glycosyltransférases (GlyT) représentent une famille importante d'enzymes qui construisent les motifs polysaccharidiques en catalysant le transfert d'une unité monosaccharidique d'un donneur activé (un sucre nucléotide) vers un accepteur (glycopeptide, oligosaccharide, glycolipide) (schéma 2.10)^{84,85}.

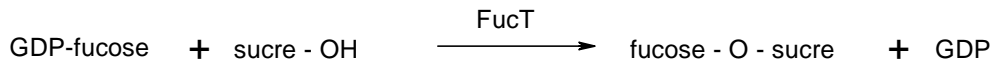


Schéma 2.10. Représentation schématique de la réaction catalysée par une fucosyltransférase.

Ce sont des protéines membranaires localisées au sein des cellules dans l'appareil de Golgi où ont lieu toutes les modifications post-translationnelles des protéines (schéma 2.11).

Les glycosyltransférases se composent alors:⁸⁴

- d'une petite queue cytoplasmique *N*-terminale
- d'une région transmembranaire
- d'une « tige » responsable de la spécificité de l'enzyme pour son accepteur
- d'un domaine catalytique *C*-terminal beaucoup plus vaste et situé dans l'appareil de Golgi

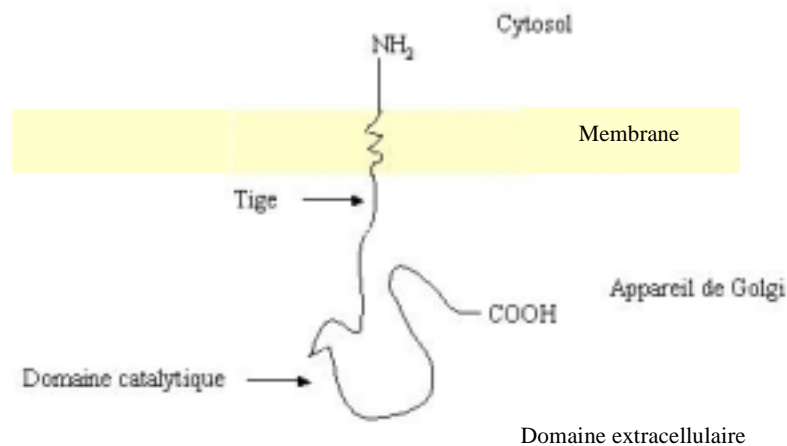


Schéma 2.11. Modèle de structure générale d'une glycosyltransférase.

Comme pour les glycosidases, il existe pratiquement une glycosyltransférase particulière pour chaque type de sucre et chaque type de liaison glycosidique à synthétiser.

Ces enzymes catalysent le transfert de l'unité L-fucose du donneur nucléotidique guanosine- β -L-fucose (GDP-fucose) en position 3 d'un accepteur oligosaccharide avec formation d'une liaison glycosidique de configuration α .

On dénombre actuellement neuf α -fucosyltransférases avec la découverte récente en 1999 de la fucosyltransférase IX par Kaneko et coll (tableau 2.2).⁸⁶

<i>Nomenclature / Familles</i>	<i>Sous-familles</i>	<i>Liaisons glycosidiques synthétisées</i>
EC 2.4.1.69 α -(1,2)-fucosyltransférase (Gal- α -(1,2)-fucosyltransférase)	FucT I FucT II	Fuc α 1 \rightarrow 2 Gal-R
I EC 2.4.1.65 α -(1,3 / 1,4)-fucosyltransférase (GlcNac α -(1,3 / 4)-fucosyltransférase)	FucT III FucT V	<u>Accepteur de type 1:</u> Fuc α 1 \rightarrow 4 Gal β 1 \rightarrow 3 GlcNac-R <u>Accepteur de type 2:</u> Fuc α 1 \rightarrow 3 Gal β 1 \rightarrow 4 GlcNac-R
EC 2.4.1.152 α -(1,3)-fucosyltransférase (GlcNac α -(1,3)-fucosyltransférase)	FucT IV FucT VI FucT VII FucT IX	<u>Accepteur de type 2:</u> Fuc α 1 \rightarrow 3 Gal β 1 \rightarrow 4 GlcNac-R
EC 2.4.1.68 α -(1,6)-fucosyltransférase (Glycoprotéine α -(1,6)-fucosyltransférase)	Fuc T VIII	Fuc α 1 \rightarrow 6 Man β 1 \rightarrow 4GlcNac β 1 \rightarrow 4GlcNac β Asn

Tableau 2.2. Classification des fucosyltransférases basée sur la spécificité de substrat.

Notons qu'il existe des fucosyltransférases qui forme des liaisons saccharidiques de type α (1,2), α (1,3/4), α (1,6). Elles sont divisées en quatre sous-familles selon leur spécificité de substrat (spécificité de l'accepteur).

Aucune structure aux rayons X n'a encore été résolue à ce jour. Il faut noter cependant que les fucosyltransférases III, V, VI sont homologues à plus de 80 % quant à leur séquence primaire, la fucosyltransférase IV présente une homologie de séquence de 65 %⁸⁷ avec les précédentes et seule la fucosyltransférase VII possède une homologie de séquence de 40 à 50 % par rapport aux autres.⁸⁸ La fucosyltransférase de type IX est peu similaire aux autres.⁸⁹ Un modèle de la fucosyltransférase VII a été établi par homologie de séquence par le groupe de Macher.⁸⁹

Il semble que les fucosyltransférases qui participent au recrutement primaire des leucocytes matures lors du processus inflammatoire se restreignent aux fucosyltransférases VII et IV.^{90,91} Mais seule la fucosyltransférase VII semble participer à la biosynthèse du SLe^x.⁹⁰

2. Mécanisme catalytique

Les glycosyltransférases sont classées suivant leur mécanisme catalytique qui peut être avec rétention ou inversion de configuration au niveau du carbone anomérique.

Les travaux de Wong sur l' α -(1,3)-fucosyltransférase V ont permis une meilleure connaissance du mécanisme d'action des α -(1,3)-fucosyltransférases.^{92,93,94,95,96}

Les fucosyltransférases agissent avec inversion de configuration du centre anomérique du L-fucose transféré. Elles utilisent un cofacteur métallique divalent qui est en général l'ion manganèse Mn²⁺ lié au groupement pyrophosphate. Elles peuvent également utiliser d'autres ions métalliques en coordination octaédrale tels que Ca²⁺, Co²⁺ ou Mg²⁺.⁹² Ce type de métal participe à la stabilisation de l'état de transition au travers d'une catalyse électrophile

(complexation du motif diphosphate du donneur de fucose) et facilite le départ du groupe partant. Il semblerait que le mécanisme d'action se situe entre une SN_1 et une SN_2 (schéma 2.12).

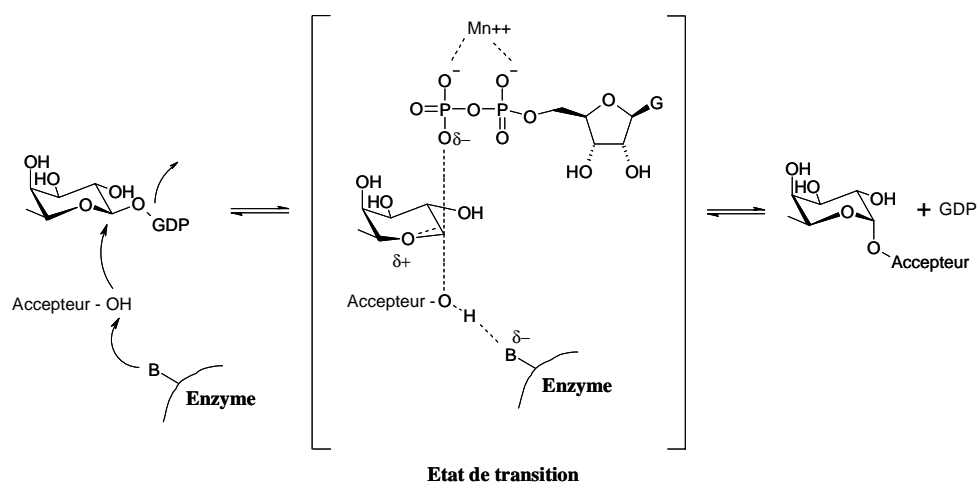


Schéma 2.12. Mécanisme postulé pour l' α -(1,3)-fucosyltransférase de type V.

Si l'on considère l'intermédiaire d'état de transition décrit au cours de ce mécanisme, la structure du sucre transféré prend une conformation de demi-chaîne aplatie avec hybridation sp^2 ponctuelle de la position anomérique qui a un caractère d'ion oxocarbenium. Celui-ci est analogue à celui observé dans l'état de transition des glycosidases (en particulier de la fucosidase) où la molécule d'eau est remplacée par le nucléophile accepteur (schéma 2.13). Une base dans le site actif de l'enzyme (acide aspartique ou acide glutamique) assiste la déprotonation de l'hydroxyle de l'accepteur afin d'activer l'atome intracyclique d'oxygène avant l'addition nucléophile.

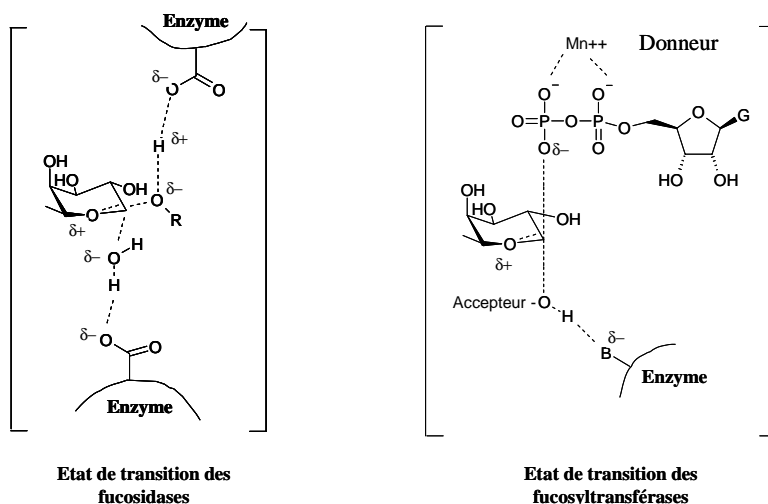


Schéma 2.13. Comparaison des intermédiaires réactionnels postulés au cours de la réaction catalysée par les fucosidases et les fucosyltransférases.

3. Revue des inhibiteurs

Quatre familles d'inhibiteurs d' α -(1,3)-fucosyltransférase ont été abordés par différents groupes de recherche⁸³:

- des analogues de l'accepteur
- des analogues du donneur
- des analogues de l'état de transition
- une série de produits naturels

Quelques exemples d'inhibiteurs évalués sur différentes fucosyltransférases, rendant difficile la comparaison de leur activité sont cités dans le schéma 2.14. Beaucoup d'autres produits ont été synthétisés mais leur évaluation enzymatique n'est pas toujours publiée^{97,98,99,100}.

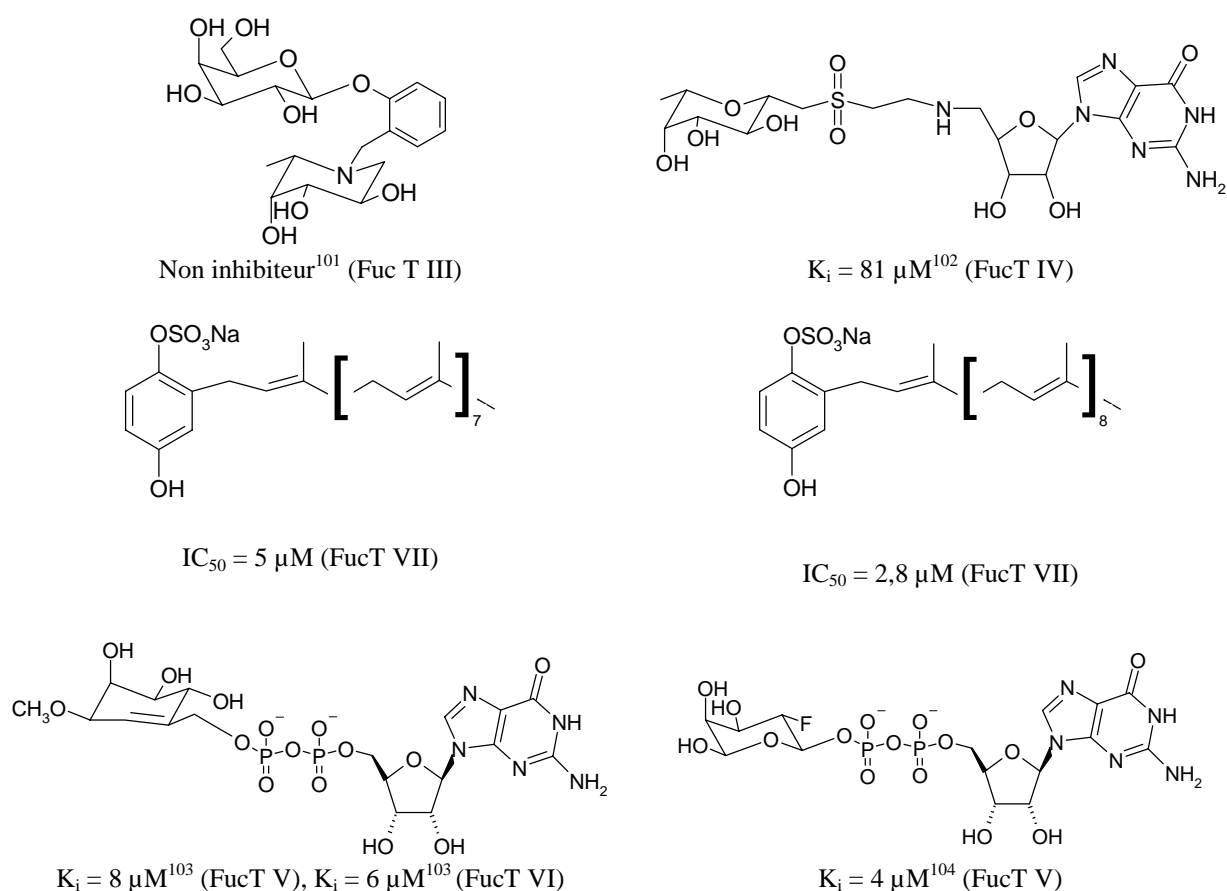
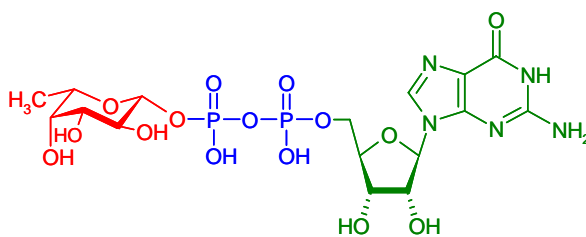


Schéma 2.14. Inhibiteurs d' α -(1,3)-fucosyltransférase.

Dans ce domaine, nous nous sommes intéressés aux analogues du donneur de fucose. Le substrat donneur des fucosyltransférases est la guanosine-5'-(β -L-fucopyranosyl)-diphosphate (GDP-fucose) (schéma 2.15).



L-fucose Chaîne diphosphate Nucléotide

Schéma 2.15. *GDP-fucose.*

Une des premières molécules évaluées en tant qu'inhibiteur des fucosyltransférases a été le GDP (K_i (sur FucT V) = 30 μM) qui est un des produits de la réaction catalytique de fucosylation. La guanosine monophosphate (GMP) a une affinité beaucoup plus faible pour cette enzyme ($K_i = 700 \mu\text{M}$). Ces résultats soulignent donc l'importance de la partie diphosphate.

- **Importance de la partie fucose**

Plusieurs études, menées en particulier par l'équipe de Wong, ont montré que des aminosucres (cycle à 5 ou à 6) étaient de bons mimés du dérivé oxocarbénium formé au cours de la catalyse enzymatique. En effet, ces molécules mimeraient la charge positive partielle développée dans l'état de transition et ainsi imiteraient la conformation de l'intermédiaire comportant un caractère d'ion oxocarbénium^{94,105} (schéma 2.16).

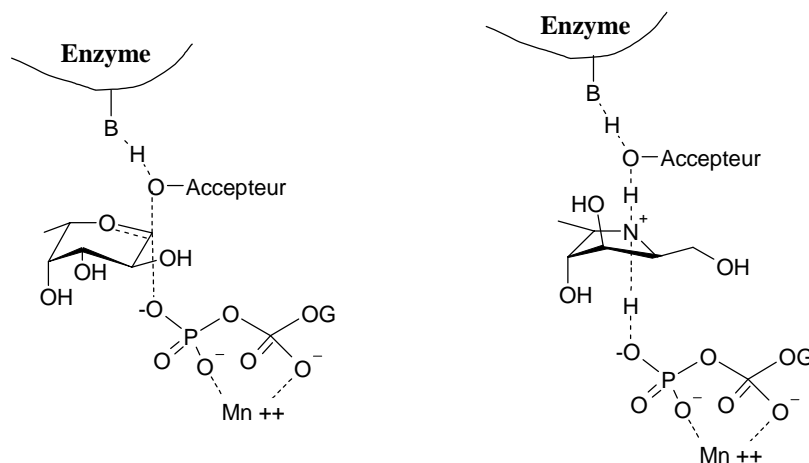
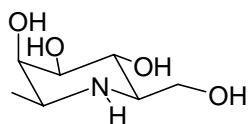
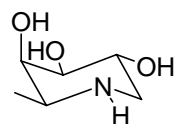


Schéma 2.16. *Comparaison des états de transition entre sucre et amino-sucres.*¹⁰⁶

Wong et coll. ont réalisé des études d'inhibition en synergie dans le cas de la fucosyltransférase V.⁹⁴ Ceux-ci ont évalué des simples amino-sucres (cycle à 6 ou 5), puissants inhibiteurs de fucosidase, en tant qu'inhibiteurs d' α -(1,3)-fucosyltransférase. En absence de GDP, ces molécules présentent une inhibition d' α -(1,3)-fucosyltransférase V de l'ordre de 20 %. Cette inhibition passe à 80 % en présence de 0,030 mM de GDP (schéma 2.17).



Homofuconojirimicine
 $IC_{50} = 71 \text{ mM}$
 $IC_{50} = 1,5 \text{ mM (30 } \mu\text{M de GDP)}$

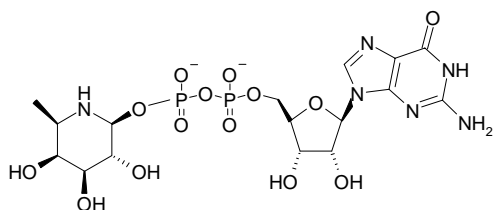


Deoxyfuconojirimicine
 $IC_{50} = 73 \text{ mM}$
 $IC_{50} = 3,5 \text{ mM (30 } \mu\text{M de GDP)}$

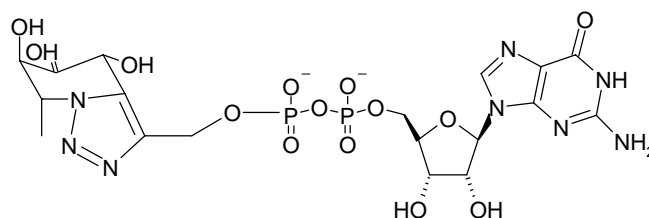
Schéma 2.17. Effet de synergie du GDP pour l'inhibition de la FucT V.

Notre objectif est donc d'utiliser un aminosucre, inhibiteur puissant d' α -L-fucosidase, afin de synthétiser des analogues de GDP-fucose non hydrolysables pour inhiber l' α -(1,3)-fucosyltransférase.

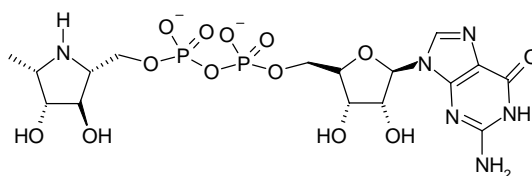
Sur la base de ces études, plusieurs groupes ont synthétisé des inhibiteurs de fucosyltransférases ayant pour corps central une structure de base aminosucre. Quelques exemples de ces inhibiteurs sont recensés dans le schéma 2.18 suivant.



$K_i = 13 \text{ } \mu\text{M (FucT V)}$
 $K_i = 11 \text{ } \mu\text{M (FucT VI)}^{107}$



$K_i = 8 \text{ } \mu\text{M (FucT V)}$
 $K_i = 13 \text{ } \mu\text{M (FucT VI)}^{108}$



$K_i = 45 \text{ } \mu\text{M}^{106} \text{ (FucT V)}$

Schéma 2.18. Exemples d'inhibiteurs de fucosyltransférases à base d'aminosucre.

Dans le cadre de cette thèse, nous projetons donc de synthétiser des aminosucres inhibiteurs de glycosidases et en particulier de fucosidases afin de les transformer en analogues de GDP-fucose non hydrolysables et d'inhiber les fucosyltransférases en greffant les chaînes adéquates sur ces iminosucres.

INHIBITEURS DE FUCOSYLTRANSFÉRASES : VERS LA SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE GDP-FUCOSE

SYNTHÈSE EN SÉRIE L-LYXOSE

FONCTIONNALISATION DE LA NITRONE

SYNTHÈSE EN SÉRIE L-LYXOSE

1. La nitrone : synthèse et propriétés

Méthodes de préparation des nitrones

Propriétés des nitrones

Réactions de réduction

Addition d'un nucléophile

La cyclo-addition 1,3-dipolaire

2. Synthèse de la nitrone en série L-lyxose

- Schéma rétrosynthétique

- Protection du D-ribose

- Formation du groupe méthyle

Bromation de l'alcool

Elimination du brome

Autres alternatives

- Débenzylation de la position anmérique

- Insertion de l'azote : formation de l'oxime

- Formation de la nitrone

Préparation à la cyclisation intramoléculaire

Cyclisation et inversion du méthyle

Seconde voie de synthèse

- Vers l'obtention de l'aminosucré

- Déprotection des aminosucres

3. Activités inhibitrices sur l' α -L-fucosidase

4. Conclusion

Nous avons déterminé, dans la première partie, un modèle d'inhibiteur de fucosidase. Celui-ci doit posséder la même configuration que le L-lyxose. Dans ce chapitre, nous allons donc synthétiser une structure de base possédant cette configuration afin de pouvoir par la suite la fonctionnaliser dans le but d'obtenir des analogues de donneurs de fucose non hydrolysable et d'inhiber l' α -(1,3)-fucosyltransférase.

Nous avons choisi une voie de synthèse nous conduisant à une nitrone, intermédiaire clé facile d'accès et aisément fonctionnalisable.

Avant de détailler cette synthèse, nous allons rappeler quelques méthodes de synthèse et différentes propriétés des nitrones.

1. La nitrone: synthèse et propriétés

Une nitrone est un dipôle, c'est-à-dire un système de trois atomes où sont distribués quatre électrons π . Les nitrones ont par conséquent une place importante dans les réactions de cyclo-addition 1,3-dipolaire. Elles jouent également le rôle d'électrophile lors des attaques organométalliques et ce sont donc des composés très largement utilisés pour la formation de liaison carbone-carbone.

Méthodes de préparation des nitrones

Il existe quatre méthodes principales pour synthétiser des nitrones (schéma 3.1):^{109,110}

- condensation d'un groupement carbonyle avec une hydroxylamine N-monosubstituée (A)

Cette voie est une des plus importante dans la synthèse des nitrones. Notons que la réaction est rapide et est réalisée à température ambiante pour les aldéhydes alors que les cétones sont moins réactives.

- oxydation d'une hydroxylamine N,N-disubstituée (B)

Cette méthode est la deuxième voie la plus utilisée pour obtenir des nitrones. L'agent oxydant le plus couramment employé est l'oxyde de mercure jaune. D'autres oxydants comme le ferricyanure de potassium, l'eau oxygénée ou encore le dioxyde de manganèse peuvent être utilisés.

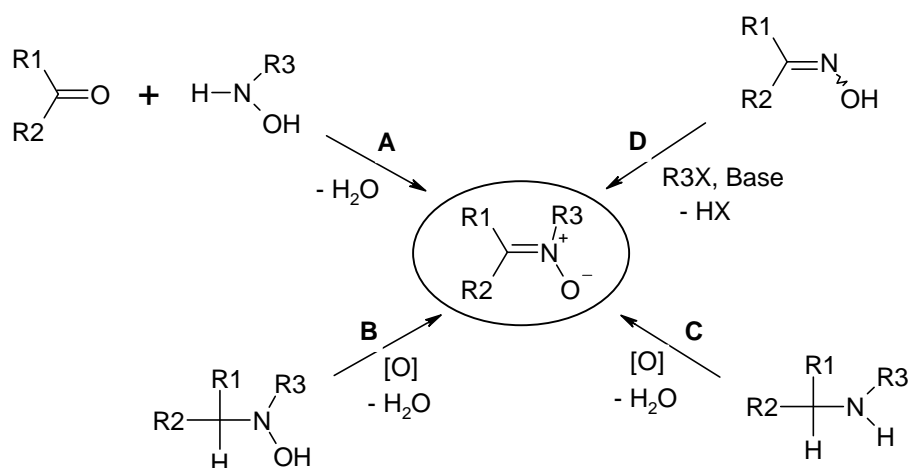


Schéma 3.1. Méthodes les plus utilisées pour obtenir une nitrone.

- oxydation d'une amine secondaire (C)

C'est une méthode simple et générale mais plus délicate dans la préparation des nitrones. Il existe plusieurs méthodes d'oxydation avec notamment l'action d'eau oxygénée en présence d'un catalyseur comme le tungstate de sodium (Na_2WO_4)¹⁰⁹, l'oxyde sélénieux

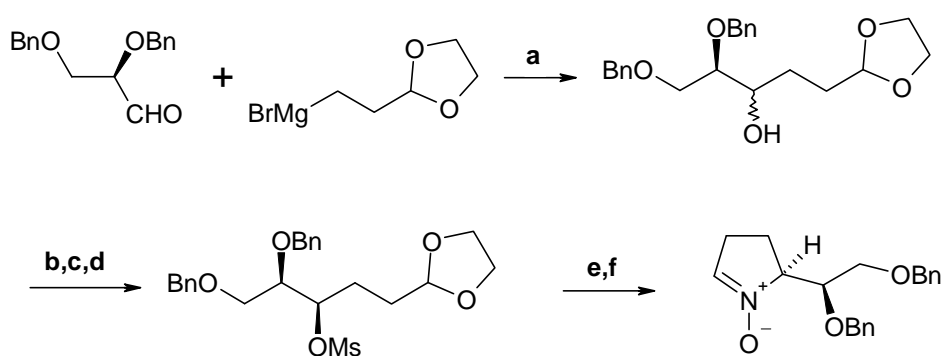
(SeO₂)¹¹¹ ou encore le méthyltrioxorhenium (MTO)¹¹². Une méthode plus récente est l'oxydation par le réactif de Davis (C-phenyl-N-phenylsulfonyloxaziridine).^{113,114,115}

- N-alkylation d'oxime (D)

Cette méthode utilise la grande nucléophilie de cette fonction, l'azote de l'oxime est considéré comme plus nucléophile que l'oxygène. On obtient donc majoritairement de la N-alkylation en présence d'O-alkylation. Cette réaction est réalisée à l'aide d'une base par addition nucléophile sur un époxyde ou une cétone ou sur un éthylénique par réaction de Michaël.

▪ Exemples de préparation de nitrones

Alibés et coll. ont par exemple utilisé la méthode A pour obtenir une nitronne afin de réaliser par la suite une cycloaddition 1,3-dipolaire (schéma 3.2).¹¹⁶ Ils ont alors réalisé la synthèse d'une nitronne en six étapes avec un rendement global de 32 %.



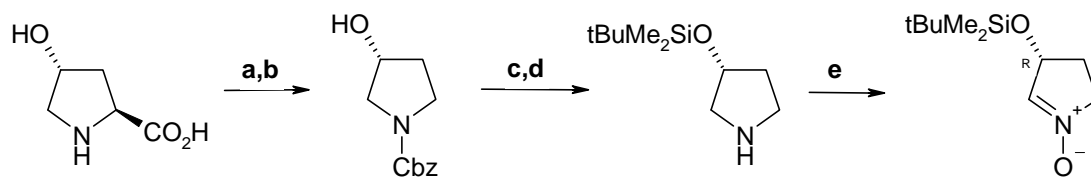
(a) THF, ta, 4h, 67% ; (b) Dess-Martin, CH₂Cl₂, 2h, 95% ; (c) L-Selectride, THF, -78°C, 87%
(d) MsCl/pyr, CH₂Cl₂, ta, 3j., 89% ; (e) 2M HCl/THF, 50 °C, 16h, 96% ; (f) NH₂OH, HCl/pyr., tBuOH, 80°C, 4 j., 67 %.

Schéma 3.2. Synthèse de pyrrolidine N-oxide par Alibés et coll.

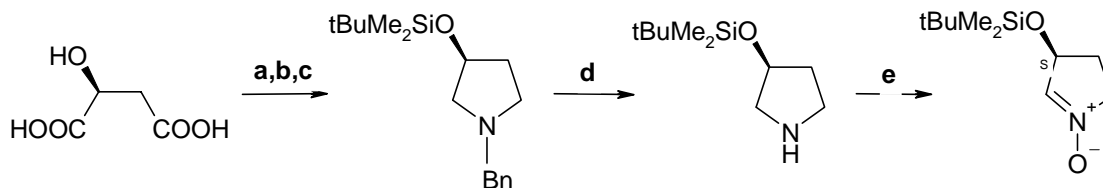
D'autres groupes comme celui d'Hanessian ou de Wightmann ont également utilisé la même méthode de synthèse de nitrones employées ultérieurement pour des réactions de cycloaddition.^{117,118}

Murahashi, en 1994, a utilisé l'oxydation d'amine par l'eau oxygénée en présence de tungstate de sodium pour obtenir des composés optiquement actifs¹¹⁹ (schéma 3.3). Les produits optiquement actifs ont un intérêt particulier en vue de synthèse de pyrrolizidine ou d'indolizidine biologiquement actives.

D'autre part, les groupes de Brandi et Petrin se sont beaucoup intéressés à la synthèse et à l'utilisation des nitrones mono- et di-hydroxylées. Ils ont en particulier utilisé l'oxyde de mercure afin d'oxyder les hydroxylamines en nitrones. Ces groupes ont effectué ces synthèses soit à partir de sucre ou tout particulièrement à partir de l'acide tartrique ou de l'acide malonique.^{41,46}



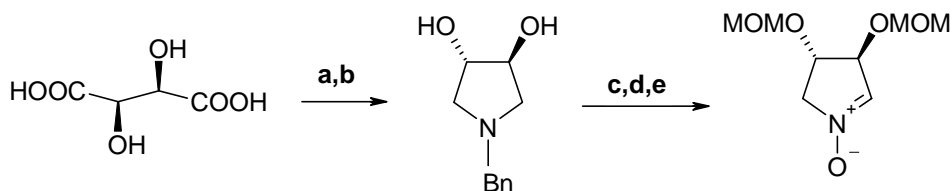
(a) - CO₂; (b) CbzCl; (c) tBuMe₂SiCl; (d) H₂/Pd-C; (e) Na₂WO₄-Et₄NCl (cat.), H₂O₂, K₂CO₃, CH₂Cl₂-H₂O



(a) BnNH₂; (b) BH₃; (c) tBuMe₂SiCl; (d) H₂/Pd-C; (e) Na₂WO₄-Et₄NCl (cat.), H₂O₂, K₂CO₃, CH₂Cl₂-H₂O

Schéma 3.3. Synthèses de produits optiquement actifs par Murahashi.

C'est Petrini qui le premier a présenté une synthèse de nitronone en cinq étapes à partir de l'acide tartrique. La dihydroxypyrrrolidine a été oxydée en nitronone à l'aide d'eau oxygénée et d'oxyde de sélénium (schéma 3.4).¹²⁰



(a) BnNH₂; (b) NaBH₄, BF₃; (c) CH₂(OMe)₂, P₂O₅; (d) H₂/Pd(OH)₂; (e) H₂O₂, SeO₂

Schéma 3.4. Synthèse réalisée par Petrini.¹²⁰

Brandi a proposé une synthèse en quatre étapes de la même nitronone en faisant varier les groupes protecteurs. Cette méthode est plus efficace et donne des rendements plus élevés que la méthode de Petrini⁴⁶. Les étapes finales sont la formation d'une N-hydroxypyrrrolidine et son oxydation en nitronone (schéma 3.5).

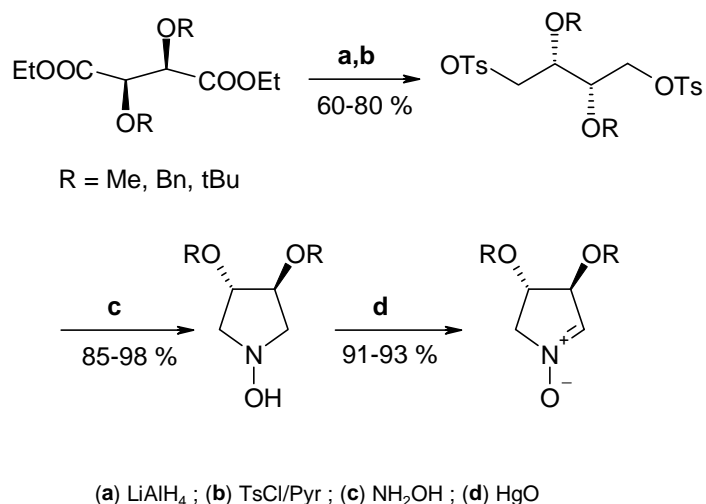
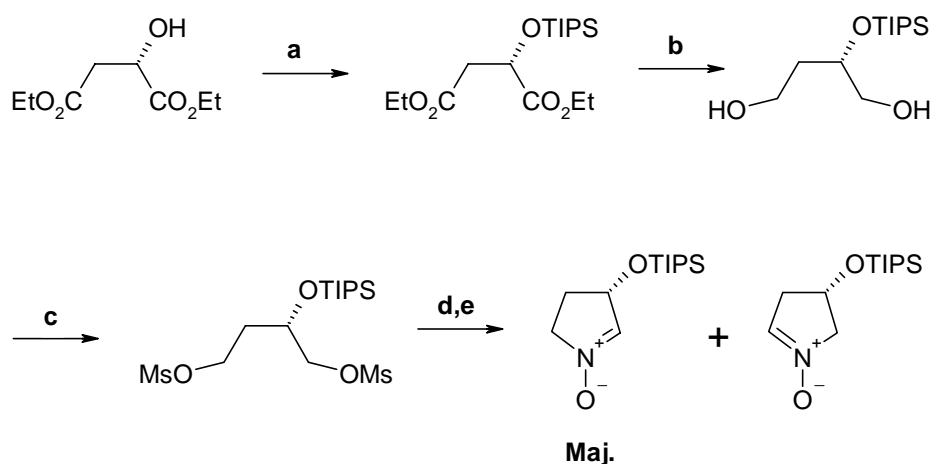


Schéma 3.5. Schéma de synthèse proposé par Brandi.

Brandi et coll. ont obtenu la formation de régioisomères lors de la synthèse de nitrones par oxydation à l'oxyde de mercure à partir de l'acide malonique^{41,121}. Cette méthode est très intéressante puisqu'elle permet d'insérer un azote par action de chlorhydrate d'hydroxylamine (schéma 3.6).

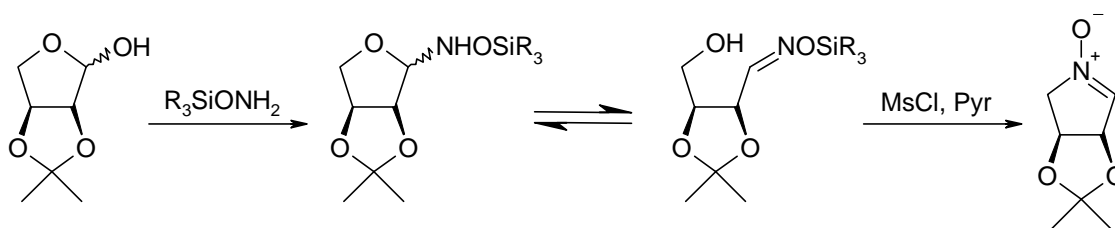


(a) TIPSCI, imidazole, DMF, ta 24h, 83 %; (b) DIBALH, CH₂Cl₂, -20°C 3,5h, 83 %
 (c) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, ta, 1h, 94 %; (d) NH₂OH, HCl, Et₃N, reflux, 2,5h
 (e) HgO, CH₂Cl₂; ta, 2h, 55%

Schéma 3.6. Synthèse de nitrone selon Brandi et coll.

Ils ont montré que l'oxydation se fait préférentiellement du côté le plus substitué. Toutefois, notons que la régiosélectivité de l'oxydation varie avec le solvant utilisé lors de la réaction.¹²² Les substituants stabiliseraient en effet la charge négative. Plus le substituant stabilise la charge négative, plus le pourcentage de nitrone du côté de la substitution est important.

Ce même groupe a encore développé une synthèse de nitrone à partir de lactol avec insertion de l'azote par l'intermédiaire d'une oxime directement activée (schéma 3.7).



Rdt global = 24 %

Schéma 3.7. Formation de nitrone par une oxime intermédiaire.

Notons également l'existence de méthodes un peu moins courantes de formation des nitrones qui consiste à alkyler une oxime en utilisant les propriétés nucléophiles de cette fonction.

Grigg a en particulier décrit la formation de nitrone par l'alkylation d'une oxime par un époxyde. Cette méthode permet en particulier la formation de nitrones cycliques et des réactions intramoléculaires^{123,124} (schéma 3.8).

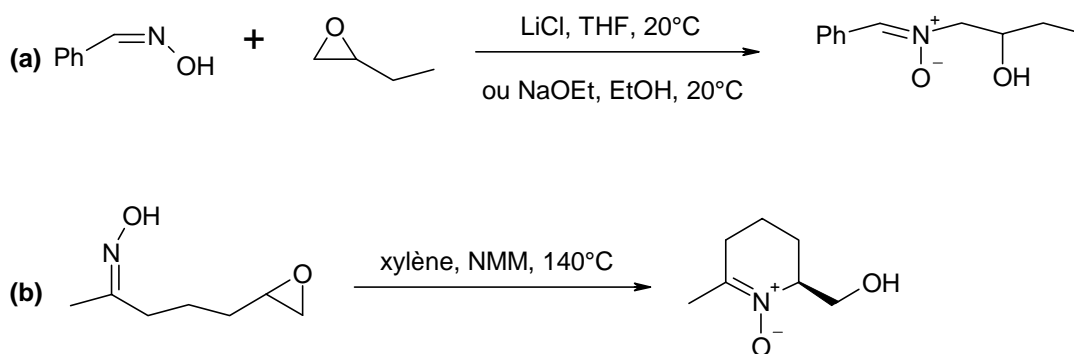


Schéma 3.8. Formation de nitrone selon Grigg.

Ce même groupe a également développé la synthèse de pyrrolidine-*N*-oxide grâce à une cyclisation nucléophile intramoléculaire de type Michael¹²⁵ (schéma 3.9).

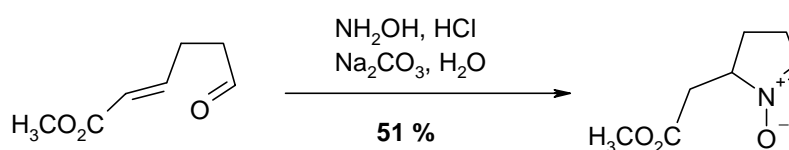


Schéma 3.9. Formation de nitrone par addition de Michael.

Grigg et coll. ont développé la cyclisation électrophile d'une oxime éthylénique dès 1992. Cette réaction se fait en présence d'un réactif électrophile comme la *N*-bromosuccinimide, le bromure de phénylsélénium ou encore l'iode ou le brome^{125,118} (schéma 3.10).

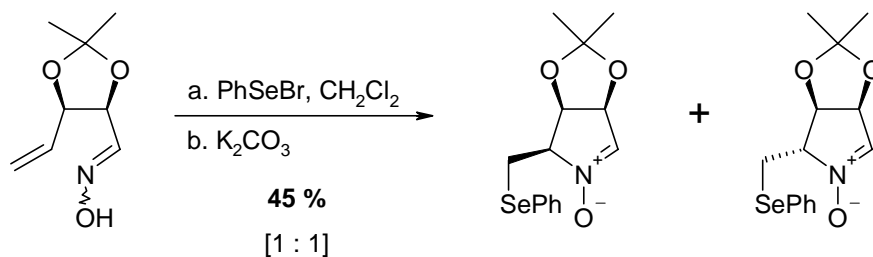


Schéma 3.10. Exemple de cyclisation électrophile.

Jäger a repris cette méthode en utilisant le brome comme électrophile. Ceci lui a permis d'obtenir comme précédemment des dérivés de pentose en série ribose et lyxose³² (schéma 3.11).

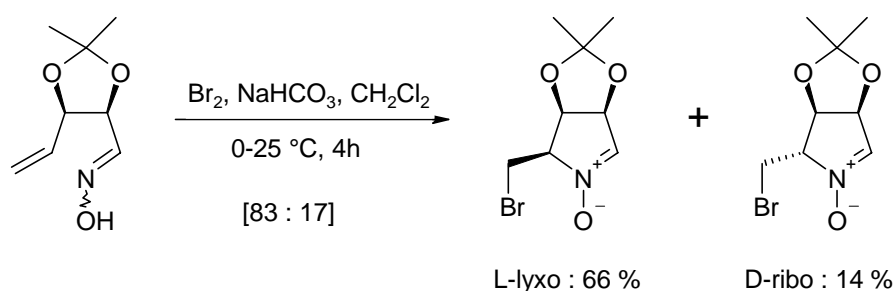


Schéma 3.11. Cyclisation électrophile selon Jäger.

Enfin, nous citerons une méthode de préparation de dérivés beaucoup moins communs, les nitrones *O*-silylés à partir de nitroalcanes et de chlorure de silyle. Martin et coll. ont appliqué cette méthode dans la synthèse de dérivé de sucre¹²⁶ (schéma 3.12).

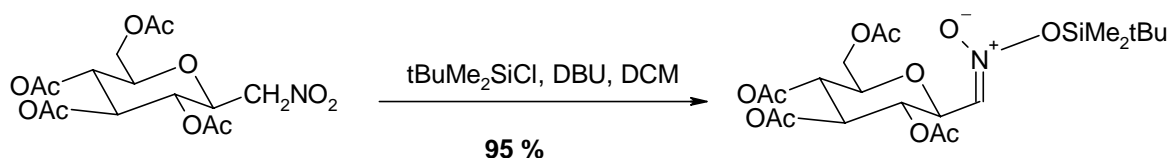


Schéma 3.12. Exemple moins classique de formation de nitrone.

Ayant décrit un certain nombre de méthodes de formation des nitrones, nous allons nous intéresser aux multiples possibilités réactionnelles qu'offrent ces composés.

Propriétés des nitrones

Les nitrones sont des composés relativement stables, ce qui présente un atout important en synthèse organique. Elles permettent aisément et de différentes manières la formation de liaisons carbone-carbone. De plus, la possibilité d'obtenir des produits optiquement actifs et le contrôle de la stéréochimie permet la synthèse de produits naturels qui peuvent présenter plusieurs intérêts biologiques.

Les nitrones sont des dipôles-1,3 qui peuvent d'une certaine manière être comparés aux groupements carbonyles au niveau de leur réactivité (schéma 3.13).

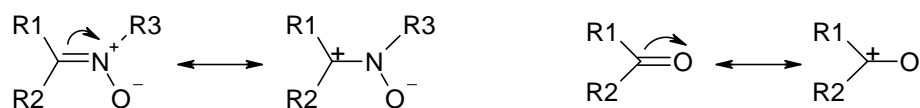


Schéma 3.13. Comparaison des fonctions nitrones et carbonyles.

Ainsi plusieurs types de réactions comme l'addition nucléophile, les réactions de type aldol ou les réductions par les hydrures sont réalisables sur les nitrones, la réaction prédominante restant la cyclo-addition 1,3 dipolaire.

▪ Les réductions

Trois produits peuvent être obtenus par réduction des nitrones (schéma 3.14):

- les imines
- les hydroxylamines *N,N*-disubstituées
- les amines secondaires

La désoxygénation des nitrones en imine offre de grandes possibilités. Plusieurs méthodes peu courantes sont employées pour cette réduction utilisant notamment la triphénylphosphine, le phosphite de triéthyle, le dioxyde de soufre ou encore le sulfure de carbone¹²⁷.

Les hydroxylamines sont facilement obtenues par réduction grâce en particulier à $\text{NaBH}_3\text{CN} / \text{AcOH}$ ¹²⁸.

La réduction totale des nitrones en amines secondaires est réalisée par l'hydrure de lithium-aluminium dans le tétrahydrofurane ou l'éther¹²⁹ ou par hydrogénolyse catalysée par le nickel de Raney, le palladium ou encore le platine. Notons que les amines peuvent également être obtenues à partir des hydroxylamines par hydrogénation catalytique, par réduction au zinc en présence d'acide chlorhydrique ou par action d'iodure de samarium.

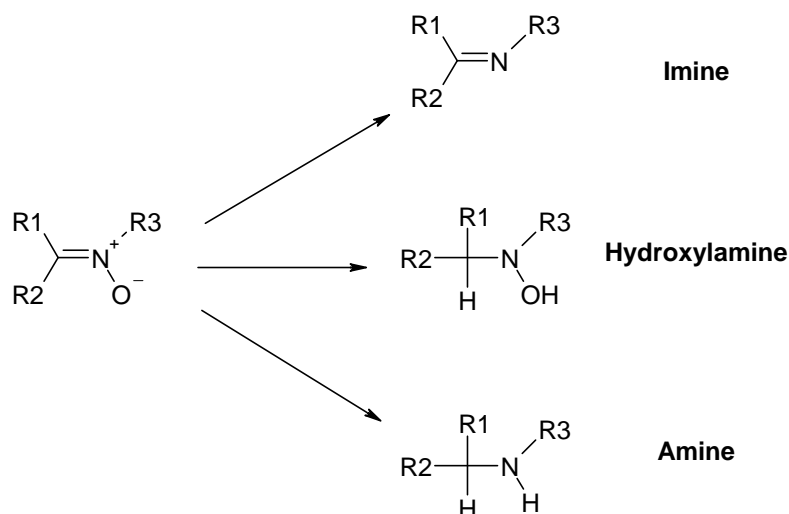


Schéma 3.14. Produits obtenus par réductions des nitrones.

▪ Addition d'un nucléophile

La substitution du carbone α de l'azote d'une amine secondaire peut être réalisée par l'intermédiaire d'un organolithien. Celui-ci crée un anion permettant une substitution électrophile après protection de l'azote par un groupement électroattracteur. L'oxydation de cette amine en nitronne conduit alors à une nouvelle alternative de substitution

en α de l'amine beaucoup plus rapide. La substitution est alors réalisée par substitution nucléophile (schéma 3.15).

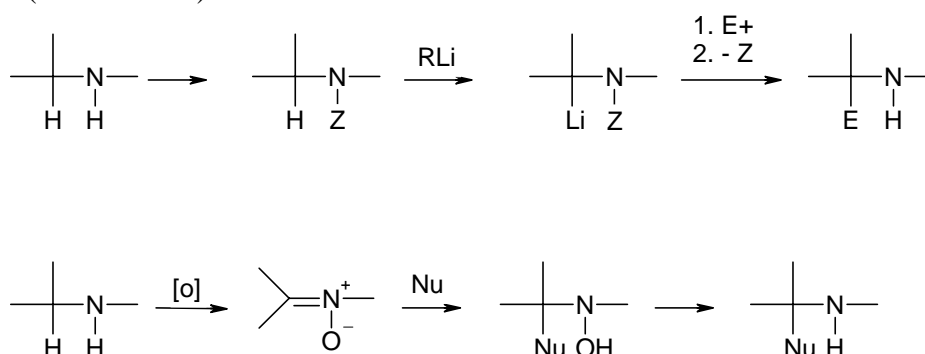


Schéma 3.15. Comparaison des deux systèmes de substitution.

Le traitement des nitrones par des réactifs de Grignard ou des organolithiens permet d'obtenir facilement des hydroxylamines α -substituées (schéma 3.16 et 3.17).

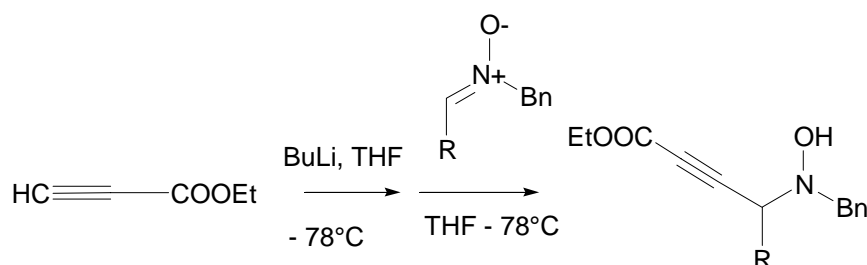


Schéma 3.16. Exemples de substitution avec un organolithien.¹³⁰

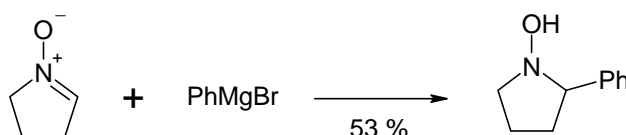


Schéma 3.17 Exemples de substitution avec un organomagnésien.¹³¹

Les nucléophiles ne sont pas limités aux réactifs de Grignard ou aux organolithiens. On trouve également des additions de phosphites de dialkyle¹³² ou encore de cyanure qui donne l' α -cyanohydroxylamine, intermédiaire clé pour la synthèse d'acide aminé¹¹¹ (schéma 3.18).

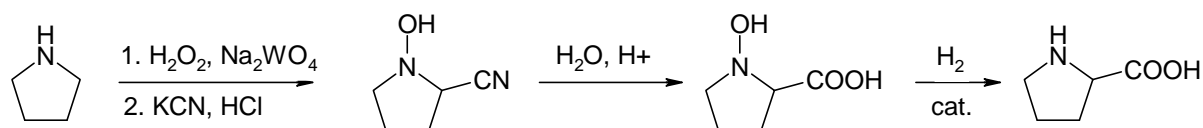


Schéma 3.18. Addition de cyanure sur une nitrosonium.

▪ La cyclo-addition 1,3-dipolaire

La réaction la plus appliquée aux nitrones reste néanmoins la cyclo-addition 1,3-dipolaire. Cette réaction permet la formation d'isoxazolidine par action d'une nitrosonium avec un

alcène (schéma 3.19). Les cycles obtenus présentent un intérêt particulier pour la synthèse des produits naturels. Nous détaillerons plus amplement cette réaction dans le chapitre 4.

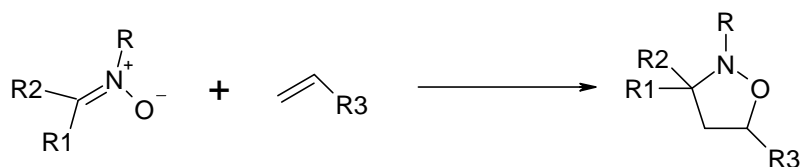


Schéma 3.19. Formation d'oxazolidine par cyclo-addition 1,3-dipolaire.

2. Synthèse de la nitroène en série L-lyxose

Une imine en série L-lyxose a déjà été synthétisée au laboratoire en tant que puissant inhibiteur d' α -L-fucosidase. Malheureusement la synthèse décrite ci-dessous ne permettant pas une fonctionnalisation simple et efficace de l'imine, nous avons donc envisagé une autre voie de synthèse de ce composé passant par un intermédiaire clé de type nitroène qui nous permet d'effectuer des greffages aisés de différentes chaînes.

La voie de synthèse qui avait été développée au laboratoire était basée sur une réaction d'hétéro-Diels-Alder asymétrique^{33,56} (schéma 3.20).

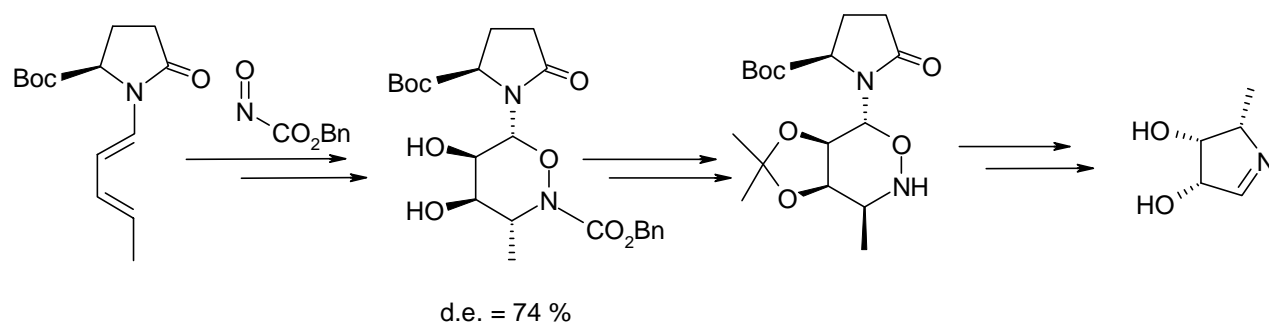


Schéma 3.20. Synthèse de l'imine par réaction d'hétéro-Diels-Alder asymétrique.

Schéma rétrosynthétique

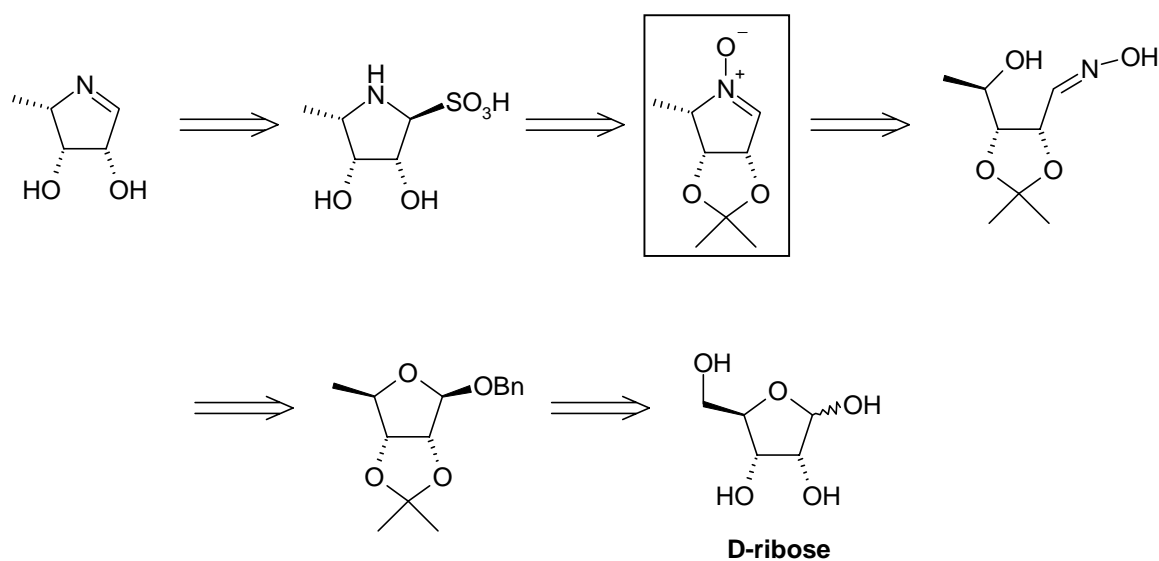


Schéma 3.21. Rétro synthèse de l'imine en série L-Lyxose.

Ce schéma 3.21. met en évidence les différentes étapes de la synthèse:

- Tout d'abord, protection des fonctions hydroxyles en 1, 2 et 3 du D-ribose
- Formation du groupe méthyle en position 5
- Insertion de l'azote sous forme d'une oxime
- Cyclisation et inversion du méthyle afin d'être en série L-lyxose: obtention de notre intermédiaire clé, la nitrone
- Coupure de la liaison N-O et déprotection des acétonides en une seule étape par hydrolyse/réduction en présence de SO₂: formation de l'adduit sulfitique
- Obtention de l'amino-sucre libre en série L-lyxose

Avantage de cette méthode: la fonctionnalisation de l'amino-sucre se fera au niveau d'un équivalent O, N tri protégé qui est la nitrone.

Protection du D-ribose

La protection du ribose a pour but de laisser l'hydroxyle en position 5 libre afin de pouvoir créer le groupement méthyle souhaité par la suite. Elle consiste donc à protéger l'hydroxyle porté par le carbone anomérique et les hydroxyles en position 2 et 3.

Nous avons envisagé de protéger l'hydroxyle anomérique par un groupement benzyle et les hydroxyles 2 et 3 sous forme d'isopropylidène.

Nous référant à la littérature, nous avons réalisé les protections en une seule étape en plaçant le ribose simultanément en présence d'acétone, d'acide sulfurique et d'alcool benzylique comme l'ont décrit Karpiesiuk¹³³ et Duvold¹³⁴. Cette méthode nous a permis d'obtenir le produit protégé mais avec un faible rendement d'environ 20 %.

C'est pourquoi, nous nous sommes tournés vers la méthode de Vasella¹³⁵ qui réalise les protections en deux étapes successives. Nous avons donc tout d'abord fait le riboside de benzyle en mettant le ribose en présence d'alcool benzylique et de chlorure d'acétyle. L'acide chlorhydrique et l'acide acétique libérés sont ensuite neutralisés en présence de céruse et après distillation de l'alcool benzylique, le produit benzylé **34** est immédiatement protégé sous forme d'acétonide en présence d'acétone et de chlorure de fer (III). Après neutralisation et traitement, la purification par cristallisation dans l'isopropanol conduit au ribose protégé sous sa forme anomère β **35** avec un rendement de 50 %. Ce rendement est conforme à celui décrit dans la littérature (schéma 3.22).

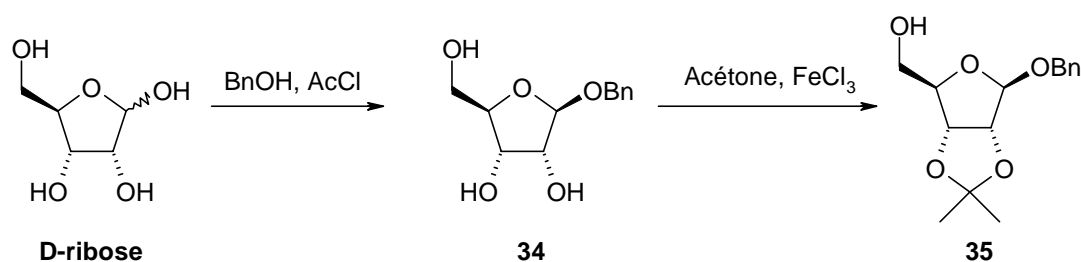


Schéma 3.22. Protection des fonctions hydroxyles du D-ribose.

Formation du groupe méthyle

Dans le but d'obtenir un groupe méthyle en position 5, il nous faut réduire l'hydroxyle en cette position. Nous avons tout d'abord envisagé de le remplacer par un brome espérant ainsi réaliser l'élimination du brome et la déprotection de la position anomérique en une seule étape.

Bromation de l'alcool

La première méthode de bromation que nous avons suivie est celle décrite par Averett¹³⁶. La réaction a été conduite dans du dichlorométhane par action du brome et de la triphénylphosphine (schéma 3.23). Cette réaction s'est montrée capricieuse avec des rendements non reproductifs allant de 33 à 73 %.

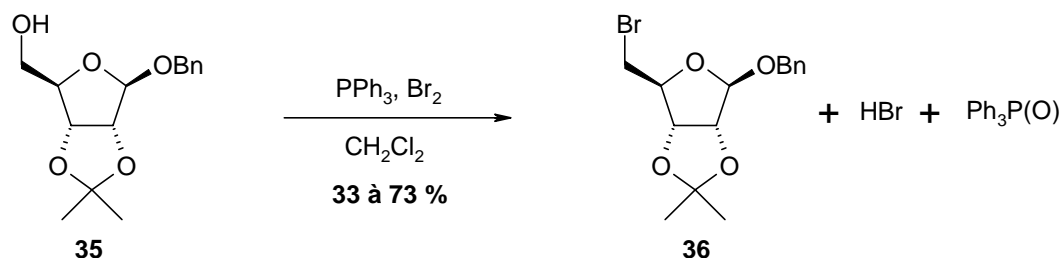


Schéma 3.23. Première méthode de bromation de l'alcool.

Nous avons alors opté pour une seconde méthode de bromation décrite par Mioskowsky¹³⁷ (bromation de Corey-Fuchs) faisant toujours intervenir la triphénylphosphine mais en présence de tétrabromure de carbone. Cette méthode se montre très efficace si des précautions de température à l'ajout des réactifs sont prises car la réaction est exothermique. De même, une pré-élimination de l'oxyde de triphénylphosphine par précipitation à l'éther favorise la filtration rapide sur silice qui suit afin d'obtenir le ribose bromé **36** avec un rendement quantitatif (schéma 3.24).

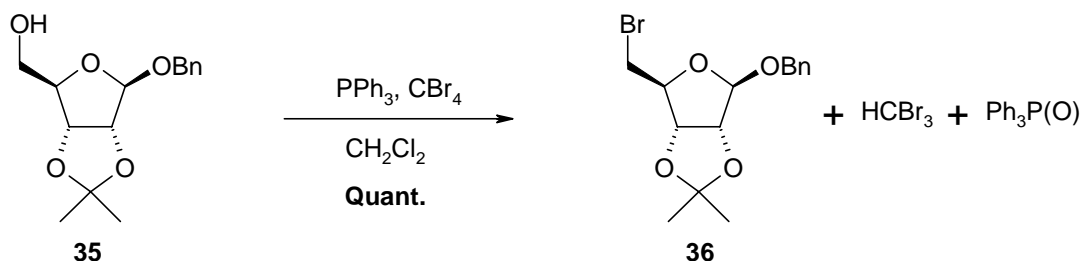


Schéma 3.24. Seconde méthode de bromation.

Il est également nécessaire de bien évaporer afin d'éliminer tout le bromoforme formé car celui-ci est néfaste pour l'étape suivante. Notons également que le dérivé bromé **36** est instable est qu'il est donc nécessaire de le conserver rapidement à $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Élimination du brome

- Première méthode: H₂ / Pd – Base

Dans un premier temps, nous avons souhaité déprotéger la position anomérique et réduire le brome en une seule étape. Pour ce faire, nous avons hydrogéné à l'aide de Pd/C le composé **36** en présence d'une base (potasse ou hydrogénocarbonate de sodium) afin de neutraliser l'acide bromhydrique libéré^{135, 136}.

La réaction a d'abord été réalisée à température ambiante mais sans succès. A $50\text{ }^\circ\text{C}$, nous avons obtenu quelques traces du produit souhaité mais surtout une grande majorité de produit uniquement débromé **37** (schéma 3.25).

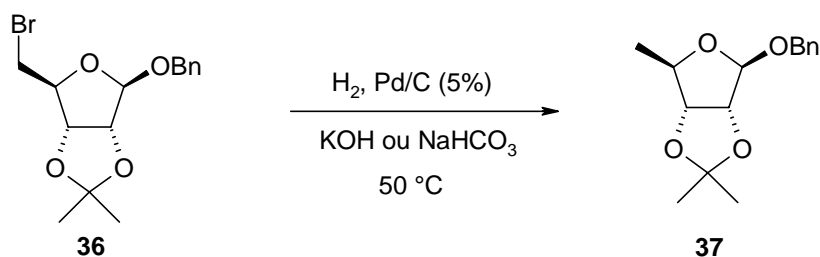


Schéma 3.25. *Obtention du produit débromé.*

La réaction s'est avérée peu concluante en présence de NaHCO_3 . Plusieurs essais ont été effectués en faisant varier les quantités de potasse et de catalyseur. Les meilleures conditions requièrent 3 équivalents de potasse et 25 % en masse (par rapport au produit de départ) de "catalyseur". Cette mise au point de la méthode ne nous permet que l'obtention du composé **37** avec un rendement de 61 %. Toutefois nous nous sommes aperçus que le KBr formé pouvait gêner la débenzylation ultérieure.

- Seconde méthode: $\text{H}_2 / \text{Pd} - \text{AcOH}$

Nous avons effectué l'hydrogénolyse en présence de 1% d'acide acétique afin de faciliter le départ du benzyle. Cette méthode nous a seulement permis d'obtenir avec un rendement proche de 60 % le composé **38** où la déprotection de la position anomérique s'est effectuée sans débromation (schéma 3.26).

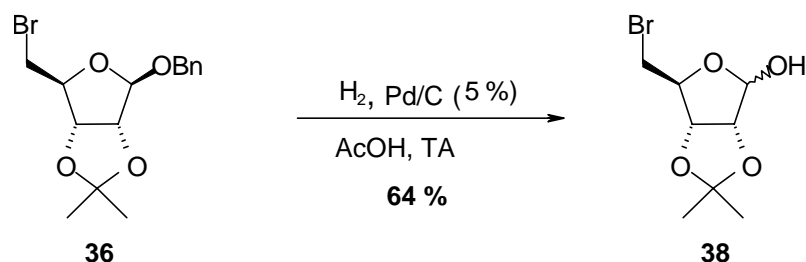


Schéma 3.26. *Obtention du produit 38.*

- Troisième méthode: Nickel de Raney

Nous avons finalement essayé une hydrogénation moins douce dans les mêmes conditions que précédemment mais en présence de nickel de Raney. Cette méthode conduit de façon quantitative à une débromation et une débenzylation mais aussi à la réduction de la position anomérique avec formation du ribitol **39** (schéma 3.27).

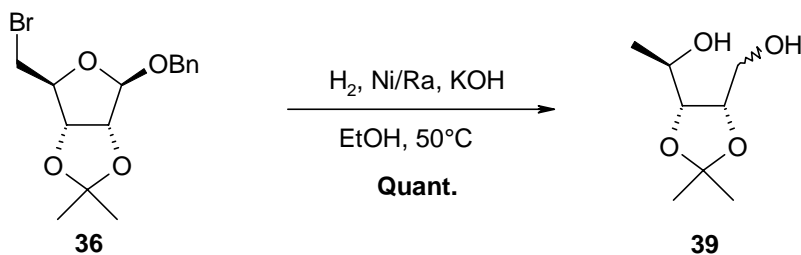


Schéma 3.27. *Formation du ribitol.*

Ce produit est d'un intérêt certain puisqu'il pourrait être mis à contribution pour synthétiser la nitrone souhaitée en un minimum d'étapes. Nous développerons cette seconde voie de synthèse en parallèle de la première.

Ces différentes méthodes ne nous permettant pas d'obtenir le produit débromé et débenzylé en une seule étape, nous avons donc effectué cette opération en deux temps.

Autres alternatives

La méthode par réduction du dérivé bromé **36** n'étant pas sans difficultés, nous avons développé parallèlement une autre alternative qui consiste à métyler l'hydroxyle en 5 et à le réduire par un hydrure.

La métylation a été conduite en présence de triéthylamine par le chlorure de méthane sulfonyle^{138,139} puis la réduction s'est effectuée par l'hydrure de lithium aluminium dans l'éther^{136,138,140,141} (schéma 3.28).

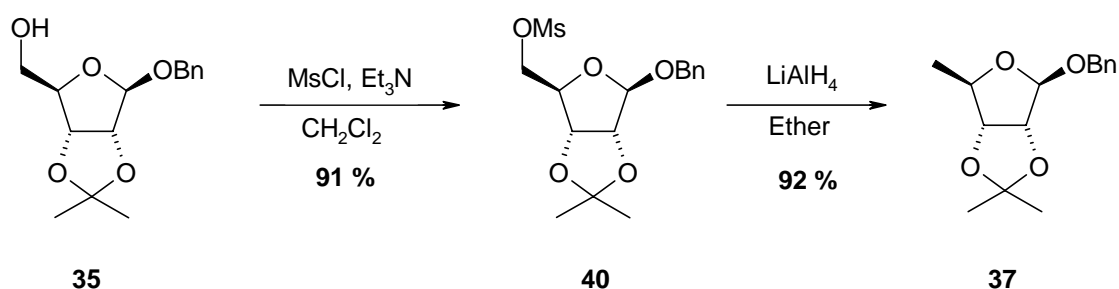


Schéma 3.28. Obtention du méthyle par métylation puis réduction.

Le produit **40** métylé est obtenu après recristallisation dans l'éthanol avec un excellent rendement de 91 %. La réduction est conduite avec un rendement de 92 % après sublimation. Cette voie de synthèse nous a paru très intéressante puisque nous obtenons le produit méthylé **37** avec un bon rendement de 84 % sur deux étapes.

La bromation en présence de $\text{PPh}_3 / \text{CBr}_4$ étant réalisée avec un rendement quantitatif, nous avons pensé que la réduction du brome par un hydrure pourrait alors être intéressante¹⁴². Nous avons donc effectué la réduction dans les mêmes conditions et nous obtenons le composé **37** avec un rendement de 60 % seulement.

Notons que si le produit débromé **38** est réduit par l'hydrure de lithium aluminium, nous n'obtenons pas le produit **37** mais le ribitol **39**. Cette méthode peut donc être utilisée pour obtenir **39** (schéma 3.29).

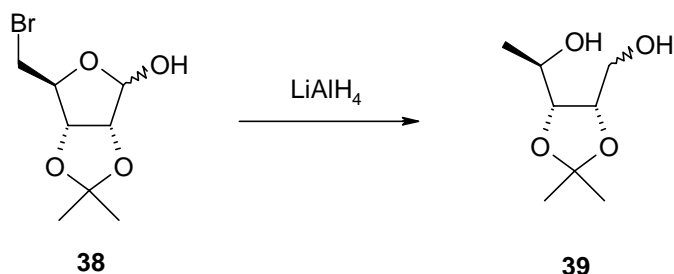


Schéma 3.29. Autre méthode de formation du ribitol **39**.

Débenzylation de la position anomérique

Afin d'introduire l'azote qui servira à former l'amino-sucre, nous devions tout d'abord déprotéger l'hydroxyle porté par le carbone anomérique. Cette déprotection d'un benzyle devait se faire tout naturellement par hydrogénation catalytique. Ayant observé lors des essais de débromation que la débenzylation s'effectuait facilement en présence d'acide acétique, nous avons opté pour cette méthode.

La subtilité de cette méthode était d'ajouter suffisamment d'acide afin d'aider la débenzylation sans déprotéger la fonction isopropylidène.

Les premiers essais ont été effectués dans les mêmes conditions que lors de la débromation, malheureusement les réactions sont longues et non reproductibles. Des essais avec chauffage à 50°C afin d'augmenter la cinétique de la réaction conduisent à la dégradation du produit. Plusieurs essais effectués avec différents pourcentages d'acide acétique demandent des temps de réactions variables et donne des rendements non reproductibles (tableau 3.1).

Pd / C (5%)	Pourcentage d'AcOH	Temps de réaction	Rendement
25 % en masse par rapport au produit de départ	1 %	60 h	76 %
	2 %	18 h	52 %
	6 %	25 h	82 %
	8 %	36 h	40 %
	8 %	5 j.	40 %
	10 %	48 h	50 %

Tableau 3.1. Exemples des essais réalisés.

Ces quelques exemples montrent la complexité de la mise au point de cette réaction. Toutefois, cette hydrogénéolyse étant réalisée sur les composés ayant subi une méthylation puis une réduction, il était donc extrêmement important de réaliser une excellente sublimation du produit **37** afin d'éliminer toute trace de dérivés soufrés pouvant empoisonner le catalyseur. Nous avons finalement échangé l'acide acétique pour de l'acide formique. Un premier essai réalisé en présence de 30 % de Pd/C (5%), d'1% d'HCOOH nous a donné en 24 heures le produit débenzylé avec un rendement de 96 %. Les essais successifs réalisés dans les mêmes conditions afin de vérifier la reproductibilité de cette expérience n'ont pas été fructueux.

Après mise au point, nous avons alors opté pour un pourcentage d'acide formique à 5% en chauffant légèrement à 30°C afin de pas dégrader la molécule tout en activant la cinétique de réaction. Le produit **41** a alors été obtenu en 24 heures avec un très bon rendement sous la forme de ces deux anomères α et β dans les proportions 10/90 (schéma 3.30).

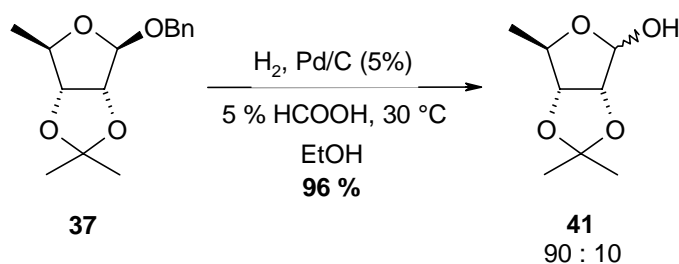


Schéma 3.30. Débenzylation de la position anomérique.

Cette méthode est reproductible et est réalisable à l'échelle des grammes avec toujours un aussi bon rendement.

Insertion de l'azote: Formation de l'oxime

La formation de l'oxime **42** qui permet l'insertion de l'azote a été réalisée très facilement selon la méthode de Vasella¹⁴³.

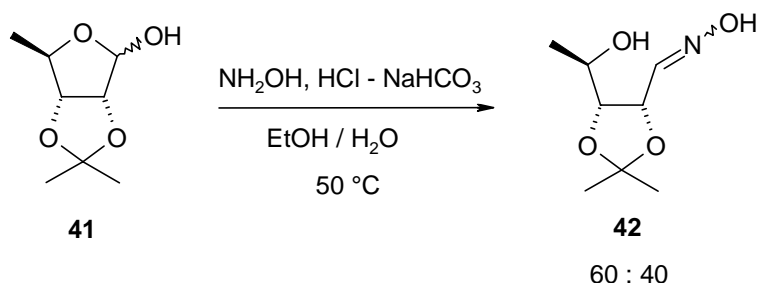


Schéma 3.31. Formation de l'oxime.

Le produit **41** est chauffé à 50 °C dans l'éthanol aqueux en présence de chlorhydrate d'hydroxylamine et d'hydrogénocarbonate de sodium pour donner l'oxime **42** (schéma 3.31). L'oxime est obtenue avec un rendement de 96 % sous forme de ses deux isomères E et Z dans des proportions 60/40 et est utilisée directement sans purification dans l'étape suivante.

Formation de la nitrone

La formation de la nitrone par cyclisation s'accompagne de l'inversion du groupe méthyle, afin d'être en configuration L-lyxose, lors de l'attaque nucléophile intramoléculaire.

Préparation à la cyclisation intramoléculaire

Dans un premier temps, nous devons protéger sélectivement le groupe *N*-hydroxyle puis activer l'alcool secondaire en position 4 afin d'induire la cyclisation intramoléculaire par déprotection de l'oxime.

Notre premier choix fut la protection de l'hydroxyle de l'oxime par une fonction carbamate. Celle-ci a été tentée par action du chloroformiate de benzyle en présence d'une base faible, l'hydrogénocarbonate de sodium (schéma 3.32)

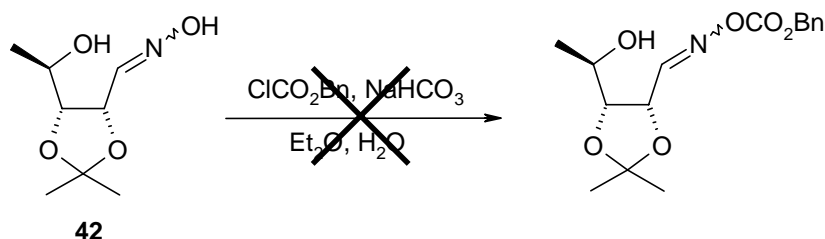


Schéma 3.32. Protection par une fonction carbamate.

Nous n'avons pas obtenu le produit souhaité mais celui résultant d'une cyclisation intramoléculaire en le composé **43** (δ (H-1) = 5,83 ppm) (schéma 3.33).

Afin d'atteindre notre objectif, nous nous sommes alors inspirés du mode de cyclisation de Holzapfel¹⁴⁴. Nous avons silylé sélectivement l'alcool primaire par action du chlorure de *ter*butyldiméthylesilyle dans la pyridine. Après purification par chromatographie sur colonne, nous obtenons le composé **44** sous forme de ces deux isomères E et Z dans des proportions 50/50 avec un rendement de 67 %.

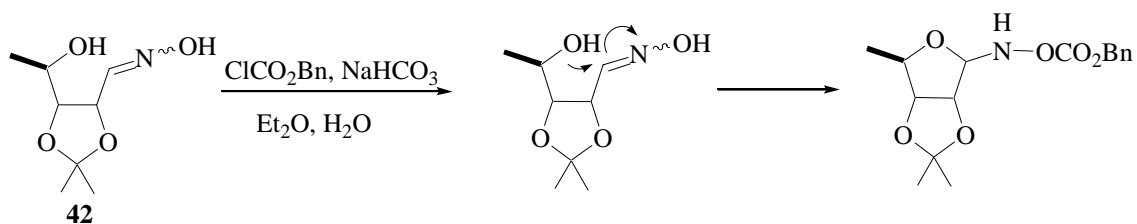


Schéma 3.33. Formation du composé **43**.

L'alcool secondaire est ensuite activé par méthylation dans les conditions classiques par action de chlorure de méthanesulfonyle en présence de triéthylamine. Le mésylate **45** est obtenu avec un rendement quantitatif après purification sur colonne de silice. Ce composé est instable et donne facilement lieu, s'il n'est pas conservé à basse température, à une désilylation en oxime **46** sous forme de deux isomères E et Z dans des proportions 50/50 (schéma 3.34).

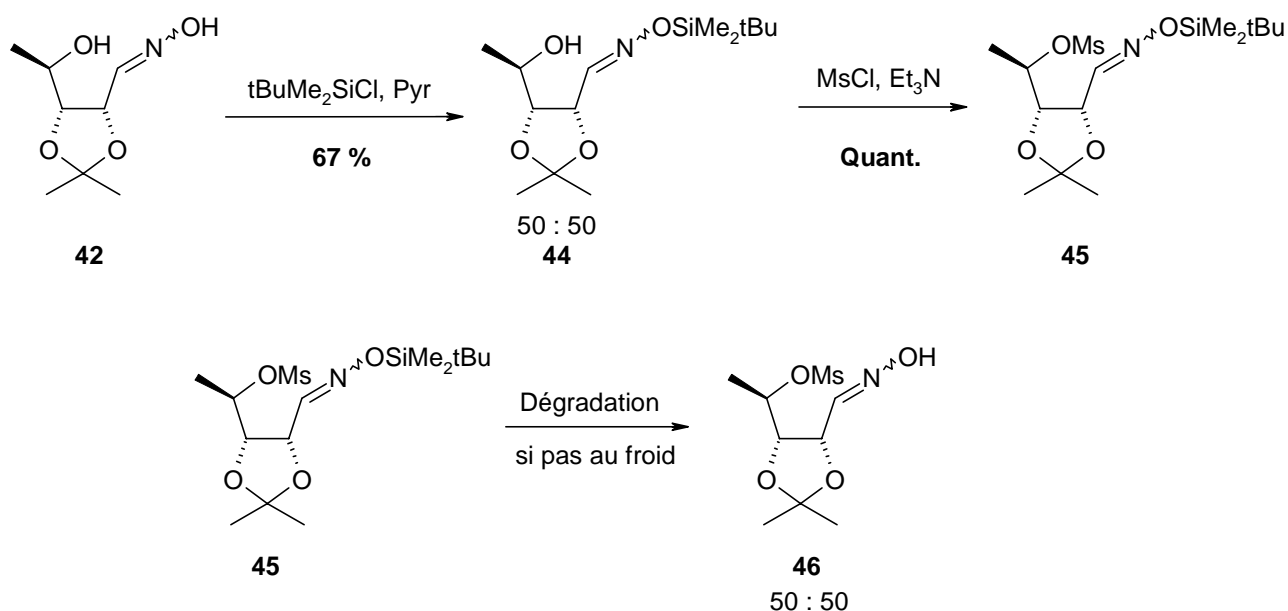


Schéma 3.34. Préparation de l'oxime pour la cyclisation.

Cyclisation et inversion du méthyle

La nitrone **47** est obtenue par désilylation du composé **45** par un fluorure^{144,145}. Cette déprotection conduit à l'anion de l'oxime et induit alors une attaque nucléophile intramoléculaire qui permet la formation de la nitrone avec inversion du méthyle en position 5 dans le même temps (schéma 3.35). Nous obtenons ainsi la nitrone dans la configuration souhaitée c'est-à-dire L-lyxose.

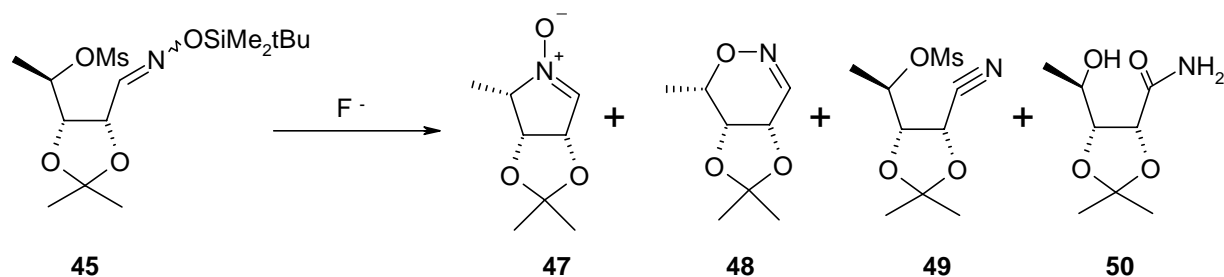


Schéma 3.35. Cyclisation intramoléculaire.

Durant cette cyclisation, on observe la formation de produits secondaires dont le plus important est l'oxazine **48**. Les autres composés **49** et **50** sont présents en faibles pourcentages (1 à 2 %).

La formation de ces différents composés peut être facilement expliquée:

La nitronne **47** est due à l'attaque de l'atome d'azote de la fonction oxime après désilylation sur le carbone activé par le mésylate alors que l'oxazine **48** est due à l'attaque de l'atome d'oxygène sur ce même carbone.

Le nitrile **49** est le résultat de l'arrachement par la triéthylamine ou par l'ion fluorure de l'hydrogène en α de l'oxime avec la perte du groupe silyle et donc la formation de nitrile. Cette réaction se fait en général avec une oxime acylée. Brandi et coll. ont d'ailleurs observé ce genre de produit secondaire, semblable à **49**, lors d'une synthèse de nitronne¹⁴⁶.

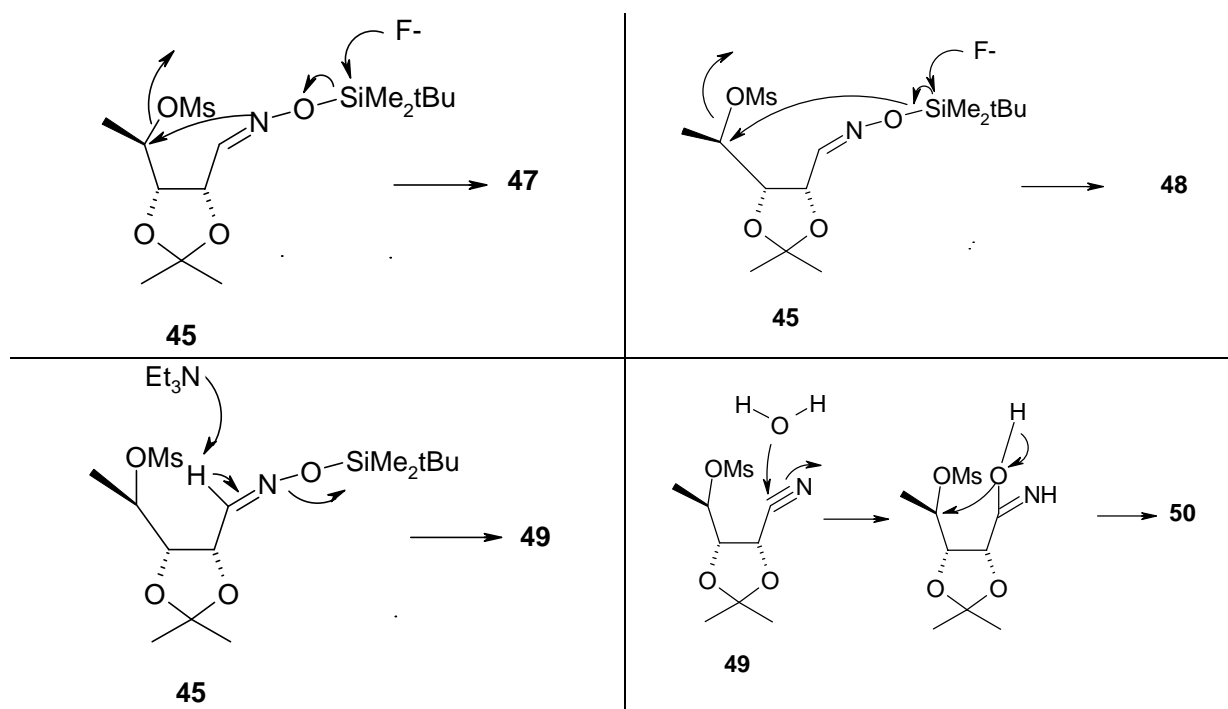


Schéma 3.36. Explications mécanistiques de formation des composés.

Quant à l'amide **50**, il pourrait découler du nitrile **49** par addition d'une molécule d'eau présente dans le milieu et participation du mésylate puis isomérisation de la forme amino-alcool avec ouverture en amide.

Une étude méthodologique a été menée afin de mettre au point les meilleures conditions pour n'obtenir que la nitronne **47** désirée (tableau 3.2).

Il s'est avéré qu'il subsiste toujours du produit de cyclisation à 6 chaînons **48** mais les conditions optimales pour la synthèse de la nitrone sont donc en présence de fluorure de tétrabutylammonium trihydraté, d'1,5 équivalents de triéthylamine afin de neutraliser l'acide métylique formé et par chauffage à 80 °C dans l'acétonitrile (schéma 3.37).

Conditions de réactions		Pourcentage de produits obtenus	
		47	48
CsF, 80 °C (1,5 éq. Et ₃ N)		50	50
TBAF, température ambiante (2h) (1,5 éq. Et ₃ N)		50	50
TBAF, 50 °C (1h, 3h) (1,5 éq. Et ₃ N)		50	50
TBAF, 80 °C (1,5 éq. Et ₃ N)	Temps de réaction variable (1h, 4h, 7h)	50	50
	Différence au niveau de l'ajout des réactifs (goutte à goutte, ordre des réactifs...)	50	50
	2,5 éq. d' Et ₃ N	50	50
TBAF en solution 1M dans THF, 80°C (1,5 éq. Et ₃ N)		65	35
TBAF, 3 H ₂ O (cristaux): 2 éq. , 80°C (1,5 éq. Et ₃ N)		66	33
TBAF, 3 H ₂ O (cristaux): 1,5 éq. , 80°C (1,5 éq. Et ₃ N)		90	10

Tableau 3.2. Récapitulatifs des essais significatifs pour la formation de la nitrone.

Le chauffage est nécessaire pour réaliser la cyclisation sinon on obtient le produit désilylé **46**. D'autre part, un chauffage à 80 °C conduit à une réaction plus propre qu'à 50°C. Ces conditions nous permettent d'obtenir les composés **47** et **48** dans des proportions 90/10 avec un rendement de 70 % après purification par chromatographie. Les produits **49** et **50** ne sont alors détectables que sous forme de traces. Notons que le traitement de la réaction est très difficile car la nitrone étant très hydrophile, l'extraction par le dichlorométhane doit être effectuée de nombreuses fois pour l'extraire de la phase aqueuse. De plus, la présence de fluorure de tétrabutylammonium gêne c'est pourquoi l'utilisation d'un système d'élution ternaire lors de la chromatographie sur silice est nécessaire.

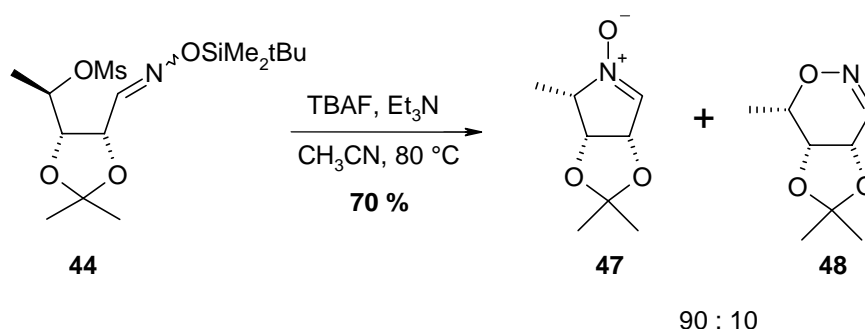


Schéma 3.37. Formation de la nitrone en série L-lyxose.

L'oxazine **48** est cependant intéressante c'est pourquoi nous étudierons ses propriétés inhibitrices sur l' α -L-fucosidase par la suite.

Seconde voie de synthèse

La seconde voie de synthèse qui s'offre à nous était celle à partir du ribitol **39**. Nous pouvons synthétiser l'hydroxylamine puis la nitrone selon la méthode de Goti par cyclisation

du dérivé dimésylé par action de chlorhydrate d'hydroxylamine dans la triéthylamine à reflux^{41,146}.

Nous avons donc appliqué cette méthode au ribitol **39**. Le ribitol a été dimésylé en le produit **51** dans les conditions classiques par le chlorure de méthane sulfonyle en présence de triéthylamine avec un rendement moyen. En effet, le composé est assez instable et la formation d'acide mésoylique peut induire la déprotection des acétonides si la purification n'est pas réalisée rapidement.

La méthode précédemment utilisée qui consiste à chauffer en présence de chlorhydrate d'hydroxylamine dans la triéthylamine a été sans succès, même en changeant la base par la diisopropyléthylamine ou la pyridine. Par contre si la réaction est réalisée dans la triéthylamine en présence d'une base forte comme la DMAP ou le DBU, la *N*-hydroxypyrrolidine **52** est obtenue avec un rendement moyen après purification sur colonne de silice (schéma 3.38).

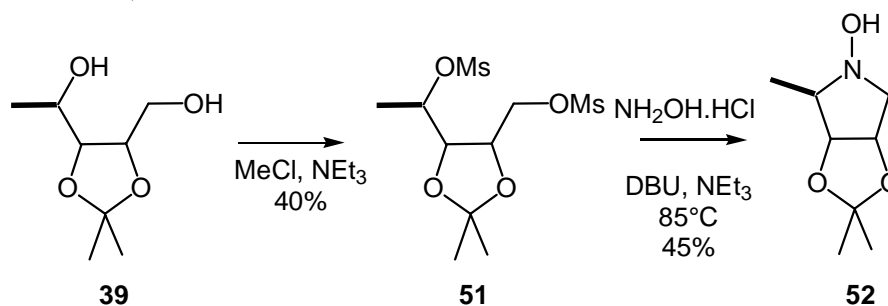


Schéma 3.38. Formation de l'hydroxylamine.

La cyclisation par l'hydroxylamine, comme pour la méthode précédente, se fait avec l'inversion du groupe méthyle et permet ainsi d'obtenir le composé **52** dans la configuration L-lyxitol souhaitée.

Par oxydation de l'hydroxylamine **52** par l'oxyde de mercure jaune dans le dichlorométhane se forment les deux nitrones isomères **47** et **53** en mélange 20/80 (schéma 3.39).

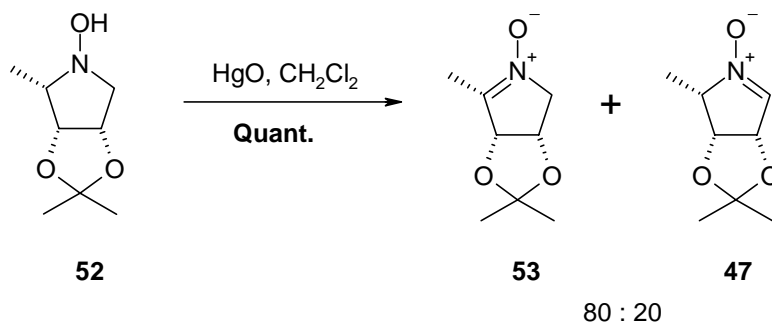


Schéma 3.39. Formation des nitrones.

Cette méthode donne accès majoritairement à la nitrone substituée isomère **53**, ce qui n'est pas totalement inintéressant mais qui ne correspond pas à l'intermédiaire clé souhaité pour la suite de la synthèse. Toutefois, ce résultat est en accord avec la littérature puisque Goti avait déjà démontré que lors d'une oxydation d'hydroxylamine, la nitrone était majoritairement formé du côté le plus substitué¹²¹.

Vers l'obtention de l'aminosucré

L'imine peut ensuite être facilement obtenue par une méthode originale en deux étapes à partir de la nitrone **47**. La nitrone est alors réduite par hydrolyse aqueuse en présence de

SO₂. Cette réaction se déroule en trois étapes avec tout d'abord la réduction de la liaison N-O. La seconde étape est l'ajout du SO₂ sur la double liaison afin de former l'adduit sulfite. En effet, dès l'ajout de dioxyde de soufre, il y a formation de cristaux. Puis il y a dissolution des cristaux qui prouve la perte des acétonides et donc le passage de l'adduit sulfite **54** en milieu aqueux. Après 24 heures de réaction à température ambiante et cristallisation par ajout d'éthanol, l'adduit sulfite est obtenu avec un rendement de 62 %.

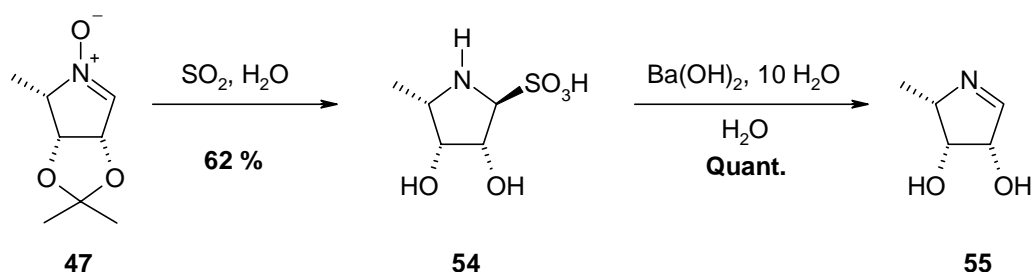


Schéma 3.40. Formation de l'imine.

Selon les conditions de température, de pH et de concentration, l'imine **55** est obtenue en équilibre avec l'amino-alcool **56** et son dimère dans des proportions variables (schéma 3.41).

Dans les conditions de pH habituelles, à 300 K et à 0,06 M dans D₂O, l'aminosucré est en équilibre sous sa forme imine à 82 % et β-aminoalcool à 20%.

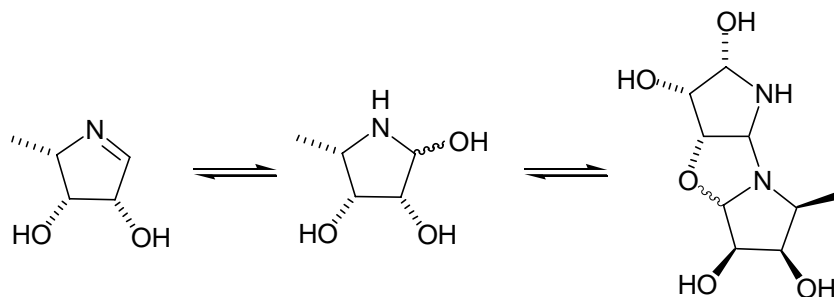


Schéma 3.41. Equilibre entre les trois formes liées à l'imine.

Déprotection des amino-sucres

Dans le but de comparer le pouvoir inhibiteur des divers composés, obtenus lors de la synthèse de la nitrone, avec l'imine déjà connue comme un puissant inhibiteur d'α-L-fucosidase, nous avons réalisé la déprotection de certains de ces composés.

Les produits que nous avons souhaité tester sont la nitrone déprotégée **57** et l'oxazine dihydroxylée **58** obtenue comme produit secondaire majoritaire lors de la synthèse de **47** ainsi que l'oxazinane **59**, produit de réduction de la double liaison.

Pour ce faire, nous avons procédé à la déprotection des isopropylidènes en milieu acide chlorhydrique 6N dans le méthanol. L'obtention des produits se fait alors facilement et la nitrone déprotégée **57** est obtenue avec un rendement quantitatif alors que l'oxazine déprotégée **58** est obtenue avec un rendement de 85 % (schéma 3.42).

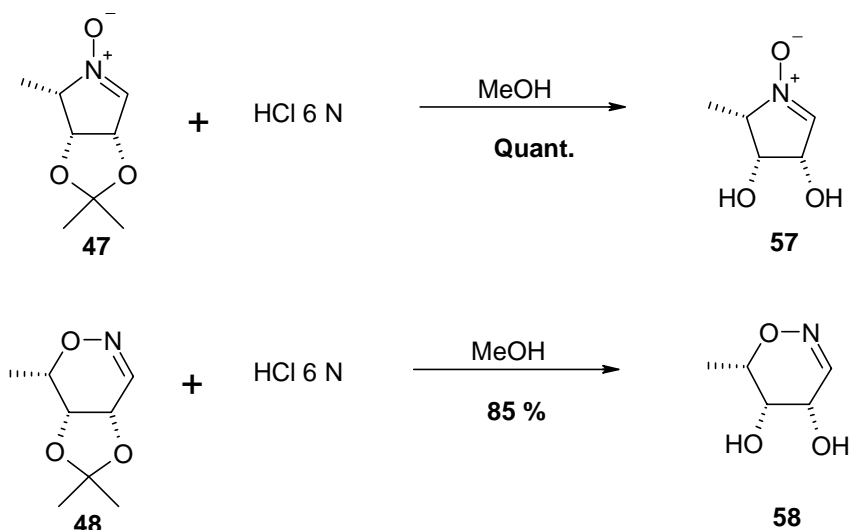


Schéma 3.42. Déprotection des produits secondaires.

L'oxazinane **59** est obtenue par réduction de la double liaison qui a été faite classiquement par du cyanoborohydrure de sodium en milieu acétique¹²⁸. Cette réduction réalisée avec un rendement moyen a été suivie par la déprotection du groupement isopropylidène dans les mêmes conditions que précédemment et conduit à l'oxazinane diol **59** que l'on peut appeler 6-méthyl-[1,2]oxazinane-4,5-diol. On obtient ainsi le composé **59**, prêt à être testé (schéma 3.43).

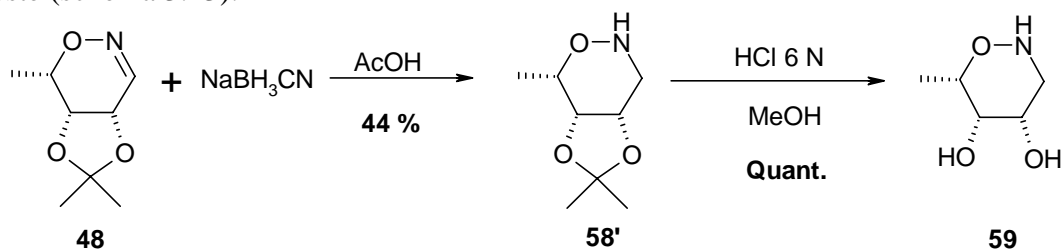


Schéma 3.43. Formation du dérivé **59**.

3. Activité inhibitrices sur l' α -L-fucosidase

Les produits obtenus ci-dessus ont donc été évalués sur l' α -L-fucosidase afin de comparer leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de cette enzyme.

Amine	55	54	57	59	58
0,05 ⁵⁶	0,01 ⁵⁶	0,01 ⁵⁶	IC ₅₀ = 50 ^(a)	IC ₅₀ = 225 ^(a)	IC ₅₀ = 300 ^(a)

(a) [S] = Km = 0,15 mM

Tableau 3.3. Inhibition de l' α -L-fucosidase en série analogue au L-fucose (K_i ou IC₅₀ en μ M).

Les essais ont été réalisés à pH = 5,5 et à 30 °C sur une α -L-fucosidase de mammifère (rein de boeuf: *Bovine Kidney*). Toutes les molécules testées sont des inhibiteurs réversibles compétitifs. Les résultats sont consignés dans le tableau 3.3.

L' amino-sucre **55** et son dérivé sulfitique **54** en série L-lyxose sont de très puissants inhibiteurs d' α -L-fucosidase. Avec des valeurs de $K_i = 10$ nM, ils sont parmi les inhibiteurs pyrrolidiniques les plus puissants connus à ce jour. Notons que la présence d'un élément de reconnaissance supplémentaire (fonction imine ou adduit sulfitique) favorise la reconnaissance avec l' α -L-fucosidase par rapport à l'amine simple.

Les propriétés inhibitrices de l' amino-sucre **55** sur l' α -L-fucosidase ont été décrites dans la littérature. Le groupe de Wong a déterminé une constante d'inhibition $K_i = 0,16$ μ M sur l' α -L-fucosidase (*Bovine Kidney*) dans des conditions différentes (à 25 °C et à pH = 5,5)³¹.

La sélectivité de ce très bon inhibiteur a été évaluée sur les six autres glycosidases sous sa forme adduit sulfitique **54**. Celui-ci ne présente pas d'inhibition significative sur les autres glycosidases⁵⁶. Les composés **54** et **55** sont donc des inhibiteurs très sélectifs de l' α -L-fucosidase de rein de bœuf (*Bovine Kidney*).

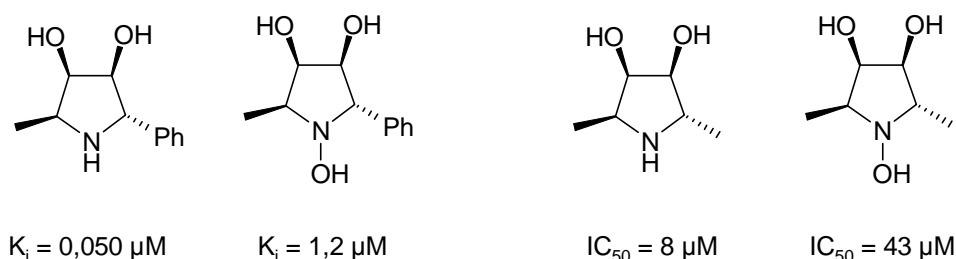


Schéma 3.44. Exemples d'hydroxylamines moins actives que l'amine.

Les composés de synthèse comportant la liaison N-O **57**, **58**, **59** sont de faibles inhibiteurs d' α -L-fucosidase. Il avait déjà été observé par Jäger³² que les composés portant une liaison N-OH défavorisent la reconnaissance avec le site actif de l'enzyme (schéma 3.44).

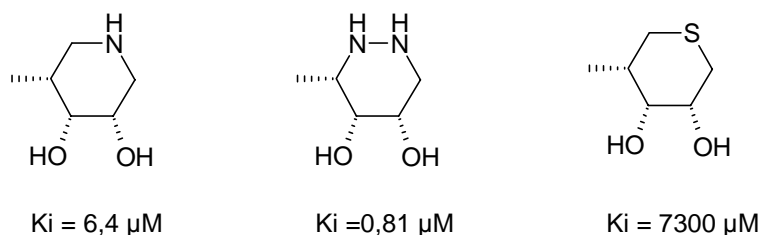


Schéma 3.45. Exemples de cycles à 6 chaînons décrit par Bols.

Le faible pouvoir inhibiteur de l'oxazine et l'oxazinane est vraisemblablement lié à la faible basicité de la fonction N-O par rapport à la fonction amine et à son absence dans le cas de l'oxime cyclique **59**. Quelques composés décrit par Bols^{147,148,149,150} confirment ces hypothèses (schéma 3.45).

Afin que le site actif de l' α -L-fucosidase soit bien reconnu, les inhibiteurs doivent donc comporter trois éléments de reconnaissance à savoir deux hydroxyles et un méthyle dans la même configuration, un site basique mais aussi un élément de reconnaissance d'addition nucléophile qui est ici l'imine.

4. Conclusion

Nous avons donc mis au point une nouvelle voie de synthèse de l'imine **55**. Cette dernière a donc été obtenue en onze étapes avec un rendement global de 10 % à partir du ribose. Cette voie de synthèse nous permet d'obtenir un intermédiaire clé, une nitronne, en neuf étapes avec un rendement global de 16 % à partir du ribose (schéma 3.46).

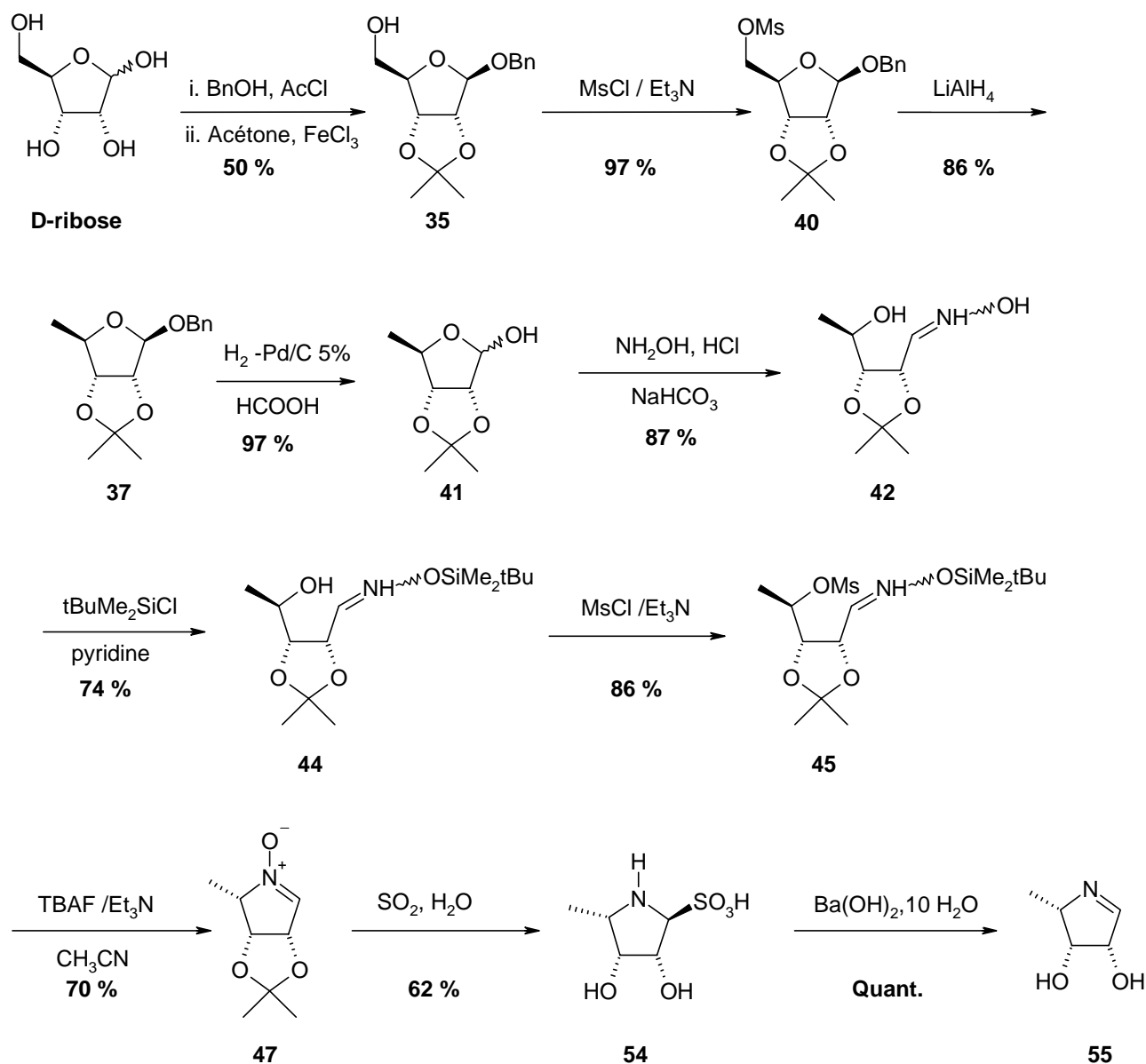


Schéma 3.46. Schéma récapitulatif de synthèse de l'imine **55**.

Une seconde voie de synthèse par l'intermédiaire du ribitol a été explorée et aurait pu être intéressante car elle présentait moins d'étapes, cependant l'obtention de la nitronne aurait présenté un facteur limitant puisque la nitronne souhaitée n'était obtenue qu'en faible quantité.

L'imine ainsi que son adduit sulfite sont de très bons inhibiteurs d' α -L-fucosidase avec une constante d'inhibition de 10 nM. L'imine semble donc être une bonne structure de base pour le greffage de chaînes phosphorées ou acides hydroxamiques dans le but d'obtenir des analogues de GDP-fucose.

La nitroène va nous permettre de préparer facilement des dérivés fonctionnalisés de l'imine afin de synthétiser ces analogues.

FONCTIONNALISATION DE LA NITRONE

1. Réactions de cyclo-addition 1,3-dipolaire

- Les dipôles
- Mécanisme
- Stéréochimie

2. Fonctionnalisation de la nitrone par cyclo-addition 1,3-dipolaire

- **Greffages de chaînes à deux carbonés**
 - Isomérisation en esters
 - Formation d'acide et d'alcool
 - Formation d'acides hydroxamiques
 - Mise en valeur de la synthèse d'acide hydroxamique
- **Greffage de chaînes phosphates**
 - Cyclo-addition 1,3-dipolaire
 - Ouverture des adduits bicycliques
 - Déshydroxylation
- **Conclusion**

3. Fonctionnalisation de la nitrone par substitution nucléophile

- **Greffage de chaînes carbonées**
- **Greffage de chaînes phosphorées**
 - Substitution directe
 - Substitution par un lithien du méthyle phosphonate
 - Formation du dérivé pyrophosphate
- **Conclusion**

4. Inversion de configuration en position anomérique

- **Méthode d'inversion pour les composés dérivés des substitutions nucléophiles**
- **Méthodes d'inversion pour les composés dérivés cyclo-addition 1,3-dipolaire**
- **Conclusion**

5. Tests enzymatiques

- **Résultats préliminaires sur la fucosyltransférases III**
- **Inhibition de l' α -L-fucosidase**

Ce chapitre va être consacré à la fonctionnalisation de la nitrone **47** en tant que structure de base conçue et synthétisée dans les chapitres précédents. Notre objectif étant d'obtenir des analogues de donneur de fucose et donc des inhibiteurs potentiels de fucosyltransférase, la synthèse d'acides phosphoniques ainsi que d'acides hydroxamiques sera développée dans ce chapitre par fonctionnalisation de la nitrone **47**, intermédiaire clé dans la synthèse de l'imine **54**.

Cette partie nous permettra prioritairement de développer une chimie importante basée sur les propriétés des nitrones: la cyclo-addition 1,3-dipolaire et les substitutions nucléophiles.

Nous allons tout d'abord rappeler quelques généralités sur les réactions de cyclo-addition 1,3-dipolaire, propriétés principales des nitrones, développer ensuite les voies de formation des composés synthétisés puis discuter finalement les tests enzymatiques.

1. Réactions de cyclo-addition 1,3-dipolaire

Les réactions de cyclo-addition 1,3-dipolaire ont un intérêt synthétique et mécanistique important en chimie organique. Le concept général des cyclo-additions 1,3-dipolaire a été introduit au début des années 1960 par Huisgen^{151,152}.

Les réactions de cyclo-addition 1,3-dipolaire sont semblables aux réactions de Diels-Alder puisque ce sont des réactions de cyclisation thermique qui font intervenir 4 électrons π d'un dipôle et 2 électrons π d'un alcène.

Les dipôles

Un dipôle est défini comme un système de trois atomes a-b-c où sont distribués quatre électrons π . L'atome central b peut être un azote, un oxygène ou un soufre. Les dipôles peuvent être divisés en deux catégories: les anions de type allyle et les anions de type propargyle-allényle¹⁵³ (schéma 4.1).

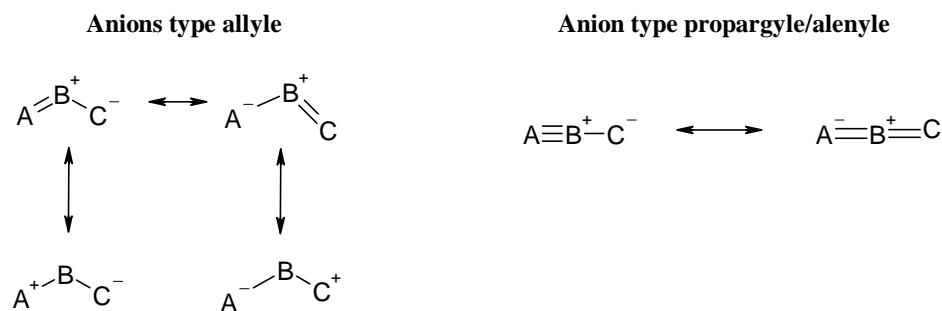
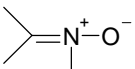
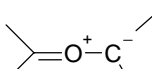
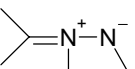
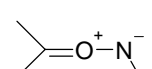
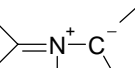
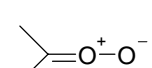
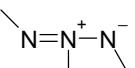
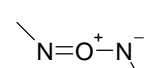
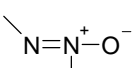
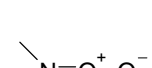
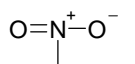
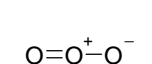


Schéma 4.1. Les différentes catégories de dipôles.

Un nombre limité de dipôles existe, dix-huit, qui sont classés selon un groupe de douze dipôles de type anion allyle et six dipôles de type anion propargyle. Ces derniers ont alors une structure linéaire^{152,153,154} (schéma 4.2).

Anions type allyle

<u>Azote au centre</u>		<u>Oxygène au centre</u>	
	Nitrones		Ylures de carbonyle
	Imines d'azométhine		Imines de carbonyle
	Ylures d'azométhine		Oxydes de carbonyle
	Azimes		Nitrosimines
	Composés azoxy		Nitrosoxydes
	Composés nitro		Ozone

Anion type propargyle/alényle

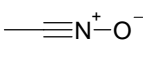
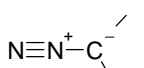
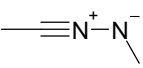
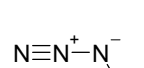
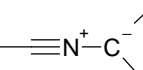
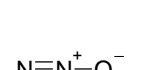
<u>Betaines nitrilium</u>		<u>Betaines diazonium</u>	
	Oxydes de nitrile		Diazoalcanes
	Imines de nitrile		Azides
	Ylures de nitrile		Oxyde nitreux

Schéma 4.2. Classification des 1,3-dipôles.

Mécanisme

Les réactions de cyclo-addition 1,3-dipolaire sont une voie de synthèse importante pour l'obtention d'hétérocycles à cinq chaînons puisqu'elles font réagir un dipôle-1,3 et un alcène (schéma 4.3).

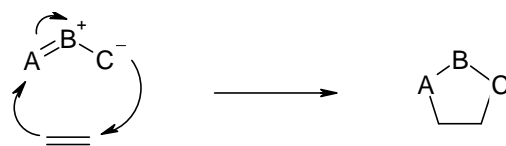


Schéma 4.3. Mécanisme d'une cyclo-addition 1,3-dipolaire.

Lors des réactions de cyclo-addition 1,3-dipolaire entre nitroène et alcène, il est alors possible d'obtenir deux paires de produits régioisomères et diastéréoisomères selon que l'approche est endo ou exo^{153,155,110}, selon la régio-sélectivité et selon la structure syn ou anti de la nitroène (schéma 4.5 et 4.6).

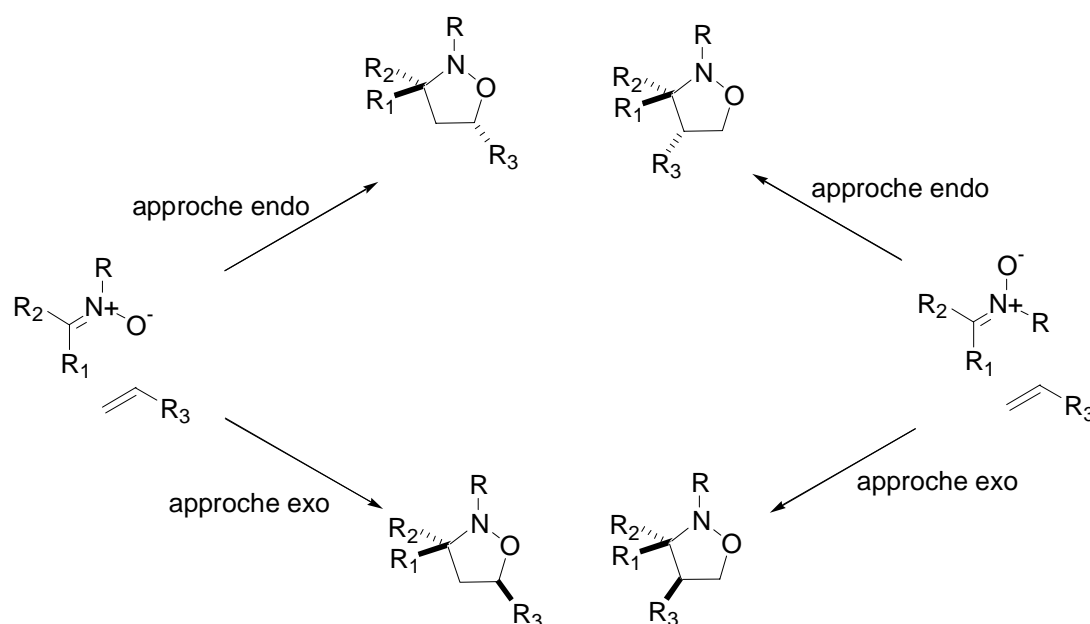


Schéma 4.6. Produits régio et diastéréoisomères obtenus selon les approches.

La stéréochimie peut être contrôlée par la chiralité de la nitroène, de l'alcène ou des deux réactifs mais aussi par l'encombrement stérique. La synthèse peut être assistée de catalyseurs tels que ZnI_2 ¹⁵⁶, $TiCl(OiPr)_3$ ou $TiCl_2(OiPr)_2$ de type acide de Lewis ou d'auxiliaires chiraux comme l'oxazaborolidine de Corey^{155,156,157}.

2. Fonctionnalisation de la nitroène par cyclo-addition 1,3-dipolaire

La nitroène est un dipôle très courant pour la formation d'hétérocycle à cinq chaînons par cyclo-addition 1,3 dipolaire. Notre étude est basée sur l'utilisation de deux nitrones, une nitroène dite modèle **17** en série D-thréose et la nitroène **46** en série L-lyxose.

La fonctionnalisation de la nitroène **17** a tout d'abord permis le développement chimique autour de ce composé que nous allons pouvoir appliquer à la nitroène **46** en vue de la synthèse d'analogues de donneur de fucose.

Nous développerons alors le greffage de chaînes à deux carbones puis celui de chaînes phosphonates à deux carbones.

Greffages de chaînes à deux carbones

Le principal intérêt de greffer ce type de chaînes était d'obtenir un acide hydroxamique car comme l'a montré C-H. Wong¹⁵⁸, ces composés peuvent mimer l'état de transition du complexe GDP-fucose avec le manganèse présent dans les réactions de fucosyltransférase (schéma 4.7).

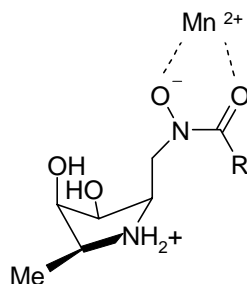


Schéma 4.7 Exemples d'acide hydroxamique chélatant le manganèse dans l'état de transition.¹⁵⁸

• **Préparation des réactifs**

Seul le dérivé éther de phényle et de vinyle a été préparé au laboratoire, les deux autres composés que nous utilisons pour les cyclo-additions 1,3-dipolaires étant commerciaux.

La synthèse de ce réactif est réalisée à partir du bromophénoxyéthane en solution biphasique en présence de soude aqueuse à 50 % et de sulfate acide de tétrabutylammonium¹⁵⁹. On obtient alors **60** après distillation sous vide avec un rendement de 65 % (schéma 4.8).

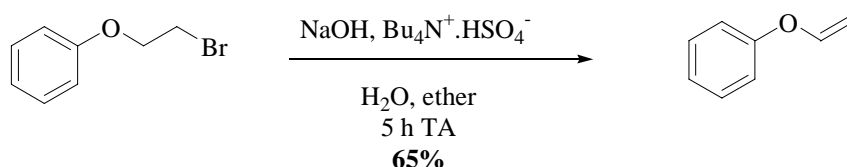


Schéma 4.8. Préparation de l'éthylèneoxybenzène.

• **Sur la nitrone test en série D-thréose**

Le premier essai de cyclo-addition a été réalisé dans les conditions de Bayon¹⁶⁰ en présence d'acide de Lewis $TiCl_4$ et d'éther d'éthyle vinylique. Cet acide est censé catalyser la réaction tout en influençant sa stéréosélectivité. Ces essais n'ont malheureusement pas donné le résultat escompté mais conduisent à une dégradation du produit de départ. Les essais ont alors été conduits simplement sans catalyseur par simple chauffage de la nitrone avec les éthers vinyliques. Deux adduits bicycliques **61** dont un majoritaire (10/1) ont alors été obtenus avec un rendement de 66 % (schéma 4.9).

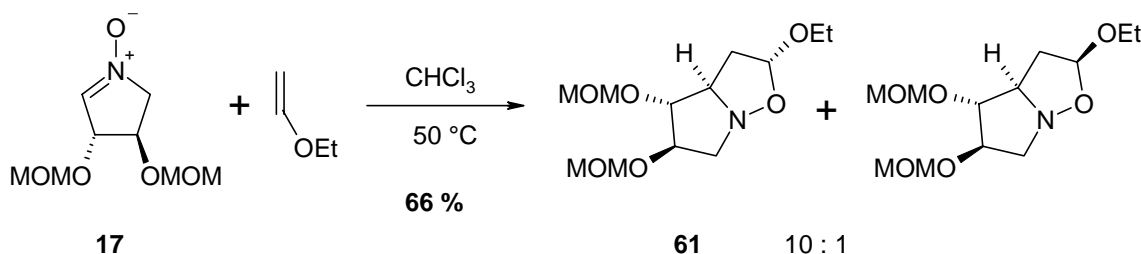


Schéma 4.9. Formation de l'adduit bicyclique **59**.

Une seconde réaction de cyclo-addition a été conduite avec l'éther de phényle que nous avons synthétisé. La réaction de cyclisation fournit cette fois un seul isomère majoritaire **62** avec un rendement de 60 % (schéma 4.10).

La structure tridimensionnelle obtenue a bien vérifié l'hypothèse formulée grâce à la RMN et nous a fourni la configuration du carbone en tête de pont. Cette structure nous indiquant donc que tous les substituants sont du même côté du plan constitué par les deux cycles c'est-à-dire que la réaction s'est effectuée suivant un mode d'attaque *exo* (schéma 4.12).

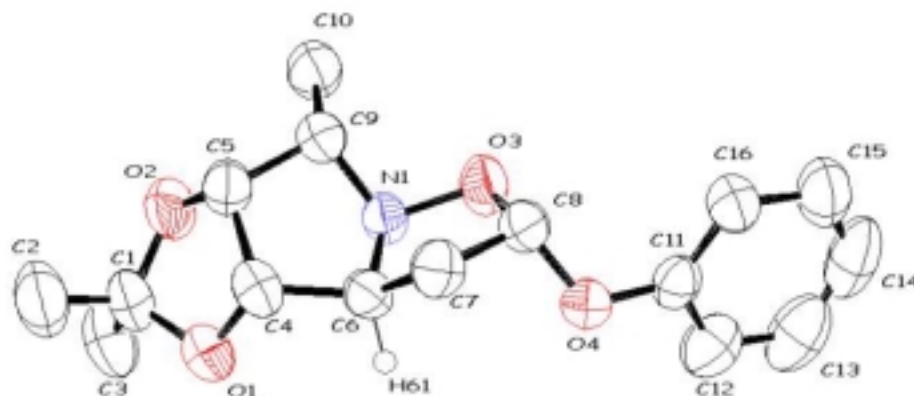


Schéma 4.12. Structure tridimensionnelle de **64** vue dans ORTEP.

Le composé **64** a été déprotégé en milieu acide afin d'évaluer le pouvoir inhibiteur d'un adduit bicyclique de ce type sur différentes enzymes (schéma 4.13).

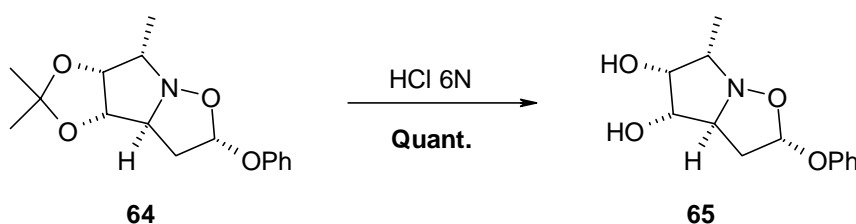


Schéma 4.13. Déprotection de la fonction isopropylidène de **64**.

Le produit déprotégé **65** a été obtenu très facilement avec un rendement quantitatif. Cette méthode de déprotection sera donc retenue pour déprotéger les autres fonctions isopropylidène.

Isomérisation en esters

Les adduits bicycliques ont alors été convertis en ester par un réarrangement thermique décrit par Bayon¹⁶⁰. Cette isomérisation thermique, peu connue et décrite seulement depuis 1997, a d'abord été testée sur l'adduit test **62** formé à partir de la nitrone **17**.

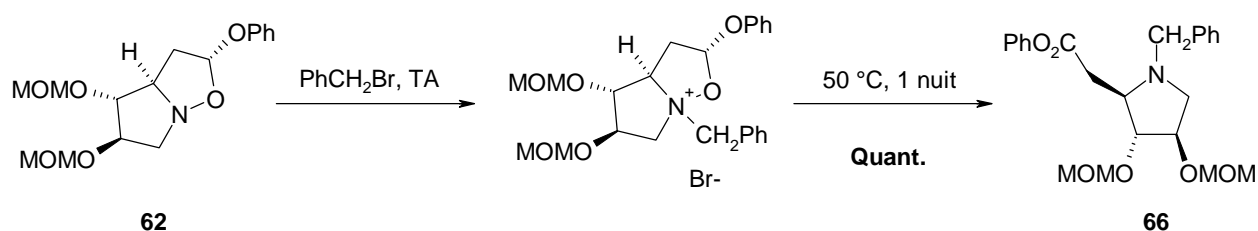


Schéma 4.14. Méthode de formation des esters.

Ce réarrangement s'effectue en deux étapes successives. Tout d'abord, l'azote intracyclique est alkylé pour fournir l'ammonium quaternaire à température ambiante par le bromure de benzyle. La solution est portée à 50°C afin de réaliser le réarrangement thermique de l'intermédiaire quaternaire en esters (schéma 4.14).

Les esters sont obtenus assez facilement avec des rendements variables allant de 35 % (par rapport à l'adduit) pour l'ester éthylique en série lyxose **68** à un rendement quantitatif pour **66**. Les autres esters sont donc tous obtenus suivant le même modèle opératoire (schéma 4.15).

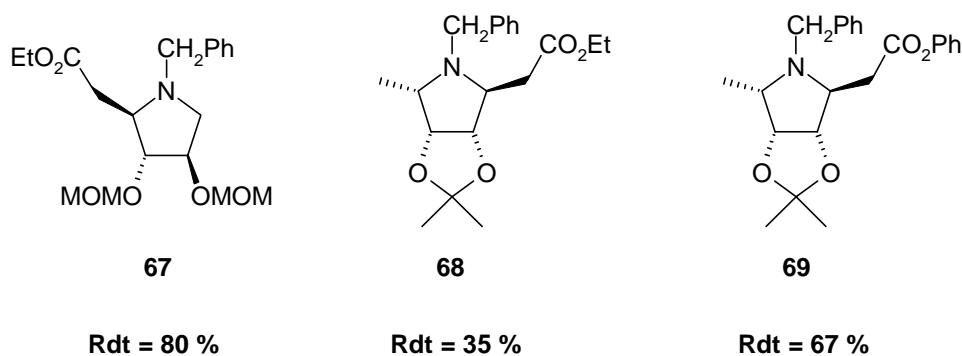


Schéma 4.15. *Obtention des autres esters.*

Le réarrangement thermique s'explique par une β -élimination d'hydrogène acétalique et ouverture concomitante de la liaison N-O qui permet de former l'ester et d'obtenir l'azote protégé par un benzyle (schéma 4.16).

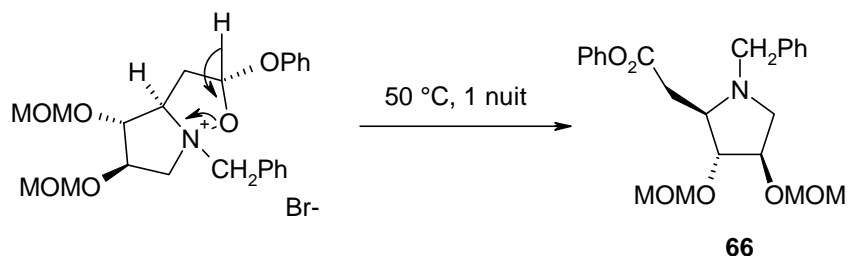


Schéma 4.16. *Mécanisme du réarrangement thermique.*

Souhaitant comme pour le bicyclic **65** tester le pouvoir inhibiteur des esters, un essai de déprotection du benzyle a été réalisé sur l'ester **67**. La *N*-déprotection par hydrogénation catalytique à température ambiante forme très facilement l'amine **70** avec un rendement de 80 % (schéma 4.17).

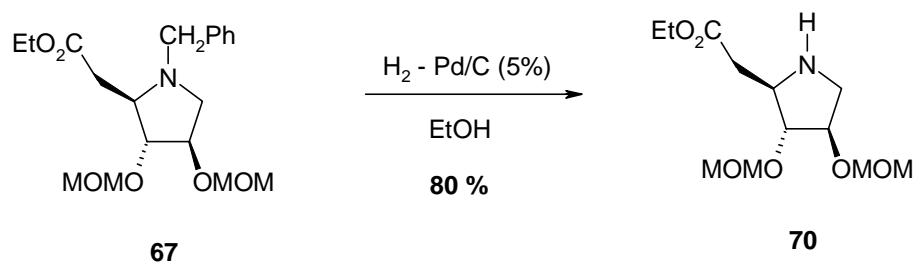


Schéma 4.17. *Déprotection de l'azote.*

La déprotection des deux esters **68** et **69** a été réalisée en deux étapes successives avec tout d'abord une déprotection des acétonides grâce à HCl 6N puis après évaporation de l'acide, libération de l'azote par hydrogénation catalytique. L'ester éthylique déprotégé **71** en série lyxose est obtenu sous forme de chlorhydrate après plusieurs jours de réaction avec un rendement de 50% sous forme d'une huile jaune qui cristallise dans AcOEt / EtOH 8/2. L'ester phénylique est beaucoup plus réactif et se transforme entièrement en acide (schéma 4.18).

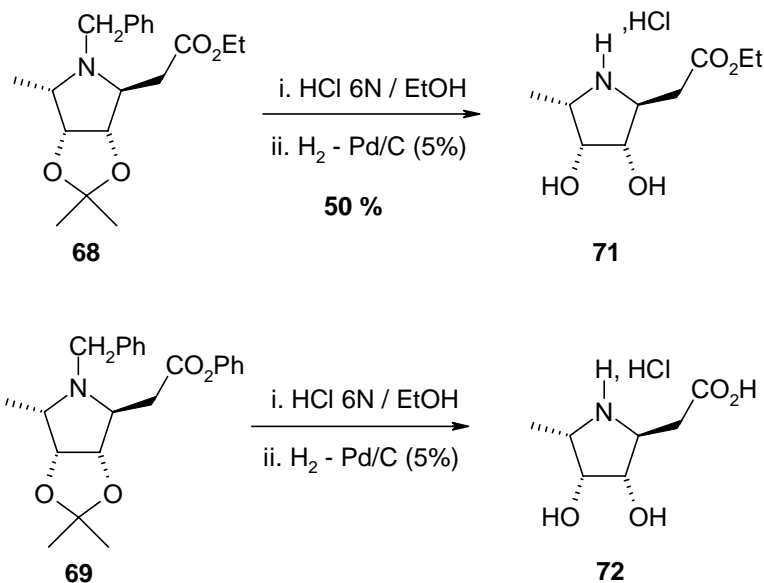


Schéma 4.18. Déprotection des esters.

Nous avons ici une méthode simple pour synthétiser l'acide et l'alcool correspondants à partir des esters.

Formation d'acide et d'alcool

- Formation d'acide

L'acide déprotégé **72** a donc été synthétisé très facilement à partir de l'ester phénylique et dans les conditions de déprotection des esters décrites ci-dessus. **72** est alors obtenu sous forme de chlorhydrate puis est passé sur une colonne d'Amberlite acide IR-120 afin d'obtenir l'amine libre avec un rendement de 62 % (schéma 4.19).

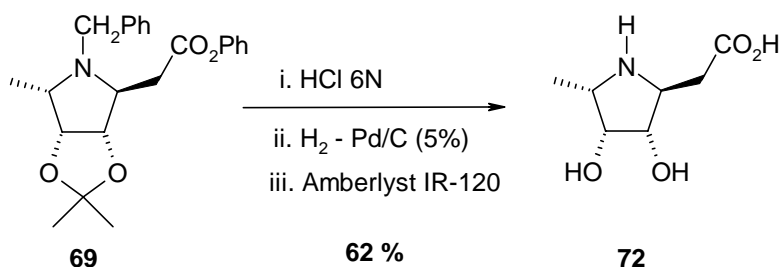


Schéma 4.19. Formation de l'acide.

- Réduction en alcool

L'alcool **73** a été facilement obtenu avec un rendement de 93 % par réduction à l'hydrure de lithium-aluminium de l'ester phénylique **69**. La déprotection du benzyle et des

acétonides a été effectuée de façon classique comme pour les autres composés pour donner l'alcool déprotégé **74** avec un très bon rendement de 95 % (schéma 4.20).

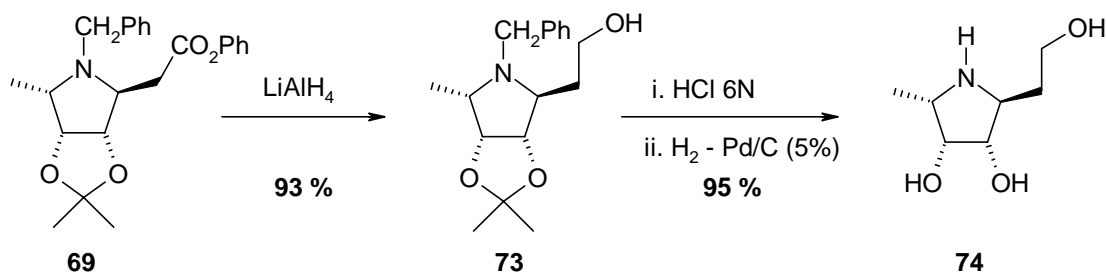


Schéma 4.20. Formation de l'alcool.

Formation d'acides hydroxamiques

L'acide hydroxamique est formé à partir des esters phéniliques par une méthode déjà utilisée au laboratoire¹⁶¹ en faisant réagir un chlorhydrate d'hydroxylamine sur un ester de phényle dans de la pyridine par chauffage léger à 30 °C.

Effectuée sur l'ester **66** en série D-thréose, cette méthode conduit à l'acide hydroxamique **75** avec un rendement de 76 % (schéma 4.21).

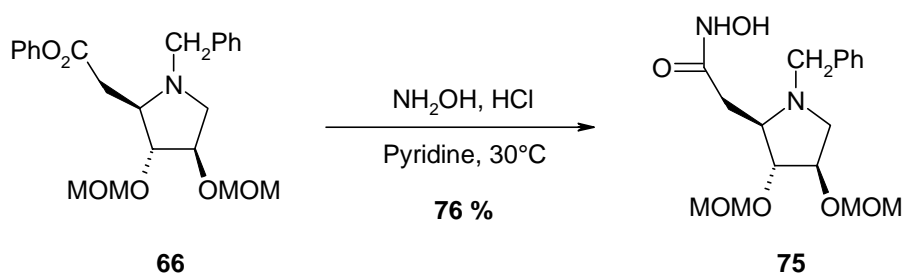


Schéma 4.21. Formation d'acide hydroxamique en série tétrorse.

Le même mode opératoire a donc été transposé en série lyxose. Nous avons alors obtenu l'acide hydroxamique **76** souhaité avec un rendement de 67 % après purification par chromatographie sur silice. La déprotection a été effectuée de la même manière que pour les autres composés en présence d'acide chlorhydrique et de palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène. Le produit déprotégé **77** est obtenu avec un bon rendement de 87 % après passage sur résine acide d'Amberlite afin de nous affranchir du chlorhydrate (schéma 4.22). Toutefois, ce produit est instable et il s'hydrolyse facilement en l'acide correspondant **72** précédemment synthétisé.

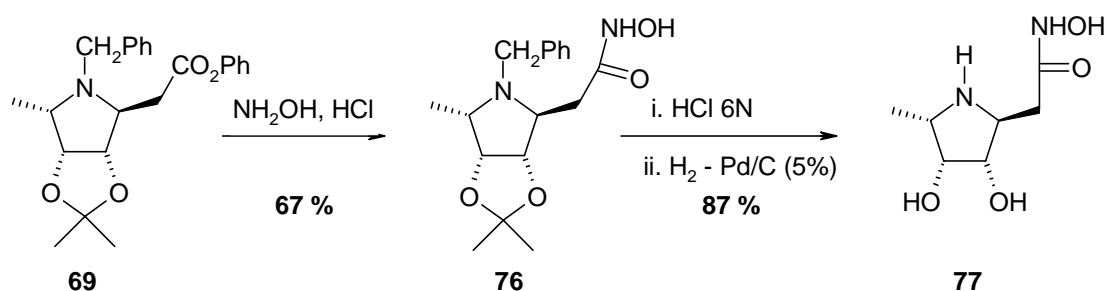


Schéma 4.22. Formation de l'acide hydroxamique en série lyxose.

Mise en valeur de la synthèse d'acide hydroxamique

Nous avons souhaité développer cette méthode et montrer que l'obtention d'acide hydroxamique à partir de nitrones est très aisée. En effet, les acides hydroxamiques étant de bons chélatants d'ions métalliques, ces composés sont souvent utilisés en chimie médicinale.

Nous avons alors développé la synthèse décrite précédemment à partir de différentes nitrones, elles-même préparées à partir de leurs amines correspondantes.

Les nitrones ont été obtenues par oxydation de l'amine en milieu peroxydé et en présence de tungstate suivant la méthode de Murahashi¹⁶². Cette méthode a toutefois été modifiée en ajoutant moins d'équivalent d'eau oxygénée (un équivalent au lieu de trois) car une trop forte concentration en peroxyde dégrade la nitrone finale (schéma 4.23).

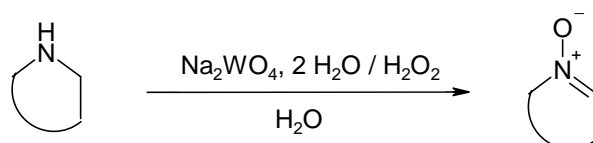
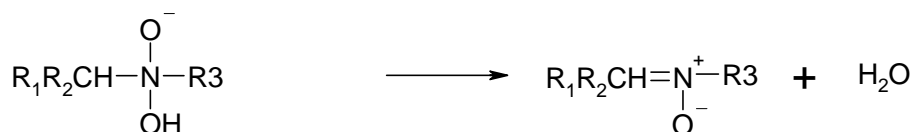
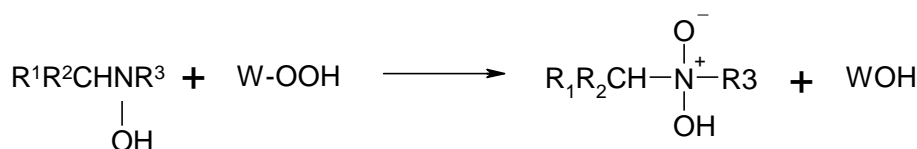
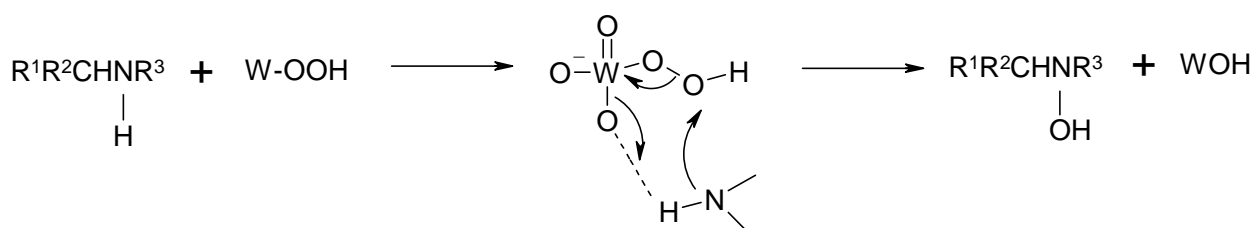
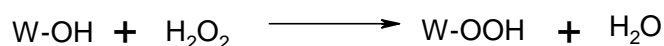


Schéma 4.23. Formation des nitrones à partir d'amines.

La formation d'une hydroxylamine intermédiaire est détectée lors de l'oxydation de l'amine secondaire. Le catalyseur serait le peroxytungstate qui est formé à partir du tungstate de sodium et de l'eau oxygénée. Les espèces actives dans cette oxydation sont HOOWO_3^- et HOOWO_6^- . L'amine est oxydée en deux étapes par le peroxytungstate (W-OOH) pour former d'abord une hydroxylamine puis une seconde oxydation suivie d'une déshydratation donne la nitrone. L'espèce libérée (W-OH) est alors oxydée in situ par l'eau oxygénée pour redonner le peroxytungstate (schéma 4.24).



avec $\text{W} = \text{WO}_3^-, \text{WO}_6^-$

Schéma 4.24. Mécanisme de formation de la nitrone.

Cette méthode nous a donc permis d'obtenir les trois nitrones **78**, **79**, **80** suivantes à partir des amines correspondantes (schéma 4.25):

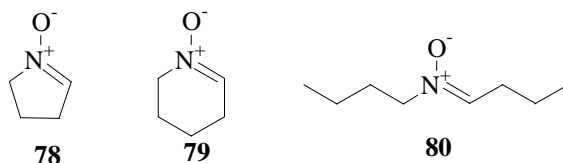


Schéma 4.25. Nitrones obtenues.

De la même manière que précédemment, ces nitrones ont été engagées dans une réaction de cyclo-addition 1,3-dipolaire. Les adduits bicycliques **78a**, **79a** et **80a** sont obtenus en mélanges isomériques variables (tableau 4.1). Le réarrangement thermique qui a suivi a permis d'obtenir les esters phéniliques **78b**, **79b** et **80b** correspondants avec de bons rendements. La réaction de substitution en présence de chlorhydrate d'hydroxylamine conduit facilement aux trois acides hydroxamiques correspondants **78c**, **79c** et **80c** (schéma 4.26).

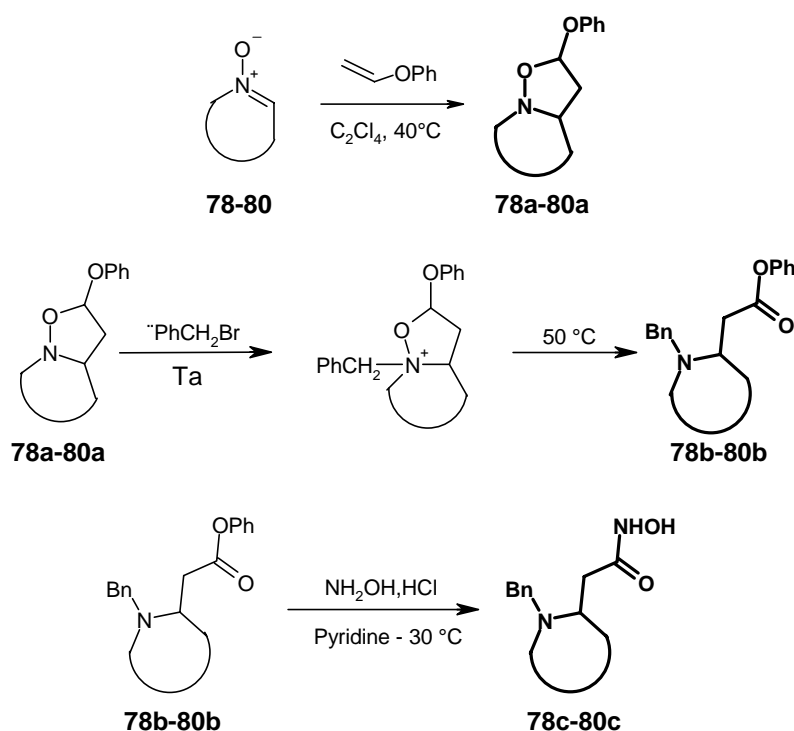


Schéma 4.26. Cascades de réactions conduisant aux acides hydroxamiques.

	Adduits bicycliques	Pourcentage des isomères	Esters phéniliques	Acides hydroxamiques
78	45 %	90: 10	78 %	97 %
79	58 %	50: 50	75 %	90 %
80	55 %	50: 50	73 %	78 %

Tableau 4.1. Rendements des différentes étapes de préparations des acides hydroxamiques.

Les rendements de chaque réaction ainsi que les proportions obtenues pour les isomères bicycliques sont résumés dans le tableau ci-dessus (tableau 4.1).

Cette méthode permet donc d'obtenir facilement et en peu d'étapes des acides hydroxamiques dérivés d'acide β -aminés *N*-benzylés à partir de nitrones avec des rendements globaux de 30 à 45 %.

Greffage de chaînes phosphonates

Cyclo-addition 1,3-dipolaire

Cette réaction n'a été conduite qu'avec la nitrone de la série L-lyxose.

La réaction de cyclo-addition 1,3-dipolaire a été utilisée pour la formation de phosphonates. Ainsi la nitrone **47** a été mise en réaction avec le vinylphosphonate de diéthyle dans les mêmes conditions que précédemment. La cyclo-addition est dans ce cas beaucoup moins sélective et se forment alors les quatre isomères possibles **80a-d** dus aux approches endo et exo (schéma 4.27).

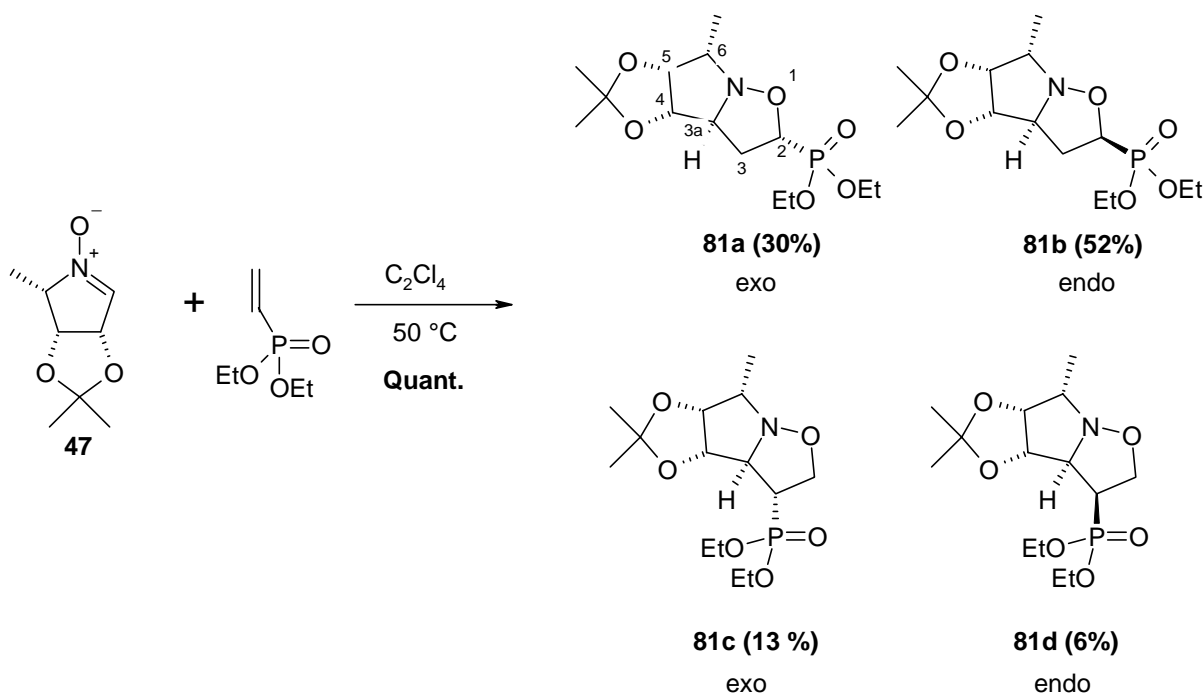


Schéma 4.27. Formation des adduits bicycliques phosphorés.

Les adduits sont obtenus dans les proportions 52/30/13/6 avec deux adduits majoritaires **81a** et **81b**. Les proportions ont été déterminées par RMN. Trois produits ont pu être isolés. **81b** est facilement isolable par chromatographie sur silice et sa stéréochimie a été déterminée par comparaison des spectres de RMN et en particulier des constantes de couplage avec l'éther de phényle **64**, produit majoritaire de la réaction de cyclo-addition décrite précédemment. Les composés **81a** et **81c** sont, à ce stade de la synthèse, inséparables. La stéréochimie de ces deux composés a été confirmée par étude NOESY et nOe (schéma 4.28 et 4.29).

On note alors pour le composé **81c** un effet de 7 % entre le proton H-4 irradié et le proton H-3a mais on observe surtout un effet de 9 % entre le proton H-4 et la proton Ha-3 qui prouve alors la configuration R de la liaison carbone-phosphore.

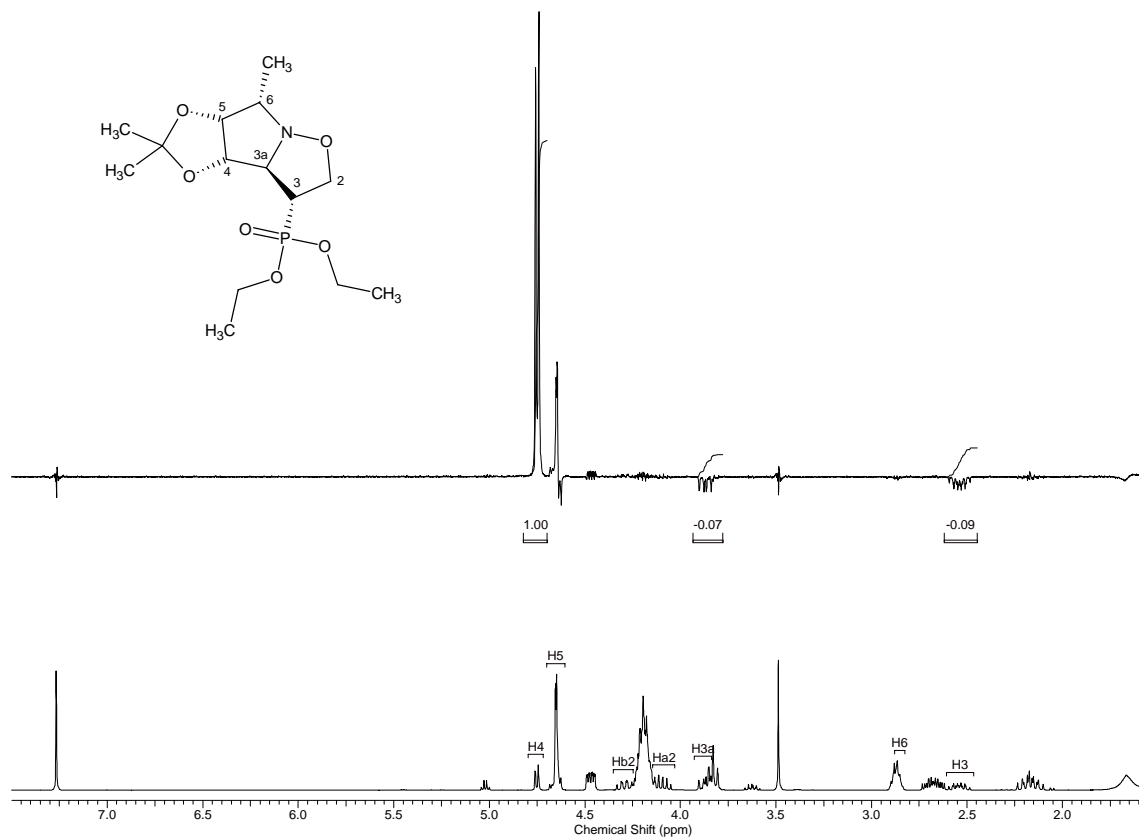


Schéma 4.28. Spectre obtenu par *nOe* pour **81c**.

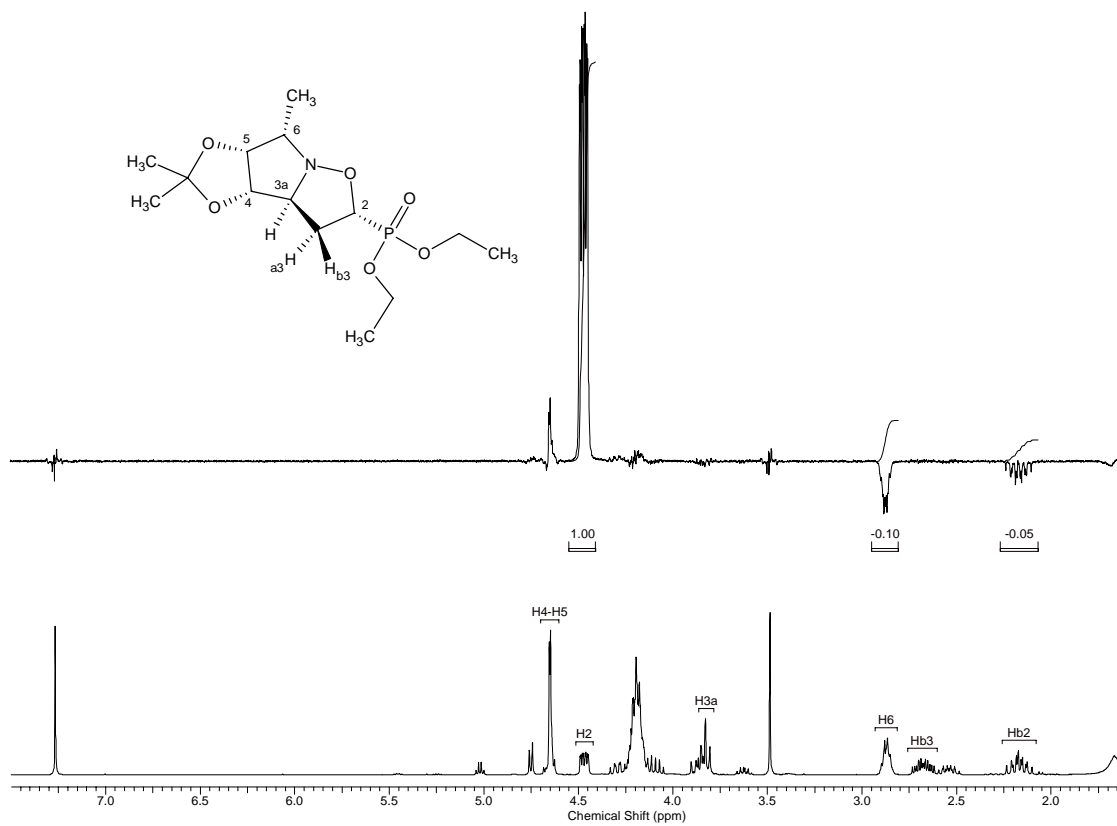


Schéma 4.29. Spectre obtenu par *nOe* pour **81a**.

Pour le composé **81a**, on observe un fort effet de 10 % entre le proton H-2 irradié et le proton H-8 d'où une configuration R pour l'ester phosphonate. Un effet de 5 % est également observé entre H-2 et le proton voisin Ha-3.

L'adduit bicyclique **81b** ayant été purifié et obtenu seul, nous avons déprotégé la fonction acétonide de ce composé en milieu acide chlorhydrique afin d'obtenir le produit déprotégé **82** avec un très bon rendement de 93 % (schéma 4.30).

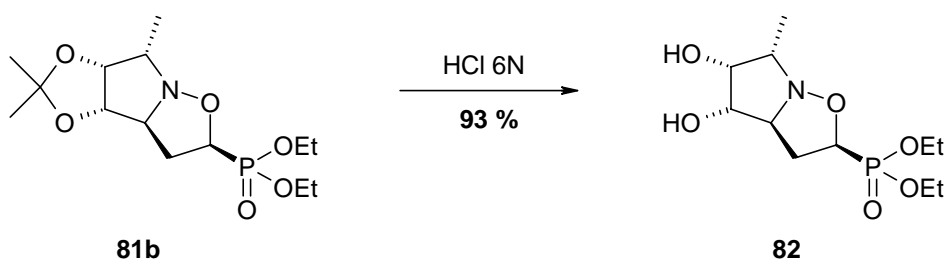


Schéma 4.30. Déprotection de la fonction isopropylidène pour un adduit.

▪ Ouverture des adduits bicycliques

Des essais d'ouverture des adduits bicycliques ont été conduits comme précédemment par ajout de bromure de benzyle et essais de réarrangement thermique mais cette méthode s'est avérée inefficace et ne conduit qu'à une dégradation des produits.

Ces adduits ont donc été ouverts par hydrogénation catalytique à l'aide de palladium sur charbon avec léger chauffage à 40 °C (schéma 4.31). On obtient alors les amino-sucres **83**, **84** et **85** correspondants possédant une chaîne phosphonate en position pseudo-anomérique. L'hydrogénation catalytique respectant les stéréochimies déjà instaurées, les deux composés **83** et **84** possèdent des hydroxyles en position 2' de stéréochimie opposée.

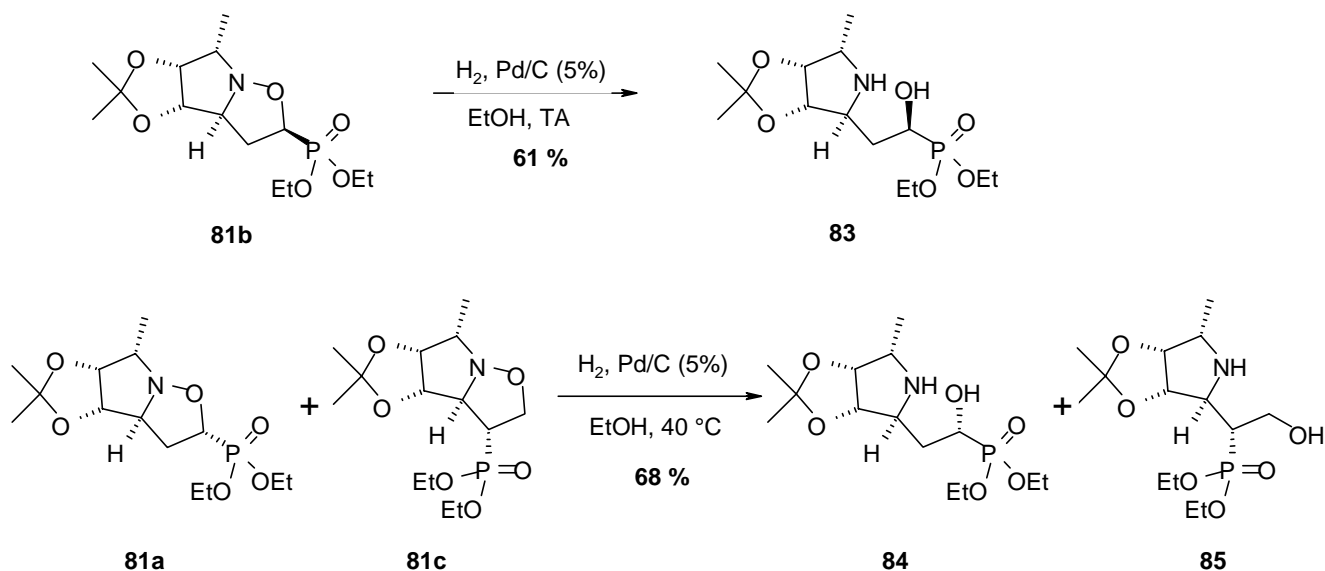


Schéma 4.31. Ouverture des adduits bicycliques phosphorés.

Les composés **84** et **85** sont séparables à ce stade de la synthèse par chromatographie sur silice. Ils sont obtenus dans des proportions correspondantes aux pourcentages décrits dans le schéma 4.26.

Ces trois amino-sucres ont été déprotégés en milieu acide fournissant ainsi les composés **86**, **87** et **88** de manière quantitative (schéma 4.32).

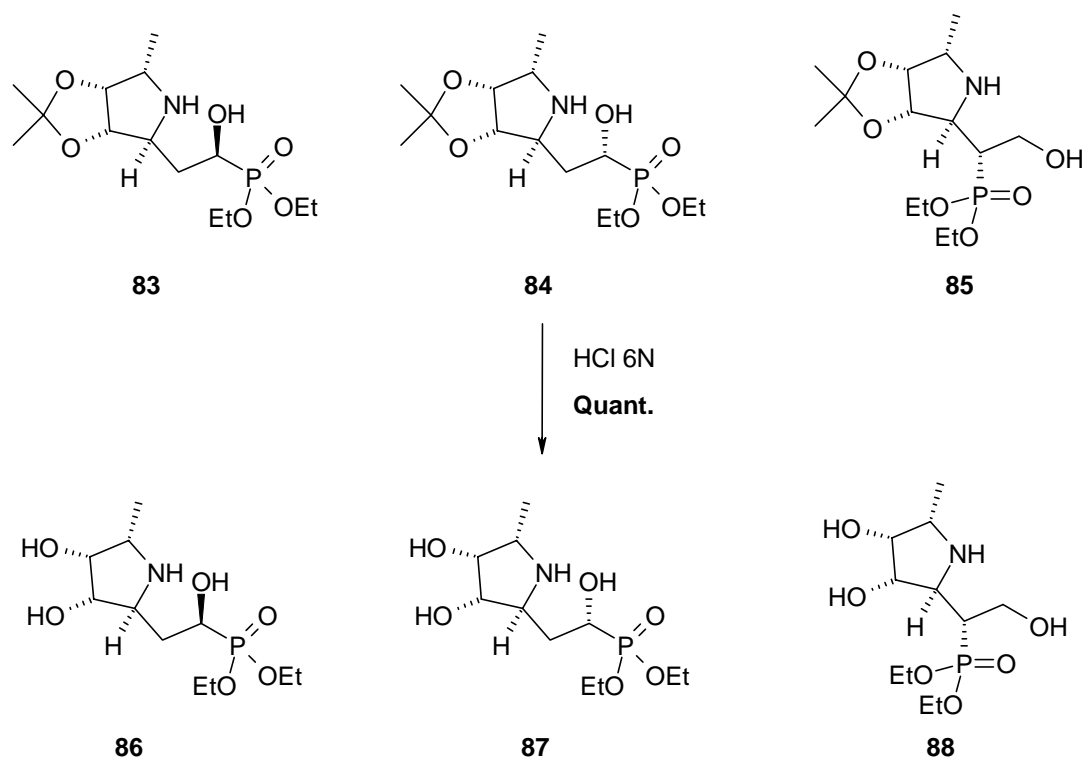


Schéma 4.32. Déprotection des amino sucres.

▪ Déshydroxylation

Afin de synthétiser un amino-sucre avec une chaîne $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$, nous avons entrepris de déshydroxyler le composé majoritaire **83** obtenu précédemment par la méthode de Barton-Mc Combie c'est-à-dire par une élimination radicalaire d'un xanthate.

Dans un premier temps, nous avons donc protégé l'amine du cycle pyrrolidinique par une fonction carbamate par action de chloroformiate de benzyle en présence de deux équivalents de bicarbonate de sodium (schéma 4.33).

La réaction a été réalisée sur l'amino-sucre **83** et permet d'obtenir l'amine protégée **89** avec un rendement de 52 % après purification.

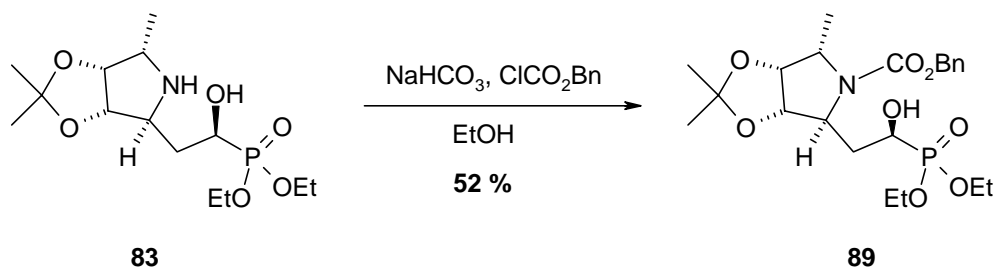


Schéma 4.33. Protection de la fonction amine.

L'étape suivante est la formation du xanthate par action du thiocarbonyldiimidazole^{163,164,165,166} (schéma 4.34).

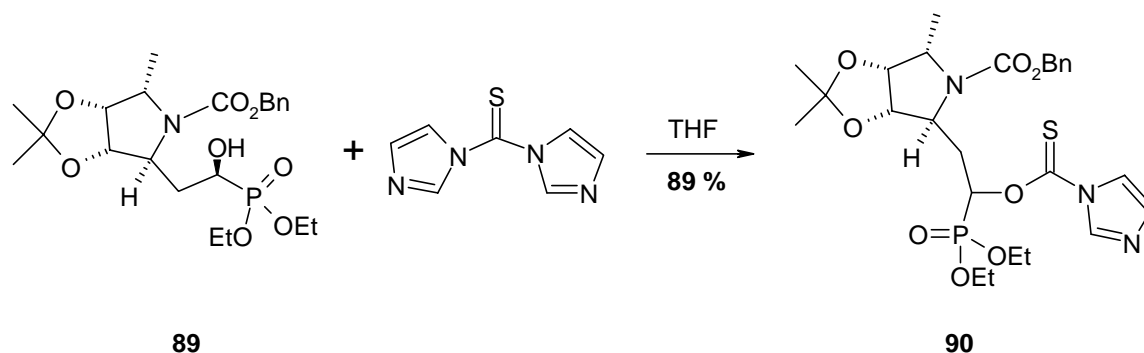


Schéma 4.34. Formation du dérivé xanthate.

Le xanthate **90** est obtenu après purification avec un rendement de 89 %. Ce dérivé est alors fragmenté par voie radicalaire. Il est donc porté à reflux dans du toluène pendant 3 heures en présence d'hydrure de tributylétain et de 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) (schéma 4.35). Du chloroforme est ajouté au milieu en fin de réaction pour transformer l'hydrure restant en solution en chlorure de tributylétain. Cette méthode facilite un peu la purification qui est rendue difficile par les dérivés de l'étain.

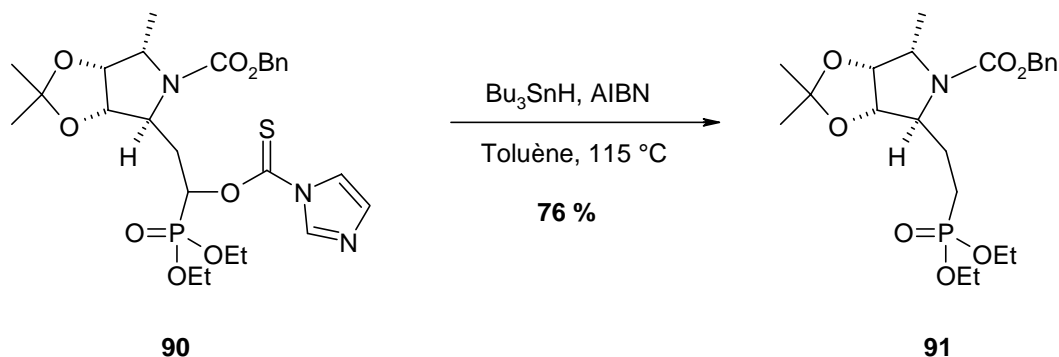


Schéma 4.35. Désoxygénation de l'amino sucre.

Le dérivé **91** est obtenu avec un bon rendement de 76 %. Nous obtenons ainsi un dérivé portant une chaîne phosphonate d'éthyle, ce qui permet d'étendre la gamme de produits qui pourraient potentiellement inhiber les différentes enzymes sur lesquelles nous allons les tester. Ce composé permettra d'étudier l'influence de la longueur de chaîne greffée sur l'amino-sucre.

La réaction de Barton-Mc Combie s'effectuant par voie radicalaire, nous allons détailler le mécanisme de celle-ci dans le schéma 4.36 suivant.

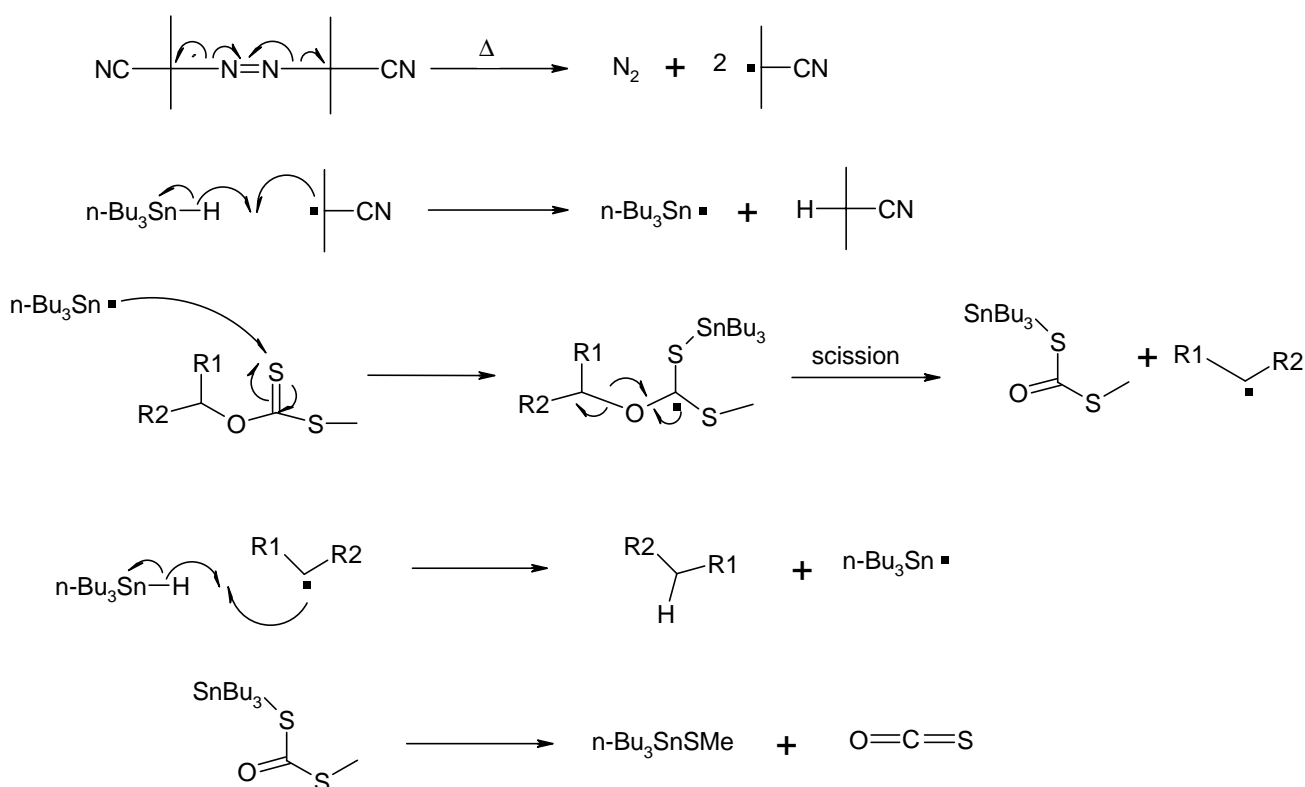


Schéma 4.36. Mécanisme de la réaction de Barton-Mc Combie.

La dernière étape est la déprotection de l'amine et des hydroxyles réalisée par hydrolyse en milieu acide puis par hydrogénation catalysé par du palladium sur charbon (schéma 4.37).

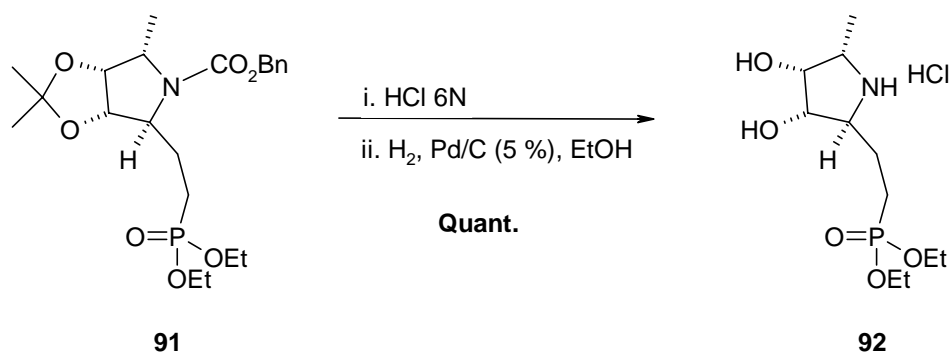


Schéma 4.37. Déprotection de l'amine et des acétonides.

L'amine greffée **92** est obtenue quantitativement. Ce produit est obtenu en six étapes à partir de la nitroène avec un rendement global sur ces six étapes de 20 %.

Conclusion

Les réactions de cyclo-addition 1,3-dipolaire nous ont permis d'exploiter une propriété essentielle de la nitroène. Nous avons ainsi synthétisé une gamme de produit qu'il va être intéressant de tester sur l' α -L-fucosidase afin de comparer ces activités inhibitrices avec celle de l'aminosucres simple **55**.

Nous avons également mis en valeur une méthode de synthèse d'acide hydroxamique et nous avons développé une chimie novatrice du phosphore.

3. Fonctionnalisation de la nitrone par substitution nucléophile

Une seconde propriété intéressante de la nitrone est qu'elle peut additionner directement un nucléophile. Nous avons donc exploité cette voie afin d'élargir le panel de produit synthétisable en vue d'obtenir des analogues de donneur de fucose.

- **Greffage de chaînes carbonées**

L'intérêt de la substitution nucléophile dans ce cas est d'obtenir des amino sucres fonctionnalisés avec des chaînes moins longues que lors des réactions de cyclo-addition 1,3-dipolaire. Nous espérons donc greffer une chaîne acide par l'intermédiaire d'un nitrile mais aussi utiliser les méthyles phosphonates pour ajouter des chaînes phosphorées possédant moins de carbones.

Du cyanure de sodium en présence d'acide chlorhydrique permet de former in situ de l'acide cyanhydrique qui s'additionne sur la nitrone (schéma 4.38).

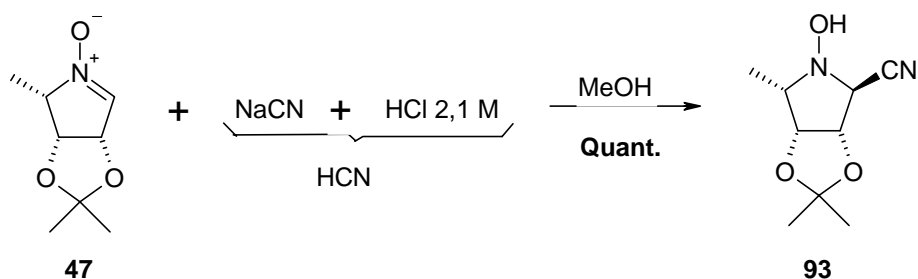


Schéma 4.38. Formation de nitrile.

Le composé **93** est obtenu très facilement sous forme de cristaux.

La déprotection du produit **93** est réalisée par hydrogénation catalytique pour couper la liaison N-OH et en milieu acide afin de nous affranchir de l'isopropylidène. Cette étape est malheureusement accompagnée de la formation de nombreux sous-produits réduisant considérablement la quantité de produit souhaité.

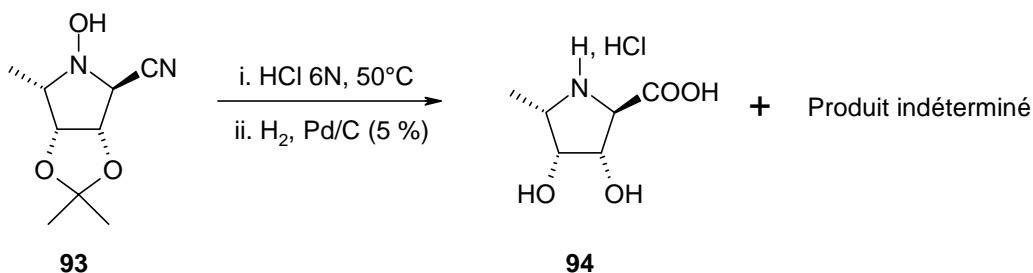


Schéma 4.39. Hydrolyse du composé nitrile.

L'acide **94** est obtenu en deux étapes: tout d'abord l'hydrolyse du nitrile et de la fonction isopropylidène en milieu acide. Il est nécessaire de chauffer à 50 °C plusieurs jours en milieu acide afin d'hydrolyser le nitrile. Une hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon est ensuite effectuée pour couper la liaison N-OH. Après plusieurs jours, l'acide souhaité est obtenu en mélange avec un produit non déterminé (schéma 4.39). Ce produit très polaire rend la purification très difficile. Plusieurs essais par HPLC sur

colonne en phase inverse ou encore sur colonne Polaris amide C18 n'ont pas permis d'obtenir le produit. Celui-ci subirait une dégradation et nous n'obtenons donc le produit qu'en mélange.

Greffage de chaînes phosphorées

▪ Substitution directe

De premiers essais ont été réalisés sur notre nitrone test **17**. Nous avons souhaité greffer des phosphites dans le but d'obtenir des longueurs variables de chaînes. Des essais ont été réalisés en présence d'acide hypophosphoreux mais ont donné des mélanges très compliqués et inexploitable. Nous avons donc suivi la méthode de Tordo¹⁶⁷ en faisant réagir du phosphite de diméthyle avec la nitrone à 40 °C. Cette réaction est réalisée sans solvant et nous obtenons après une nuit de chauffage deux isomères **95** et **96** qui sont séparés par HPLC (schéma 4.40).

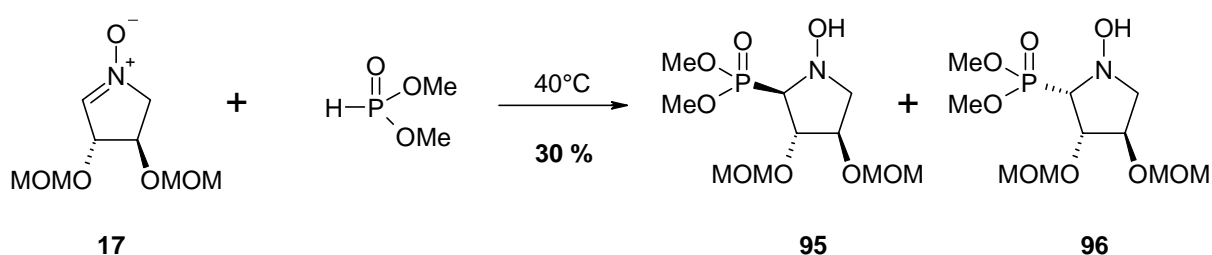


Schéma 4.40. Substitution par des phosphites.

Le rendement de cette réaction est moyen mais nous avons transposé cette méthode à la nitrone en série L-lyxose **47**.

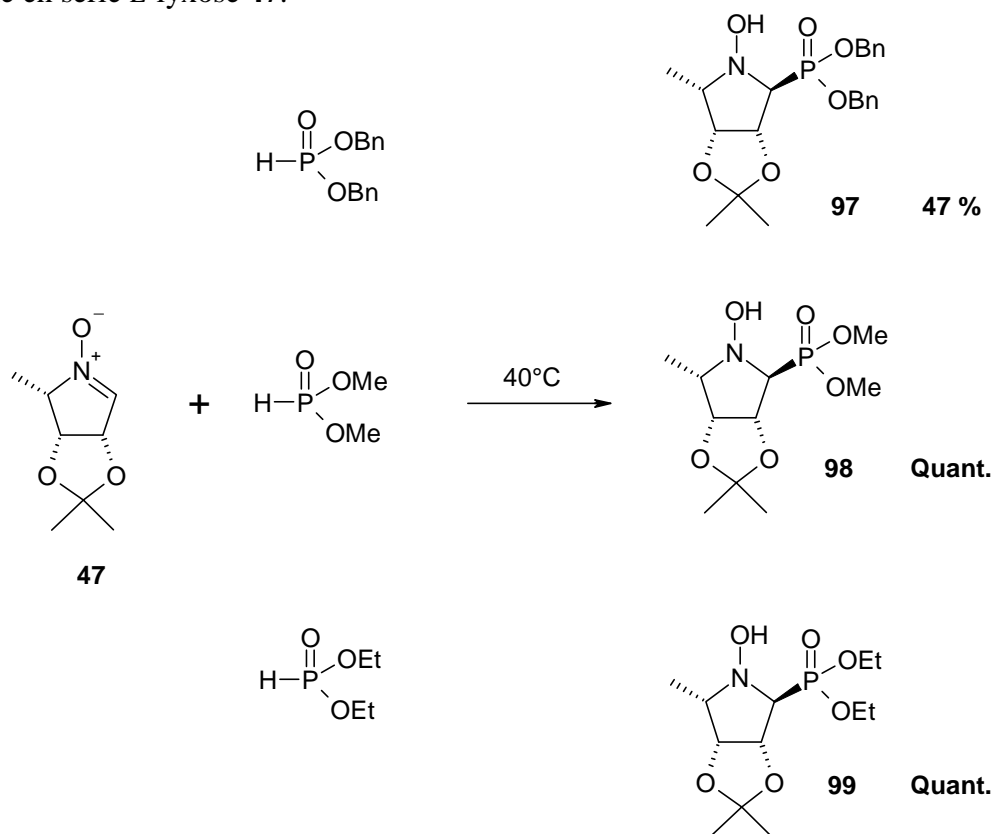


Schéma 4.41. Application des phosphites à la nitrone en série L-lyxose.

Cette même réaction a donc été accomplie avec trois phosphites différents sur la nitrone **47** (schéma 4.41). Chaque réaction donne la formation d'un seul isomère et a permis d'obtenir trois produits substitués **97**, **98** et **99** avec de bons rendements. Cette méthode est donc plus facile en série lyxose qu'en série tétrose. Cependant, le phosphite de benzyle, présentant un encombrement stérique plus important, conduit à des rendements plus faibles.

Cette réaction de substitution nucléophile a également été réalisée avec un diphosphonate de diéthyle **100** synthétisé par le laboratoire de Chimie Organique Thérapeutique du Pr. Eustache¹⁶⁸ (schéma 4.42).

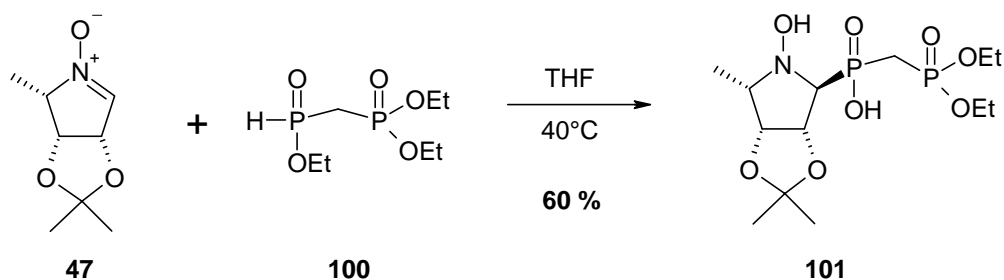


Schéma 4.42. Substitution avec le diéthylidiphosphonate.

Ce réactif nous a permis d'élargir la gamme de produits phosphorés en obtenant le composé **101** qui comporte deux phosphores. Cette réaction a légèrement été modifiée par rapport aux précédentes par l'ajout d'un solvant qui est le THF.

Lors de la purification par plaque préparative, la perte d'un éthyle a été observée pour conduire au produit dérivé **101** avec un rendement de 60 %. Ce produit reste pourtant aussi intéressant car l'objectif de cette manipulation était surtout d'obtenir un dérivé diphosphate.

La déprotection de ces différents composés s'est avérée plus compliquée que pour les composés précédents.

Des essais de réduction de la liaison N-OH ont été réalisés sur le composé **95**. Une hydrogénation catalytique en présence de Pd/C (5%) n'a donné aucun résultat c'est pourquoi la réduction a été tentée en présence de nickel de Raney afin d'obtenir l'amine. Cette méthode de réduction a donc été transposée aux composés en série lyxose.

Ces composés possédant également une fonction isopropylidène à déprotéger, nous avons procédé comme précédemment par action d'acide chlorhydrique 6N afin d'obtenir les hydroxyles libres. Cette déprotection suivie de l'action du nickel de Raney semble donner les produits déprotégés souhaités mais avec formation de sels de nickel, vraisemblablement NiCl₂, qui donne une couleur verte aux produits obtenus.

Plusieurs méthodes s'offraient à nous pour résoudre ce problème. Nous avons tout d'abord réalisé chaque étape séparément suivie d'une purification afin d'éliminer toute trace de chlorure ou de nickel. Puis nous avons essayé de neutraliser l'acide chlorhydrique par ajout de carbonate de sodium. Les étapes de déprotection ont également été inversées mais le résultat final indiquait toujours la présence de sels de nickel.

Ces différentes combinaisons n'étant pas concluantes, nous avons donc décidé de modifier la méthode de déprotection des acétonides. Quatre méthodes différentes ont été essayées:

- résine DOWEX 50*8 (H⁺)
- AcOH / H₂O (80/20), 25 °C
- HCl 6N puis neutralisation par une résine (Amberlyst A26, Cl⁻)
- CF₃CO₂H / H₂O, 50 °C¹⁶⁹

Toutes ces méthodes ont permis la déprotection des hydroxyles mais de manière moins efficace. En effet, chaque méthode a permis d'obtenir le produit souhaité mais de façon moins

pure car toujours en mélange avec beaucoup de produits.

Ces méthodes n'étant pas concluantes, nous avons décidé de conserver le procédé en présence d'acide chlorhydrique mais en modifiant la méthode de réduction de la liaison N-OH. Trois modes opératoires ont été utilisés:

- H₂ - Pd/C (5%)
- TiCl₃, Na₂CO₃¹⁷⁰
- Sulfite (Na₂SO₃ ou Na₂S₂O₅)

La réduction au titane III était assez concluante mais mettait toujours en concurrence le produit souhaité et un ou deux sous-produits dont la quantité augmentaient avec le temps de mise en réaction. La méthode au sulfite est beaucoup moins intéressante puisqu'elle conduit à un mélange de produits.

L'hydrogénation catalytique, quant à elle, ne donne de réaction qu'avec un catalyseur actif (neuf ou activé au préalable) en présence d'acide chlorhydrique 1N censé augmenter la cinétique de la réaction. Cet acide n'est pas gênant puisqu'il permet en une seule étape d'aider la réaction de réduction de l'hydroxylamine et de déprotéger la fonction isopropylidène (schéma 4.43).

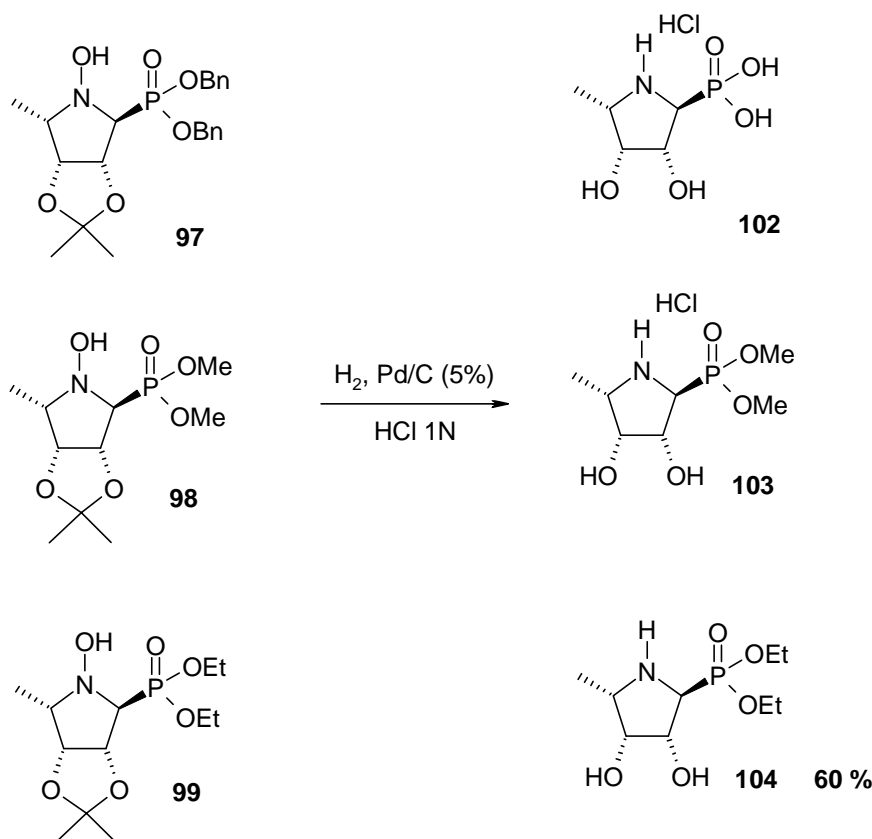


Schéma 4.43. Déprotection des dérivés phosphorés.

Les deux dérivés **102** et **103** ont été obtenus sous forme de chlorhydrate sans aucune purification et le dérivé phosphonate d'éthyle **104** a été purifié sur résine échangeuse d'ions Amberlite IR-120 (forme H⁺).

La déprotection du composé **101** comportant la chaîne diphosphonate a été effectué sans succès, cette réaction suivie d'une purification donnant lieu à une dégradation du composé.

▪ Substitution par un lithien du méthyle phosphonate

Afin d'augmenter la chaîne carbonée substituée d'un seul carbone, nous avons utilisé une substitution nucléophile par l'intermédiaire d'un organolithien.

Le lithien a été réalisé en présence de butyllithium et de méthane-phosphonate de diéthyle dans le THF à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Celui-ci est transféré directement à la canule après sa formation (formation d'un trouble blanc) sur une solution de nitrone préalablement refroidie à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ¹⁷¹. On obtient alors facilement l'hydroxylamine substituée **105** (schéma 4.44).

Nous procédons ensuite à la déprotection des hydroxyles et à la réduction de l'hydroxylamine dans les conditions énoncées précédemment, c'est-à-dire hydrogénation catalytique en milieu acide chlorhydrique 1 N (schéma 4.44).

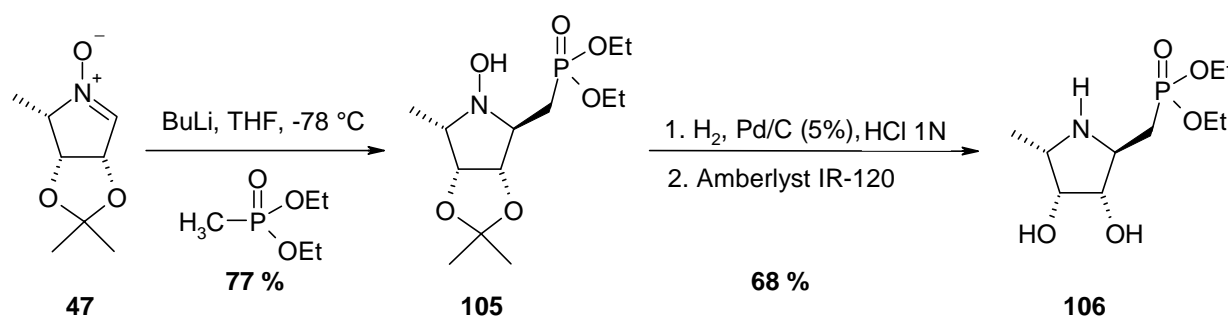


Schéma 4.44. Formation par substitution d'un dérivé phosphoré $-\text{CH}_2\text{P}$.

Le composé **106** est obtenu facilement avec un rendement global sur deux étapes de 52 % après passage sur une résine Amberlite IR 120 (forme acide) et élution à l'ammoniaque diluée pour éliminer le chlorhydrate formé.

Ce dérivé va nous permettre de synthétiser un composé pyrophosphate, produit très important pour mimer au mieux le GDP-fucose.

▪ Formation du dérivé pyrophosphate

Le composé **105** est notre précurseur pour étudier les méthodes de couplage des phosphonates. Nous avons suivi la méthode classique de Whitesides¹⁷² améliorée par Wong.^{93,173}

105 a donc été transformé en sel de triéthylamine en une étape¹⁷¹. Tout d'abord, une coupure sélective des esters phosphonates est réalisée par action du bromure de triméthylsilyle et la réaction est stoppée par ajout d'une solution de triéthylamine dans le méthanol qui conduit à la formation du sel de triéthylammonium. Ce sel lyophilisé est engagé dans la réaction de couplage où sont mis en présence le sel de guanosine monophosphate morpholidate et le tétrazole dans la pyridine (schéma 4.45).

Après plusieurs jours (2 à 5 jours), le dérivé **107** est obtenu avec un faible rendement comme indiqué dans la littérature et en mélange avec le produit de départ, le dimère du sel de guanosine et son dérivé phosphate. Plus la réaction dure, plus il y a formation de dimère. La purification du produit **107** est très délicate et une simple purification sur résine ne permet pas d'obtenir le produit escompté. Le dérivé **107** est mis en évidence par RMN du phosphore avec l'obtention de deux doublets de déplacement chimique $-9,5$ et $11,7$ ppm et avec une constante de couplage de $25,6$ Hz.

Il sera donc nécessaire de réaliser une mise au point de la réaction ainsi que de la purification.

phosphonate qui reste encore à améliorer, en particulier l'étape de purification. Ainsi, nous avons pu exploiter et développer une chimie abondante autour de notre nitrone de départ.

4. Inversion de configuration en position anomérique

Ayant développé une chimie assez vaste au travers des cyclo-additions 1,3-dipolaire et des substitutions nucléophiles, il est maintenant nécessaire d'appliquer cette chimie à la synthèse d'analogues de donneurs de fucose.

Chaque aminosucre que nous avons obtenu s'est naturellement formé en configuration α . A ce stade de la synthèse, il reste donc capital d'inverser la configuration de la position anomérique afin de mimer le plus fidèlement possible la configuration du GDP- β -fucose c'est-à-dire un donneur β puisque le mécanisme des α -(1,3)-fucosyltransférases fonctionne avec inversion de configuration.

Méthode d'inversion pour les composés dérivés des substitutions nucléophiles

Des premiers essais d'oxydation d'hydroxylamine puis réduction de la nitrone ont été réalisés sur les composés **95** et **96**, produits issus de la série D-thréose.

L'oxydation a été réalisée en présence d'oxyde de mercure jaune dans du dichlorométhane. Elle s'effectue prioritairement du côté le plus substitué comme nous l'avons souligné dans le chapitre précédent (schéma 4.47).

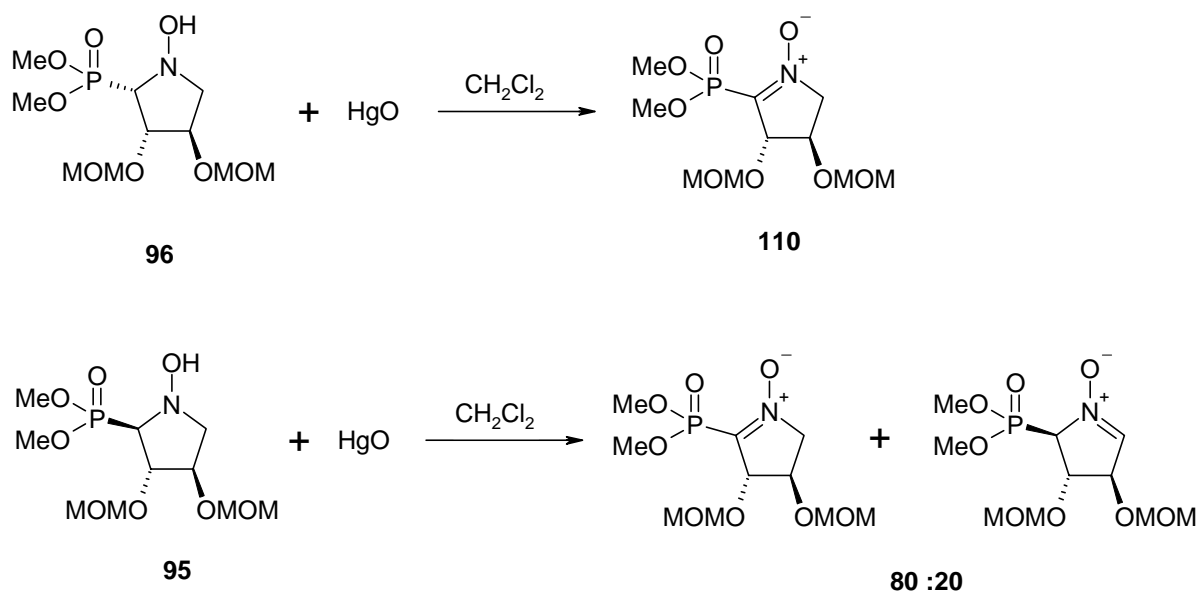


Schéma 4.47. Oxydation de l'hydroxylamine.

L'oxydation du dérivé **96** donne exclusivement l'oxydation du côté le plus substitué avec le composé **110**. Par contre, le produit **95** donne un mélange des deux produits d'oxydation dans les proportions 80: 20.

Nous avons réduit la nitrosonium **110** dans l'espoir d'observer une éventuelle inversion de configuration. La réduction a été réalisée par l'action du borohydrure de sodium (schéma 4.48).

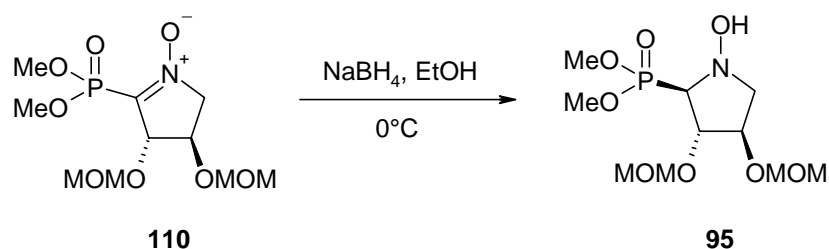


Schéma 4.48. Inversion de configuration du phosphore.

Cet essai de réduction semble nous donner majoritairement le composé **95** en mélange avec l'autre isomère et la nitrone. Cette réaction n'est pas optimisée mais donne bien lieu à une inversion de configuration.

Cette méthode nous semble donc intéressante pour inverser la configuration du carbone pseudo-anomérique pour les composés obtenus par substitution nucléophile.

Un essai d'oxydation du composé en série L-lyxose **99** remet malheureusement en question cette stratégie d'inversion (schéma 4.49).

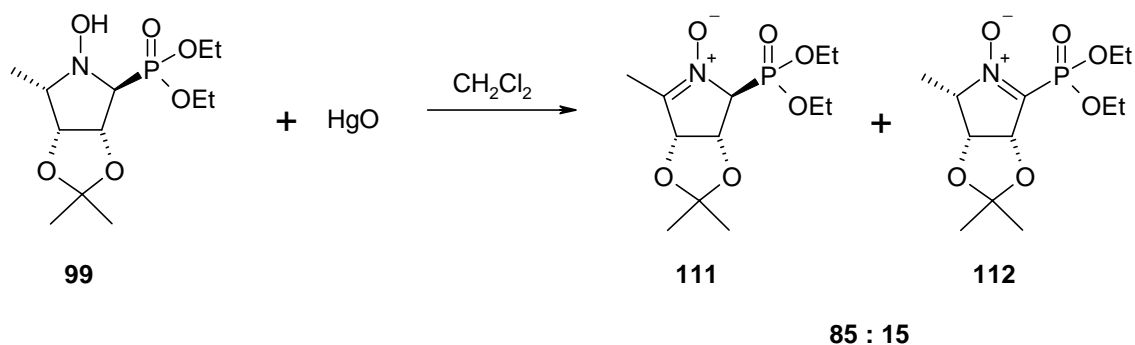


Schéma 4.49. Oxydation du composé **99**.

En effet, cette oxydation forme deux isomères dans les proportions 85:15. Le produit majoritaire **111** est celui dont l'oxydation s'effectue du côté du méthyle. Celui-ci est obtenu avec un rendement de 53 %. Le produit **112** étant celui qui nous intéresse, il serait alors nécessaire de réitérer une seconde fois ce processus d'oxydation-réduction afin d'obtenir **112** dans des proportions raisonnables.

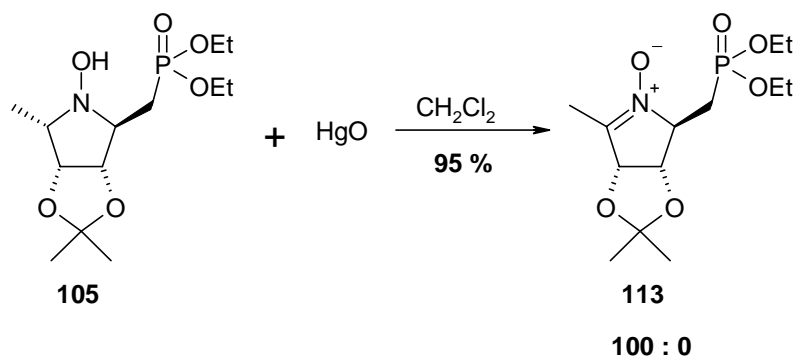


Schéma 4.50. Oxydation de l'hydroxylamine **105**.

Toutefois, l'oxydation des composés **95** et **96** montre que les produits d'obtention ne suivent pas obligatoirement la règle d'oxydation du côté le plus substitué, c'est pourquoi nous

avons appliqué cette méthode à l'hydroxylamine **105**, produit le plus important pour obtenir un analogue de donneur de fucose le plus proche du GDP-fucose.

Malheureusement, l'oxydation du produit **105** s'effectue exclusivement du côté du méthyle (schéma 4.50).

D'après les travaux d'Ali¹⁷⁴, la régiosélectivité de l'oxydation dépend de la nature du solvant ou encore de l'oxydant utilisé, c'est pourquoi nous avons réalisé cette réaction dans différentes conditions.

Les résultats de ces essais sont rapportés dans le tableau 4.1.

Produit	Oxydant	Solvant	Résultats
105	HgO	Ethanol	Oxydation du côté du méthyle: 113
		Cyclohexane	
		Acide acétique	
	Para-benzoquinone	Chloroforme	
	K ₃ CN ₆ Fe / KOH	Ether	
	tBuOOH	Toluène	

Tableau 4.1. Récapitulatif des différentes procédures d'oxydation.

Toutes ces méthodes nous ont conduit au même composé **113** qui est le produit non souhaité c'est-à-dire présentant l'insaturation du côté du méthyle.

Cette oxydation peut être expliquée par l'encombrement stérique en position 2 alors que le proton en position 5 est plus accessible pour qu'il puisse être arraché lors de l'oxydation (schéma 4.51).

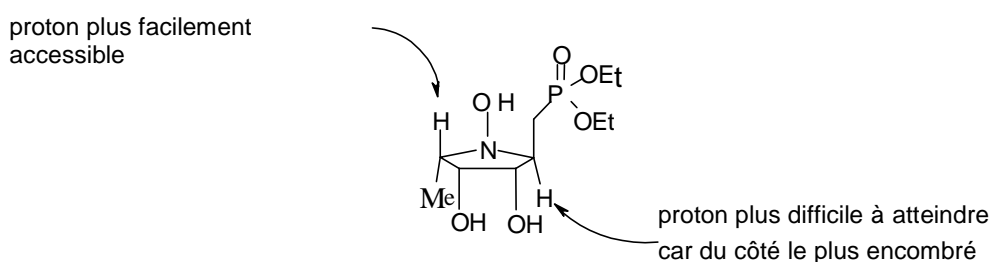


Schéma 4.51. Explication possible pour l'oxydation.

Au vu de ces résultats, nous avons donc envisagé cette même oxydation afin d'obtenir le composé **113** puis de bloquer la position 5 par addition de HCN. Une seconde oxydation devrait alors nous donner le composé avec l'insaturation souhaitée (schéma 4.52).

Cette réaction nous a malheureusement conduits à une élimination du nitrile pour redonner le produit d'oxydation du côté du méthyle **113** en mélange avec l'imine **116**, produit secondaire de la réaction.

Une seconde méthode d'oxydation par la para-benzoquinone a également conduit à la formation du composé **113**.

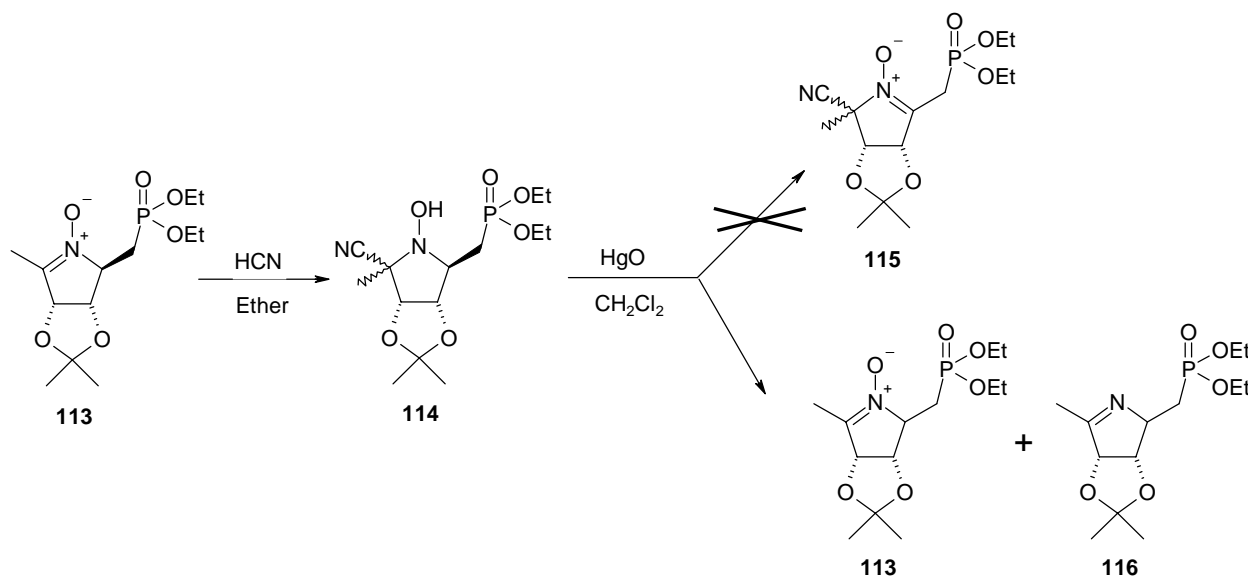


Schéma 4.52. Formation de l'insaturation souhaitée.

Méthode d'inversion pour les composés dérivés des cyclo-addition 1,3-dipolaire

Pour les adduits bicycliques obtenus lors des cyclo-additions 1,3-dipolaire, nous avons envisagé l'inversion de la position pseudo-anomérique en suivant la méthode de Tuffariello^{175,176}.

Cette méthode qui consiste à ouvrir l'adduit bicyclique par oxydation par un peracide permet alors d'obtenir la nitroène correspondante, nous aurions alors pu effectuer la même suite de réaction prévue que pour les composés obtenus par substitution nucléophile.

Cette méthode a été reprise par le groupe de Nakata¹⁷⁷ et par le groupe d'Ali^{174,178} afin d'inverser les positions souhaitées des composés synthétisés. L'oxydation se fait généralement du côté le moins encombré mais Ali a démontré qu'avec l'utilisation d'un solvant polaire contrairement à l'utilisation du dichlorométhane, il est possible d'obtenir un mélange des deux nitrones dans des proportions quasi équivalentes.

Nous avons effectué parallèlement l'oxydation de notre adduit bicyclique phosphoré **81b** par du mCPBA en présence d'éthanol (schéma 4.53).

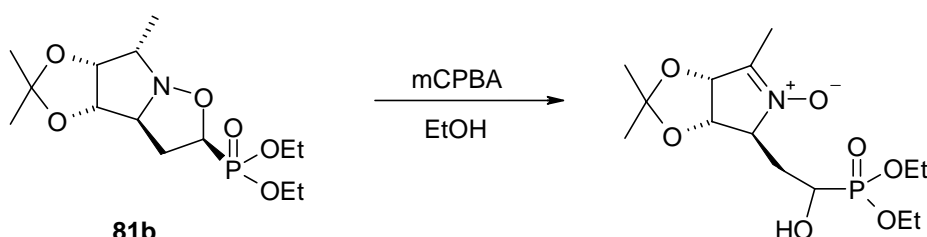


Schéma 4.53. Oxydation de l'adduit bicyclique **81b**.

Malheureusement, cette réaction a conduit exclusivement au produit d'oxydation non souhaité c'est-à-dire avec la double liaison du côté du méthyle comme pour les produits obtenus par oxydation au mercure.

Conclusion

Plusieurs méthodes ont donc été testées en vain pour inverser la position pseudo-anomérique. La méthode oxydation-réduction, de même que l'oxydation de l'adduit bicyclique ne permettent pas d'obtenir le produit d'oxydation souhaité.

Une autre stratégie pourrait encore être expérimentée: celle-ci consiste en l'acylation de l'azote suivie de l'ouverture de l'aminosucré par déprotonation en position 1' réalisée par une base forte telle que le LDA. La présence d'une base plus faible pourrait alors permettre la cyclisation avec inversion de configuration au niveau du carbone 2 (schéma 4.54).

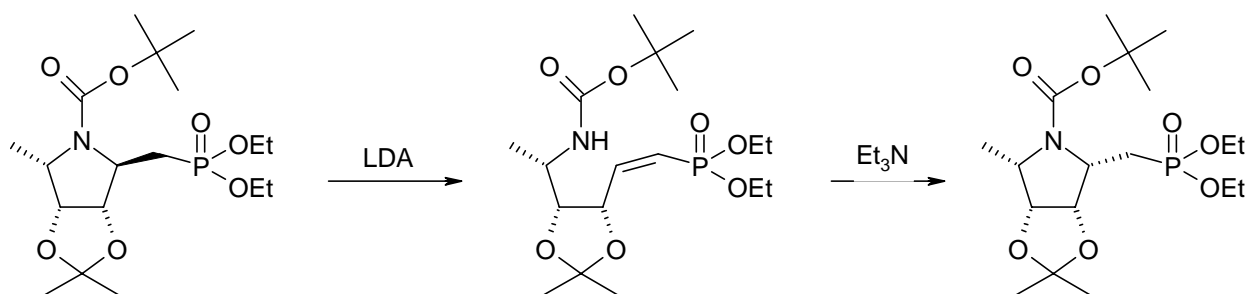


Schéma 4.54. Stratégie possible d'inversion.

5. Tests enzymatiques

Afin d'être initié à la méthode de tests enzymatiques sur les fucosyltransférases, nous avons été accueillis dans le laboratoire du Pr. Lubineau à Orsay qui possède le matériel adéquat pour tester toutes les molécules synthétisées.

D'autre part, tous les composés synthétisés précédemment ont été évalués sur l' α -L-fucosidase de reins de bœuf (*Bovine Kidney*) dans le but de connaître leur pouvoir inhibiteur.

Résultats préliminaires sur la fucosyltransférase III

Des tests préliminaires ont donc été réalisés sur l' α -(1,3)-fucosyltransférase III afin d'estimer le pouvoir inhibiteur de nos produits. Notons également que les composés ont pour but d'être testé sur l' α -(1,3)-fucosyltransférase VII. Les résultats suivants ne sont donc que formels.

Tous les produits testés ont un IC_{50} supérieur à 25 mM qu'ils soient testés en synergie ou non. Toutefois 4 produits montrent un pourcentage d'inhibition de 15 à 40 % par rapport au GDP pour les tests en synergie. Il est donc essentiel d'étudier plus précisément ces produits en essayant d'inverser la configuration au niveau du carbone anomérique et d'y greffer le motif guanosine.

Nos deux «meilleurs» inhibiteurs sont les composés **107** et **108** avec un IC_{50} d'environ 1 mM (schéma 4.51).

Il est important de souligner que le composé **107** n'étant pas purifié, il a été testé en mélange avec les composés **106** et **108**. Il est donc difficile d'analyser et de savoir si cette inhibition est bien due à **107**, **106** n'étant pas actif, où si elle correspond au composé **108**. Les tests de ces deux molécules seraient donc à approfondir après purification optimisée des composés pour vérifier leur pouvoir inhibiteur.

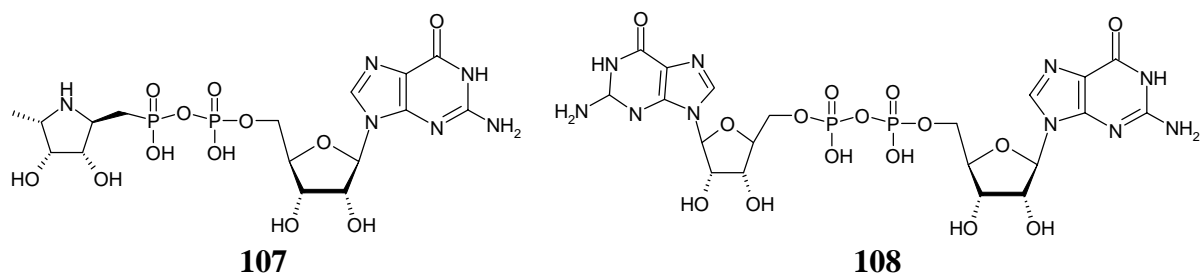


Schéma 5.55. Les composés pyrophosphates.

L'imino-sucré **55**, qui est notre structure de base, a également été testé sur la fucosyltransférase III. Ce produit montre peu d'inhibition lorsqu'il est testé seul, cependant le milieu très basique, dû à la présence de baryte dans le milieu, peut perturber cette inhibition. Lors du test en synergie, une inhibition significative est obtenue à $[I] = 12,5$ mM. La constante d'inhibition de ce produit n'a pas été déterminée mais ces résultats préliminaires confirment notre hypothèse de départ sur cette structure de base. Nous pouvons également émettre l'hypothèse que les produits obtenus par greffage de chaînes sur cette structure pourraient être plus actifs vis-à-vis de l' α -(1,3)-fucosyltransférase si la double liaison était conservée afin de garder toujours une imine. En effet, le caractère sp^2 conféré par la double liaison permettrait d'éventuellement mieux mimer l'ion oxocarbénium qui se forme dans le site actif de l'enzyme lors de l'état de transition.

Inhibition de l' α -L- fucosidase

Les résultats vis-à-vis de l' α -L-fucosidase sont rapportés dans les deux schémas suivants (schéma 4.56 et 4.57).

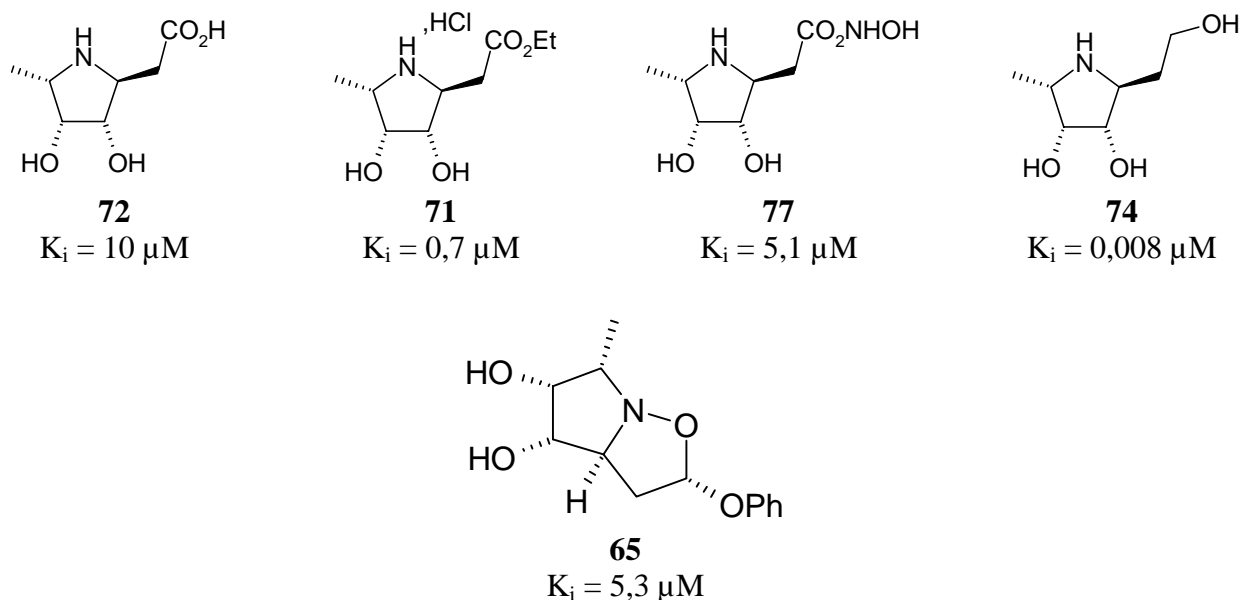


Schéma 4.56. Inhibition de l' α -L-fucosidase pour les dérivés substitués par des chaînes carbonés.

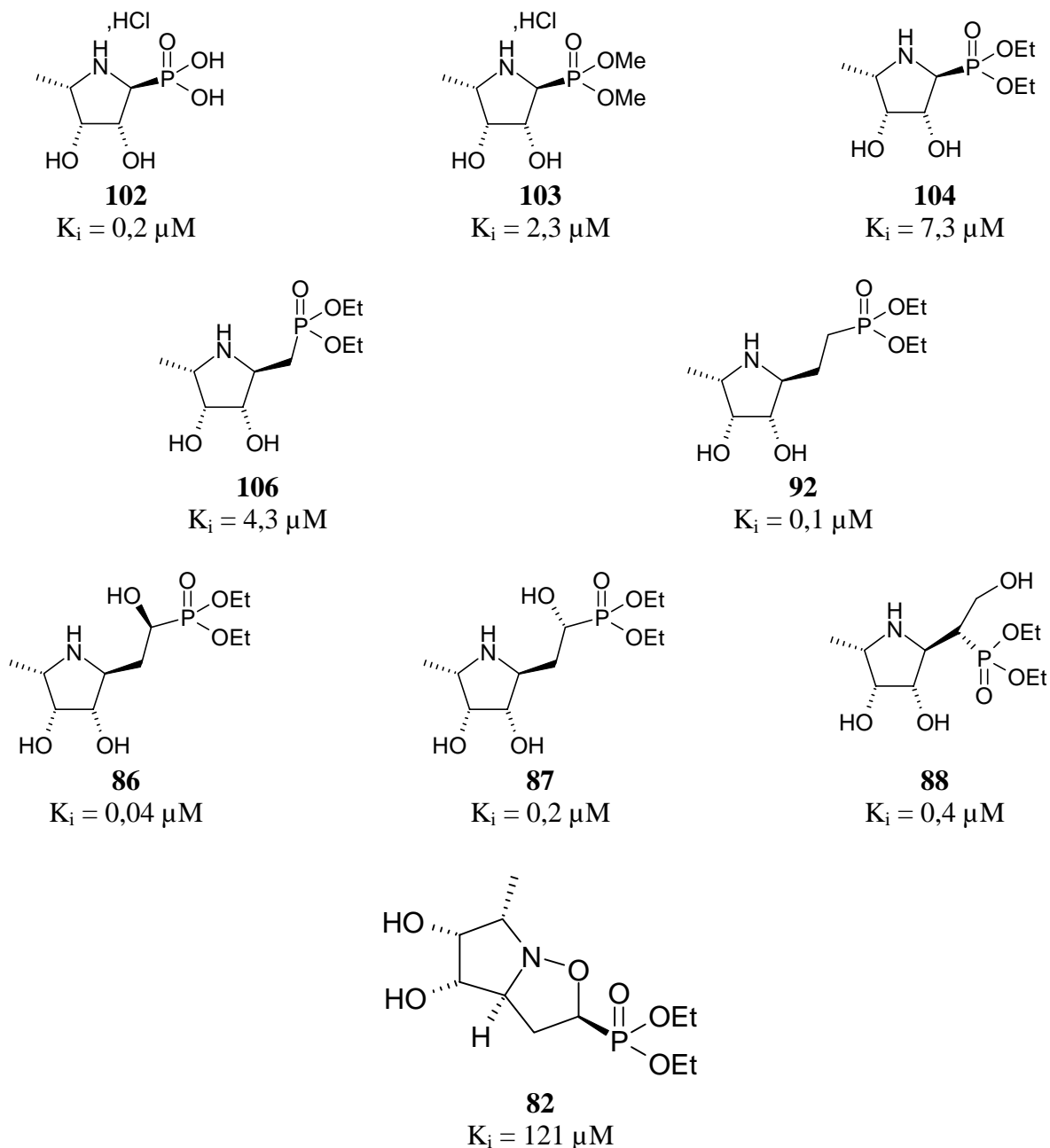


Schéma 4.57. Inhibition de l' α -L-fucosidase pour les dérivés substitués par des chaînes phosphorés.

Parmi ces composés dérivés de l'amino-sucre, nous avons donc obtenu de puissants inhibiteurs d' α -L-fucosidase qui font parties des plus puissants connus à ce jour. Cependant, ceci nous confirme que certains de ces produits ne seront pas des inhibiteurs intéressants pour la fucosyltransférase qui possède un mécanisme de configuration inverse.

Les produits **74** (8 nM) et **86** (40 nM) portant un groupe hydroxyle en β sont de puissants inhibiteurs d' α -L-fucosidase. Les autres dérivés sont de bons inhibiteurs de cette enzyme avec des constantes d'inhibition de l'ordre du micromolaire.

D'autre part, les composés **86** et **87** comportant également une chaîne $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$ font partie des meilleurs inhibiteurs que nous avons synthétisés. Nous remarquerons par ailleurs l'influence de la stéréochimie du groupement hydroxyle.

Un groupement hydroxyle en position 2' améliore l'inhibition, ce qui peut indiquer qu'il y aurait une poche hydrophile dans le site actif de l'enzyme.

Nous remarquons également que la longueur de la chaîne peut aider à la reconnaissance dans le site actif de l'enzyme. En effet, si nous comparons les phosphonates d'éthyle **104**, **106** et **92**, l'inhibition augmente avec la longueur de chaîne comportant le même motif phosphonate.

Le groupement porté par le phosphore joue également un rôle important dans la reconnaissance des composés par l'enzyme. Nous remarquons que l'inhibition diminue avec l'encombrement des phosphonates. Nous pourrions alors émettre l'hypothèse qu'un composé avec une chaîne $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}(\text{OH})_2$ pourrait être un bon inhibiteur d' α -L-fucosidase.

Des composés beaucoup plus volumineux tels que les adduits bicycliques sont peu reconnus par le site actif de l'enzyme.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif majeur de ce travail a été de synthétiser des composés amino-saccharidiques potentiellement inhibiteurs de fucosyltransférases en s'appuyant le savoir-faire du laboratoire dans le domaine de la chimie des sucres.

Le mécanisme catalytique des fucosyltransférases et des fucosidases, au cours de la réaction enzymatique, présentent des états de transition où la structure du sucre formé semble identique. C'est pourquoi l' α -L-fucosidase a été notre modèle de reconnaissance pour les analogues du fucose. Dans cette optique, la synthèse d'un précurseur de type aminosucre et le choix d'un puissant inhibiteur de fucosidase ont été élaborés. Cette synthèse a été conduite à partir d'acides tartriques avec insertion de l'atome d'azote afin d'obtenir les motifs aminotétroses désirés.

Dans le but de substituer une structure de base pour nous diriger vers des inhibiteurs potentiels de fucosyltransférases, nous avons établi une nouvelle voie de synthèse d'un aminosucre de la série L-lyxose qui permet le greffage de différentes chaînes.

Ce dernier a été synthétisé à partir du D-ribose via un intermédiaire clé facilement fonctionnalisable: une nitroène.

Les propriétés réactionnelles de celle-ci ont permis d'appliquer deux types de réactions importantes, la cyclo-addition 1,3-dipolaire et la substitution nucléophile, facilitant notamment l'introduction des groupements phosphonates et hydroxamiques.

De plus, une chimie des phosphonates et en particulier le couplage phosphonate-phosphate ont été étudiés.

Ces différentes méthodes de synthèse nous ont permis d'obtenir une série de différents composés prometteurs et de valider notre concept chimique.

Afin d'être le plus proche possible de la conformation du GDP-fucose, il a toutefois fallu entreprendre des réactions d'inversion du centre pseudo-anomérique de ces produits, ce dernier se formant spontanément en position α . Après de nombreuses tentatives, le problème reste entier car nous n'avons pour l'instant pas réussi à mener à bien cette inversion de configuration.

Hormis les essais de routine sur les fucosidases, nous avons de plus évalué nos molécules sur les fucosyltransférases afin de nous familiariser avec ces tests. Il faudra cependant avoir les molécules avec la bonne configuration au niveau du carbone pseudo-anomérique pour une analyse complète de nos résultats.

Les perspectives de ce travail seront d'élaborer une méthode d'inversion du carbone pseudo-anomérique afin d'obtenir des composés de configuration β . Une nouvelle stratégie synthétique sera peut-être à envisager à partir de nouveaux réactifs de départ.

D'autre part, une optimisation de la réaction de couplage entre phosphonate et surtout une bonne méthode de purification de ces composés serait à développer.

Par la suite, les nouveaux composés en série β pourront alors être testés sur l' α -(1,3)-fucosyltransférase de type VII afin d'évaluer leur pouvoir inhibiteur et leur intérêt thérapeutique.

PARTIES EXPERIMENTALES

PARTIE EXPERIMENTALE : CHIMIE

PARTIE EXPERIMENTALE : TESTS ENZYMATIQUES

PARTIE EXPERIMENTALE : CHIMIE

1. Généralités

2. Partie expérimentale de la partie I

- **Synthèse en série L-thréose**
- **Synthèse en série D-thréose**

3. Partie expérimentale de la partie II : Synthèse en série L-lyxose

- **Synthèse de la nitrone à partir du ribitol**
- **Synthèse de la nitrone en série L-lyxose**

4. Partie expérimentale de la partie II : Fonctionnalisation de la nitrone

- **Synthèse du réactif**
- **Cycloadditions 1,3-dipolaire**
- **Synthèse des esters**
- **Synthèse des dérivés des esters**
- **Synthèse d'acides hydroxamiques**
- **Cycloadditions 1,3-dipolaire avec les composés phosphorés**
- **Synthèse des produits phosphorés dérivés de la cycloaddition**
- **Synthèse par substitutions nucléophiles**
- **Synthèse du dérivé pyrophosphate**
- **Inversion de la position anomérique**

Généralités

- **Montages**

Les réactions sont conduites dans des montages en verre sous agitation magnétique et la plupart du temps sous argon U.

- **Chromatographies**

Sauf indication contraire, les réactions sont suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de silice *Merck 60 F₂₅₄* sur support aluminium.

La révélation est réalisée à la lumière ultra-violette UV ($\lambda = 254$ nm) puis au réactif phosphomolybdique, solution éthanolique à 5 % d'acide phosphomolybdique $\text{PH}_3(\text{MO}_3\text{O}_{10})_4$, en chauffant à environ 100-200 °C.

Les séparations chromatographiques ont été effectuées par chromatographie flash sur gel de silice *Merck 60* (230-400 Mesh) ou par chromatographie sur couche mince préparative sur gel de silice *Merck 60* (60 Mesh).

- **Solvants**

Tous les solvants utilisés ont été préalablement distillés.

Les solvants anhydres sont préparés comme suit:

- l'ether diéthylique, séché sur CaCl_2 , est distillé puis conservé sur fil de sodium.
- l'acétonitrile distillé sur P_2O_5 et K_2CO_3 puis stocké sur tamis 3 Å.
- le dichlorométhane est distillé juste avant utilisation sur P_2O_5 .
- le tétrahydrofurane est distillé juste avant utilisation sur fil de sodium.
- la pyridine et la triéthylamine sont distillées et conservées sur KOH en pastilles.
- le toluène, prédistillé sur KOH, est distillé puis stocké sur fil de sodium.

Les distillations sur fil de sodium sont réalisées en présence de benzophénone.

- **Réactifs**

Les réactifs sont commerciaux et engagés sans purification préalable, après vérification de leur état par mesure du point de fusion ou spectroscopie RMN ^1H .

- **Appareillage**

Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés à 250 MHz sur un spectromètre *Bruker ACF 250* ou à 400 MHz sur spectromètre *Bruker série Avance*. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au TMS (SiMe_4) pour CDCl_3 et MeOD ou TSPD₄ ($\text{Me}_3\text{SiCD}_2\text{CD}_2\text{CO}_2\text{Na}$) pour D_2O . Les constantes de couplages J sont exprimées en Hertz (Hz).

Les spectres RMN ^{13}C ont été enregistrés à 62,9 MHz sur un spectromètre *Bruker ACF 250* ou à 100,6 MHz sur spectromètre *Bruker série Avance*. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au CDCl_3 (77,03 ppm), au MeOD (30 ppm) ou au dioxane (67,34 ppm) pour D_2O . Les attributions sont faites par enregistrements de spectres 2D (HMQC).

Les spectres RMN ^{31}P ont été enregistrés à 161,9 MHz sur spectromètre *Bruker série Avance*. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport à PO_4H_3 à 80 % en référence externe.

Les points de fusion corrigés (F) sont mesurés sur banc *Kofler*.

Les spectres infra-rouge (IR) sont enregistrés sur spectromètre *Perkin Elmer 175 G* ou sur *Nicolet 205 FT-IR* soit après formation d'une pastille de KBr ou en solution. Les nombres d'ondes (ν) sont exprimés en cm^{-1} .

Les pouvoirs rotatoires ($[\alpha]_D^{20}$) sont mesurés à 20°C par rapport à la raie D du sodium sur un polarimètre *Schmidt-Haensch Polartronic Universal* ou sur *Perkin Elmer Model 341 LC*. Les concentrations (C) sont exprimées en grammes pour 100 mL.

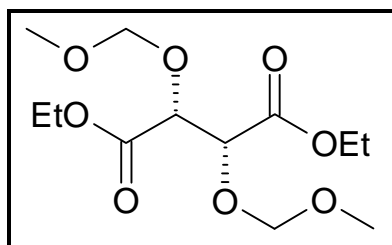
Les analyses élémentaires, exprimées en pourcentage, ont été réalisées par le Service de Microanalyse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, du CNRS à Gif sur Yvette ou par le Service Centrale d'Analyse du CNRS à Vernaison.

Les spectres de masse ont été réalisés par le service d'analyse de **Basilea Pharmaceutica**.

2. Partie expérimentale: synthèse en série tétrose

- Synthèse en série L-thréose

2,3-Di-O-(méthoxyméthyl)-L-tartrate d'éthyle: 23



$C_{12}H_{22}O_8$
 $M = 294,30 \text{ g/mol}$
 Huile
 $[\alpha]_D = -174,1$ ($c = 1,31$; $CHCl_3$)
 CCM: Rf = (CH_2Cl_2/Et_2O 8/2)

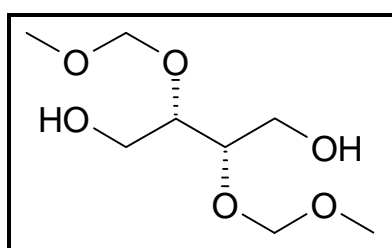
Dans un erlenmeyer de 250 mL, une solution de 40 mL de dichlorométhane et 45 mL de méthylal (0,51 mmol, 10 éq.) sont agités avec 27,6 g de P_2O_5 (0,19 moles). Une solution de 10,3 g de tartrate d'éthyle (50 mmol) dans 60 mL de CH_2Cl_2 est ajoutée à cette suspension. A l'addition de la solution de tartrate, la suspension d'anhydride phosphorique devient une pâte épaisse. Après 2 heures d'agitation, 7 g d'anhydride phosphorique sont rajoutés. Après 1 heure d'agitation la solution est décantée dans un erlenmeyer contenant 10 g de Na_2CO_3 , le résidu pâteux est lavé par 2*50 mL de dichlorométhane. Les différentes phases sont réunies, filtrées puis évaporées pour donner 15,9 g de produit brut qui est utilisé sans purification pour la suite, celui-ci étant suffisamment pur.

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz, TA): 1,32 (6H, t, 2 OCH_2CH_3); 3,36 (6H, s, 2 OMe); 4,25 (4H, m, 2 OCH_2CH_3); 4,68 (2H, d, 2 $OCHHO$); 4,72 (2H, s, H-2, H-3); 4,80 (2H, d, $OCHHO$).

$J_{CH_2, CH_3} = 7,2$; $J_{H,H(Mom)} = 7,1 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,5 MHz, TA) : 14,0 (2 OCH_2CH_3); 56,1 (2 OMe); 61,3 (2 OCH_2CH_3); 75,7 (C-2, C-3); 96,5 (2 OCH_2O); 168,8 (2 C=O).

2,3-Di-O-(méthoxyméthyl)-L-thréitol: 24



$C_8H_{18}O_6$
 $M = 210,23 \text{ g/mol}$
 Cristaux blancs
 $F = 62-63 \text{ }^\circ C$
 $[\alpha]_D = -42 \text{ }^\circ$ ($c = 1$; $CHCl_3$); -8 ° ($c = 0,2$; MeOH)
 CCM: $Et_2O/MeOH$ 9/1

Dans un ballon de 1 L, une suspension grise de 2,85 g de $LiAlH_4$ (75 mmol, 1,5 éq.) dans 200 mL d'éther anhydre est agitée sous argon. Après avoir plongé ce ballon dans un bain de glace, 16 g de tartrate d'éthyle protégé dans 150 mL d'éther anhydre sont ajoutés. La solution est alors agitée à température ambiante pendant 2h. 15 g de $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ (47 mmol) sont alors ajoutés afin de neutraliser le $LiAlH_4$ restant en solution. Il se forme alors un dégagement gazeux. 15 mL de NaOH aqueux à 10 % (2,5 M) sont ensuite ajoutés. Le précipité gris obtenu passe au blanc. On laisse agiter quelques instant puis on filtre le précipité sur célite en lavant à l'éther puis à l'acétate d'éthyle. Le filtrat est ensuite évaporé et on

obtient 10,7 g de résine qui cristallise au réfrigérateur. Le produit est purifié par recristallisation dans *i*Pr₂O à 0°C et on obtient alors 7,98 g (Rdt = 76 %) de fines aiguilles incolores.

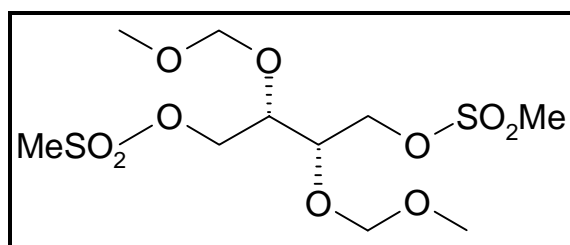
IR (cm⁻¹, KBr): 3440, 2930, 1362, 1210, 1153, 1092, 1015, 973, 910, 845, 810, 758.

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, TA) : 2,95 (2H, t, 4 OH-1, OH-4); 3,44 (6H, s, 2OMe); 3,74 (2H, m, H-2, H-3); 3,76 (4H, m, 2 CH₂(1,4)); 4,72 (2H, d, OCH₂O); 4,76 (2H, d, OCH₂O).

$J_{1-OH1} = 5,1$; $J_{O-CH_2-O} = 6,8$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz, TA) : 55,8 (2 OMe); 61,7 (2 CH₂OH); 79,9 (C-2, C-3); 97,3 (2 OCH₂O).

1,4-Di-*O*- méthanesulfonyl-2,3-di-*O*-(méthoxyméthyl)-L-thréitol: 25



C₁₀H₂₂O₁₀S₂

M = 368,30 g/mol

Résine incolore

$[\alpha]_D = -9^\circ$ (c = 1; CHCl₃)

CCM: Et₂O/ MeOH 9/1

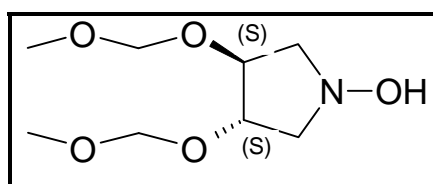
Dans un ballon de 100 mL, 2 g de diol (9,5 mmol) sont agités sous argon dans 20 mL de CH₂Cl₂ anhydre et 7,92 mL de triéthylamine (57 mmol, 6 éq.). Sur un bain de glace, une solution de 2,22 mL (28,6 mmol, 3 éq.) de chlorure de méthane sulfonyle dans 25 mL de dichlorométhane anhydre est ajoutée. Après 1 heure d'agitation, la solution est versée dans un mélange eau / glace. La phase aqueuse est alors extraite 3 fois à l'éther (20-50 mL), les phases organiques sont lavées 3 fois à l'eau, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. 3,22 g de résine incolore est alors obtenue. Le produit obtenu est pur.

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, TA) : 3,07 (6H,s, 2 SO₂Me); 3,42 (6H, s, 2 OMe); 4,05 (2H, m, H-2, H-3); 4,35 (2H, dd, H_a-1, H_a-4); 4,46 (2H, dd, H_b-1, H_b-4); 4,74 (2H, d, 2OCHHO); 4,76 (2H, d, 2 OCHHO).

$J_{1a,2} = 5,4$; $J_{1b,2} = 4,1$; $J_{1a,1b} = 10,7$; $J_{OCH_2O} = 7$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz, TA) : 37,5 (SO₂Me); 56,1 (OMe); 67,8 (C-1, C-4); 74,9 (C-2, C-3); 97,4 (OCH₂O).

1,4-(*N*-hydroxy)imino-2,3-di-*O*-(méthoxyméthyl)-1,4-didésoxy-L-thréitol: 20



C₈H₁₇O₅N

M = 207,23 g/mol

Cristaux incolores

F = 60-61 °C

$[\alpha]_D = -17^\circ$ (c = 1; CHCl₃)

CCM: Et₂O/ MeOH 9/1

Dans un ballon de 50 mL, on porte à reflux une suspension agitée de 2,62 g de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (37,7 mmol, 5,6 éq.) et 2,84 g de dimésylate (6,7 mmol) dans 28,5 mL de triéthylamine. La réaction est rapide. Il se forme une abondante masse semi-cristalline blanche de chlorhydrates. Après 1 heure de réaction, on évapore la triéthylamine puis 50 mL d'éther sont ajoutés. On décante puis le précipité est lavé 2 fois à l'éther. Les phases organiques sont évaporées pour donner 1,62 g de N-hydroxypyrrolidine sous forme de cristaux incolores. Le produit obtenu est purifié par dissolution dans l'éther, décantation et évaporation. Les cristaux obtenus sont lavés à $i\text{Pr}_2\text{O}$ au bain de glace et on obtient 1,3 g (Rdt = 98%) de produit pur.

IR (cm^{-1} , KBr): 3160, 2860, 1465, 1430, 1385, 1225, 1210, 1200, 1148, 1110, 1058, 1032, 1008, 965, 935, 912.

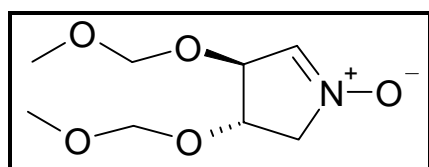
RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, TA) : 1,7 (1H, s large, NOH); 3,07 (2H, d large, H_{a-1} , H_{a-4}); 3,38 (6H, s, 2 OMe); 3,44 (2H, m large, H_{b-1} , H_{b-4}); 4,22 (2H, m, $H-2$, $H-3$); 4,66 (2H, d, OCHHO); 4,72 (2H, d, OCHHO).

$J_{1a,1b} = 11,4$; $J_{1a,2} = 4,8$; $J_{1b,2} = 4,8$; $J_{\text{OCH}_2\text{O}} = 6,8$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,5 MHz, TA) : 55,2 (2*OMe); 62,9 (C-1, C-4); 80,7 (C-2, C-3); 95,8 (2*OCH₂O).

Analyse élémentaire: Calculée: C 46,37	H 8,27	N 6,76
Trouvée: C 46,07	H 8,47	N 6,53

(3S,4S)-3,4-Bis(méthoxyméthoxy)-1-pyrroline-N-oxyde: 26



$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}$
 $M = 205,21$ g/mol
 Résine légèrement brune
 CCM: $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 9/1

Dans un ballon de 5 mL, une suspension de 0,25 g de HgO jaune (1,15 mmol, 1,2 éq.) dans 2,5 mL de CH_2Cl_2 est agitée. 0,20 g (0,96 mmol) de N-hydroxypyrrolidine sont ajoutés. La réaction est rapide, le précipité orange d'oxyde mercurique devient rapidement noir. Après 30 min. d'agitation à température ambiante, la solution est centrifugée, décantée puis le précipité est lavé 2 fois au dichlorométhane. Les phases organiques sont évaporées et on obtient 193 mg (Rdt = 97 %) de nitronne sous forme d'une résine légèrement brune. Le produit est pur.

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, TA) : 3,39 (3H, s, OMe); 3,40 (3H, s, OMe); 3,87 (1H, m, $H-5a$); 4,36 (2H, m, $H-5b$, $H-4$); 4,74 (1H, m, $H-3$); 4,69-4,75 (2H, 2d, OCHHO); 4,70-4,77 (2H, 2d, OCHHO); 6,94 (1H, t, $H-2$).

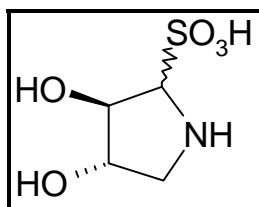
$J_{2,3} = 1,9$; $J_{\text{OCH}_2\text{O}} = 7,0$ Hz.

RMN ^1H (D_2O , 250 MHz, TA) : 3,44 (6H, s, 2 OMe); 4,00 (1H, ddt, $H-5a$); 4,50 (1H, dm, $H-5b$); 4,57 (1H, dt, $H-4$); 4,81 (2H, 2d, OCHHO); 4,85 (2H, 2d, OCHHO); 4,96 (1H, m, $H-3$); 7,39 (1H, q, $H-2$).

$J_{2,3} = 1,8$; $J_{3,4} = 2,4$; $J_{5a,2} = 1,8$; $J_{5a,3} = 1,0$; $J_{5a,4} = 2,6$; $J_{5b,2} = 1,8$; $J_{5b,3} = 1,6$; $J_{5b,4} = 6,8$; $J_{5a,5b} = 14,2$; $J_{\text{OCH}_2\text{O}} = 7,1$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,5 MHz, TA) : 55,6 (OMe); 55,8 (OMe); 66,9 (C-5); 76,9 (C-4); 82,7 (C-3); 96,1 (OCH_2O); 96,2 (OCH_2O); 132,2 (C-2).

Acide 4-amino-1,4-didésoxy-L-thréose-1-sulfonique: 27



$\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_5\text{NS}$
 $M = 183,18 \text{ g/mol}$
 Cristaux blancs
 $F = 200-210$ (déc.)

La nitrone (213 mg, 0,98 mmol) est dissoute dans H_2SO_4 1N et est placée sous SO_2 à température ambiante pendant 2 jours. 1 mL d'éthanol sont alors ajoutés. Des cristaux sont obtenus et isolés par centrifugation. On obtient alors un mélange de 81 mg des deux anomères α (dérivé majoritaire) et β (dérivé minoritaire) dans les proportions 75/25 (Rdt = 41 %).

RMN ^1H (D_2O , 250 MHz, TA) :

Dérivé majoritaire: 3,45 (1H, dd, H-4b); 3,63 (1H, dd, H-4a); 4,36 (1H, q, H-3); 4,41 (1H, d, H-1); 4,47 (1H dd, H-2)

$J_{1,2} = 5,2$; $J_{2,3} = 3,3$; $J_{3,4a} = 5,3$; $J_{4a,4b} = 12,2$; $J_{4b,3} = 4,1$; $J_{4b,2} = 1,0$ Hz.

Dérivé minoritaire: 3,38 (1H, d, H-4b); 3,86 (1H, dd, H-4a); 4,44 (1H, dd, H-3); 4,54 (1H, dd, H-2); 4,76 (1H, d, H-1)

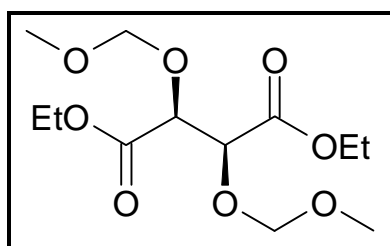
$J_{1,2} = 3,3$; $J_{2,3} = 1,8$; $J_{3,4a} = 4,3$; $J_{4a,4b} = 11,8$; $J_{4b,3} = 1,0$ Hz.

Analyse élémentaire: Calculée (+10 % d'aminosucres):

C 27,18	H 5,13	N 7,65	S 16,30
Trouvée: C 27,00	H 5,29	N 7,60	S 15,84

- Synthèse en série D-thréose

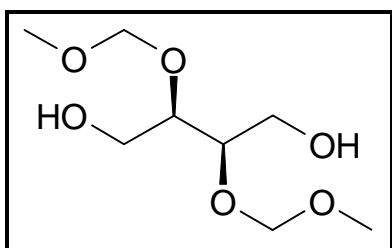
2,3-Di-O-(méthoxyméthyl)-D-tartrate d'éthyle: 12



$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_8$
 $M = 294,30 \text{ g/mol}$
 Huile
 $[\alpha]_D = +173^\circ$ ($c = 1$; CHCl_3)
 CCM: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ 8/2

Même mode opératoire qu'en série L avec 12 g de P_2O_5 (0,085 moles), 22 mL (0,25 mmol, 10 éq.) de méthylal, 5 g (24 mmol) de tartrate d'éthyle dans 50 mL de dichlorométhane. 7,2 g de produit pur sont obtenus.

RMN ^1H et RMN ^{13}C : Idem de l'énantiomère en série L

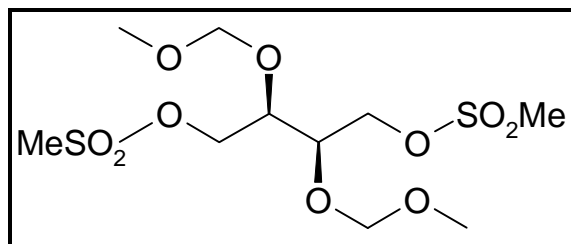
2,3-Di-O-(méthoxyméthyl)-D-thréitol: 13

$C_8H_{18}O_6$
 $M = 210,23 \text{ g/mol}$
 Aiguilles incolores
 $F = 62-63 \text{ }^\circ\text{C}$
 $[\alpha]_D = +43 \text{ }^\circ (c = 0,1; CHCl_3)$
 CCM: Et₂O/ MeOH 9/1

Même mode opératoire qu'en série L avec 1,5 g de LiAlH₄ (39 mmol, 1,5 éq.) dans 100 mL d'éther anhydre, 7,2 g de tartrate d'éthyle protégé bien sec dans 75 mL d'éther anhydre pour obtenir 3,98 g (Rdt = 78 %) de fines aiguilles blanches.

IR, RMN ¹H, RMN ¹³C: Idem de l'énantiomère en série L

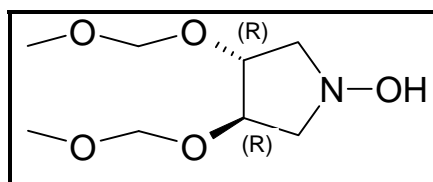
Analyse élémentaire: Calculée: C 45,71	H 8,63
Trouvée: C 45,61	H 8,64

1,4-Di-O- méthanesulfonyl-2,3-di-O-(méthoxyméthyl)-D-thréitol: 15

$C_{10}H_{22}O_{10}S_2$
 $M = 368,30 \text{ g/mol}$
 Résine incolore
 $[\alpha]_D = +10 \text{ }^\circ (c = 1; CHCl_3)$
 CCM: Et₂O/ MeOH 9/1

Même mode opératoire qu'en série L avec 3,73 g de diol (17,7 mmol) dans 50 mL de CH₂Cl₂ anhydre et 15 mL de triéthylamine (0,11 mmol, 6 éq.). Une solution de 4,2 mL (54 mmol, 3éq.) de chlorure de méthane sulfonyle dans 50 mL de dichlorométhane anhydre est ajoutée. On obtient 6,92g de résine incolore pure.

RMN ¹H, RMN ¹³C: Idem de l'énantiomère en série L.

1,4-(N-hydroxy)imino-2,3-di-O-(méthoxyméthyl)-1,4-didésoxy-D-thréitol ou (3R,4R)-N-Hydroxy-3,4-bis(méthoxyméthoxy)pyrrolidine: 9

$C_8H_{17}O_5N$
 $M = 207,23 \text{ g/mol}$
 Cristaux incolores
 $F = 60-61 \text{ }^\circ\text{C}$
 $[\alpha]_D = +16 \text{ }^\circ (c = 1; CHCl_3)$
 CCM: Et₂O/ MeOH 9/1

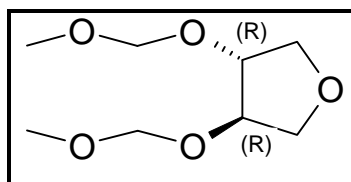
Même mode opératoire qu'en série L avec 6 g de NH₂OH.HCl (86 mmol, 4 éq.) et 6,92 g de dimésylate (17,7 mmol) dans 60 mL de triéthylamine. On obtient 3 g de cristaux (Rdt = 82 %).

IR, RMN ¹H , RMN ¹³C: Idem de l'énantiomère en série L.

Analyse élémentaire: Calculée: C 46,37 H 8,27 N 6,76
 Trouvée: C 46,31 H 8,53 N 6,58

Un produit secondaire est obtenu par cette réaction:

(3R,4R)-3,4bis(méthoxyméthoxy)tétrahydrofurane: 21



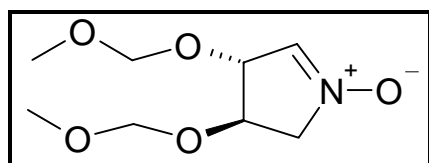
C₈H₁₆O₅
 M = 192 g/mol
 Résine

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, TA): 3,38 (6H, d large, 2 OMe); 3,81 (2H, d large, *Ha*-2, *Ha*-5); 4,01 (2H, dd, *Hb*-2, *Hb*-5); 4,23 (2H, m, *H*-3, *H*-4); 4,68 (2H, d, OCHHO); 4,71 (2H, d, OCHHO).

*J*_{2a,2b} = 9,9; *J*_{2a,3} = 2,4; *J*_{2b,3} = 4,2; *J*_{CH2} = 6,8 Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz, TA): 55,4 (2OMe); 71,7 (*C*-1, *C*-4); 80,6 (*C*-2, *C*-3); 95,5 (2 OCH₂O).

(3R,4R)-3,4-Bis(méthoxyméthoxy)-1-pyrroline-*N*-oxyde ou 4-Hydroxylamino-2,3-di-*O*-(méthoxyméthyl)4-désoxy-*D*-thréitol: 17



C₈H₁₅O₅N
 M = 205,21 g/mol
 Résine légèrement brune
 CCM: Et₂O/ MeOH 9/1

Même mode opératoire qu'en série L avec 0,63 g de HgO (2,9 mmol, 1,2 éq.) dans 6 mL de CH₂Cl₂ et 0,50 g (2,42 mmol) de *N*-hydroxypyrrolidine. On obtient 0,47 g (Rdt = 95 %) de nitronne sous forme d'une résine pure légèrement brune

RMN ¹H, RMN ¹³C: Idem de l'énantiomère en série L.

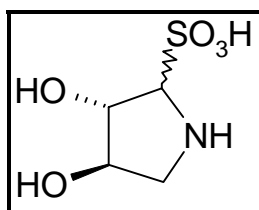
Spectre de masse Haute Résolution (FAB+):

Ion [M+H]⁺: formule brute C₈H₁₅O₅N; *m/z* théorique 206,102848; *m/z* trouvée 206,103518

Acide (2S,3R)-4-amino-1,4-didésoxy-*D*-thréose-1-sulfonique: 18

Le produit dissout dans D₂O et alors placé sous SO₂.

On obtient alors un mélange des deux anomères α (dérivé majoritaire) et β (dérivé minoritaire) dans les proportions 75/25.



$C_4H_9O_5NS$
 $M = 183,18 \text{ g/mol}$
 Cristaux blancs
 $F = 200-210^\circ\text{C}$

IR (cm^{-1} , KBr): 3420, 3040, 2800, 1575, 1420, 1260, 1230, 1175, 1105, 1070, 1050, 1025, 990.

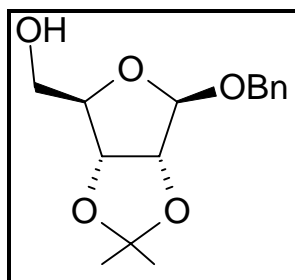
RMN ^1H : Idem de l'énantiomère en série L.

Spectre de masse Haute Résolution (FAB+):

Ion $[M+H]^+$: Formule brute: $C_4H_9O_5NS$; m/z théorique: 206,102848; m/z trouvé: 206,103519

3. Partie expérimentale: synthèse en série L-lyxose

2,3-*O*-Isopropylidène-D-ribofuranoside de benzyle: 35



$C_{15}H_{20}O_2$
 $M = 280,31 \text{ g/mol}$
 Cristaux blancs
 $[\alpha]_D = -94,4$ ($c = 1, \text{CHCl}_3$)
 $F = 104^\circ\text{C}$
 CCM: $R_f = 0,35$ (Cyclo/AcOEt 7/3)

Dans un Erlenmeyer de 250 mL, 10 g (66,7 mmol) de D-ribose sont agités à température ambiante dans 100 mL (0,97 mol) d'alcool benzylique et 1 mL (14 mmol) de chlorure d'acétyle soit 0,15 M de HCl. Lorsque le sucre est dissout (environ 3 heures), 4 g de céruse (15 mmol de Pb^{2+}) sont ajoutés et la solution est portée à 80°C au bain-marie pendant 15 minutes. Après refroidissement, la solution est filtrée sur célite, lavée à l'éther puis l'alcool benzylique est distillé sous vide ($Eb_1 = 85-89^\circ\text{C}$).

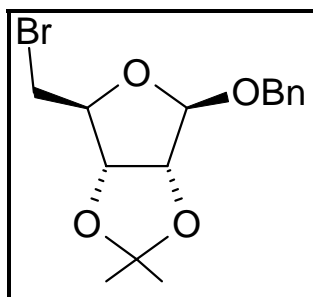
Le riboside de benzyle obtenu (67 mmol) est agité pendant 1 heure à température ambiante dans 200 mL d'acétone distillée et 1 g (6,17 mmol) de FeCl_3 sublimé. La solution devient rouille à l'addition du sel ferrique. Lorsque la réaction est terminée 20 mL de carbonate de sodium aqueux molaire sont ajoutés pour former un précipité rouille. L'acétone est évaporée et 200 mL d'AcOEt sont additionnés. Le précipité est décanté et la phase organique est lavée 2 fois par 10 mL de carbonate de sodium aqueux molaire puis 1 fois par 10 mL de NaCl aqueux. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis évaporée. 20,2 g de résine jaune contenant les deux anomères ribosides α et β sont obtenus. L'anomère β cristallise par addition de 50 mL d'éther isopropylique au bain de glace. Les cristaux sont filtrés, lavés puis séchés pour donner 9,66 g ($R = 52\%$) d'anomère β .

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, TA): 1,34 (3H, s, CH_3); 1,51 (3H, s, CH_3); 3,13 (1H, dd, OH); 3,58-3,74 (2H, m, 2 $H-5$); 4,25 (1H, t, $H-4$); 4,56 (1H, d, CHH-Ph); 4,77 (1H, d, CHH-Ph); 4,66 (1H, d, $H-3$); 4,85 (1H, d, $H-2$); 5,18 (1H, s, $H-1$); 7,34 (5H, s, Ph).

$J_{2,3} = 6,0$; $J_{\text{CH}_2-\text{Ph}} = 12,0$; $J_{5,4} = 6,0$; $J_{5,5'} = 8,0 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,5 MHz, TA): 24,65 (CH_3); 26,32 (CH_3); 63,78 (C-5); 81,47 (C-3); 85,75 (C-2); 88,18 (C-4); 107,79 (C-1); 111,96 (C-Me_2); 127,99 ($\text{C}_{\text{Ph-p}}$); 128,45 ($\text{C}_{\text{Ph-m}}$); 136,43 ($\text{C}_{\text{Ph-s}}$).

5-Bromo-2,3-O-isopropylidène-5-désoxy- β -D-ribofuranoside de benzyle: 36



$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{Br}$

$M = 343,22 \text{ g/mol}$

Huile jaune pâle

$[\alpha]_D^{20} = -84^\circ$ ($c = 1, \text{CHCl}_3$)

CCM: $R_f = 0,7$ (Cyclo/AcOEt 7/3)

5 g (0,02 mol) de ribose protégé sont dissous dans 30 mL de dichlorométhane anhydre sous argon. Deux équivalents (0,04 mol, 13,3 g) de tétrabromure de carbone et deux équivalents (0,04 mol, 10,5 g) de triphénylphosphine sont ajoutés à la solution placée au bain de glace afin de limiter la réaction exothermique. On agite à température ambiante sous argon pendant 5 heures. La solution est alors versée dans 200 mL d'éther afin de précipiter l'oxyde de triphénylphosphine puis une filtration sur fritté est effectuée pour éliminer le précipité. Enfin, on évapore la phase organique. Une purification par chromatographie sur colonne (C/A 9/1) permet d'obtenir le produit **2** (6,1 g, R = 100 %) sous forme d'une huile jaune pâle.

Seconde méthode:

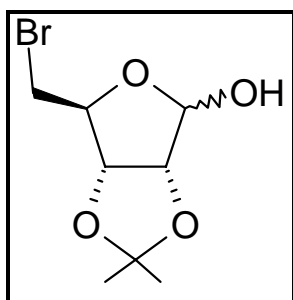
2 g (7,13 mol) de ribose protégé sont dissout dans 15 mL de CH_2Cl_2 anhydre. La solution est placée à 0 °C sous argon. 3,75 g (2 équivalents, 14,3 mol) de triphénylphosphine et 0,75 mL (2 équivalents, 14,3 mol) de Br_2 sont ajoutés à cette solution au bain de glace car la réaction est très exothermique. Enfin la solution est agitée pendant 2 heures à 40 °C (reflux) sous argon. Lorsque la réaction est totale, une solution de NaHCO_3 molaire est ajoutée à 0°C afin de stopper la réaction jusqu'à pH basique. La solution est reprise à l'éther puis lavée à l'eau. Les phases organiques sont séchées sur MgSO_4 , filtrées puis évaporées. La masse rouille obtenue est reprise dans l'éther puis l'éther isopropylique afin d'éliminer par précipitation une partie des sels d'oxyde de triphénylphosphine. Le surnageant est évaporée puis une filtration rapide sur gel de silice est effectuée (C/A 9/1) afin de donner 1,7 g de **2** (R = 70 %). ($R_f = 0,6$ C/A 7/3).

IR (ν , cm^{-1} , solution CH_2Cl_2): 2920, 1375

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, TA) : 1,32 (3H, s, CH_3); 1,49 (3H, s, CH_3); 3,42 (1H, t, H_{a-5}); 3,47 (1H, dd, H_{b-5}); 4,44 (1H, dd, $H-4$); 4,48 (1H, d, CH_2Ph); 4,70 (1H, d, $H-2$); 4,76 (1H, d, CH_2Ph); 4,78 (1H, d, $H-3$); 5,21 (1H, s, $H-1$); 7,33 (5H, m, $H-\text{Ph}$).

$J_{2,3} = 6,1$; $J_{3,4} = 3,6$; $J_{4,5a} = 6,1$; $J_{5a,5b} = 3,9$; $J_{4,5b} = 10$; $J_{\text{CH}_2\text{Ph}} = 11,3 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,5 MHz, TA) : 24,8 (CH_3); 26,3 (CH_3); 32,6 (CH_2-5); 69,5 (CH_2-Bn); 82,6 (C-3); 85,2 (C-2); 86,7 (C-4); 107,4 (C-1); 112,6 (C-Me_2); 128,0 ($\text{C}_{\text{Ph-p}}$); 128,1 ($\text{C}_{\text{Ph-o}}$); 128,5 ($\text{C}_{\text{Ph-m}}$); 136,7 ($\text{C}_{\text{Ph-s}}$).

5-Bromo-2,3-O-isopropylidène-5-désoxy-D-ribofuranose: 38

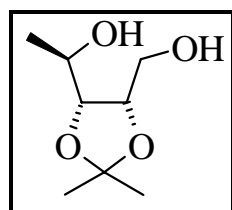
$C_8H_{13}O_4Br$
 $M = 253 \text{ g/mol}$
 Huile jaune pâle
 CCM: $R_f = 0,43$ (Cyclo/AcOEt 7/3)

100 mg de dérivé bromé sont hydrogénéolysés dans 2 mL d'éthanol en présence de 30 mg de Pd/C (5%) et 20 μl d'acide acétique à température ambiante pendant 1 heure. Lorsque la réaction est terminée, du carbonate de sodium est ajouté afin de neutraliser l'acide, agité pendant 15 minutes puis on élimine par centrifugation le palladium. On lave 3 fois à l'éthanol puis les phases organiques sont évaporées. Une purification par chromatographie sur silice est effectuée (C/A 7/3) pour donner 48 mg du produit débzylé ($R = 64 \%$). Ce produit est trop instable pour être analysé.

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, TA): 1,34 (3H, s, CH_3); 1,49 (3H, s, CH_3); 3,44 (1H, t, $H\text{-}5\text{a}$); 3,48 (1H, dd, $H\text{-}5\text{b}$); 4,42 (1H, dd, $H\text{-}4$); 4,66 (1H, d, $H\text{-}3$); 4,82 (1H, d, $H\text{-}2$); 5,52 (1H, s, $H\text{-}1$).

$J_{2,3} = 6,1$; $J_{3,4} = 3,6$; $J_{4,5\text{a}} = 6,1$; $J_{4,5\text{b}} = 10$; $J_{5\text{a},5\text{b}} = 3,9 \text{ Hz}$.

- **Synthèse de la nitrone à partir du ribitol**

5-désoxy -2,3-O-isopropylidène-D-ribitol: 39

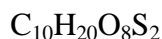
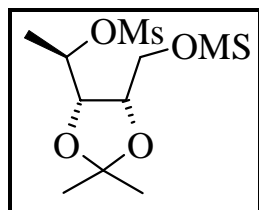
$C_8H_{16}O_4$
 $M = 175 \text{ g/mol}$
 Huile incolore
 $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3)
 CCM: $R_f = 0,08$ (Cyclo/AcOEt 7/3)

3 g (8,7 mmol) de ribose bromé sont dissous dans 30 mL d'éthanol et 30 mL (3 éq., 26 mmols) de potasse aqueuse 1N. On ajoute cette solution à 30 g de Ni/Ra préalablement lavé à l'éthanol sous hydrogène. L'hydrogénéolyse est suivie en CCM (C/A 7/3). Après 8h sous hydrogène à 50°C , le solide est centrifugé, lavé 3 fois à l'éthanol puis le surnageant est évaporé. Le produit est repris dans l'éther et centrifugé afin d'éliminer les sels de brome formés. Après évaporation, on obtient 1,15 g de ribitol ($R_{dt} = 100\%$).

RMN ^1H (D_2O , 250 MHz, TA): 1,34 (3H, d, $H\text{-}5$); 1,36 (3H, s, CH_3); 1,38 (3H, s, CH_3); 3,64 (1H, dq, $H\text{-}4$); 3,76 (1H, dd, $H\text{-}3$); 3,86 (1H, dd, $H\text{a}\text{-}1$); 3,92 (1H, dd, $H\text{b}\text{-}1$); 4,24 (1H, ddd, $H\text{-}2$); 4,85 (2H, s, OH).

$J_{1\text{a},1\text{b}} = 11,4$; $J_{1\text{a},2} = 8,6$; $J_{1\text{b},2} = 5$; $J_{2,3} = 5$; $J_{3,4} = 9$; $J_{4,5} = 5,6 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (D_2O , 62,5 MHz, TA): 18,0 ($C\text{-}5$); 25,2 ($C\text{-Me}_2$); 27,8 ($C\text{-Me}_2$); 58,0 ($C\text{-}1$); 65,7 ($C\text{-}4$); 77,1 ($C\text{-}3$); 81,3 ($C\text{-}2$); 108,3 ($C\text{q-Me}_2$).

1,4-Di-methanesulfonyl-5-désoxy-2,3-O-isopropylidène-D-ribitol: 51

M = 332 g/mol

Huile jaune

[α]_D²⁰ = -17° (c = 1, CHCl₃)

CCM: Rf = 0,4 (Toluène / MeOH 9/1)

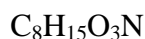
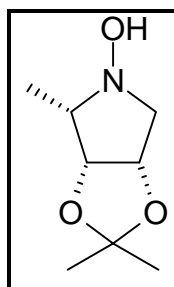
Rf = 0,22 (C/A 6/4)

1,5 g de diol sont dissous sous argon dans 15 mL de dichlorométhane anhydre. 2 mL (3 éq., 25,7 mmols) de chlorure de mésyle et 3,6 mL (3 éq., 25,7 mmols) de triéthylamine sont ajoutés à la solution à 0°C car la réaction est exothermique. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, 50 mL de CH₂Cl₂ sont additionnés au milieu réactionnel puis 2 lavages avec une solution saturée de chlorure d'ammonium et 1 lavage à l'eau sont effectués. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées. Une chromatographie flash sur silice (C/A 6/4) permet d'obtenir 900 mg de produit dimésylé. (Rdt = 30%).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, TA): 1,38 (3H, s, CH₃); 1,49 (3H, s, CH₃); 1,59 (3H, d, H-5); 3,0 (3H, s, OSO₂CH₃); 3,1 (3H, s, OSO₂CH₃); 4,15 (1H, dd, H-3); 4,30 (1H, dq, H-4); 4,44 (1H, dd, H-1); 4,51 (1H, dd, H-1'); 4,89 (2H, ddd, H-2)

J_{1a,1b} = 10,8; J_{1a,2} = 3,8; J_{1b,2} = 7,4; J_{2,3} = 5,8; J_{3,4} = 7,8; J_{4,5} = 6,4 Hz .

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz, TA): 18,2 (C-5); 25,1 (CH₃); 27,3 (CH₃); 37,3 (OSO₂CH₃); 39,1 (OSO₂CH₃); 68,0 (C-1); 74,6 (C-4); 75,4 (C-3); 77,5 (C-2); 109,4 (Cq- Me₂).

N-hydroxy-1,4-imino-2,3-O-isopropylidène-1,4,5-tridésoxy-L-lyxitol: 52

M = 173 g/mol

Huile incolore

[α]_D²⁰ = + 47° (c = 1, CHCl₃)CCM: Rf = 0,67 (Ether) ou 0,1 (CH₂Cl₂/Ether 95/5)

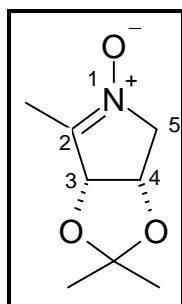
360 mg (1,08 mmol) de produit dimésylé sont dissous dans 3,5 mL de triéthylamine. 4 équivalents (301 mg, 4,34 mol) de chlorhydrate d'hydroxylamine et 0,2 équivalents (30 μL, 0,22 mmol) de DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene(1,5-5)) sont additionnés à la solution. On porte à 85 °C pendant 6h30, il y a formation d'un précipité blanc de chlorhydrate. La triéthylamine est évaporée puis le solide blanc repris dans l'éther plusieurs fois afin d'extraire l'hydroxylamine. Une purification sur colonne CH₂Cl₂/Ether 95/5 puis éther permet d'obtenir 84 mg du produit désiré. (Rdt = 45 %).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, TA): 1,27 (3H, s, CH₃); 1,30 (3H, d, C-5); 1,42 (3H, s, CH₃); 2,58 (1H, dq, H-4); 2,66 (1H, dd, H-1a); 3,45 (1H, d, H-1b); 4,48 (1H, dd, H-3); 4,61 (1H, dd, H-2); 8,10 (1H, s, OH).

$J_{1a,1b} = 10,9$; $J_{1a,2} = 4,9$; $J_{2,3} = 6,7$; $J_{3,4} = 4,9$; $J_{4,5} = 6,1$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,5 MHz, TA): 11,6 (C-5); 23,9 (CH_3); 25,7 (CH_3); 62,4 (C-1); 66,1 (C-4); 75,4 (C-2); 78,4 (C-3); 110,0 (Cq- Me₂).

1,5-didesoxy-5-hydroxyamino-3,4-O-isopropylidène-L-érythropentulose: 53



$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}$
 F = 112-114°C
 M = 171 g/mol
 Cristaux blancs
 $[\alpha]_D^{20} = +5^\circ$ (c = 1, CHCl_3)
 CCM: Rf = 0,23 (Ether/MeOH 9/1)

30 mg (0,17 mmol) de N-hydroxyribitol sont dissous dans 0,3 mL de dichlorométhane et 90 mg (2,2 éq, 0,42 mmol) d'oxyde de mercure jaune sont ajoutés. Après 6 heures d'agitation à température ambiante, le solide est éliminé par centrifugation, lavé au CH_2Cl_2 , puis les phases organiques évaporées. Une purification par flash chromatographie sur silice permet d'obtenir 25 mg d'erythropentulose (Rdt = 84 %) et 7 mg de nitronne isomère en série lyxose.

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, TA): 1,39 (6H, s, 2 CH_3); 2,08 (3H, dd, Me); 4,1 (1H, t, H-5a); 4,15 (1H, qd, H-5b); 4,82 (1H, ddd, H-5); 5,15 (1H, m, H-3)

$J_{5a,5b} = 15,0$; $J_{5b,4} = 4,9$; $J_{5a,4} = 1,5$; $J_{5a,3} = 1,5$; $J_{5b,3} = 0,8$; $J_{5a,\text{Me}} = 1,5$; $J_{5b,\text{Me}} = 2$; $J_{4,3} = 6,3$; $J_{3,\text{Me}} = 1,1$ Hz.

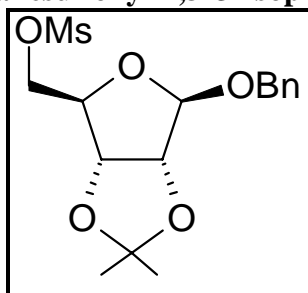
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,5 MHz, TA): 10,5 (Me); 25,8 (CH_3); 27,1 (CH_3); 67,1 (C-5); 71,5 (C-4); 82,3 (C-3); 102,5 (C-2); 112,1 (Cq- Me₂).

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺) :

Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$: formule brute $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_3\text{N}$; m/z théorique 172,09737; m/z trouvée 172,091

• Synthèse de la nitronne en série L-lyxose

5-O-Methanesulfonyl-2,3-O-isopropylidène-β-D-ribofuranoside de benzyle: 40



$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{S}$
 M = 358,31 g/mol
 Cristaux blancs
 F = 80 °C
 $[\alpha]_D^{20} = -80^\circ$ (c = 1, CHCl_3)
 CCM: Rf = 0,28 (Cyclo/AcOEt 7/3)

$J_{2,3} = 6$, $J_{3,4} = 1$; $J_{4,Me} = 7$ Hz.

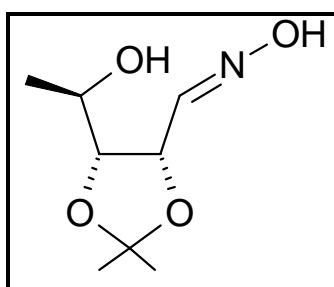
Anomère α : 1,24 (3H, d, *Me*-5); 1,28 (3H, s, CH_3); 1,57 (3H, s, CH_3); 1,85 (1H, s, OH); 4,17 (1H, qd, *H*-4); 4,37 (1H, dd, *H*-3); 4,62 (1H, d, *H*-2); 5,28 (1H, s, *H*-1).

$J_{1,OH} = 9,16$; $J_{1,2} = 4,0$; $J_{1,4} = 3,0$; $J_{2,3} = 6,7$; $J_{3,4} = 3,0$; $J_{4,Me} = 7,0$; $J_{3,Me} = 6,7$ Hz.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,5 MHz, TA): 18,3 (*Me*-5); 24,9 (CH_3); 26,2 (CH_3); 76,4 (*C*-2); 77,5 (*C*-4); 84,8 (*C*-3); 95,4 (*C*-1); 113,0 (*C*- Me_2).

Analyse élémentaire: Calculée: C 55,16 H 8,10
 Trouvée: C 55,23 H 8,19

Oxime du 2,3-*O*-isopropylidène-5-désoxy-D-ribose: 42



$C_8H_{15}O_4N$

$M = 189$ g/mol

Huile incolore

$[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$ ($c = 1$, $CHCl_3$)

CCM: $R_f = 0,17$ (E) et 0,13 (Z)
 (Cyclo/AcOEt 7/3)

610 mg (3,5 mmol) de 2,3-*O*-isopropylidène-5-désoxy-D-ribofuranose sont dissous dans 4 mL d'éthanol auxquels et 4 mL d'eau. 1,5 équivalents de bicarbonate de sodium (442 mg, 5,26 mmols) sont ajoutés à cette solution. Celle-ci est mise sous argon. 1,5 équivalents (365 mg, 5,26 mmols) de chlorhydrate d'hydroxylamine sont alors ajoutés. La solution est agitée pendant 4 heures sous argon à 50 °C.

La solution est alors extraite 3 fois à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis évaporée pour donner 638 mg d'oxime sous forme des 2 isomères E et Z (60/40) ($R = 96\%$).

IR (ν , cm^{-1} , solution CH_2Cl_2): (NH) 3450; (OH) 3580; (C-N) 1070; (acétonide) 1380

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz, TA):

Isomère Z (minoritaire): 1,24 (3H, d, *Me*-5); 1,38 (3H, s, CH_3); 1,49 (3H, s, CH_3); 3,78 (1H, ddd, *H*-4); 4,13 (1H, dd, *H*-3); 5,30 (1H, dd, *H*-2); 6,91 (1H, d, *H*-1); 9,8 (1H, s, OH)

$J_{1,2} = 5,8$; $J_{2,3} = 6,4$; $J_{3,4} = 7,3$; $J_{4,Me} = 6,1$ Hz

Isomère E (majoritaire): 1,29 (3H, d, *Me*-5); 1,39 (3H, s, CH_3); 1,50 (3H, s, CH_3); 3,9 (1H, ddd, *H*-4); 4,03 (1H, dd, *H*-3); 4,71 (1H, dd, *H*-2); 7,43 (1H, d, *H*-1); 9,8 (1H, s, OH)

$J_{1,2} = 7,0$; $J_{2,3} = 6,1$; $J_{3,4} = 7,6$; $J_{4,Me} = 6,1$ Hz

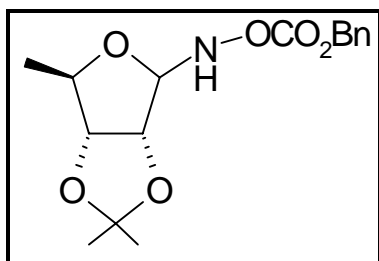
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,5 MHz, TA) :

Isomère Z (minoritaire): 19,8 (*Me*-5); 25,5 (*C*- Me_2); 27,7 (*C*- Me_2); 67,3 (*C*-4); 71,8 (*C*-2); 82,8 (*C*-3); 110,1 (*C**q*- Me_2); 152,7 (*C*-1)

Isomère E (majoritaire): 20,3 (*Me*-5); 25,6 (*C*- Me_2); 27,9(*C*- Me_2); 66,3 (*C*-4); 75,3 (*C*-2); 82,3(*C*-3); 110,2 (*C**q*- Me_2); 150,5 (*C*-1)

Analyse élémentaire: Calculée: C 50,78 H 7,99 N 7,40
 Trouvée: C 50,99 H 8,08 N 7,09

***N*-(benzyloxycarbonyloxy)-2,3-*O*-isopropylidène-5-désoxy-D-ribose: 43**



$C_{16}H_{21}O_6N$
 $M = 283 \text{ g/mol}$
 Cristaux blancs
 $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$ (c = 1, $CHCl_3$)
 CCM: Rf = 0,25 (Cyclo/AcOEt 7/3)

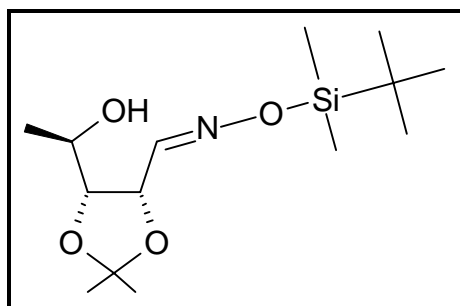
A 200 mg (1,05 mmol) d'oxime dilué dans 6 mL d'éther sont ajoutés 0,225 mL (1,5 éq., 1,5 mmols) de chlorure de benzyle, 90 mg (1 éq., 1,05 mmols) de bicarbonate de sodium et 0,225 mL d'eau. La réaction est suivie par CCM (C/A 7/3). Après 24 h d'agitation à température ambiante, la solution est lavée à l'eau. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis évaporée. Une purification par colonne chromatographie sur silice (C/A 7/3) permet d'obtenir 205 mg (R = 60 %) du produit benzylé sous forme de cristaux blancs.

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz, TA): 1,32 (3H, d, *Me*-5); 1,33 (3H, s, CH_3); 1,52 (3H, s, CH_3); 4,16 (1H, ddd, *H*-4); 4,37 (1H, dd, *H*-3); 4,93 (1H, dd, *H*-2); 5,22 (2H, dd, CH_2Ph); 5,83 (1H, d, *H*-1); 6,22 (1H, s, *NH*); 7,36 (5H, s, Ph)

$J_{1,2} = 2,0$; $J_{2,3} = 6,0$; $J_{3,4} = 4,0$; $J_{4,Me} = 6,7$; $J_{CH_2Ph} = 12,0$ Hz.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,5 MHz, TA): 19,1 (*Me*-5); 25,2 (CH_3); 27,0 (CH_3); 68,4 (CH_2Ph); 81,9 (*C*-4); 82,3 (*C*-3); 85,0 (*C*-2); 92,5 (*C*-1); 113,2 (*C*- Me_2); 128,0 (C_{Ph-o}); 128,2 (C_{Ph-m}); 128,4 (C_{Ph-p}); 135,2 (C_{Ph-s}); 156,7 (OCO_2)

***O*-(tertiobutyl-diméthyl)silyle-oxime du 2,3-*O*-isopropylidène-5-désoxy-D-ribose: 44**



$C_{14}H_{19}O_4NSi$
 $M = 303 \text{ g/mol}$
 Huile incolore
 $[\alpha]_D^{20} = +25^\circ$ (c = 1, $CHCl_3$)
 CCM: Rf = 0,60 (E) et 0,66 (Z)
 (Cyclo/AcOEt 7/3)

A 520 mg (2,75 mmols) d'oxime dissoute dans 5 mL de pyridine sous argon sont additionnés 830 mg (2 éq., 5,5 mmols) de chlorure de tertbutyldiméthylsilyle. La réaction est suivie en CCM (C/A 7/3). Après une nuit d'agitation à température ambiante, la pyridine est évaporée et le produit repris dans l'éther. Deux lavages avec une solution de NaCl saturée puis un lavage à l'eau sont effectués. Les phases organiques sont séchées sur $MgSO_4$, filtrées puis évaporées. Une chromatographie sur silice (C/A 7/3) permet d'obtenir 557 mg d'une huile incolore d'oxime silylé. (Rdt = 67 %).

IR (ν , cm^{-1} , solvant CH_2Cl_2): 786, 838, 936, 1066, 1219, 1252, 1373, 1382, 1463, 1473, 2932, 2957, 3491.

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, TA):

Isomère Z (minoritaire): 0,17 (3H, s, CH_3Si); 0,20 (3H, s, CH_3Si); 0,91 (9H, s, tBu); 1,25 (3H, d, *Me*-5); 1,39 (3H, s, CH_3); 1,51 (3H, s, CH_3); 2,48 (1H, s, OH); 3,87 (1H, ddd, *H*-4); 4,10 (1H, dd, *H*-3); 5,34 (1H, t, *H*-2); 7,04 (1H, d, *H*-1).

$J_{1,2} = 5,8$; $J_{2,3} = 6,4$; $J_{3,4} = 7,3$; $J_{4,\text{Me}} = 6,1$ Hz.

Isomère E (majoritaire): 0,16 (3H, s, CH_3Si); 0,19 (3H, s, CH_3Si); 0,92 (9H, s, tBu); 1,27 (3H, d, *Me*-5); 1,38 (3H, s, CH_3); 1,48 (3H, s, CH_3); 3,14 (1H, s, OH); 4,0 (1H, ddd, *H*-4); 4,03 (1H, dd, *H*-3); 4,78 (1H, dd, *H*-2); 7,58 (1H, d, *H*-1).

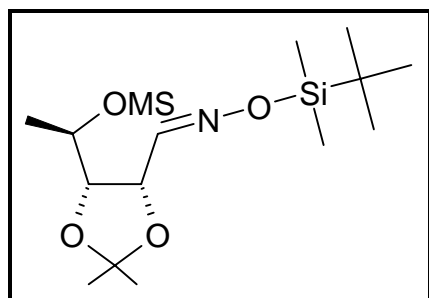
$J_{1,2} = 7,0$; $J_{2,3} = 6,1$; $J_{3,4} = 7,6$; $J_{4,\text{Me}} = 6,1$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,5 MHz, TA):

Isomère Z (minoritaire): -5,5 (2 $\text{CH}_3\text{-Si}$); 18,0 (*C*- Me_3); 19,6 (*Me*-5); 25,4 (*C*- Me_2); 25,8 (tBu); 27,6 (*C*- Me_2); 66,0 (*C*-4); 75,2 (*C*-2); 83,0 (*C*-3); 110,0 (*C**q*- Me_2); 156,3 (*C*-1).

Isomère E (majoritaire): -5,4 (2 $\text{CH}_3\text{-Si}$); 18,1 (*C*- Me_3); 19,6 (*Me*-5); 25,3 (*C*- Me_2); 25,8 (tBu); 27,5 (*C*- Me_2); 67,0 (*C*-4); 75,2 (*C*-2); 82,4 (*C*-3); 109,8 (*C**q*- Me_2); 154,4 (*C*-1).

***O*-(tertiobutyl-dimethyl)silyl-oxime du 4-*O*-methanesulfonyl-2,3-*O*-isopropylidène-5-désoxy-D-ribose: 45**



$\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{O}_6\text{NSSi}$

$M = 381$ g/mol

Huile jaune

$[\alpha]_D^{20} = +42^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3)

CCM: $R_f = 0,55$ (C/A 7/3)

500 mg (1,35 mmols) d'oxime silylé sont dissous dans 5 mL de dichlorométhane anhydre. 192 μL (283 mg, 1,5 équ., 2,47 mmols) de chlorure de mésyle et 345 μL (250 mg, 1,5 équ., 2,47 mmols) de triéthylamine sont ajoutés à la solution placée sous argon. Après 6 h 30 d'agitation à température ambiante (réaction suivie par CCM), 40 mL de CH_2Cl_2 sont additionnés au milieu, et 2 lavages par une solution saturée de chlorure d'ammonium ainsi qu'un lavage à l'eau sont effectués. Les phases organiques sont séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées pour donner après purification sur colonne de silice (C/A 7/3) 628 mg du produit mésylé. (Rdt quantitatif). Le produit est instable, il se désilyle facilement en deux oximes isomères dans les proportions 50/50.

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, TA):

Isomère Z (minoritaire): 0,14 (3H, s, CH_3Si); 0,20 (3H, s, CH_3Si); 0,92 (9H, s, tBu); 1,33 (3H, d, *Me*-5); 1,46 (3H, s, CH_3); 1,52 (3H, s, CH_3); 2,97 (3H, s, OSO_2CH_3); 4,59 (1H, dd, *H*-3); 4,75 (1H, ddd, *H*-4); 5,27 (1H, dd, *H*-2); 7,08 (1H, d, *H*-1).

$J_{1,2} = 4,3$; $J_{2,3} = 7,6$; $J_{3,4} = 3$; $J_{4,\text{Me}} = 6,4$ Hz.

Isomère E (majoritaire): 0,13(3H, s, CH₃Si); 0,19 (3H, s, CH₃Si); 0,90 (9H, s, tBu); 1,47(3H, d, Me); 1,48 (3H, s, CH₃); 1,52 (3H, s, CH₃); 3,0 (3H, s, OSO₂CH₃); 4,21 (1H, t, CH-3); 4,85 (1H, dd, CH-2); 4,89 (1H, ddd, CH-4); 7,50 (1H, d, CH-1) .

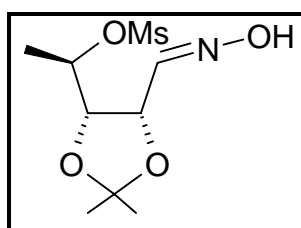
$J_{1,2} = 8,2$; $J_{2,3} = 6,7$; $J_{3,4} = 6,7$; $J_{4,Me} = 6,4$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz, TA):

Isomère Z (minoritaire): -5,3 (CH₃-Si); 18,0 (Me-5); 24,3 (C-Me₂); 25,9 (tBu); 26,1 (C-Me₂); 38,9 (OSO₂CH₃); 71,7 (C-4); 77,1 (C-2); 79,0 (C-3); 109,9 (Cq Me₂); 152,8 (C-1)

Isomère E (majoritaire): -5,2 (CH₃-Si); 18,1 (Me-5); 25,6 (C-Me₂); 25,9 (tBu); 27,4 (C-Me₂); 38,9 (OSO₂CH₃); 74,7 (C-4); 76,5 (C-2); 78,9 (C-3); 109,6 (Cq-Me₂); 151,4 (C-1).

Oxime du 4-O-methanesulfonyl-2,3-O-isopropylidène-5-désoxy-ribose: 46



C₉H₂₇O₆NS

M = 267 g/mol

Huile jaune

CCM: R_f = 0,1 (C/A 7/3)

Produit de dégradation du *O*-(tertiobutyl-diméthyl)silyl-oxime du 4-*O*-methanesulfonyl-2,3-*O*-isopropylidène-5-désoxy-D-ribose.

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, TA):

Isomère Z (minoritaire): 1,33 (3H, d, Me-5); 1,46 (3H, s, CH₃); 1,52 (3H, s, CH₃); 3,01 (3H, s, OSO₂CH₃); 4,63 (1H, dd, H-3); 4,82 (1H, ddd, H-4); 5,32 (1H, dd, H-2); 7,98 (1H, d, H-1).

$J_{1,2} = 4,4$; $J_{2,3} = 7,5$; $J_{3,4} = 3,1$; $J_{4,Me} = 6,4$ Hz.

Isomère E (majoritaire): 1,47(3H, d, Me-5); 1,48 (3H, s, CH₃); 1,52 (3H, s, CH₃); 3,02 (3H, s, OSO₂CH₃); 4,21 (1H, t, H-3); 4,78 (1H, dd, H-2); 4,87 (1H, ddd, H-4); 7,78 (1H, d, H-1) .

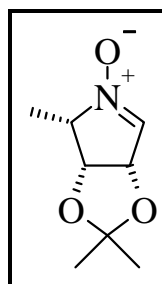
$J_{1,2} = 8,0$; $J_{2,3} = 6,5$; $J_{3,4} = 6,4$; $J_{4,Me} = 6,4$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz, TA):

Isomère Z (minoritaire): 17,0 (Me-5); 24,4 (C-Me₂); 26,3 (C-Me₂); 38,8 (OSO₂CH₃); 71,2 (C-4); 77,0 (C-2); 78,8 (C-3); 109,8 (Cq-Me₂); 149,6 (C-1).

Isomère E (majoritaire): 18,3 (Me-5); 25,2 (C-Me₂); 27,5 (C-Me₂); 39,1 (OSO₂CH₃); 74,7 (C-4); 75,7 (C-2); 79,0 (C-3); 110,2 (Cq-Me₂); 148,3 (C-1).

4,5-didésoxy-2,3-*O*-isopropylidène-4-(hydroxylamino)-L-lyxofuranose: 47



C₈H₁₅O₃N

M = 171 g/mol

Cristaux blancs

F = 92-94 °C

$[\alpha]_D^{20} = -3^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

CCM: R_f = 0,32 (Ether/MeOH 9/1)

A 2 g (5,25 mmol) de produit ouvert mesylé-silylé dissous dans 20 mL d'acétonitrile sont additionnés 2,75 g (10,5 mmols, 2 éq.) de fluorure de tétrabutylammonium cristallisé et 1,1 mL (7,9 mmols, 1,5 éq.) de triéthylamine. La réaction est suivie en CCM (Ether/MeOH 9/1). Après 6 h d'agitation à 80 °C, le solvant est évaporé puis le produit repris au dichlorométhane. Plusieurs lavages avec une solution saturée de chlorure d'ammonium sont effectués. Les phases aqueuses sont ensuite réextraites au dichlorométhane car le produit a du mal à passer en phase organique. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄, filtrées puis évaporées. Une purification par chromatographie sur silice (AcOEt/ CHCl₃ / MeOH 8/1,5/0,5) permet d'obtenir 404 mg de nitrone et 190 mg d'oxazine. (Rdt = 66 %). Les produits sont obtenus en proportion 2/1. D'autres produits minoritaires (environ 1 à 2 %) sont également observés et analysés.

IR (ν en cm⁻¹, KBr): 437, 515, 682, 878, 1041, 1049, 1210, 1259, 1383, 1459, 1578, 2944, 2995, 3066, 3463.

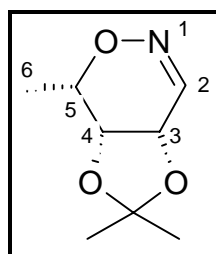
RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, TA): 1,40 (3H, s, CH₃); 1,45 (3H, s, CH₃); 1,47 (3H, d, Me-5); 4,1 (1H, m, H-4); 4,88 (1H, t, H-3); 5,27 (1H, ddd, H-2); 6,91 (1H, t, H-1)
J_{1,2} = 1,8; J_{1,4} = 2,1; J_{2,3} = 6,3; J_{2,4} = 0,7; J_{3,4} = 5,5; J_{4,Me} = 7,0 Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz, TA): 11,0 (Me-5); 25,8 (C-Me₂); 27,0 (C-Me₂); 71,1 (C-4); 75,8 (C-2); 77,8 (C-3); 112,0 (Cq-Me₂); 131,5 (C-1).

Spectre de masse Haute Résolution (FAB+):

Ion [M+H]⁺: formule brute C₈H₁₅O₃N; m/z théorique 172,097368; m/z trouvée 172,097325

1,2-Didéhydro-2,6-didésoxy-3,4-O-isopropylidène-1-aza-L-lyxohexopyranose: 48



C₈H₁₅O₃N

M = 171 g/mol

Cristaux blancs

F = 104-106 °C

[α]_D²⁰ = -54,5° (c = 1, CHCl₃)

CCM: R_f = 0,28 (Ether/MeOH 9/1)

R_f = 0,39 (C/A 7/3)

IR (ν, cm⁻¹, KBr): 792, 863, 914, 1009, 1042, 1090, 1117, 1142, 1186, 1222, 1241, 1264, 1373, 1384, 1391, 1450, 1789, 2997.

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz, TA): 1,39 (3H, s, CH₃); 1,41 (3H, d, Me-6); 1,46 (3H, s, CH₃); 3,98 (1H, q, H-5); 4,27 (1H, d, H-4); 4,44 (1H, dd, H-3); 7,27 (1H, s, H-2)
J_{2,3} = 2,1; J_{2,4} = 1,6; J_{3,4} = 6,6; J_{4,5} = 1,2; J_{5,Me} = 6,6 Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz, TA): 16,2 (C-6); 26,5 (C-Me₂); 27,3 (C-Me₂); 66,4 (C-5); 71,4 (C-3); 72,8 (C-4); 112,1 (Cq-Me₂); 147,8 (C-2).

Analyse élémentaire: Calculée: C 56,12

H 7,65

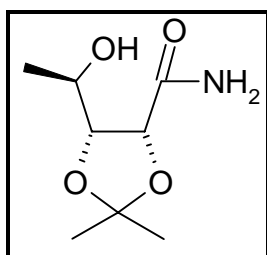
N 8,18

Trouvée: C 55,99

H 7,78

N 7,91

2,3-*O*-isopropylidène-5-désoxy-D-ribonamide: 50



$C_8H_{15}O_4N$
 $M = 189 \text{ g/mol}$
 Cristaux blancs
 CCM: $R_f = 0,4$ (ACOEt / $CHCl_3$ / MeOH
 8/1,5/0,5)

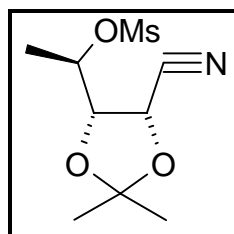
RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, TA): 1,27 (3H, d, *Me*-5); 1,40 (3H, s, CH_3); 1,59 (3H, s, CH_3); 4,09 (1H, m, *H*-4); 4,28 (1H, dd, *H*-3); 4,53 (1H, d, *H*-2); 6,23 (1H, s, OH); 6,59 (1H, s, NH_2)
 $J_{2,3} = 8,0$; $J_{3,4} = 2,9$; $J_{4,Me} = 5,0$ Hz.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, TA): 20,2 (*Me*-5); 24,2 (*C*- Me_2); 26,6 (*C*- Me_2); 65,0 (*C*-4); 75,8 (*C*-2); 80,8 (*C*-3); 109,4 (*Cq*- Me_2); 173,2 ($CONH_2$ -1).

Spectre de masse Haute Résolution (FAB+):

Ion $[M+H]^+$: formule brute $C_8H_{15}O_4N$; m/z théorique 190,107933; m/z trouvée 190,108384

4-*O*-methanesulfonyl-2,3-*O*-isopropylidène-5-désoxy-D-ribonitrile: 49



$C_9H_{15}O_5NS$
 $M = 249 \text{ g/mol}$
 Huile incolore
 CCM: $R_f = 0,74$ (CH_2Cl_2 / MeOH 95/5)

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, TA): 1,39 (3H, s, CH_3); 1,59 (3H, s, CH_3); 1,66 (3H, d, *Me*-5); 3,09 (3H, s, OSO_2CH_3); 4,18 (1H, dd, *H*-3); 4,92 (1H, d, *H*-2); 5,01 (1H, quint., *H*-4).
 $J_{2,3} = 5,4$; $J_{3,4} = 7,8$; $J_{4,Me} = 6,3$ Hz.

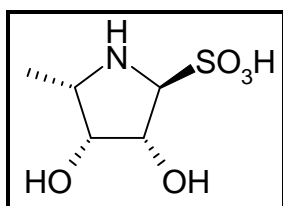
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, TA): 18,9 (*Me*-5); 25,8 (*C*- Me_2); 26,8 (*C*- Me_2); 39,0 (OSO_2CH_3); 66,6 (*C*-2); 76,9 (*C*-4); 78,8 (*C*-3); 113,3 (*Cq*- Me_2); 116,3 (CN).

Spectre de masse Haute Résolution (FAB+): Ion $[M+H]^+$: formule brute $C_9H_{15}O_5NS$; m/z théorique 250,074920; m/z trouvée 250,075764

1,4,5-tridésoxy-4-amino-L-lyxose-1-sulfonate: 54

50 mg (0,3 mmol) de nitrone sont mis en suspension dans 0,5 mL de D_2O . Cette solution est mise sous SO_2 . Après 24 h à température ambiante, 2 mL d'éthanol sont ajoutés et le ballon est placé au réfrigérateur. On obtient alors des cristaux. Le solide est centrifugé, lavé au méthanol et les eaux mères évaporées. On obtient 24 mg de cristaux blancs purs. Les eaux

mères sont recristallisées dans l'éthanol pour donner à nouveau 19 mg de cristaux d'adduit sulfite pur. (Rdt = 62 %).



M = 197,21 g/mol

Cristaux blancs

F = 210-215 °C (decomposition)

$[\alpha]_D^{20} = -11^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

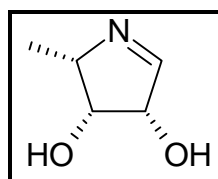
IR (ν en cm⁻¹): 571, 622, 1009, 1045, 1143, 1204, 1237, 1408, 1575, 1634, 3341.

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz, TA): 1,40 (3H, d, Me-5); 3,83 (1H, dq, H-4); 4,23 (1H, dd, H-3); 4,33 (1H, d, H-1); 4,64 (1H, dd, H-2)

J_{1,2} = 7,7; J_{2,3} = 3,9; J_{3,4} = 2,4; J_{4,Me} = 6,7 Hz.

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz, TA): 11,0 (Me-5); 59,0 (C-4); 72,5 (C-2); 73,1 (C-3); 74,1 (C-1).

4-amino-4,5-didésoxy-L-lyxose: 55

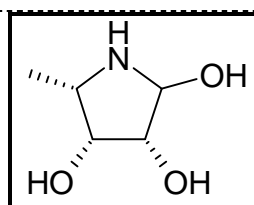


M = 115,13 g/mol

A une solution d'adduit sulfite (60 mg, 0,25 mmol) dans 0,6 mL de D₂O, 120 mg (1,5 éq., 0,38 mmol) de baryte octahydratée sont ajoutés. La solution est agitée pendant 1h à température ambiante. Les sels formés sont ensuite centrifugés. On obtient une solution à environ 0,4 M en produit (pH = 10), que l'on analyse telle quelle en RMN du proton. L'imine est obtenue en équilibre avec l'aminoalcool correspondant ainsi qu'un dimère, et la proportion relative des différents produits dépend de la concentration, du pH et de la température.

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz, TA) : 1,32 (3H, d, Me); 3,85 (1H, m, H-4); 4,24 (1H, dd, H-3); 4,75 (1H, dd, H-2); 7,65 (1H, d, H-1)

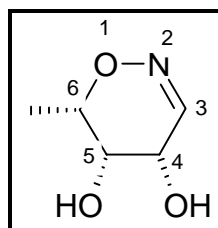
J_{1,2} = 2,9; J_{2,3} = 5,0; J_{3,4} = 4,3; J_{4,Me} = 7,2 Hz.



M = 133,15g/mol

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz, TA) : 1,16 (3H, d, Me); 3,33 (1H, dd, H-4); 4,01 (1H, dd, H-3); 4,06 (1H, d, H-1); 4,54 (1H, dd, H-2)

J_{1,2} = 6,5; J_{2,3} = 4,4; J_{3,4} = 2,9; J_{4,Me} = 6,6 Hz.

6-Méthyl-5,6-dihydro-4H-1,2-oxazine-4,5-diol: 58

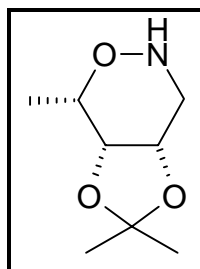
$C_5H_9O_3N$
 $M = 131 \text{ g/mol}$
 Huile jaune

40 mg (0,23 mmol) de cycle à 6 protégé sont dissous dans 0,3 mL de méthanol et 0,1 mL d'HCl 6N. La solution est agitée à température ambiante pendant 5h puis le solvant évaporé pour donner 25 mg de produit déprotégé. (Rdt = 83 %).

RMN 1H (D_2O , 400 MHz, TA) : 1,30 (3H, d, *Me*-6); 3,91 (1H, q, *H*-6); 4,16 (1H, dt, *H*-5); 4,41 (1H, dd, *H*-4); 7,20 (1H, dd, *H*-3)

$J_{3,4} = 2,0$; $J_{3,5} = 1,55$; $J_{3,4} = 2,27$; $J_{4,5} = 4,81$; $J_{5,6} = 1,27$; $J_{6,Me} = 6,47 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA) : 15,5 (*Me*-6); 63,5 (*C*-4); 64,6 (*C*-6); 75,2 (*C*-5); 151,6 (*C*-3).

6-Méthyl-4,5-*O*-isopropylidène-(1,2)-oxazinane: 58'

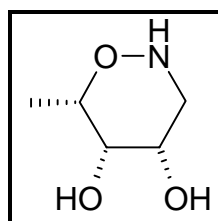
$C_8H_{15}O_3N$
 $M = 173 \text{ g/mol}$
 Huile
 CCM: $R_f = 0,19$ (C/A 7/3)

36 mg (0,21 mmol) de cycle à 6 sont mis en solution dans 0,4 mL d'acide acétique sous argon. 16 mg (1,25 éq., 0,26 mmol) de $NaBH_3CN$ sont alors ajoutés au milieu. La solution est agitée pendant 5h à température ambiante puis étendue au méthanol et évaporé. Le résidu est alors purifié par colonne chromatographique (C/A 7/3) pour donner 16 mg (Rdt = 44 %) d'une huile pure.

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, TA) : 1,33 (3H, d, *Me*-6); 1,36 (3H, s, *C*- Me_2); 1,51 (3H, s, *C*- Me_2); 3,04 (1H, dd, *H*_b-3); 3,19 (1H, dd, *H*_a-3); 4,00 (1H, dd, *H*-5); 4,14 (1H, s, *H*-6); 4,32 (1H, ddd, *H*-4); 5,50 (1H, s, NH).

$J_{6,5} = 2,4$; $J_{6,4} = 1,6$; $J_{5,4} = 5,2$; $J_{4,3a} = 9,8$; $J_{4,3b} = 7,0$; $J_{3a,3b} = 12,6$; $J_{6,Me} = 6,6 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, TA) : 15,7 (*Me*-6); 26,4 (CH_3); 28,3 (CH_3); 50,9 (*C*-3); 70,8 (*C*-4); 74,3 (*C*-5); 76,7 (*C*-6); 109,2 (*C*_q- Me_2).

6-Methyl-4,5-diol-(1,2)-oxazinane: 59

$C_5H_{11}O_3N$
 $M = 133 \text{ g/mol}$
 Cristaux blancs

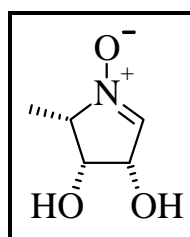
16 mg (0,21 mmol) de produit sont dissous dans 0,12 mL de méthanol. On ajoute alors 40 μL d'acide chlorhydrique 6N. La solution est agitée à température ambiante pendant 7h. On ajoute alors 50 mg d'hydrogénocarbonate de sodium afin de neutraliser l'acide en excès et de ne pas obtenir le chlorhydrate. On laisse agiter pendant 1h puis les sels sont éliminés par centrifugation, lavés 3 fois au méthanol puis on évapore les solvants et on obtient 12 mg de produit pur (Rdt = quantitatif).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,19 (3H, d, *Me*-6); 2,97 (1H, dd, *Hb*-3); 3,11 (1H, dd, *Ha*-3); 3,77 (1H, dt, *H*-5); 3,87 (1H, q, *H*-6); 3,88 (1H, ddd, *H*-4);
 $J_{5,6} = 1,0$; $J_{5,3b} = 1,0$; $J_{4,5} = 3,2$; $J_{4,3a} = 11,1$; $J_{4,3b} = 5,5$; $J_{3a,3b} = 13,1$; $J_{6,Me} = 6,6 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 18,0 (*Me*-6); 50,3 (*C*-3); 69,7 (*C*-4); 72,2 (*C*-6); 81,3 (*C*-5).

Spectre de masse Haute Résolution (FAB+):

Ion $[M+H]^+$: formule brute $C_5H_{11}O_3N$; m/z théorique 134,081054; m/z trouvée 134,081718

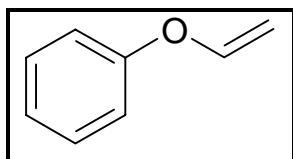
4,5-didésoxy-4-(hydroxylamino)-L-lyxofuranose: 57

$C_5H_9O_3N$
 $M = 131 \text{ g/mol}$
 Cristaux blancs
 $F = 148-152 \text{ }^\circ\text{C}$ (décomposition)

50 mg de nitronne sont dissous dans 0,4 mL de méthanol et 0,24 mL d'HCl 6N. La solution est agitée pendant 9h à température ambiante. On ajoute alors 260 mg de NaHCO_3 et 0,5 mL de méthanol. Cette solution est agitée pendant 2h à température ambiante afin de neutraliser l'acide puis les solides sont éliminés par centrifugation et lavés 3 fois au méthanol. Après évaporation des solvants, on obtient des cristaux blancs qui sont lavés au dichlorométhane. On obtient alors 38 mg de cristaux blancs purs (Rdt quantitatif)

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,471(3H, d, *Me*-5); 4,24 (1H, m, *H*-4); 4,59 (1H, t, *H*-3); 5,01 (1H, d, *H*-2); 7,31 (1H, s, *H*-1).
 $J_{2,3} = 4,9$; $J_{3,4} = 6,0$; $J_{4,Me} = 6,9 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 10,4 (*Me*); 69,2 (*C*-2); 70,3 (*C*-4); 71,0 (*C*-3); 140,8 (*C*-1).

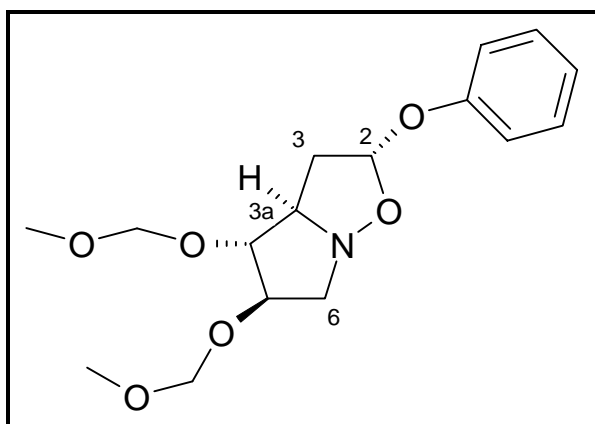
Spectre de masse Haute Résolution (FAB+) :Ion $[M+H]^+$: formule brute $C_5H_9O_3N$; m/z théorique 132,067514; m/z trouvée 132,068748**4. Partie expérimentale: fonctionnalisation de la nitronne**• **Synthèse du réactif****Ethylènoxybenzène: 60**

C_8H_8O
 $M = 120,15 \text{ g/mol}$
 Liquide incolore

Dans un bicol de 1 L est agitée fortement à température ambiante une solution biphasique composée de 20 g de bromophénoxyéthane (0,1 moles), 400 mL d'éther, 100 mL de NaOH aqueux à 50 % et 33 g de sulfate acide de tétrabutylammonium. Après 5h d'agitation, les phases organique et aqueuse sont séparées. La phase organique est lavée par 3*50 mL d'eau et la phase aqueuse est extraite par 2*50 mL d'éther. Les phases organiques sont séchées sur $MgSO_4$, filtrée puis réduite à 50-100 mL car on perd facilement le produit par évaporation. L'éther de vinyle est donc séparé par distillation sous vide puis micro distillation (bain à 150 °C, 90 Torr, t = 88°C). On obtient alors 7,8 g (Rdt = 65 %) d'éther de vinyle.

RMN 1H ($CDCl_3$, 62,5 MHz, TA) : 4,43 (1H, dd, H_{b-2}); 4,77 (1H, dd, H_{a-2}); 6,65 (1H, dd, H-1); 7,01 (2H, dm, H_{Ph-o}); 7,08 (1H, t, H_{Ph-p}); 7,33 (2H, mt, H_{Ph-m}).

$J_{2a,2b} = 1,6$; $J_{1,2b} = 6,0$; $J_{1,2a} = 13,4$; $J_{m,p} = 7,5$; $J_{o,m} = 8 \text{ Hz}$.

• **Cycloadditions 1,3-dipolaire****(2R,3aR,4R,5R)-4,5-bis(méthoxyméthoxy)2-phényloxyhexahydro-pyrrolo[1,2-b]isoxazole: 62**

$C_{16}H_{23}O_6N$
 $M = 325 \text{ g/mol}$
 Cristaux blancs
 $F = 103-105^\circ C$
 $[\alpha]_D^{20} = -110^\circ$ (c = 1; $CHCl_3$)
 CCM: Rf = 0,19
 (Cyclohexane/AcOEt 5/5)

Dans un cône de 1 mL sont placés 100 mg (0,49 mmol) de nitronne dans 50 μL de tétrachloroéthylène, auxquels sont ajoutés 118 mg (0,97 mmol, 2 éq.) d'éther phénylique. La solution est agitée pendant 1 nuit à 50°C. Il y a alors formation de cristaux brunâtre. On ajoute

alors de l'éther isopropylique et on place le ballon dans la glace. Après cristallisation, le produit est centrifugé puis lavé 2 fois au cyclohexane afin d'obtenir 95 mg (Rdt = 60 %) de cristaux blancs purs.

IR (KBr): 753, 920, 940, 969, 1009, 1039, 1067, 1084, 1119, 1149, 1176, 1196, 1225, 1251, 1355, 1482, 1496, 1601, 2810, 2825, 2901, 2951.

RMN ¹H (δ, J): (CDCl₃, 400 MHz, 300K): 2,75 (1H, dt, *H_b-3*); 2,83 (1H, ddd, *H_a-3*); 3,39 (3H, s, OMe); 3,40 (3H, s, OMe); 3,49 (1H, dd, *H_b-6*); 3,60 (1H, dd, *H_a-6*); 3,87 (1H, quint, *H-3a*); 4,13 (1H, t, *H-4*); 4,26 (1H, dt, *H-5*); 4,69 (1H, d, OCHHO); 4,71 (1H, d, OCHHO); 4,69 (1H, d, OCH₂O); 4,74 (1H, d, OCH₂O); 5,89 (1H, d, *H-2*); 6,98 (1H, t, *H_{Ph-p}*); 7,03 (d, 2H, *H_{Ph-o}*); 7,26 (t, 2H, *H_{Ph-m}*).

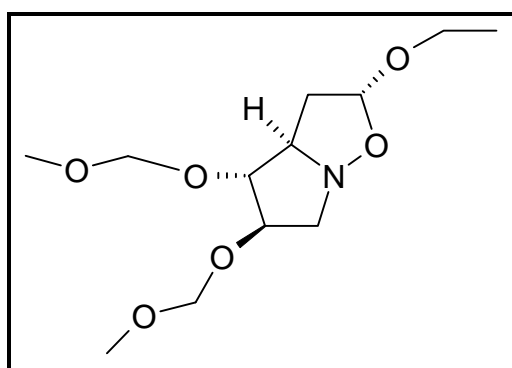
$J_{(2,3a)tr} = 1,6$; $J_{(2,3b)cis} = 5,2$; $J_{2,6a} = 1,2$; $J_{3a,3b} = 13,2$; $J_{3a,H-3a} = 8,0$; $J_{3b,H-3a} = 6,0$; $J_{H-3a,4} = 4,6$; $J_{4,5} = 3,0$; $J_{5,6a} = 5,8$; $J_{5,6b} = 3,5$; $J_{6a,6b} = 14,6$; $J_{Ho,Hm} = 7,2$; $J_{Hm,Hp} = 8,0$; $J_{OCH_2O} = 6,8$; $J_{OCH_2O} = 6,9$ Hz.

RMN ¹³C (δ): (CDCl₃, 100 MHz, 300K): 41,7 (*C-3*); 55,6 (2 OMe); 60,3 (*C-6*); 69,2 (*C-3a*); 83,6 (*C-5*); 87,6 (*C-4*); 96,1 (OCH₂O); 96,2 (OCH₂O); 100,4 (*C-2*); 116,9 (*C_{Ph-o}*); 122,0 (*C_{Ph-p}*); 129,4 (*C_{Ph-m}*); 156,8 (*C_{Ph-s}*).

Analyse élémentaire: Calculée: C 59,07	H 7,13	N 4,30
Trouvée: C 58,95	H 7,23	N 4,26

(2R,3aR,4R,5R)-4,5-bis(méthoxyméthoxy) 2-éthoxyloxy hexahydro-pyrrolo[1,2-b]isoxazole: 61

Dans un cône de 1 mL sont placés 200 mg (0,97 mmol) de nitrone qui sont dissout dans 0,1 mL de chloroforme. 0,5 mL (5 équ., 4,9 mmol) d'éther vinyl éther sont ajoutés au milieu. On agite alors pendant 24 h à 50 °C puis on évapore le solvant. Le produit est alors purifié par colonne de chromatographie sur silice (éther) et on obtient 180 mg (Rdt = 66 %) du mélange des deux isomères dans les proportions 10/1.



$C_{12}H_{23}O_6N$
 $M = 277$ g/mol
 Huile jaune
 $[\alpha]_D^{20} = -42$ °(c = 1; CHCl₃)
 CCM: Rf = 0,70 (Ether/MeOH 9/1)

IR (ν, cm⁻¹, solution CH₂Cl₂): 919, 1040, 1076, 1106, 1152, 1176, 1360, 1444, 2896, 2936, 3583.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TA):

Dérivé majoritaire: 1,22 (t, 3H, CH₂CH₃); 2,53 (2H, dd, *H_a-3*, *H_b-3*); 3,37 (6H, s, OMe); 3,41 (1H, m, *H_b-6*); 3,44 (1H, dq, CHHCH₃); 3,58 (1H, dd, *H_a-6*); 3,71 (1H, qd, *H-3a*); 3,82

(1H, dd, CHHCH₃); 4,07 (1H, t, H-4); 4,24 (1H, ddd, H-5); 4,68 (4H, dd, 2 OCH₂O); 5,23 (1H, m, H-2).

$J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,0$; $J_{\text{Ha}_3,\text{Hb}_3} = 13,2$; $J_{\text{Ha}_3,\text{H}_3\text{a}} = 7,6$; $J_{\text{Ha}_3,2} = 2,3$; $J_{\text{Hb}_3,2} = 4$; $J_{\text{Hb}_3,3\text{a}} = 4,0$; $J_{\text{CHHCH}_3, \text{CHHCH}_3} = 9,5$; $J_{6\text{a},6\text{b}} = 14,4$; $J_{6\text{a},5} = 6,3$; $J_{\text{H}_3\text{a},4} = 4,8$; $J_{4,5} = 3,2$; $J_{5,6\text{a}} = 6,3$; $J_{5,6\text{b}} = 3,2$; $J_{\text{OCH}_2\text{O}} = 6,91$; $J_{\text{OCH}_2\text{O}} = 6,75$ Hz.

Dérivé minoritaire: 1,25 (3H, t, CH₂CH₃); 2,28 (2H, dd, Hb-3); 2,69 (1H, dd, Ha-3); 3,06 (1H, dd, Hb-6); 3,37 (3H, s, OMe); 3,41 (1H, m, Ha-6); 3,44 (1H, dq, CHHCH₃); 3,82 (1H, dd, CHHCH₃); 4,01 (1H, qd, H-3a); 4,35 (1H, t, H-4); 4,46 (1H, dd, H-5); 4,68 (4H, dd, 2 OCH₂O); 5,13 (1H, dt, H-2).

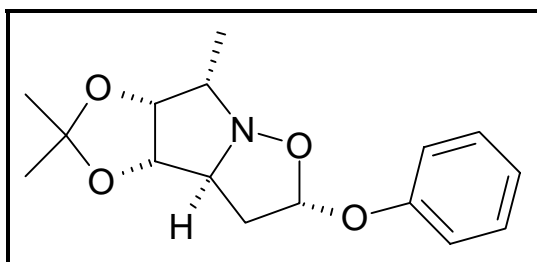
$J_{\text{CH}_3} = 7,04$; $J_{\text{a}_3,\text{b}_3} = 13,1$; $J_{\text{a}_3,3\text{a}} = 4,4$; $J_{\text{a}_3,2} = 5,9$; $J_{\text{b}_3,2} = 1,7$; $J_{\text{b}_3,3\text{a}} = 8,4$; $J_{\text{CHHCH}_3, \text{CHHCH}_3} = 9,5$; $J_{6\text{a},5} = 6,3$; $J_{\text{H}_3\text{a},4} = 7,2$; $J_{\text{OCH}_2\text{O}} = 6,91$; $J_{\text{OCH}_2\text{O}} = 6,75$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TA):

Dérivé majoritaire: 15,0 (CH₂CH₃); 41,5 (C-3); 55,5 (2 OMe); 60,2 (C-6); 63,1 (CH₂CH₃); 69,3 (C-3a); 83,6 (C-5); 87,8 (C-4); 96,0 (OCH₂O); 96,1 (OCH₂O); 101,7 (C-2).

Dérivé minoritaire: 15,1 (CH₂CH₃); 37,2 (C-3); 55,5 (2 OMe); 58,5 (C-6); 63,1 (CH₂CH₃); 65,0 (C-3a); 67,8 (C-5, C-4); 96,1 (OCH₂O); 97,4 (OCH₂O); 102,2 (C-2).

2,2,7-Triméthyl-5-phénoxy-hexahydro-1,3,6-trioxa-6a-aza-cyclopenta[α]pentalène: 64



C₁₆H₂₁O₄N

M = 291 g/mol

Cristaux blancs

F = 110-112°C (cyclohexane)

$[\alpha]_D^{20} = +219^\circ$ (c = 1; CHCl₃)

CCM: R_f = 0,8 (Ether/MeOH 9/1)

Dans un cône de 2 mL sont placés 250 mg (1,46 mmol) de nitroène dans 125 µL de tétrachloroéthylène, auxquels sont ajoutés 354 mg (2,92 mmol, 2 éq.) d'éther phénolique. La solution est agitée pendant 1 nuit à 50°C. La solution est alors évaporée, il y a formation de cristaux. On ajoute alors de l'éther isopropylique et on place le ballon dans la glace. Après cristallisation, le produit est centrifugé puis lavé 3 fois au cyclohexane afin d'obtenir 359 mg (Rdt = 85 %) de cristaux blancs purs.

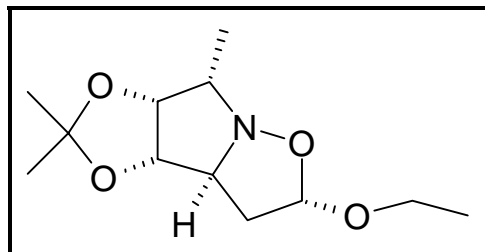
IR (ν, cm⁻¹, KBr): 691, 757, 860, 932, 1001, 1046, 1075, 1136, 1189, 1209, 1226, 1258, 1269, 1372, 1496, 1587, 2933, 2987.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TA): 1,31 (1H, d, Me-6); 1,52 (3H, s, CH₃); 1,56 (3H, s, CH₃); 2,26 (1H, ddd, Hb-3); 2,60 (1H, dd, Ha-3); 3,18 (1H, m, H-6); 4,11 (1H, dd, H-3a); 4,69 (1H, dd, H-4); 4,75 (1H, dd, H-5); 5,90 (1H, d, H-2); 6,98 (3H, m, H_{Ph-o}, H_{Ph-p}); 7,26 (2H, m, H_{Ph-m}).

$J_{\text{b}_3,2} = 5,19$; $J_{\text{b}_3,3\text{a}} = 10,6$; $J_{\text{a}_3,2} = 0$; $J_{\text{a}_3,3\text{a}} = 7,04$; $J_{\text{a}_3,\text{b}_3} = 13,01$; $J_{6,5} = 5,3$; $J_{3\text{a},4} = 0$; $J_{4,5} = 6,3$; $J_{4,3\text{a}} = 1,2$; $J_{6,\text{Me}} = 6,3$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TA): 13,9 (Me-6); 25,6 (C-Me₂); 26,5 (C-Me₂); 39,1 (C-3); 66,5 (C-6); 69,0 (C-3a); 81,5 (C-4); 82,2 (C-5); 102,0 (C-2); 111,0 (C_q-Me₂); 117,1 (C_{Ph-o}); 122,4 (C_{Ph-m}); 129,7 (C_{Ph-p}); 157,1 (C_{Ph-s}).

Analyse élémentaire:	Calculée: C 65,95	H 7,27	N 4,81
	Trouvé: C 65,43	H 7,15	N 4,73

5-Ethoxy-2,2,7-trimethyl-hexahydro-1,3,6-trioxa-6a-aza-cyclopenta[α]pentalène: 63

$C_{12}H_{21}O_4N$
 $M = 243 \text{ g/mol}$
 Cristaux blancs (iPrOH)
 $F = 88-90 \text{ }^\circ\text{C}$
 $[\alpha]_D^{20} = +147^\circ (c = 1; CHCl_3)$
 CCM: $R_f = 0,82(\text{Ether/MeOH } 9/1)$

Dans un cône de 2 mL sont placés 100 mg (0,58 mmol) de nitrone qui sont dissout dans 0,1 mL de chloroforme. 280 μL (5 eq. , 2,9 mmol) d'éthyl vinyl éther sont ajoutés au milieu. On agite alors pendant 1 nuit à 50 $^\circ\text{C}$ puis on évapore le solvant. Le produit est alors recristallisé dans l'éther isopropylique pour donner 140 mg de cristaux blancs purs (rdt quant.).

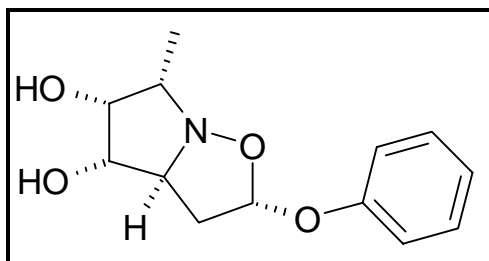
IR (v, cm^{-1} , KBr): 514, 645, 854, 1002, 1040, 1090, 1206, 1371, 1449, 2978.

RMN ^1H (δ , J): 1,80 (3H, t, CH_2CH_3); 1,27 (3H, d, Me-6); 1,32 (3H, s, CH_3); 1,51 (3H, s, CH_3); 2,04 (1H, ddd, H-3b); 2,28 (1H, dd, H-3a); 3,06 (1H, q, H-6); 3,41 (1H, dq, CH_2b); 3,80 (1H, dq, CH_2a); 3,95 (1H, dd, H-3a); 4,61 (1H, d, H-4); 4,68 (1H, dd, H-5); 5,25 (1H, d, H-2).

$J_{a_3,b_3} = 12,7$; $J_{a_3,3a} = 6,8$; $J_{a_3,2} = 0$; $J_{b_3,2} = 5,2$; $J_{b_3,3a} = 11,0$; $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 14,1$; $J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_3} = 7,0$;
 $J_{\text{CH}_2\text{b},\text{CH}_3} = 7,0$; $J_{6,5} = 6,5$; $J_{3a,4} = 0$; $J_{4,5} = 6,5$; $J_{6,\text{Me}} = 5,0 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (δ , CDCl_3): 13,4 (Me-6); 14,8 (CH_3); 25,0 (C-Me₂); 26,0 (C-Me₂); 38,3 (C-3); 62,8 (CH_2); 65,9 (C-6); 68,6 (C-3a); 80,8 (C-4); 81,5 (C-5); 103,0 (C-2); 111,2 (-Me₂).

Analyse élémentaire:	Calculée: C 59,24	H 8,70	N 5,76
	Trouvé: C 58,79	H 8,55	N 5,62

6-Méthyl-2-phénoxy-hexahydro-pyrrolo[1,2-b]isoxazole-4,5-diol: 65

$C_{13}H_{17}O_4N$
 $M = 251 \text{ g/mol}$
 Huile incolore
 $[\alpha]_D^{20} = +130^\circ (c = 1; \text{MeOH})$

100 mg de dérivé bicyclique protégé sont dissout dans 0,4 mL de méthanol et 0,6 mL d'HCl 6N. La solution est agitée à température ambiante pendant 1 nuit puis évaporée pour donner 90 mg de produit déprotégé (Rdt quant.).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,49 (1H, d, Me-6); 2,84 (1H, ddd, Ha-3); 3,10 (1H, dd, Hb-3); 4,13 (1H, qd, H-6); 4,48 (1H, t, H-5); 4,54 (1H, dd, H-4); 4,63 (1H, td, H-3a); 6,55 (1H, d, H-2); 7,13 (2H, d, H_{Ph-o}); 7,19 (1H, t, H_{Ph-p}); 7,42 (2H, t, H_{Ph-m}).

$J_{b3,3a} = 8,1$; $J_{b3,2} = 0$; $J_{a3,2} = 4,8$; $J_{a3,3a} = 9,8$; $J_{a3,b3} = 13,6$; $J_{6,5} = 2,8$; $J_{3a,4} = 7,08$; $J_{4,5} = 3,8$; $J_{6,Me} = 6,8$; $J_{o,m} = 7,3$; $J_{m,p} = 7,5$ Hz.

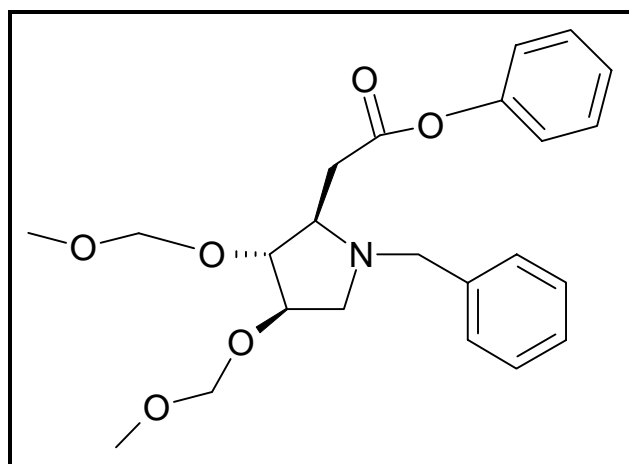
RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 9,8 (Me-6); 38,4 (C-3); 69,2 (C-3a); 69,4 (C-6); 75,5 (C-4); 76,2 (C-5); 107,6 (C-2); 117,3 (C_{Ph-o}); 124,3 (C_{Ph-p}); 130,5 (C_{Ph-m}); 155,4 (C_{Ph-s}).

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺):

Ion $[M+H]^+$: formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}$; m/z théorique 252,12358; m/z trouvée 252,121

• **Synthèse des esters**

(2R, 3R, 4R)-3,4-bis(methoxymethoxy)-N-benzyl-pyrrolidine-2-acétate de phényle: 66



$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{O}_6\text{N}$

M = 415 g/mol

Huile brune

$[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ (c = 1; CHCl_3)

CCM: Rf = 0,3

(Cyclohexane/AcOEt 7/3)

Dans un cône de 1 mL sont placés 50 mg (0,15 mmol) de bicyclic phénylé dilué dans 0,5 mL de chloroforme auxquels sont ajoutés 15 μL (0,15 mmol, 1 éq.) de bromure de benzyle. La solution est agitée pendant 3 h 30 à température ambiante. La réaction est suivie par CCM. Après obtention de l'intermédiaire ammonium, la solution est chauffée à 50 $^\circ\text{C}$ pendant 18 h. Le produit est repris dans du chloroforme puis lavé avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis évaporée pour donner 64 mg (Rdt = quant.) de produit.

IR (ν , cm^{-1} , solution CH_2Cl_2): 691, 700, 749, 918, 1039, 1105, 1150, 1196, 1454, 1493, 1593, 1754, 2823, 2892, 2944.

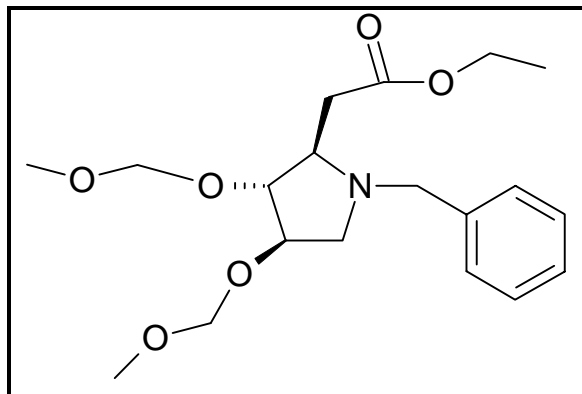
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TA) : 2,63 (1H, q, Hb-5); 2,89 (1H, dd, Ha-2'); 2,92 (1H, dd, Hb-2'); 3,00 (1H, m, Ha-5); 3,12 (1H, m, H-2); 3,31 (3H, s, OMe); 3,37 (3H, s, OMe); 3,41 (1H, d, CHPh); 4,04 (1H, dt, H-4); 4,07 (1H, d, CHPh); 4,08 (1H, d, H-3); 4,35 (1H, dd, OCH_2O); 4,44 (1H, d, OCH_2O); 7,09 (2H, d, H_{Ph-o}); 7,24 (2H, d, $H_{Ph,m}$); 7,30 (1H, t, H_{Ph-p}).

$J_{2,3} = 4,4$; $J_{3,4} = 2,9$; $J_{4,5} = 1,4$; $J_{4,5'} = 5,5$; $J_{5,5'} = 10,9$; $J_{2,2'a} = 7,3$; $J_{2,2'b} = 5,0$; $J_{2'a,2'b} = 15,0$; $J_{\text{CH}_2\text{Ph}} = 5,3$; $J_{\text{CH}_2\text{Ph}} = 13,0$; $J_{\text{OCH}_2\text{O}} = 6,9$; $J_{\text{OCH}_2\text{O}} = 6,7$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TA) : 37,4 (C-2'); 55,4 (OMe); 55,7 (OMe); 57,4 (C-5); 58,6 (CH_2Ph); 66,2 (C-2); 79,5 (C-4); 86,0 (C-3); 95,5 (OCH_2O); 95,9 (OCH_2O); 121,5 ($C_{\text{Ph-o}}$);

125,7 ($C_{\text{OPh-p}}$); 126,4 ($C_{\text{Bn-p}}$); 128,2 ($C_{\text{OPh-m}}$); 128,42 ($C_{\text{Bn-m}}$); 128,54 ($C_{\text{Bn-o}}$); 129,8 (COPh); 138,3 ($C_{\text{Bn-s}}$); 150,7 ($C_{\text{OPh-s}}$); 170,3 (CO_2).

(2R, 3R, 4R)-(1-Benzyl-3,4-bis(methoxymethoxy)-pyrrolidin-2-yl)-acetate d'ethyle: 67



$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{N}$
 $M = 368 \text{ g/mol}$
 Huile jaune
 $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ (c = 1; \text{CHCl}_3)$
 CCM: $R_f = 0,37 (C/A 7/3)$

Dans un cône de 1 mL sont placés 50 mg (0,18 mmol) de dérivé bicyclique qui sont dissous dans 0,5 mL de chloroforme et 21 μL (1 éq., 0,18 mmol) de bromure de benzyle sont ajoutés au milieu. On agite alors pendant 4 h à température ambiante. Après obtention de l'intermédiaire ammonium quaternaire, le solvant et le bromure de benzyle sont évaporés. L'huile obtenue est alors redissoute dans 0,5 mL de chloroforme puis on chauffe à 50 °C pendant 1 nuit. La solution est alors reprise dans du chloroforme puis lavée 3 fois par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée. Les phases organiques sont séchées sur MgSO_4 , filtrée puis évaporées pour donner 53 mg (Rdt = 80%) de produit sous forme d'une huile.

IR (v, cm^{-1} , solution CH_2Cl_2): 700, 918, 1037, 1105, 1151, 1215, 1305, 1145, 1732, 2823, 2935.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TA): 1,25 (1H, t, CH_2CH_3); 2,57 (1H, dd, $H-5a$); 2,65 (1H, dd, $H-2'a$); 2,67 (1H, dd, $H-2'b$); 2,93 (1H, d, $H-5b$); 2,97 (1H, td, $H-2$); 3,31 (3H, s, OMe); 3,36 (1H, d, CHPh); 3,38 (3H, s, OMe); 4,01 (1H, d, CHPh); 4,02 (1H, m, $H-3$); 4,04 (1H, m, $H-4$); 4,14 (2H, dq, CH_2CH_3); 4,62 (1H, dd, OCH_2O); 4,71 (1H, d, OCH_2O); 7,09 (2H, d, $H_{\text{Ph-o}}$); 7,24 (2H, d, $H_{\text{Ph-m}}$); 7,30 (1H, t, $H_{\text{Ph-p}}$).

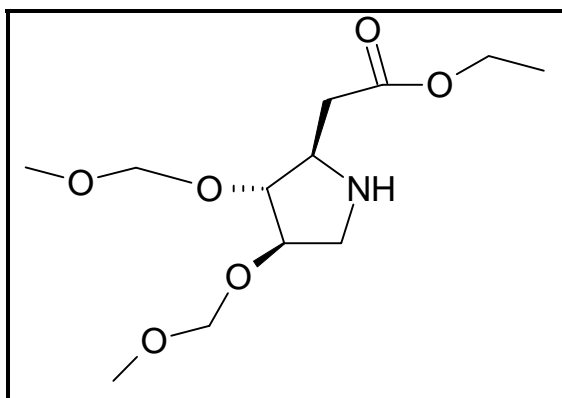
$J_{\text{H,CH}_3} = 7,1$; $J_{\text{H,CH}_3} = 7,2$; $J_{\text{H,H}'} = 14,3$; $J_{4,5a} = 5,3$; $J_{5a,5b} = 10,8$; $J_{4,5b} = 1,6$; $J_{2,2'a} = 7,3$; $J_{2,2'b} = 5,3$; $J_{2'a,2'b} = 15,0$; $J_{2,3} = 5$; $J_{3,4} = 1,6$; $J_{\text{CH}_2\text{Ph}} = 13,1$; $J_{\text{OCH}_2\text{O}} = 6,7 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TA) : 14,2 (CH_2CH_3); 37,5 ($C-2'$); 55,4 (OMe); 55,6 (OMe); 57,4 ($C-5$); 58,5 (CH_2Ph); 60,5 (CH_2CH_3); 66,0 ($C-2$); 79,5 ($C-4$); 86,1 ($C-3$); 95,4 (OCH_2O); 95,8 (OCH_2O); 127,0 ($C_{\text{Ph-p}}$); 128,2 ($C_{\text{Ph-o}}$); 128,8 ($C_{\text{Ph-m}}$); 138,6 ($C_{\text{Ph-s}}$); 171,9 (CO_2).

(2R, 3R, 4R)-3,4-bis(methoxymethoxy)-pyrrolidine)-2-acetate d'éthyle: 70

Dans un cône de 1 mL sont placés 10 mg (0,027 mmol) de l'ester éthylique qui sont dissout dans 0,1 mL d'éthanol. 4 mg de palladium sur charbon 5% sont ajoutés au milieu qui est mis sous hydrogène. Le produit est alors hydrogénolysé à température ambiante pendant 4

h 30. Le solide est ensuite centrifugé, lavé 3 fois à l'éthanol puis les phases alcooliques sont évaporés pour donner 6 mg (Rdt = 80 %) de produit débenzylé.



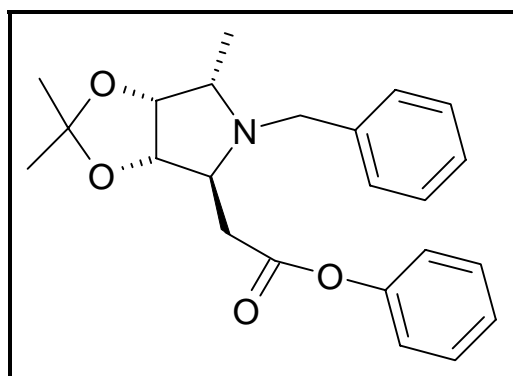
$C_{12}H_{23}O_6N$
 $M = 277 \text{ g/mol}$
 Huile jaune
 CCM: Rf = 0,1 (C/A 7/3)

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, TA): 1,28 (1H, t, CH_2CH_3); 2,96 (1H, dd, H_{a-5}); 3,27 (1H, d, H_{b-5}); 3,38 (3H, s, OMe); 3,41 (3H, s, OMe); 3,57 (2H, m, $H_{a-2'}$, $H_{b-2'}$); 4,06 (1H, m, $H-4$); 4,12 (1H, t, $H-3$); 4,17 (2H, qd, CH_2CH_3); 4,28 (1H, quint., $H-2$); 4,68 (1H, dd, OCH_2O); 4,72 (1H, d, OCH_2O).

$J_{H,CH_3} = 6,8$; $J_{H,CH_3} = 7,0$; $J_{H,H'} = 14,3$; $J_{4,5a} = 7,8$; $J_{5a,5b} = 17,6$; $J_{4,5b} = 7,4$; $J_{2,2'a} = 2,5$; $J_{2,2'b} = 4,0$; $J_{2'a,2'b} = 12,6$; $J_{2,3} = 2,0$; $J_{3,4} = 2,0 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, TA): 14,1 (CH_2CH_3); 35,2 (C-5); 49,0 (C-2'); 56,0 (OMe); 56,1 (OMe); 60,2 (C-4); 61,2 (C-3); 78,8 (C-2); 82,7 (CH_2CH_3); 95,5 (OCH_2O); 95,7 (OCH_2O); 170,5 (CO_2).

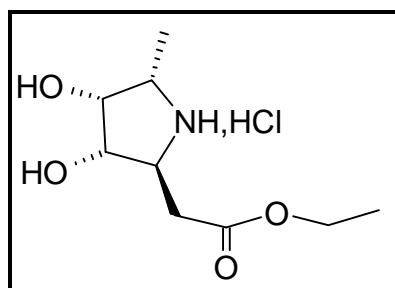
(2S,3S,4R,5R)-5-Methyl-3,4-isopropylidènedioxy-N-benzyl-pyrrolidine-2-acétate de phényle: 69



$C_{23}H_{27}O_4N$
 $M = 381 \text{ g/mol}$
 Huile jaune
 $[\alpha]_D^{20} = +37^\circ$ (c = 1; $CHCl_3$)
 CCM: Rf = 0,54
 (Cyclohexane/AcOEt 7/3)

Dans un cône de 2 mL sont placés 50 mg (0,17 mmol) de dérivé bicyclique phénylé dans 0,5 mL de tétrachloroéthane auxquels sont ajoutés 20 μ L (0,17 mmol, 1 éq.) de bromure de benzyle. La solution est agitée pendant 1 nuit à 100 °C. Le produit est repris au chloroforme puis lavé 3 fois avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium 1N. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis évaporée. On chromatographie alors le produit sur silice (C/A 7/3) pour donner 44 mg (Rdt = 67 %) d'une huile jaune.

IR (ν , cm^{-1} , solution CH_2Cl_2): 689, 738, 871, 909, 934, 1001, 1026, 1070, 1195, 1378, 1493, 1593, 1754, 2935, 2986, 2804, 3029, 3063, 3378.

(2S,3S,4R,5R)-Methyl-3,4-diol-N-benzyl-pyrrolidine-2-acétate d'éthyle: 71C₉H₁₈O₄NCl

M = 239,5 g/mol

Cristaux blancs

F = 158-160 °C (AcOEt/EtOH 8/2)

[α]_D²⁰ = -4° (c = 1; CHCl₃)CCM: Rf = 0,6 (CH₂Cl₂/EtOH 6/4)

100 mg (0,3 mmol) d'ester protégé sont dissous dans 1 mL d'éthanol et 0,35 mL d'HCl 6N. La solution est agitée à température ambiante pendant 32 h. Après évaporation de l'acide, la solution est hydrogénéolysée dans 1 mL d'éthanol en présence de 10 mg de Pd/C (5%) à température ambiante pendant 48 h. Après centrifugation, lavage à l'éthanol et évaporation, on obtient alors des cristaux blancs. Ceux ci sont repris dans l'éthanol afin d'éliminer les insolubles puis recristallisés dans AcOEt / EtOH 8/2. On obtient alors 15 mg de produit déprotégé sous forme de cristaux blancs (Rdt = 25 %).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz, TA): 1,28 (3H, t, CH₂CH₃); 1,40 (3H, d, Me-5); 2,91 (1H, dd, H-2'b); 3,07 (1H, dd, H-2'a); 3,80 (2H, m, H-5, H-2); 4,16 (1H, dd, H-4); 4,23 (3H, m, CH₂CH₃, H-3).

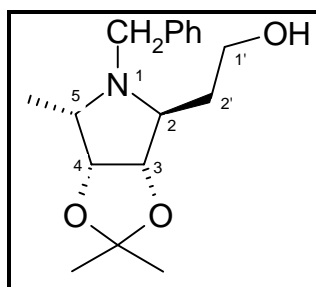
J_{5,Me} = 6,8; J_{CH₂,CH₃} = 7,3; J_{2,2'a} = 3,5; J_{2,2'b} = 10,1; J_{2'a,2'b} = 17,9 Hz.

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz, TA): 11,4 (Me-5); 13,7 (CH₂CH₃); 35,1 (C-2'); 57,2 (C-2); 57,4 (C-5); 62,9 (CH₂CH₃); 71,9 – 75,4 (C-4, C-3); 172,5 (CO₂).

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺):

Ion [M+H]⁺: formule brute C₉H₁₉O₄N; m/z théorique 204,12358; m/z trouvée 204,1249

- Synthèse des dérivés des esters**

(2S,3S,4R,5R)-N-Benzyl-5-méthyl-3,4-isopropylidènedioxypyrrolidine-2-éthanol: 73C₁₆H₂₃O₃N

M = 277 g/mol

Huile incolore

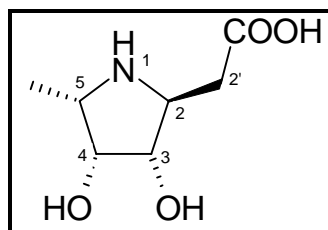
[α]_D²⁰ = - 25 ° (c = 1; CHCl₃)

CCM: Rf = 0,08 (C/A 7/3)

150 mg (0,39 mmol) d'ester phénolique sont placés sous argon dans 1,5 mL d'éther sec. 23 mg (0,59 mmol, 1,5 éq.) de LiAlH₄ sont ajoutés et la solution est agitée à température ambiante pendant 3h. L'hydruire restant est alors neutralisé avec 40 mg de Na₂SO₄, 10 H₂O puis 0,5 mL de soude 10 %. Le précipité compact est alors repris dans l'éther 3 fois puis dans l'AcOEt. Les solutions organiques sont évaporées puis purifiées par chromatographie (C/A 7/3) pour donner 101 mg d'alcool (Rdt = 93%).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TA): 1,14 (1H, ddd, Hb-2'); 1,20 (3H, s, Me-5); 1,25 (3H, s, CH₃); 1,52 (3H, s, CH₃); 1,58 (1H, ddt, Ha-2'); 3,18 (1H, q, H-5); 2,20 (1H, m, H-2); 3,26

Le produit est élué à l'eau, au méthanol puis à l'ammoniac 0,5 N. On obtient alors 26 mg (Rdt = 62 %) de produit totalement déprotégé recueilli dans la phase ammoniacuée.



$C_7H_{13}O_4N$
 $M = 175 \text{ g/mol}$
 Huile incolore
 $[\alpha]_D^{20} = -39^\circ$ (c = 1; $CHCl_3$)
 CCM: Rf = 0,15 (MeOH)

RMN 1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,38 (3H, d, Me-5); 2,63 (1H, dd, $Hb-2'$); 2,79 (1H, dd, $Ha-2'$); 3,72 (1H, tq, $H-2$); 3,80 (1H, qd, $H-5$); 4,16 (1H, t, $H-4$); 4,23 (1H, dd, $H-3$).

$J_{5,Me} = 6,8$; $J_{2,2'a} = 4,3$; $J_{2,2'b} = J_{2,3} = 8,3$; $J_{2'a,2'b} = 17,3$; $J_{4,5} = 2,8$; $J_{3,4} = 4,0$ Hz.

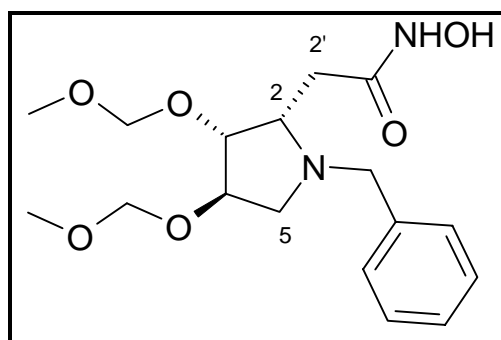
RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 11,6 (Me-5); 36,6 (C-2'); 57,1 (C-5); 58,4 (C-2); 72,1 (C-4); 75,2 (C-3); 177,6 (CO_2).

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺) :

Ion $[M+H]^+$: formule brute $C_7H_{13}O_4N$; m/z théorique 176,09228; m/z trouvée 176,0975

Acide (2S,3R,4R)-N-benzyl-3,4-bis(methoxyméthoxy)-pyrrolidine-2-acetohydroxamique: 75

Dans un cône de 1 mL sont placés 30 mg (0,07 mmol) d'éther phénylique dissous dans 0,3 mL de pyridine. On ajoute alors 10 mg (2 éq., 0,14 mmol) de chlorhydrate d'hydroxylamine. La solution est chauffée à 30 °C pendant 1 nuit puis le solvant évaporé. Le produit est alors purifié par colonne de chromatographie sur silice (CH_2Cl_2 puis MeOH) pour donner 19 mg (Rdt = 76 %) de produit pur.



$C_{17}H_{26}O_6N_2$
 $M = 354 \text{ g/mol}$
 Huile jaune
 $[\alpha]_D^{20} = -5^\circ$ (c = 1; $CHCl_3$)
 CCM: Visible à $FeCl_3$

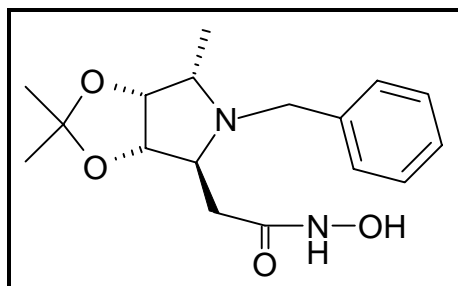
RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, TA): 2,46 (1H, dd, $Ha-5$); 2,67 (2H, br s, $H-2$, $Ha-2'$); 2,77 (1H, m, $Hb-2'$); 2,97 (1H, d, $Hb-5$); 3,23 (1H, d, $H(Bn)$); 3,94 (1H, d, $H-3$); 3,98 (1H, d, $H-4$); 4,03 (1H, d, $H(Bn)$); 4,58 (1H, d, OCH_2O); 4,64 (1H, d, OCH_2O); 4,64 (1H, d, OCH_2O); 4,70 (1H, d, OCH_2O); 7,26-7,35 (5H, m, H_{Ph}); 10,8 (1H, br s, NHOH).

$J_{2,3} = 4,9$; $J_{3,4} = 0$; $J_{4,5a} = 4,6$; $J_{4,5b} = 0$; $J_{5a,5b} = 10,8$; $J_{Bn} = 12,8$; $J_{OCH_2O} = 7,0$; $J_{OCH_2O} = 6,9$ Hz.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, TA): 32,8 (C-2'); 55,6 (OMe); 55,7 (OMe); 57,4 (C-5); 57,8 (CH_2Ph); 66,3 (C-2); 78,3 (C-4); 85,2 (C-3); 95,3 (OCH_2O); 96,1 (OCH_2O); 127,7 (C_{Ph-p}); 128,7 (C_{Ph-o}); 129,0 (C_{Ph-m}); 136,9 (C_{Ph-s}); 167,9 (CO).

Analyse élémentaire: Calculée: C 57,61 H 7,39 N 7,90
 Trouvée: C 57,46 H 7,41 N 7,49

Acide (2S,3S,4R,5R)-N-benzyl-5-méthyl-3,4-isopropylidènedioxypyrrolidine-2-acetohydroxamique: 76



$C_{17}H_{24}O_4N_2$
 $M = 320 \text{ g/mol}$
 Mousse orange
 $[\alpha]_D^{20} = +30^\circ$ (c = 1; $CHCl_3$)
 CCM: Rf = 0,37 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9/1)

100 mg (0,36 mmol) d'ester phénylique sont dissous dans 1,5 mL de pyridine auxquels sont ajoutés 50 mg (2 éq., 0,72 mmol) de chlorhydrate d'hydroxylamine. La solution est agitée à 30 °C pendant une nuit. Le solvant est alors évaporé puis coévaporé au toluène. Une chromatographie sur silice ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95/5 puis 9/1) permet d'obtenir 85 mg d'une mousse orange. (Rdt = 67 %).

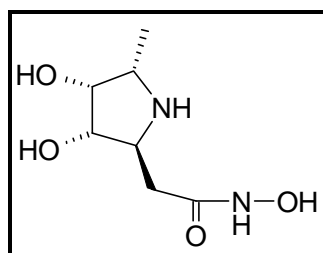
RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, TA): 1,03 (3H, s large, Me-5); 1,16 (3H, s, CH_3); 1,46 (3H, s, CH_3); 2,05 (1H, m, H-2'b); 2,09 (1H, m, H-2'a); 2,93 (1H, m, H-5); 3,30 (1H, dd, H-2); 3,49 (1H, m, CH_2Ph); 3,77 (1H, m, CH_2Ph); 4,47 (2H, m, H-3, H-4); 7,14-7,23 (5H, m, Ph).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, TA): 11,6 (Me-5); 25,1 (C-Me₂); 26,2 (C-Me₂); 29,7 (C-2'); 50,8 (CH_2Ph); 58,3 (C-5); 62,3 (C-2); 81,2 (C-4); 82,8 (C-3); 112,0 (C_q-Me₂); 127,1 (Ph-p); 128,3 (C_{Ph}-m); 128,4 (C_{Ph}-o); 138,6 (C_{Ph}-s); 169,2 (CO₂).

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺):

Ion $[M+H]^+$: formule brute $C_{17}H_{25}O_4N_2$; m/z théorique 321,18143; m/z trouvée 321,1878

Acide (2S,3S,4R,5R)-3,4-dihydroxy-5-méthyl-pyrrolidine-2-acetohydroxamique: 77



$C_7H_{14}O_4N_2$
 $M = 190 \text{ g/mol}$
 Mousse orangée
 $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ$ (c = 1; H_2O)
 CCM: Rf = 0,36 (MeOH)

79 mg (0,24 mmol) d'acide hydroxamique protégé sont dissout dans 0,6 mL d'HCl 6N. La solution est agitée à température ambiante pendant 24h. L'acide est alors évaporé et le produit sans acétonide est alors hydrogénéolysé dans 0,5 mL d'eau sur 20 mg de Pd/C (5%) pendant une nuit. La solution est centrifugée et lavée à l'eau. Après évaporation, le produit totalement déprotégé est purifié sur 3g de résine d'Amberlite IR-120 (forme H⁺). Le produit est élué par H_2O , MeOH puis NH_4OH 0,5 N puis 1N. On obtient alors 40 mg de mousse orangée après évaporation des phases ammoniacuées (Rdt = 87 %).

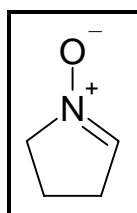
RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,39 (3H, d, Me-5); 2,62 (1H, dd, H-2'b); 2,79 (1H, dd, H-2'a); 3,70 (1H, td, H-2); 3,80 (1H, q, H-5); 4,15 (1H, t, H-4); 4,17 (1H, dd, H-3).

$J_{5,\text{Me}} = 6,8$; $J_{2,2a'} = 8,6$; $J_{2,2'b} = 4,5$; $J_{2'a,2'b} = 17,4$; $J_{2,3} = 8,6$; $J_{3,4} = 3,8$; $J_{4,5} = 3$ Hz.

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 11,5 (Me-5); 34,7 (C-2'); 57,2 (C-2); 57,6 (C-5); 71,8 (C-4); 75,3 (C-3); 174,1 (CO_2).

• **Synthèse d'acides hydroxamiques**

1-Pyrroline N-oxyde: 78



$\text{C}_4\text{H}_7\text{ON}$
 $M = 85$ g/mol
 Huile orange
 CCM: 0,27 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1)

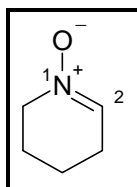
2g (28 mmol, 2,3 mL) de pyrrolidine et 371 mg (0,04 éq., 1,12 mmol) de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sont dissout dans 8 mL d'eau. La solution est placée à 0°C et on ajoute alors 2,6 mL (3éq., 84 mmol) d'eau oxygénée 30 %. Lorsque l'ajout est terminé, la solution est agitée pendant 5h à température ambiante. Elle est ensuite reprise dans du chloroforme afin d'extraire la phase aqueuse. Le produit ayant beaucoup d'affinité pour la phase aqueuse, celle ci est saturée en NaCl afin de faire passer le produit en phase organique. Après plusieurs extractions, la phase aqueuse est séchée sur MgSO_4 puis reprise dans le chloroforme afin de récupérer tout le produit. Les phases organiques sont séchées sur MgSO_4 , filtrées puis évaporées. On obtient alors un mélange de nitroène 50/50 avec le produit de départ. Le produit sera utilisé brut dans l'étape suivante où la purification aura lieu.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TA): 2,28 (2H, quint, H-4); 2,76 (2H, qt, H-3); 3,99 (2H, qt, H-5); 6,93 (1H, m, H-2).

$J_{2,3} = 2,2$; $J_{2,5} = 2,0$; $J_{3,4} = 7,4$; $J_{4,5} = 8,0$ Hz

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TA): 18,8 (C-4); 28,4 (C-3); 61,7 (C-5); 135,5 (C-2).

2,3,4,5-tetrahydropyridine-N-oxyde: 79



$\text{C}_5\text{H}_9\text{ON}$
 $M = 99,13$ g/mol
 Huile jaune
 CCM: 0,4 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1)

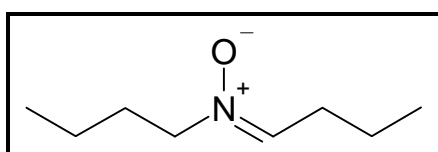
2g (23,5 mmol, 2,3 mL) de pipéridine et 310 mg (0,04 éq., 0,94 mmol) de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sont dissout dans 8 mL d'eau. La solution est placée à 0°C et on ajoute alors 2,2 mL (3éq., 70,5 mmol) d'eau oxygénée 30 %. Lorsque l'ajout est terminé, la solution est agitée pendant 8h à température ambiante. Elle est ensuite reprise dans du chloroforme afin d'extraire la phase aqueuse. Le produit ayant beaucoup d'affinité pour la phase aqueuse, celle ci est saturée en NaCl afin de faire passer le produit en phase organique. Après plusieurs

extractions, la phase aqueuse est séchée sur MgSO_4 puis reprise dans le chloroforme afin de récupérer tout le produit. Les phases organiques sont séchées sur MgSO_4 , filtrées puis évaporées. On obtient alors un mélange 60/40 de nitron et de produit de départ. Le produit sera utilisé brut dans l'étape suivante où la purification aura lieu.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, 300K): 1,74 (2H, m, H-4); 1,98 (2H, quint, H-5); 2,46 (2H, m, H-3); 3,80 (2H, m, H-6); 7,21 (1H, m, H-1).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TA): 17,0 (C-4); 22,4 (C-5); 25,2 (C-3); 57,5 (C-6); 137,2 (C-2).

***N*-butylidene-butylamine-*N*-oxide: 80**



$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{ON}$
 $M = 143 \text{ g/mol}$
 Huile incolore
 CCM: 0,6 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1)

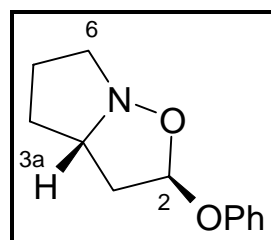
2g (15,5 mmol, 2,65 mL) de dibutylamine et 204 mg (0,04 éq., 0,62 mmol) de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sont dissout dans 20 mL de méthanol. La solution est placée à 0°C et on ajoute alors 1,42 mL (3éq., 46,4 mmol) d'eau oxygénée 30 %. Lorsque l'ajout est terminé, la solution est agitée pendant 8h à température ambiante. Le méthanol est ensuite évaporé, on ajoute alors 20 mL d'une solution de NaCl saturée puis on extrait au chloroforme. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis évaporée. On obtient alors un mélange de nitron avec la présence d'un peu de produit de départ. Le produit sera utilisé brut dans l'étape suivante où la purification aura lieu.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TA): 0,94 (3H, t, CH_3); 0,97 (3H, t, CH_3); 1,32-1,37 (2H, m, CH_2); 1,53-1,57 (2H, m, CH_2); 1,87-1,91 (2H, m, CH_2); 2,47 (2H, dt, $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$); 3,77 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-N}$); 6,73 (1H, t, $\text{CH}=\text{N}$).

$J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 6,4$; $J_{\text{CH}_2\text{C}=\text{, CHN}} = 6,5$; $J_{\text{CH}=\text{N, CH}_2\text{C}=\text{}} = 6,0 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TA): 13,5 (CH_3); 13,6 (CH_3); 18,6 (CH_2); 19,2 (CH_2); 28,1 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{}$); 29,0 (CH_2); 77,2 (CH_2N); 138,9 ($\text{CH}=\text{N}$).

2-Phényloxy hexahydro pyrrolo[1,2-*b*]isoxazole: 78a



$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$
 $M = 205 \text{ g/mol}$
 Huile jaune pâle
 CCM: 0,74 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1)
 0,38 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98/2)

300 mg (3,5 mmol) de nitronne sont dissout dans 1,5 mL de tétrachloroéthane auxquels sont ajoutés 855 mg (2 éq., 7 mmols) d'éther phénylique. La solution est agitée à 50°C pendant 1 nuit. La solution est ensuite évaporée puis le produit purifié sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 98/2) pour donner 318 mg de produit pur.

IR (ν, cm⁻¹): 504, 689, 751, 923, 969, 1002, 1011, 1029, 1069, 1175, **1224**, 1345, 1494, 1588, 1598, 2850, 2960, 2967.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, 300K): 1,64 (1H, m, *Ha*-4); 1,76 (1H, m, *Ha*-5); 1,95-2,05 (2H, m, *Hb*-4, *Hb*-5); 2,42 (1H, dt, *Ha*-3); 2,82 (1H, ddd, *Hb*-3); 3,04 (1H, m, *Ha*-6); 3,43 (1H, ddd, *Hb*-6); 3,90 (1H, m, *H*-3a); 5,82 (1H, dt, *H*-2); 6,97 (1H, t, *H*_{Ph-p}); 7,02 (2H, d, *H*_{Ph-o}); 7,26 (2H, m, *H*_{Ph-m}).

$J_{2,3a} = 5,7$; $J_{2,3b} = J_{2,6a} = 1,5$; $J_{3a,3b} = 13,3$; $J_{3a,H-3a} = 4,5$; $J_{3b,H-3a} = 7,8$; $J_{H-3a,4a} = 5,6$; $J_{H-3a,4b} = 8,0$; $J_{4a,4b} = 12,2$; $J_{5a,5b} = 12,0$; $J_{5a,6a} = 7,6$; $J_{5a,6b} = 3,4$; $J_{5b,6a} = 8,4$; $J_{5b,6b} = 7,0$; $J_{6a,6b} = 13,8$; $J_{H_o,H_m} = 8,2$; $J_{H_m,H_p} = 7,3$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, 300K): 23,8 (*C*-5); 31,5 (*C*-4); 44,0 (*C*-3); 56,9 (*C*-6); 64,2 (*C*-3a); 100,0 (*C*-2); 116,6 (*C*_{Ph-o}); 121,6 (*C*_{Ph-m}); 129,1 (*C*_{Ph-p}); 156,6 (*C*_{Ph-s}).

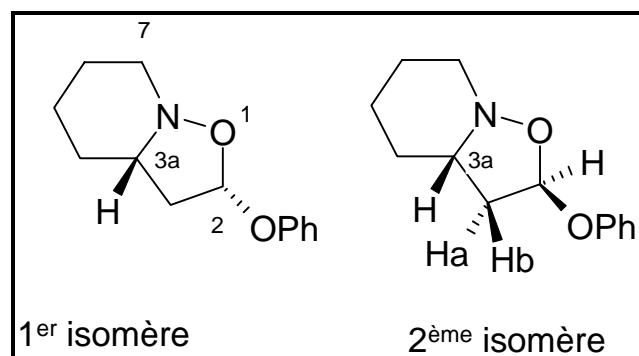
Isomère minoritaire (9%): 23,7 (*C*-5); 31,0 (*C*-4); 43,4 (*C*-3); 58,7 (*C*-6); 63,7 (*C*-3a); 101,5 (*C*-2); 116,1 (*C*_{Ph-o}); 121,0 (*C*_{Ph-m}); 129,2 (*C*_{Ph-p}); 156,0 (*C*_{Ph-s}).

Analyse élémentaire: Calculée: C 70,22 H 7,37 N 6,82

Trouvée: C 70,28 H 7,56 N 6,82

2-Phénoxy hexahydro-2*H*-isoxazolo[2,3-*a*]pyridine: 79a

500 mg (5,05 mmol) de nitronne sont dissous dans 2,5 mL de tétrachloroéthane auxquels sont ajoutés 1,20 g (2 éq., 10,1 mmol) d'éther phénylique. La solution est agitée à 50°C pendant 1 nuit. La solution est ensuite évaporée puis le produit purifié sur colonne de silice (CH₂Cl₂) pour donner 647 mg des deux isomères en proportion 50/50 (rdt = 58 %).



C₁₃H₁₇O₂N
M = 219 g/mol
Huile orange
CCM: 0,75 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1)
0,2 (CH₂Cl₂)

IR (ν, cm⁻¹): 692, 754, 923, 954, 984, 1004, 1028, 1071, 1174, 1194, 1227, 1260, 1496, 1588, 1600, 2855, 2838.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TA):

1er isomère: 1,28 (1H, m, *Hb*-5); 1,40 (1H, m, *Hb*-6); 1,63 (2H, m, *Ha*-4, *Hb*-4); 1,65-1,80 (2H, m, *Ha*-5, *Ha*-6); 2,43 (1H, m, *Ha*-3); 2,54 (1H, dd, *Hb*-3); 3,14 (1H, t, *Hb*-7); 3,28 (1H,

d, *Ha*-7); 3,56 (1H, m, *H*-3a); 5,84 (1H, d, *H*-2); 7,00 (3H, m, 2 *H_{Ph}*-o, *H_{Ph}*-p); 7,26 (2H, m, 2 *H_{Ph}*-m).

$J_{2,3a} = 5,5$; $J_{2,3b} = 2$; $J_{3a,3b} = 12,6$; $J_{3a,H-3a} = 5,0$; $J_{3b,H-3a} = 5,8$; $J_{6,7b} = 10,0$; $J_{7a,7b} = 13,5$ Hz.

2ème isomère: 1,33-1,43 (2H, m, *Hb*-4', *Hb*-5'); 1,63 (1H, m, *Ha*-4'); 1,65-1,80 (2H, m, *Ha*-6', *Hb*-6'); 2,02 (1H, d, *Ha*-5'); 2,25 (1H, dt, *Ha*-3'); 2,37 (1H, m, *Hb*-3'); 2,65 (2H, m, *H*-3a', *Hb*-7'); 3,51 (1H, m, *Ha*-7'); 5,73 (1H, d, *H*-2'); 7,00 (3H, m, 2 *H_{Ph}*-o, *H_{Ph}*-p); 7,26 (2H, m, 2 *H_{Ph}*-m).

$J_{2,3a} = 5,7$; $J_{2,3b} = 0$; $J_{3a,3b} = 11,8$; $J_{3a,H-3a} = 11,8$; $J_{3b,H-3a} = 4,2$; $J_{5'a,5'b} = 12,6$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TA):

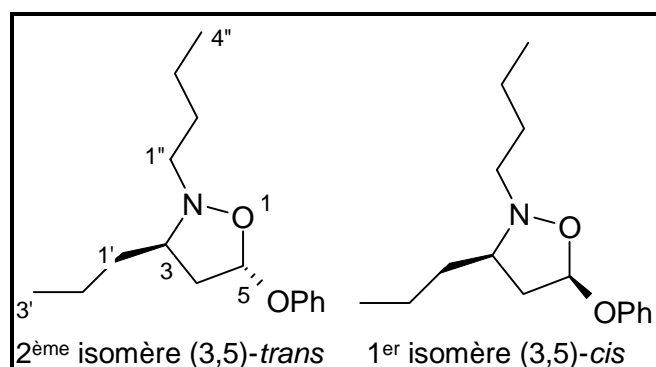
1er isomère: 20,7 (C-6); 23,4 (C-5); 26,0 (C-4); 41,6 (C-3); 51,0 (C-7); 57,8 (C-3a); 99,9 (C-2); 116,6 (C_{Ph}-o); 121,6 (C_{Ph}-p); 129,1 (C_{Ph}-m); 157,0 (C_{Ph}-s).

2ème isomère: 21,3 (C-4'); 24,8 (C-6'); 28,6 (C-5'); 41,6 (C-3'); 55,7 (C-7'); 63,8 (C-3a'); 98,7 (C-2'); 116,1 (C_{Ph}-o'); 121,6 (C_{Ph}-p'); 129,2 (C_{Ph}-m'); 156,8 (C_{Ph}-s').

Analyse élémentaire: Calculée: C 71,21 H 7,81 N 6,39

Trouvée: C 71,12 H 8,05 N 6,27

2-Butyl 5-phénoxy 3-propyl isoxazolidine: 80a



C₁₆H₂₅O₂N

M = 263 g/mol

Huile orange

CCM: 0,48 et 0,29 (CH₂Cl₂)

500 mg (3,5 mmol) de nitronne sont dissout dans 2,5 mL de tétrachlorure de carbone auxquels sont ajoutés 0,850 mg (2 éq., 7 mmols) d'éther phénylique. La solution est agitée à 50°C pendant 48 heures. Après évaporation, le produit est purifié sur colonne de silice (CH₂Cl₂) pour donner 506 mg des deux isomères en proportion 50/50 (rdt = 55 %).

IR (ν, cm⁻¹): 692, 754, 949, 975, 1006, 1029, **1227**, 1495, 1588, 1600, 2872, **2933**, **2958**.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TA):

Isomère 1 (3,5)-cis: 0,89 (3H, t, CH₃-3'); 0,96 (3H, t, CH₃-4''); 1,32-1,43 (4H, m, CH₂-2', CH₂-3''); 1,52 (1H, m, *Ha*-1'); 1,62 (3H, m, *Hb*-1', CH₂-2''); 2,23 (1H, ddd, *Ha*-4); 2,58 (1H, ddd, *Hb*-1''); 2,60 (1H, m, *H*-3); 2,78 (1H, m, *Hb*-4); 2,92 (1H, m, *Ha*-1''); 5,67 (1H, d, *H*-5); 6,98 (1H, t, *H_{Ph}*-p); 7,03 (2H, d, 2 *H_{Ph}*-o); 7,25 (2H, m, 2 *H_{Ph}*-m).

$J_{1a'',1b''} = 12,6$; $J_{1a'',2''} = 6,1$ et $9,2$; $J_{1b'',2''} = 5,3$ et $8,9$; $J_{3',4'} = 7,3$; $J_{3'',4''} = 7,3$; $J_{3,4a} = 8,6$; $J_{3,4b} = 7,1$; $J_{4a,4b} = 13,1$; $J_{4a,5} = 2,8$; $J_{4b,5} = 7,1$; $J_{H_o,H_m} = 7,2$; $J_{H_m,H_p} = 8,4$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TA): 13,9 (Me-3'); 14,1 (Me-4''); 20,2 (C-2'); 20,4 (C-3''); 30,5 (C-2''); 36,7 (C-1'); 42,7 (C-4); 60,6 (C-1''); 64,5 (C-3); 101,4 (C-5); 116,5 (C_{Ph}-o); 121,7 (C_{Ph}-p); 129,3 (C_{Ph}-m); 157,1 (C_{Ph}-s).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TA):

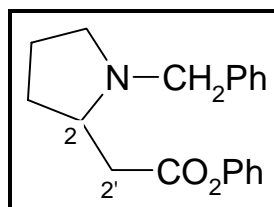
Isomère 2 (3,5)-trans: 0,83 (3H, t, CH₃-4"); 0,96 (3H, t, CH₃-3'); 1,28 (2H, m, CH₂-3"); 1,35-1,45 (3H, m, H_b-1', CH₂-2'); 1,54 (2H, quint, CH₂-2"); 1,62 (2H, m, H_a-1'); 2,23 (1H, ddd, H_a-4); 2,67 (1H, dd, H_b-4); 2,84 (1H, td, H_a-1"); 2,97 (1H, td, H_b-1"); 3,22 (1H, quint, H-3); 5,77 (1H, d, H-5); 7,00 (3H, m, 2 H_{Ph-o}, H_{Ph-p}); 7,27 (2H, m, 2 H_{Ph-m}).

J_{1a",1b"} = 12,3; J_{1a",2"} = 7,7; J_{1b",2"} = 7,0; J_{2",3"} = J_{3",4"} = 7,4; J_{2',3'} = 7,0; J_{3,1'} = 6,1; J_{3,4a} = 8,3; J_{3,4b} = 6,6; J_{4a,5} = 5,3; J_{4b,5} = 0; J_{4a,4b} = 12,8 Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TA): 13,8 (Me-4"); 14,1 (Me-3'); 20,2 (C-2'); 20,3 (C-3"); 30,5 (C-2"); 36,6 (C-1'); 42,6 (C-4); 60,7 (C-1"); 64,4 (C-3); 101,4 (C-5); 116,5 (C_{Ph-o}); 121,6 (C_{Ph-p}); 129,3 (C_{Ph-m}); 157,0 (C_{Ph-s}).

Analyse élémentaire: Calculée: C 72,97 H 9,57 N 5,32

Trouvée: C 72,67 H 9,79 N 5,51

N-Benzyl pyrrolidine 2-acétate de phényle: 78b

C₁₉H₂₁O₂N

M = 295 g/mol

Huile jaune pâle

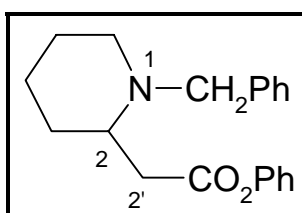
CCM: 0,24 (CH₂Cl₂)

180 mg (0,87 mmol) d'adduit sont dissout dans 2 mL de chloroforme auxquels sont ajoutés 100 µL (1 éq., 0,87 mmols) de bromure de benzyle. La solution est agitée à température ambiante pendant 7h puis à 50°C pendant 1 nuit. La solution est ensuite reprise au dichlorométhane puis lavée 3 fois avec une solution de bicarbonate de sodium saturée. Les phases organiques sont ensuite séchées sur MgSO₄, filtrées puis évaporées pour donner une huile qui sera purifiée sur colonne de silice (CH₂Cl₂). On obtient alors 203 mg (rdt = 78 %) d'une huile jaune pâle.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TA): 1,71-1,78 (3H, m, H_b-3, CH₂-4); 2,15 (1H, m, H_a-3); 2,25 (1H, q, H_b-5); 2,63 (1H, dd, H_a-2'); 2,91 (1H, dd, H_b-2'); 2,95 (1H, m, H_a-5); 3,04 (1H, m, H-2); 3,37 (1H, d, CH₂Ph); 4,07 (1H, d, CH₂Ph); 7,08 (2H, d, Ho(OPh)); 7,20-7,37 (8H, m, H_{Ph}).

J_{2a'-2b'} = 14,9; J_{2b',2} = 4,3; J_{2a',2} = 8,5; J_{4,5b} = J_{5a,5b} = 7,5; J_{CH₂Ph} = 12,8; J_{CH₂Ph} = 12,8 Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TA): 22,3 (C-4); 30,9 (C-3); 39,8 (C-2'); 54,0 (C-5); 58,7 (CH₂Ph); 60,8 (C-2); 121,6 (C_{Ph-o}); 125,8 (C_{Ph-p}); 127,0 (C_{Bn-p}); 128,3 (C_{Bn-o}); 128,9 (C_{Bn-m}); 129,4 (C_{Ph-m}); 139,1 (C_{Bn-s}); 150,7 (C_{Ph-s}); 170,8 (CO).

1-Benzyl pipéridine 2-acétate de phényle: 79b

C₂₀H₂₃O₂N

M = 309 g/mol

Huile jaune pâle

CCM: 0,08 (CH₂Cl₂)

0,5 (CH₂Cl₂/MeOH 95/5)

300 mg (1,4 mmol) d'adduit sont dissout dans 3 mL de chloroforme auxquels sont ajoutés 165 μL (1 eq. , 1,4 mmols) de bromure de benzyle. La solution est agitée à température ambiante pendant 4h puis à 50°C pendant 1 nuit. La solution est ensuite reprise au dichlorométhane puis lavée 3 fois avec une solution de bicarbonate de sodium saturée. Les phases organiques sont ensuite séchées sur MgSO_4 , filtrées puis évaporées pour donner une huile qui sera purifiée sur colonne de silice (CH_2Cl_2). On obtient alors 276 mg (rdt = 65 %) d'une huile jaune pâle.

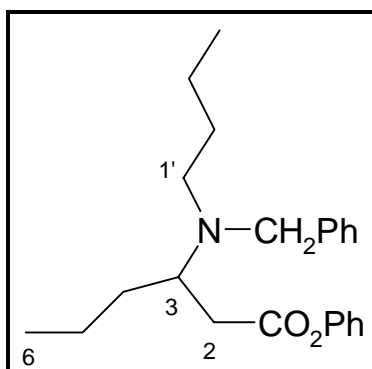
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TA): 1,50 (3H, m, H_{b-4} , H_{a-5} , H_{b-5}); 1,65 (2H, m, H_{b-3} , H_{a-4}); 1,86 (1H, m, H_{a-3}); 2,25 (1H, m, H_{b-6}); 2,67 (1H, m, H_{a-6}); 2,70 (1H, dd, $H_{b-2'}$); 2,96 (1H, dd, $H_{a-2'}$); 3,14 (1H, m, $H-2$); 3,45 (1H, d, CH_2Ph); 3,88 (1H, d, CH_2Ph); 7,06 (2H, d, 2 $H_{o}(\text{OPh})$); 7,23 (4H, m, $H_{p}(\text{OPh})$, $H_{p}(\text{Bn})$), 7,27-7,37 (6H, m, H_{Ph}).

$J_{2,2'a} = 4,7$; $J_{2,2'b} = 7,8$; $J_{2'a,2'b} = 14,5$; $J_{2,3} = 4,0$ et $6,5$; $J_{5,6a} = 3,5$ et $6,4$; $J_{5,6b} = 4,0$ et $7,3$; $J_{6a,6b} = 12,0$; $J_{\text{CH}_2\text{Ph}} = 13,3$; $J_{\text{CH}_2\text{Ph}} = 13,3$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TA): 22,1 (C-4); 25,4 (C-5); 30,8 (C-3); 32,1 (C-2'); 49,9 (C-6); 57,7 (C-2); 58,7 (CH_2Ph); 121,6 ($\text{C}_{\text{Ph-o}}$); 125,8 ($\text{C}_{\text{Ph-p}}$); 126,9 ($\text{C}_{\text{Bn-p}}$); 128,2 ($\text{C}_{\text{Bn-o}}$); 128,8 ($\text{C}_{\text{Bn-m}}$); 129,4 ($\text{C}_{\text{Ph-m}}$); 139,2 ($\text{C}_{\text{Bn-s}}$); 150,7 ($\text{C}_{\text{Ph-s}}$); 171,4 (CO).

***N*-Benzyl, *N*-butyl 3-amino hexanoate de phényle: 80b**

300 mg (1,14 mmol) d'adduit sont dissout dans 3 mL de chloroforme auxquels sont ajoutés 135 μL (1 eq. , 1,14 mmols) de bromure de benzyle. La solution est agitée à température ambiante pendant 4 h 30 puis à 50°C pendant 20 h. La solution est ensuite reprise au dichlorométhane puis lavée 3 fois avec une solution de bicarbonate de sodium saturée. Les phases organiques sont ensuite séchées sur MgSO_4 , filtrées puis évaporées pour donner une huile qui sera purifiée sur colonne de silice (C/A 9/1). On obtient alors 293 mg (rdt = 73 %) d'une huile jaune pâle.



$\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_2\text{N}$

$M = 353$ g/mol

Huile jaune pâle

CCM: 0,71 (CH_2Cl_2)

0,37 (C/A 9/1)

IR (ν , cm^{-1}): 734, 689, 697, 1117, **1162**, **1197**, 1456, 1493, 1594, **1755**, 2872, **2932**, **2958**.

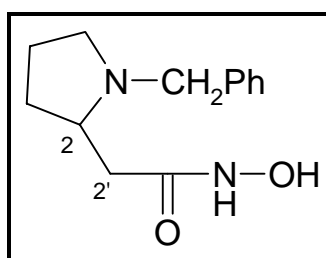
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, 300K): 0,82 (3H, t, CH_3-4'); 0,90 (3H, t, CH_3-6); 1,25 (2H, m, CH_2-3'); 1,36-1,44 (5H, m, CH_2-2' , H_{b-4} , CH_2-5); 1,67 (1H, m, H_{a-4}); 2,44 (1H, m, CH_2-1'); 2,49 (1H, m, H_{b-2}); 2,80 (1H, dd, H_{a-2}); 3,30 (1H, quint, $H-3$); 3,57 (1H, d, CH_2Ph); 3,66 (1H, d, CH_2Ph); 7,07 (2H, d, 2 $H_{o}(\text{OPh})$); 7,17-7,37 (8H, m, H_{Ph}).

$J_{2a,2b} = 14,1$; $J_{2a,3} = 6,8$; $J_{2b,3} = 7,3$; $J_{3,4} = 6,8$; $J_{3,4'} = 7,3$; $J_{5,6} = 7,3$; $J_{\text{CH}_2\text{Ph}} = 13,8$; $J_{\text{CH}_2\text{Ph}} = 13,8$; $J_{H_{o}(\text{OPh})} = 7,6$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, 300K): 14,0 (CH_3 -4'); 14,1 (CH_3 -6); 20,1 (C -3'); 20,4 (C -5); 30,9 (C -2'); 33,2 (C -4); 36,0 (C -2); 49,5 (C -1'); 54,2 (CH_2Ph); 56,8 (C -3); 121,6 ($\text{C}_{\text{Ph-o}}$); 125,7 ($\text{C}_{\text{Ph-p}}$); 126,7 ($\text{C}_{\text{Bn-p}}$); 128,0, 128,8, 129,4 (3 C_{Ph}); 140,6 ($\text{C}_{\text{Bn-s}}$); 150,8 ($\text{C}_{\text{Ph-s}}$); 171,6 (CO).

Analyse élémentaire: Calculée: C 78,15 H 8,84 N 3,96
 Trouvée: C 77,84 H 8,87 N 3,73

Acide N-Benzyl pyrrolidine 2-acétohydroxamique: 78c



$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_2$
 M = 234 g/mol
 Huile jaune pâle
 CCM: 0,53 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8/2)

130 mg (0,44 mmol) d'ester phénylique sont dissout dans 1,3 mL de pyridine. 61 mg (2 éq., 0,88 mmol) de chlorhydrate d'hydroxylamine sont alors ajoutés au milieu. La solution est agitée à 30°C pendant 1 nuit puis évaporée. Le produit est chromatographié sur colonne de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8/2) afin d'obtenir 100 mg (rdt = 97 %) de produit pur sous forme d'une huile jaune.

IR (ν , cm^{-1}): 3388, 2540, 1639, 1457, 703.

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,74 (1H, m, $H_{\text{b-3}}$); 1,92 (1H, m, $H_{\text{b-4}}$); 2,00 (1H, m, $H_{\text{a-4}}$); 2,28 (1H, m, $H_{\text{a-3}}$); 2,43 (1H, dd, $H_{\text{b-2'}}$); 2,63 (1H, dd, $H_{\text{a-2'}}$); 3,01 (1H, dt, $H_{\text{b-5}}$); 3,26 (1H, m, $H_{\text{a-5}}$); 3,64 (1H, quint, H -2); 4,00 (1H, d, CH_2Ph); 4,40 (1H, d, CH_2Ph); 7,50 (5H, s, H_{Ph}).

$J_{2',\text{a},2',\text{b}} = 14,8$; $J_{2,2',\text{a}} = 4,8$; $J_{2,2',\text{b}} = 7,8$; $J_{2,3\text{a}} = J_{2,3\text{b}} = 8,1$; $J_{3\text{a},3\text{b}} = 13,4$; $J_{3\text{b},4} = 6,4$ et $8,7$; $J_{3\text{a},4} = 6,0$ et $8,0$; $J_{4,5\text{a}} = 7,5$ et $4,6$; $J_{4\text{a},5\text{b}} = J_{4\text{b},5\text{b}} = 8,2$; $J_{5\text{a},5\text{b}} = 11,0$; $J_{\text{CH}_2\text{Ph}} = 12,8$; $J_{\text{CH}_2\text{Ph}} = 12,8$ Hz.

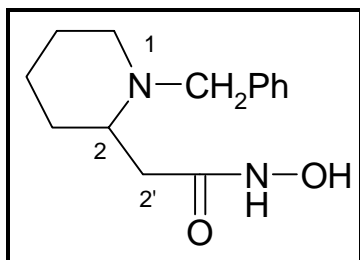
RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 21,7 (C -4); 29,5 (C -3); 33,2 (C -2'); 54,4 (C -5); 57,9 (CH_2Ph); 64,8 (C -2); 129,9 ($\text{C}_{\text{Ph-o}}$); 130,7 ($\text{C}_{\text{Ph-p}}$); 131,0 ($\text{C}_{\text{Ph-m}}$); 168,6 ($\text{C}_{\text{Ph-s}}$); 168,6 ($\text{C}=\text{O}$).

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺) :

Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$: formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_2$; m/z théorique 235,1446; m/z trouvée 235,1425

Acide N-benzyl piperidine 2-acétohydroxamique: 79c

150 mg (0,48 mmol) d'ester phénylique sont dissout dans 1,5 mL de pyridine. 68 mg (2 éq., 0,97 mmol) de chlorhydrate d'hydroxylamine sont alors ajoutés au milieu. La solution est agitée à 30°C pendant 1 nuit puis évaporée. Le produit est chromatographié sur colonne de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1) afin d'obtenir 108 mg (rdt = 90 %) de produit pur sous forme d'une mousse blanche.



$C_{14}H_{20}O_2N_2$
 $M = 248 \text{ g/mol}$
 Mousse blanche
 CCM: 0,24 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9/1)

IR (ν , cm^{-1} , KBr): 3440, 3188, 2949, 2710, 1660, 1498, 1455, 1379, 1059, 1042, 999, 977, 757, 736, 701.

RMN 1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,54 (1H, m, $Ha-4$); 1,65 (2H, m, $Ha-3$, $Hb-5$); 1,77 (2H, m, $Hb-4$, $Ha-5$); 1,92 (1H, m, $Hb-3$); 2,67 (1H, dd, $Ha-2'$); 2,83 (1H, dt, $Ha-6$); 2,89 (1H, dd, $Hb-2'$); 3,17 (1H, dt, $Hb-6$); 3,50 (1H, m, $H-2$); 4,04 (1H, d, CH_2Ph); 4,52 (1H, d, CH_2Ph); 7,50 (5H, s, H_{Ph}).

$J_{2'a,2'b} = 15,3$; $J_{2'b,2} = 5,0$; $J_{2'a,2} = 7,8$; $J_{6a,6b} = 12,8$; $J_{5,6b} = 2,5$ et $10,0$; $J_{5,6a} = 3,8$; $J_{CH_2Ph} = 13,0$; $J_{CH_2Ph} = 13,0$ Hz.

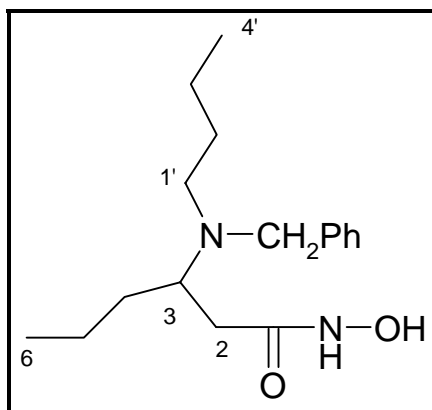
RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 21,1 ($C-4$); 22,2 ($C-5$); 28,2 ($C-3$); 33,5 ($C-2'$); 51,1 ($C-6$); 56,5 (CH_2Ph); 60,0 ($C-2$); 129,6 (C_{Bn-O}); 129,9 (C_{Bn-p}); 131,3 (C_{Bn-m}); 132,0 (C_{Bn-s}); 168,4 (CO).

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺) :

Ion $[M+H]^+$: formule brute $C_{14}H_{20}O_2N_2$; m/z théorique 249,1603; m/z trouvée 249,1609

Acide N-Benzyl N-Butyl 3-amino hexanohydroxamique: 80c

150 mg (0,42 mmol) d'ester phénylique sont dissout dans 1,5 mL de pyridine. 60 mg (2 éq., 0,85 mmol) de chlorhydrate d'hydroxylamine sont alors ajoutés au milieu. La solution est agitée à 30°C pendant 1 nuit puis évaporée. Le produit est chromatographié sur colonne de silice ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95/5) afin d'obtenir 97 mg (rdt = 78 %) de produit pur sous forme d'une huile jaune pâle.



$C_{17}H_{28}O_2N_2$
 $M = 292 \text{ g/mol}$
 Huile jaune pâle
 CCM: 0,29 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95/5)

IR (ν , cm^{-1}): 698, 763, 788, 1378, 1455, 1495, 1653, 2872, 2932, 2958, 3029, 3063, 3196.

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, 300K): 0,87 (3H, t, CH_3-4'); 0,93 (3H, t, CH_3-6); 1,15-1,30 (4H, m, $Hb-3'$, $Hb-4$, CH_2-5); 1,40 (2H, m, $Hb-2'$, $Ha-3'$); 1,51 (1H, m, $Ha-2'$); 1,67 (1H, m, $Ha-4$);

2,35 (1H, m, *Hb*-2); 2,37 (1H, m, *Hb*-1'); 2,40 (1H, m, *Ha*-2); 2,56 (1H, m, *Ha*-1'); 2,91 (1H, m, *H*-3); 3,37 (1H, d, *CH*₂Ph); 3,82 (1H, d, *CH*₂Ph); 7,27 (2H, m, *H*_{Ph}-m); 7,35 (3H, m, *H*_{Ph}).
 $J_{1'a,1'b} = 12,8$; $J_{1'a,2'} = 6,2$ et $9,5$; $J_{3',4'} = 7,3$; $J_{5,6} = 7,0$; $J_{CH_2Ph} = 13,3$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, 300K):

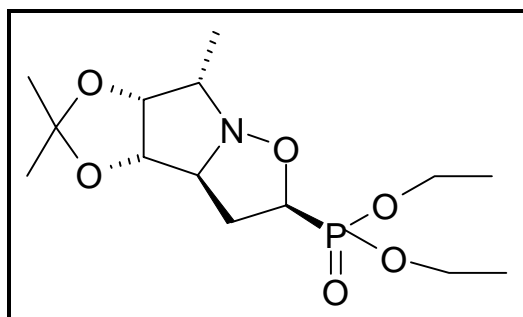
13,8 (*CH*₃-4'); 13,9 (*CH*₃-6); 20,2 (*C*-5); 20,5 (*C*-3'); 30,2 (*C*-4); 30,4 (*C*-2'); 34,2 (*C*-2); 48,9 (*C*-1'); 54,0 (*CH*₂Ph); 56,0 (*C*-3); 127,2 (*C*_{Ph}-p); 128,5 (*C*_{Ph}-o); 128,8 (*C*_{Ph}-m); 138,6 (*C*_{Ph}-s); 169,9 (CO).

Analyse élémentaire: Calculée: C 69,83 H 9,65 N 9,58

Trouvée: C 69,75 H 9,47 N 9,41

• **Cycloadditions 1,3-dipolaire avec les composés phosphorés**

(2,2,7-Triméthyl-hexahydro-1,3,6-trioxa-6a-aza-cyclopenta[a]pentalen-5-yl)-phosphonate de diéthyle: 81b



C₁₄H₂₆O₆NP

M = 335 g/mol

Huile incolore

$[\alpha]_D^{20} = +25^\circ$ (c = 1; CHCl₃)

CCM: 0,49 (Ether/MeOH 95/5)

200 mg (1,17 mmol) de nitroène dissoute dans 1 mL de tétrachloroéthène sont agités à 50 °C en présence de 360 µL (2éq. ,2,34 mmol) de diéthylvinylphosphate. Après 1 nuit d'agitation, la solution est évaporée. On obtient alors deux paires de diastéréoisomères qui sont séparées par chromatographie sur silice (Ether/EtOH 95/5). On obtient alors 200 mg de 2 diastéréoisomères (R_f = 0,49) et 190 mg de la seconde paire (R_f = 0,34). Les diastéréoisomères sont obtenus dans les proportions 52/30/13/6 (Rdt = quant.).

Isomère 1: Isomère majoritaire 52 %

IR (ν, cm⁻¹, solution CH₂Cl₂): 788; 876; 934; 1026; 1053; 1165; 1210; 1232; 1246; 1373; 1380; 1457; 1712; 2913; 2936; 2986; 3467.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TA): 1,23 (3H, t, CH₂CH₃); 1,30 (3H, t, CH₂CH₃); 1,37 (3H, s, CH₃); 1,39 (3H, d, Me-6); 1,51 (3H, s, CH₃); 2,17 (1H, dddd, *Hb*-3); 2,68 (1H, dddd, *Ha*-3); 2,88 (1H, qd, *H*-6); 3,83 (1H, t, *H*-3a); 4,15-4,25 (4H, m, CH₂CH₃); 4,47 (1H, ddd, *H*-2); 4,65 (2H, m, *H*-4, *H*-5).

$J_{6,Me} = 6,3$; $J_{6,5} = 4,3$; $J_{3a,4} = 0$; $J_{2,P} = 1,8$; $J_{b3,P} = 21,1$; $J_{b3,3a} = 9,6$; $J_{b3,2} = 10,3$; $J_{b3,a3} = 13,0$; $J_{a3,P} = 18,7$; $J_{a3,3a} = 8,8$; $J_{a3,2} = 5,0$; $J_{4,5} = 7,0$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TA): 12,9 (Me-6); 16,3 (CH₂CH₃); 16,4 (CH₂CH₃); 24,9 (*C*-Me₂); 25,9 (*C*-Me₂); 33,8 (*C*-3); 61,7 (*C*-6); 62,8 (CH₂CH₃); 62,9 (CH₂CH₃); 70,3 (*C*-3a); 71,9 (*C*-2); 79,8 (*C*-4); 80,3 (*C*-5); 111,4 (*C*_q-Me₂).

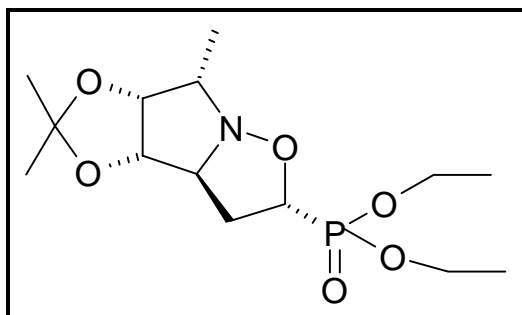
$J_{CH_2CH_3,P} = 5,6$; $J_{CH_2CH_3,P} = 6,2$; $J_{3a,P} = 3,7$; $J_{3,P} = 1,0$; $J_{2,P} = 170,3$ Hz.

RMN ^{31}P (CDCl_3 , TA): 23,5.

Analyse élémentaire: Calculée: C 50,14
 Trouvée: C 50,19 H 7,92 N 4,09 P 9,22

H 7,82 N 4,18 P 9,24

Isomère 2: isomère obtenu à 30 %: 81a



$\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{NP}$
 M = 335 g/mol
 Huile incolore
 $[\alpha]_D^{20} = +70^\circ$ (c = 1; CHCl_3)
 CCM: 0,34 (Ether/MeOH 95/5)

IR (ν , cm^{-1} , solution CH_2Cl_2): 752; 793; 876; 752; 967; 1022; 1053; 1097; 1133; 1143; 1163; 1211; 1234; 1270; 1378; 1448; 1458; 1652; 2915; 2936; 2986; 3454.

RMN ^1H (C_6D_6 , 400 MHz, TA): 1,00 (3H, t, CH_2CH_3); 1,10 (3H, t, CH_2CH_3); 1,27 (3H, s, CH_3); 1,49 (3H, d, Me-6); 1,50 (3H, s, CH_3); 1,91 (1H, dddd, Hb-3); 2,07 (1H, dddd, Ha-3); 3,54 (1H, qd, H-6); 3,65 (1H, dd, H-3a); 3,87 (2H, m, CH_2CH_3); 4,02 (1H, ddd, H-2); 4,13 (2H, m, CH_2CH_3); 4,24 (1H, dd, H-5); 4,25 (1H, d, H-4).

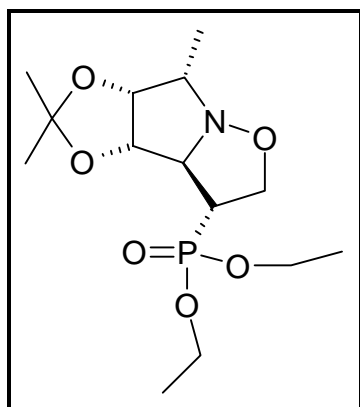
$J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7,1$; $J_{\text{CH}_3\text{CH}_2,\text{P}} = 0,5$; $J_{6,\text{Me}} = 6,4$; $J_{6,5} = 4,5$; $J_{4,5} = 6,6$; $J_{\text{b}_3,\text{P}} = 5,7$; $J_{\text{b}_3,3\text{a}} = 7,2$; $J_{\text{b}_3,2} = 7,9$; $J_{\text{b}_3,\text{a}_3} = 12,1$; $J_{\text{a}_3,\text{P}} = 22,0$; $J_{\text{a}_3,3\text{a}} = 11,0$; $J_{\text{a}_3,2} = 11,0$; $J_{3\text{a},4} = 0$; $J_{2,\text{P}} = 2,4$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TA): 10,7 (Me-6); 12,8 (CH_2CH_3); 13,0 (CH_2CH_3); 24,8 (C-Me₂); 27,5 (C-Me₂); 33,5 (C-3); 60,0 (CH_2CH_3); 62,1 (CH_2CH_3); 63,3 (C-6); 70,8 (C-3a); 75,2 (C-2); 78,9 (C-4); 80,9 (C-5); 111,3 (Cq-Me₂).

$J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 5,7$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 7,1$; $J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6,4$; $J_{3\text{a},\text{P}} = 7,1$; $J_{2,\text{P}} = 166,7$ Hz.

RMN ^{31}P (CDCl_3 , TA): 21,9.

Isomère 3: isomère obtenu à 13 %: 81c



$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_6\text{NP}$
 M = 337 g/mol
 Huile incolore
 CCM: 0,34 (Ether/MeOH 95/5)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TA): 1,18 (3H, d, Me-6); 1,21 (3H, s, CH_3); 1,24 (3H, t, CH_2CH_3); 1,25 (3H, t, CH_2CH_3); 1,40 (3H, s, CH_3); 2,46 (1H, dtd, H-3); 2,78 (1H, qd, H-6); 3,75 (1H, dd, H-3a); 3,87 (2H, m, CH_2CH_3); 3,98 (1H, td, H-2a); 4,13 (2H, m, CH_2CH_3); 4,19 (1H, ddd, H-2b); 4,55 (1H, dd, H-5); 4,65 (1H, d, H-4).

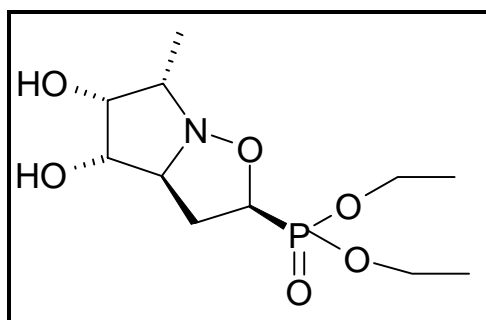
$J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7,04$; $J_{6,\text{Me}} = 6,5$; $J_{6,5} = 5,0$; $J_{4,5} = 6,5$; $J_{3,\text{P}} = 14,9$; $J_{3,2a} = 7,9$; $J_{3,2b} = 10,1$; $J_{3,3a} = 10,1$; $J_{3a,\text{P}} = 15,1$; $J_{2a,2b} = 8,3$; $J_{2a,\text{P}} = 17,0$; $J_{2b,\text{P}} = 12,1$; $J_{4,3a} = 0$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TA): 12,8 (Me-6); 16,3 (CH_2CH_3); 16,4 (CH_2CH_3); 24,9 (C-Me₂); 25,9 (C-Me₂); 41,9 (C-3); 62,3 (CH_2CH_3); 62,5 (CH_2CH_3); 61,8 (C-6); 67,1 (C-2); 71,9 (C-3a); 79,9 (C-4); 80,3 (C-5); 111,4 (Cq-Me₂).

$J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 5,7$; $J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7,1$; $J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7,1$; $J_{2,\text{P}} = 2,1$; $J_{4,\text{P}} = 2,1$; $J_{3,\text{P}} = 150,5$ Hz.

RMN ^{31}P (CDCl_3 , TA): 27,6.

(4,5-Dihydroxy-6-methyl-hexahydro-pyrrolo[1,2-b]isoxazol-2-yl)-phosphonate de diethyle: 82



$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{NP}$

$M = 295$ g/mol

Huile incolore

$[\alpha]_D^{20} = +32^\circ$ (c = 1; MeOH)

CCM: Rf = 0,2 (Ether/MeOH 95/5)

Rf = 0,35 (AcOEt/EtOH 7/3)

135 mg (0,4 mmol) de dérivé bicyclique protégé sont dissous dans 1 mL d'éthanol auxquels sont ajoutés 1 mL d'HCl 6N. La solution est agitée pendant 1 nuit à température ambiante puis évaporée.

Le produit est purifié par chromatographie sur silice (AcOEt/EtOH 7/3) pour donner 111 mg de produit pur (Rdt = 93 %).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,21 (3H, d, Me-6); 1,35 (6H, t, CH_2CH_3); 2,39 (1H, dddd, Ha-3); 2,90 (1H, dddd, Hb-3); 3,49 (1H, qd, H-6); 3,75 (1H, tdd, H-3a); 4,19-4,29 (6H, m, CH_2CH_3 , H-4, H-5); 4,41 (1H, dd, H-2);

$J_{6,\text{Me}} = 6,9$; $J_{6,5} = 3,8$; $J_{b3,3a} = 12,8$; $J_{b3,2} = 7,8$; $J_{a3,\text{P}} = 17,9$; $J_{a3,3a} = 7,0$; $J_{a3,2} = 10,6$; $J_{2,3a} = 1,0$; $J_{2,b3} = 7,3$; $J_{2,a3} = 10,3$; $J_{3a,\text{P}} = 1,0$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,05$ Hz.

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 12,8 (Me); 16,03 (CH_3); 16,08 (CH_3); 35,4 (C-3); 65,1 (CH_2); 65,3 (CH_2); 65,9 (C-6); 69,2 (C-3a); 74,3 (C-2); 75,6; 75,7 (C-4) (C-5).

$J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 4,9$; $J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 4,9$; $J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7,1$; $J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7,1$; $J_{3a,\text{P}} = 8,5$; $J_{2,\text{P}} = 167,4$ Hz.

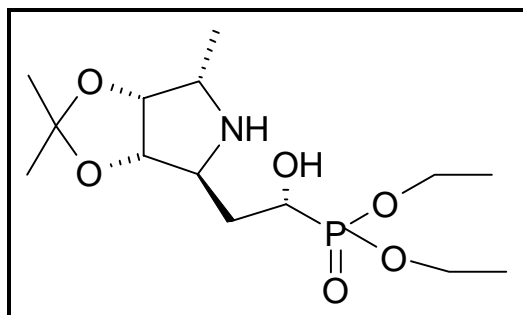
RMN ^{31}P (D_2O , TA): 23,5.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺) :

Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$: formule brute $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{NP}$; m/z théorique 296,12630; m/z trouvée 296,178

• **Synthèse des produits phosphorés dérivés de la cycloaddition**

3,4-isopropylidènedioxy-5-méthyl-1'-hydroxypyrrolidine-2-éthane phosphonate de diéthyle: 84



$C_{14}H_{28}O_6NP$
 $M = 337 \text{ g/mol}$
 Huile incolore
 $[\alpha]_D^{20} = +19^\circ$ (c = 1; $CHCl_3$)
 CCM: 0,33 (Ether/MeOH 95/5)

200 mg de mélange des isomères bicycliques phosphorés (minoritaire) sont dissous dans 2mL d'éthanol et hydrogènylés sur 30 mg de Pd/C (5%). La solution est agitée à 40 °C pendant 48 h. Elle est ensuite centrifugée, les résidus sont lavés 3 fois à l'éthanol et centrifugé puis le solvant est évaporé. Le produit est purifié sur colonne de silice (éther/MeOH 95/5) pour donner 2 isomères dont 86 mg de l'isomère 1 et 52 mg de l'isomère 2 (Rdt = 68 %).

Isomère 1:

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, TA): 1,19 (3H, d, Me-5); 1,30 (3H, s, CH_3); 1,34 (3H, t, CH_2CH_3); 1,35 (3H, t, CH_2CH_3); 1,45 (3H, s, CH_3); 1,75-1,92 (2H, m, $H-2'$); 3,18 (1H, qd, $H-5$); 3,88 (1H, m, $H-2$); 4,11-4,27 (5H, m, $2*CH_2CH_3$, $H-1'$); 4,37 (1H, d, $H-3$); 4,50 (1H, dd, $H-4$).

$J_{CH_3,CH_2} = 7,0$; $J_{CH_3,CH_2} = 7,0$; $J_{5,Me} = 6,5$; $J_{4,5} = 4,0$; $J_{4,3} = 5,5$ Hz.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, TA): 13,1 (Me-5); 16,4 (CH_2CH_3); 16,5 (CH_2CH_3); 23,9 (C-Me₂); 26,0 (C-Me₂); 28,6 (C-2'); 55,3 (C-5); 62,0 (CH_2); 62,3 (C-2); 62,8 (CH_2); 67,7 (C-1'); 82,9 (C-4); 87,3 (C-3); 110,9 (Cq-Me₂).

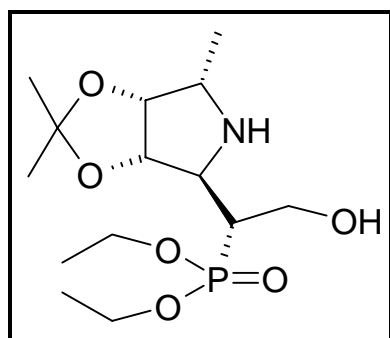
$J_{CH_3,P} = 4,9$; $J_{CH_3,P} = 4,9$; $J_{CH_2,P} = 7,1$; $J_{CH_2,P} = 7,8$; $J_{2',P} = 2,8$; $J_{2,P} = 4,9$; $J_{1',P} = 162,5$ Hz.

RMN ^{31}P ($CDCl_3$, TA): 25,6.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES+) :

Ion $[M+H]^+$: formule brute $C_{14}H_{29}O_6NP$; m/z théorique 338,17325; m/z trouvée 338,199

Isomère 2: 3,4-isopropylidènedioxy-5-méthyl-pyrrolidine-2-(1'-hydroxy)-éthane-2'-phosphonate de diéthyle: 85



$C_{14}H_{28}O_6NP$
 $M = 337 \text{ g/mol}$
 Huile incolore
 $[\alpha]_D^{20} = +22^\circ$ (c = 1; $CHCl_3$)
 CCM: 0,32 (CH_2Cl_2 /EtOH 98/2)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TA): 1,20 (3H, d, Me-5); 1,31 (3H, s, CH₃); 1,33 (3H, t, CH₂CH₃); 1,34 (3H, t, CH₂CH₃); 1,46 (3H, s, CH₃); 2,07 (1H, dddd, H-1'); 3,10 (1H, qd, H-5); 3,53 (1H, dd, H-2); 3,86 (1H, ddd, Ha -2'); 3,97 (1H, ddd, Hb-2'); 4,11 (4H, m, CH₂CH₃); 4,50 (1H, dd, H-4); 5,12 (1H, d, H-3).

$J_{2,CH} = 12,3$; $J_{2,P} = 7,8$; $J_{CH,P} = 21,4$; $J_{1',2'a} = 9,6$; $J_{1',2'b} = 3$; $J_{2'a,2'b} = 11,3$; $J_{2'a,P} = 7,8$; $J_{2'b,P} = 2,8$; $J_{3,4} = 5,3$; $J_{4,5} = 3,8$; $J_{5,CH_3} = 6,6$; $J_{CH_2CH_3} = 7,05$; $J_{CH_2CH_3} = 7,05$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TA): 10,6 (Me-5); 16,3 (CH₂CH₃); 16,4 (CH₂CH₃); 23,9 (C-Me₂); 26,0 (C-Me₂); 38,5 (C-1'); 54,1 (C-5); 61,8 (CH₂CH₃); 62,0 (CH₂CH₃); 63,0 (C-2'); 69,4 (C-2); 82,5 (C-4); 85,9 (C-3); 110,6 (Cq-Me₂).

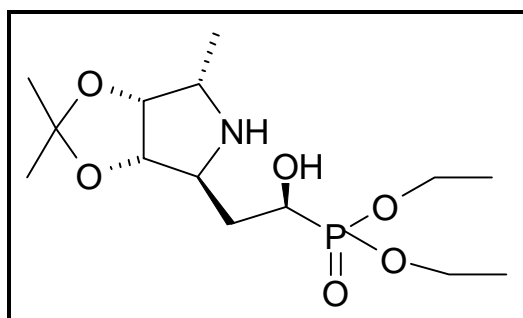
$J_{CH_2CH_3,P} = 5,7$; $J_{1',P} = 132,1$; $J_{CH_2CH_3,P} = 6,4$; $J_{CH_2CH_3,P} = 7,1$; $J_{2,P} = 2$ Hz.

RMN ³¹P (CDCl₃, TA): 28,1.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺) :

Ion [M+H]⁺: formule brute C₁₄H₂₉O₆NP; m/z théorique 338,17325; m/z trouvée 338,184

(2S,3S,4R,5R)-3,4-isopropylidènedioxy-5-méthyl-pyrrolidine-2-(1'-hydroxyéthane)-1'-phosphonate de diéthyle: 83



C₁₄H₂₈O₆NP

M = 337 g/mol

Huile incolore

$[\alpha]_D^{20} = +15^\circ$ (c = 1; CHCl₃)

CCM: 0,22 (Ether/MeOH 95/5)

200 mg de bicyclic phosphoré (majoritaire) sont hydrogénéolysés dans 2 mL d'éthanol sur 30 mg de Pd/C (5%) à température ambiante pendant 48 h. Les solides sont centrifugés, lavés 3 fois à l'éthanol et centrifugé puis le solvant est évaporé. Le produit est purifié sur colonne de silice (éther/MeOH 95/5) pour donner 120 mg de produit (Rdt = 61 %).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, TA): 1,19 (3H, d, Me-5); 1,30 (3H, s, CH₃); 1,34 (3H, t, CH₂CH₃); 1,35 (3H, t, CH₂CH₃); 1,45 (3H, s, CH₃); 1,65-1,80 (2H, m, H-1'a); 3,23 (1H, qd, H-5); 3,42 (1H, m, H-2); 4,13-4,25 (5H, m, 2*CH₂CH₃, H-2'); 4,40 (1H, d, H-3); 4,50 (1H, dd, H-4).

$J_{CH_3,CH_2} = 7,0$; $J_{CH_3,CH_2} = 7,0$; $J_{5,Me} = 6,55$; $J_{4,5} = 4,0$; $J_{4,3} = 5,5$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TA): 12,9 (Me-5); 16,48 (CH₂CH₃); 16,55 (CH₂CH₃); 23,8 (C-Me₂); 26,0 (C-Me₂); 28,6 (C-1'); 55,2 (C-5); 62,1 (CH₂CH₃); 62,8 (CH₂CH₃); 65,9 (C-2); 69,0 (C-2'); 82,6 (C-4); 87,0 (C-3); 111,0 (Cq-Me₂).

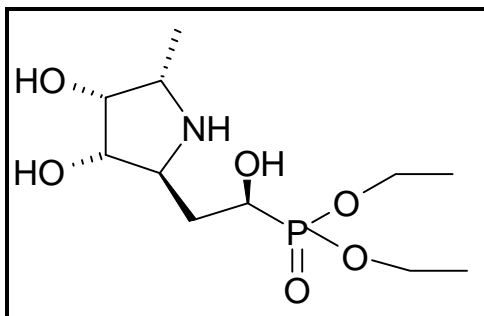
$J_{CH_3,P} = 5,7$; $J_{CH_3,P} = 5,7$; $J_{CH_2,P} = 7,1$; $J_{CH_2,P} = 6,4$; $J_{1',P} = 1,4$; $J_{2,P} = 19,1$; $J_{3,P} = 5,0$; $J_{2',P} = 173,1$ Hz.

RMN ³¹P (CDCl₃, TA): 24,2.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES+) :

Ion $[M+H]^+$: formule brute $C_{14}H_{29}O_6NP$; m/z théorique 338,17325; m/z trouvée 338,184

(2S,3S,4R,5R)-3,4-dihydroxy-5-méthyl-1'-hydroxypyrrolidine-2-éthanephosphonate de diéthyle: 86



$C_{11}H_{24}O_6NP$
 M = 297 g/mol
 Huile jaune
 $[\alpha]_D^{20} = -13^\circ$ (c = 1; $CHCl_3$)

100 mg (0,29 mmol) de produit protégé de la réduction majoritaire sont hydrolysés dans 0,1 mL d'éthanol et 0,3 mL d'HCl 6N à température ambiante pendant 1 nuit puis le solvant est évaporé pour donner 88 mg de produit déprotégé (Rdt quant.).

RMN 1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,34 (3H, t, CH_2CH_3); 1,35 (3H, t, CH_2CH_3); 1,37 (3H, d, Me-5); 2,15 (1H, tdd, H-2'b); 2,28 (1H, tdd, H-2'a); 3,64 (1H, td, H-2); 3,79 (1H, qd, H-5); 4,13 (1H, t, H-4); 4,19 (1H, dd, H-3); 4,22 (4H, m, 2* CH_2CH_3); 4,28 (1H, ddd, H-1').

$J_{CH_3,CH_2} = 7,0$; $J_{CH_3,CH_2} = 7,0$; $J_{5,Me} = 6,8$; $J_{4,5} = 2,8$; $J_{4,3} = 3,8$; $J_{2'b,P} = J_{2'b,2} = 8,8$; $J_{2'b,1'} = 11,6$; $J_{2'b,2'a} = 14,9$; $J_{2,2'a} = 5$; $J_{P,2'a} = 3,8$; $J_{1',2'a} = 2,8$; $J_{2,3} = 8,8$; $J_{1',P} = 5,8$ Hz.

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 11,6 (Me-5); 16,20 (CH_2CH_3); 16,26 (CH_2CH_3); 31,9 (C-2'); 57,5 (C-5); 59,74 (C-2); 64,8 (CH_2CH_3); 64,08 (CH_2CH_3); 65,3 (C-1'); 71,6 (C-4); 76,4 (C-3).

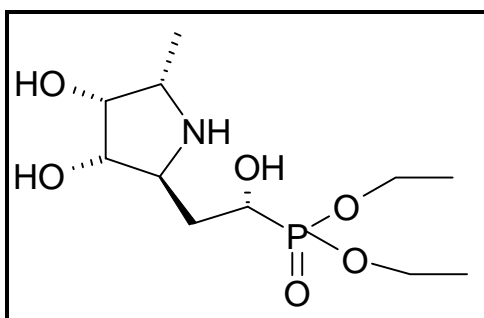
$J_{CH_2CH_3,P} = 4,2$; $J_{CH_2CH_3,P} = 7,8$; $J_{2',P} = 3,5$; $J_{2,P} = 19,1$; $J_{1',P} = 166,7$ Hz.

RMN ^{31}P (D_2O , TA): 25,9.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES+) :

Ion $[M+H]^+$: formule brute $C_{11}H_{25}O_6NP$; m/z théorique 298,14195; m/z trouvée 298,159

(2S,3S,4R,5R)-[3,4-Dihydroxy-5-méthyl-pyrrolidine-2)-(1'-hydroxy-éthyl)-phosphonate de diéthyle: 87



$C_{11}H_{24}O_6NP$
 M = 297 g/mol
 Huile jaune
 $[\alpha]_D^{20} = -31^\circ$ (c = 1; $CHCl_3$)

100 mg (0,29 mmol) de produit protégé sont dissout dans 0,1 mL d'éthanol auxquels sont ajoutés 0,3 mL d'HCl 6N. La solution est agitée à température ambiante pendant 1 nuit puis évaporée pour donner 88 mg de produit déprotégé (Rdt quant.).

RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz, TA): 1,36 (6H, t, CH₂CH₃); 1,38 (3H, d, Me-5); 2,15 (1H, tdd, H-2'^b); 2,25 (1H, tdd, H-2'^a); 3,72 (1H, qd, H-5); 3,82 (1H, td, H-2); 4,00 (1H, t, H-4); 4,06 (1H, dd, H-3); 4,15 (1H, ddd, H-1'); 4,17-4,25 (4H, m, 2*CH₂CH₃).

$J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7,0$; $J_{5,\text{Me}} = 6,8$; $J_{4,5} = 2,8$; $J_{4,3} = 3,5$; $J_{2',\text{P}} = 12,6$; $J_{2',\text{b},2} = 9,6$; $J_{2',\text{b},1'} = 4,3$; $J_{2',\text{b},2',\text{a}} = 15,3$; $J_{2,2',\text{a}} = 3,3$; $J_{\text{P},2',\text{a}} = J_{1',2',\text{a}} = 9,0$; $J_{2,3} = 9,6$; $J_{1',\text{P}} = 7,3$ Hz.

RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz, TA): 12,2 (Me-5); 16,82 (CH₂CH₃); 16,85 (CH₂CH₃); 32,7 (C-2'); 58,2 (C-5); 58,9 (C-2); 64,3 (CH₂CH₃); 64,6 (CH₂CH₃); 65,1 (C-1'); 72,8 (C-4); 77,1 (C-3).

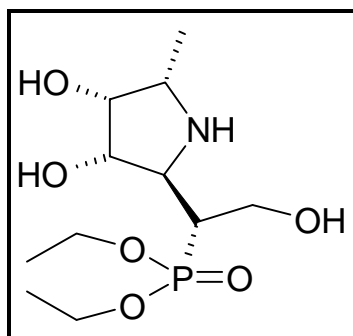
$J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 4,9$; $J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 4$; $J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7,0$; $J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7,0$; $J_{2',\text{P}} = 2,8$; $J_{2,\text{P}} = 12,0$; $J_{2',\text{P}} = 168,1$ Hz.

RMN ³¹P (CD₃OD, TA): 22,7.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺) :

Ion [M+H]⁺: formule brute C₁₁H₂₅O₆NP; m/z théorique 298,14195; m/z trouvée 298,166

(2S,3S,4R,5R)-[1-(3,4-Dihydroxy-5-méthyl-pyrrolidin-2-yl)-2-hydroxy-éthyl]-phosphonate de diéthyle: 88



C₁₁H₂₄O₆NP

M = 337 g/mol

Huile orange

$[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$ (c = 1; MeOH)

35 mg de produit protégé sont dissous dans 0,2 mL d'éthanol et 0,3mL d'HCl 6N. Après une nuit d'agitation à température ambiante et évaporation , on obtient 30 mg de produit déprotégé. (Rdt = quant.).

RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz, TA): 1,37 (3H, t, CH₂CH₃); 1,38 (3H, t, CH₂CH₃); 1,41 (3H, d, Me-5); 2,46 (1H, dq, H-2'); 3,76 (1H, qd, H-5); 3,88 (1H, ddd, H-2); 4,03 (1H, quint., H-4); 4,12 (1H, ddd, Ha-1'); 4,19 (1H, ddd, Hb-1'); 4,17-4,3 (4H, m, CH₂CH₃); 4,46 (1H, dd, H-3).

$J_{2,2'} = 3,0$; $J_{2,\text{P}} = 12,1$; $J_{2',\text{P}} = 23,9$; $J_{2',1',\text{a}} = 4,5$; $J_{2',1',\text{b}} = 3,8$; $J_{1',\text{a},2',\text{b}} = 11,6$; $J_{1',\text{a},\text{P}} = 9,6$; $J_{1',\text{b},\text{P}} = 7,3$; $J_{3,2} = 9,3$; $J_{3,4} = 3,5$; $J_{4,5} = 2,5$; $J_{5,\text{CH}_3} = 6,8$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,0$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,0$ Hz.

RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz, TA): 12,0 (Me-5); 16,6 (CH₂CH₃); 16,7 (CH₂CH₃); 37,9 (C-2'); 58,7 (C-1'); 59,1 (C-5); 61,0 (C-2); 64,3 (CH₂CH₃); 64,4 (CH₂CH₃); 72,9 (C-4); 74,7 (C-3).

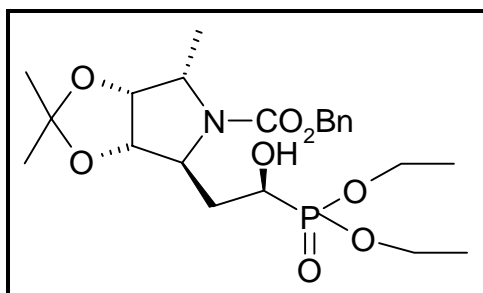
$J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 4,9$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 5,7$; $J_{2',\text{P}} = 140,6$; $J_{1',\text{P}} = 3,0$; $J_{3,\text{P}} = 10,6$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 7,0$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 7,0$; $J_{2,\text{P}} = 4,2$ Hz.

RMN ^{31}P (CD_3OD , TA): 26,2.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES+) :

Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$: formule brute $\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{NP}$; m/z théorique 298,14195; m/z trouvée 298,166

(2S,3S,4R,5R)-4-[2-(Diethoxy-phosphoryl)-2-hydroxy-ethyl]-2,2,6-trimethyl-tetrahydro-[1,3]dioxolo [4,5-c]pyrrole-5-carboxylate de benzyle: 89



$\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_8\text{NP}$

$M = 471 \text{ g/mol}$

Huile incolore

$[\alpha]_D^{20} = +65^\circ$ ($c = 1$; CHCl_3)

CCM: 0,63 (Ether/MeOH 95/5)

0,27 (AcOEt)

315 mg (0,93 mmol) d'amine substituée sont dissous dans 3,2 mL d'éthanol anhydre sous argon en présence de 157 mg (1,87 mmol, 2éq.) de bicarbonate de sodium et 0,145 mL (1,03 mmol, 1,1éq.) de chloroformiate de benzyle pendant 8h à température ambiante. On ajoute du dichlorométhane puis on centrifuge et on évapore les phases organiques. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur silice (AcOEt) pour obtenir 230 mg de d'amine protégé (Rdt = 52%).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, 328K): 1,29 (3H, t, CH_2CH_3); 1,31 (3H, t, CH_2CH_3); 1,32 (3H, s, CH_3); 1,40 (3H, d, Me-5); 1,47 (3H, s, CH_3); 1,90-2,20 (2H, m, $H-2'$); 2,8-3,6 (1H, s large, OH); 3,87 (1H, m, $H-1'$); 3,91 (1H, quint., $H-5$); 4,05-4,18 (4H, m, $2^*\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,28 (1H, d large, $H-2$); 4,59 (1H, d, $H-3$); 4,69 (1H, t, $H-4$); 5,10 (1H, d, CH_2Ph); 5,14 (1H, d, CH_2Ph); 7,28-7,35 (5H, m, Ph).

$J_{4,5} = 6,3$; $J_{4,3} = 6,0$; $J_{2,3} = 0$; $J_{\text{CH}_2\text{Ph}} = 12,6 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TA): 15,5 (Me-5); 16,5 ($2^*\text{CH}_2\text{CH}_3$); 24,9 (C-Me_2); 25,3 (C-Me_2); 32,9 ($\text{C-2}'$); 57,6 (C-5); 60,6 (C-2); 62,8 (CH_2CH_3); 62,9 (CH_2CH_3); 64,9 ($\text{C-1}'$); 66,9 (CH_2Ph); 80,5 (C-4); 83,4 (C-3); 111,4 (Cq-Me_2); 128,1 ($\text{C}_{\text{Ph-p}}$, $\text{C}_{\text{Ph-m}}$); 128,5 ($\text{C}_{\text{Ph-o}}$); 136,5 ($\text{C}_{\text{Ph-s}}$); 155,0 (C=O).

$J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 5,3$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 7,0$; $J_{1',\text{P}} = 163,0 \text{ Hz}$.

RMN ^{31}P (CDCl_3 , TA): 25,3.

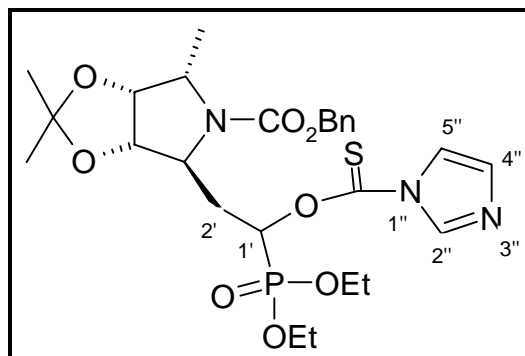
Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES+) :

Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$: formule brute $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_8\text{NP}$; m/z théorique 472,21003; m/z trouvée 472,265

4-[2-(Diethoxy-phosphoryl)-2-(imidazole-1-carbothioyloxy)-ethyl]-2,2,6-trimethyl-tetrahydro-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyrrole-5-carboxylate de benzyle: 90

230 mg (0,49 mmol) d'alcool sont dissous dans 3 mL de THF anhydre sous argon. 174 mg (0,98 mmol, 2 éq.) de thiocarbodiimidazole sont alors ajoutés au milieu. Après 1 nuit d'agitation à température ambiante, on ajoute une solution de NaCl saturée puis le milieu est

extrait à l'AcOEt. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄, filtrée puis évaporée. Le produit est alors purifié sur colonne de silice (AcOEt) pour donner 253 mg de produit pur (Rdt = 89 %).



C₂₆H₃₆O₈N₃PS

M = 581 g/mol

Huile incolore

$[\alpha]_D^{20} = +23^\circ$ (c = 1; CHCl₃)

CCM: 0,45 (Ether/MeOH 95/5)
0,37 (AcOEt)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, 328 K): 1,28 (3H, t, CH₂CH₃); 1,30 (3H, s, CH₃); 1,31 (3H, t, CH₂CH₃); 1,34-1,45 (3H, s large, Me-5); 1,42 (3H, s, CH₃); 1,90-2,80 (2H, m, H-2'); 3,86 (1H, quint., H-5); 4,00-4,25 (5H, m, 2*CH₂CH₃, H-2); 4,53 (1H, d, H-3); 4,60 (1H, t, H-4); 4,95-5,25 (2H, m, CH₂Ph); 6,17 (1H, td, H-1'); 7,01 (1H, s large, H-4''); 7,28-7,35 (5H, m, Ph); 7,37-7,75 (1H, m, H-5''); 8-8,4 (1H, m, H-2'').

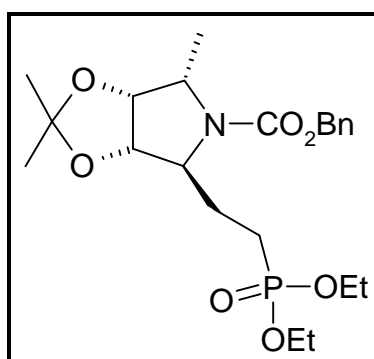
$J_{4,3} = 6,0$; $J_{2,3} = 0$; $J_{1',P} = J_{2'a,1'} = 9,6$; $J_{2'b,1'} = 1,8$; $J_{CH_2CH_3} = 6,8$; $J_{5,Me} = 6,4$ Hz.

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, TA): 15,3 (Me-5); 16,4 (CH₂CH₃); 16,5 (CH₂CH₃); 24,9 (C-Me₂); 25,8 (C-Me₂); 31,1 (C-2'); 57,2 (C-5); 59,1 (C-2); 63,3 (CH₂CH₃); 63,6 (CH₂CH₃); 67,0 (CH₂Ph); 73,5 (C-1'); 79,9 (C-4); 81,6 (C-3); 111,8 (Cq-Me₂); 117,9 (C-5''); 128,2 (C_{Ph-p}, C_{Ph-m}); 128,6 (C_{Ph-o}); 131,2 (C-4''); 136,3 (C_{Ph-s}); 137,2 (C-2''); 154,5 (C=O); 183,3 (C=S).

$J_{CH_3CH_2,P} = 5,7$; $J_{CH_2CH_3,P} = 6,4$; $J_{1',P} = 166,0$; $J_{2,P} = 15,5$ Hz.

RMN ³¹P (CDCl₃, TA): 18,5.

(2S,3S,4R,5R)-5-Méthyl-3,4-isopropylidènedioxy-N-benzyloxycarbonylpyrrolidine-2-éthane-phosphonate de diéthyle: 91



C₂₂H₃₄O₇NP

M = 455 g/mol

Huile incolore

$[\alpha]_D^{20} = +58^\circ$ (c = 1; CHCl₃)

CCM: 0,30 (AcOEt)

220 mg (0,38 mmol) de xanthate sont placés à reflux pendant 15 minutes dans du toluène anhydre sous argon. Après 15 minutes, 0,155 mL (0,97 mmol, 1,5 équ.) d'hydrure de tributylétain et 1,5 mg (0,008 mmol, 0,02 équ.) d'AIBN sont ajoutés au milieu. Après avoir fait circuler un courant d'argon dans le milieu, celui-ci est mis au reflux sous argon pendant 2 h

45. Du chloroforme est alors ajouté au milieu pour former du Bu_3SnCl après chauffage puis le milieu est évaporé. Le produit est purifié par chromatographie sur silice (AcOEt) pour donner 125 mg de produit pur (rdt = 76 %).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TA): 1,29 (6H, m, $2^*\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,32 (3H, s, CH_3); 1,46 (6H, m Me-5, CH_3); 1,60-2,20 (4H, m, $H-2'$, $H-1'$); 3,84 (1H, s large, $H-5$); 4,95-4,15 (5H, m, $2^*\text{CH}_2\text{CH}_3$, $H-2$); 4,40 (1H, d, $H-3$); 4,61 (1H, t, $H-4$); 5,08 (1H, d, CHHPh); 5,15 (1H, d, CHHPh); 7,29-7,35 (5H, m, Ph).

$J_{4,3} = 6,0$; $J_{\text{CH}_2\text{Ph}} = 12,3$; $J_{5,4} = 4,6$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TA): 15,1 (Me-5); 16,4 ($2^*\text{CH}_2\text{CH}_3$); 22,1 ($C-1'$); 24,3 ($C-2'$); 24,9 ($C-\text{Me}_2$); 25,9 ($C-\text{Me}_2$); 56,8 ($C-5$); 61,6 ($2^*\text{CH}_2\text{CH}_3$); 63,3 ($C-2$); 66,7 (CH_2Ph); 80,4 ($C-4$); 82,0 ($C-3$); 111,7 ($C_q-\text{Me}_2$); 127,9 ($C_{\text{Ph},p}$, $C_{\text{Ph},m}$); 128,4 ($C_{\text{Ph},o}$); 136,4 ($C_{\text{Ph},s}$); 154,8 ($C=\text{O}$).

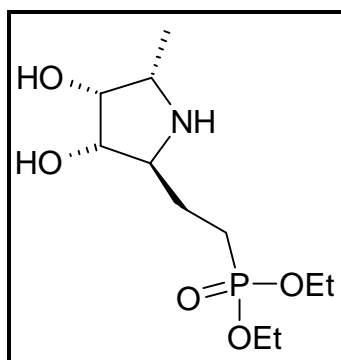
$J_{\text{CH}_3\text{CH}_2,\text{P}} = 6,0$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 6,4$; $J_{1',\text{P}} = 144,0$; $J_{2,\text{P}} = 15,5$ Hz.

RMN ^{31}P (CDCl_3 , TA): 31,9.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺) :

Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$: formule brute $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_7\text{NP}$; m/z théorique 456,21512; m/z trouvée 456,243

(2S,3S,4R,5R)-(3,4-Dihydroxy-5-méthyl-pyrrolidine-2-ethanephosphonate de diethyle:
92



$\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{NP}$

$M = 281$ g/mol

Huile incolore

$[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ ($c = 1$; MeOH)

104 mg (0,23 mmol) de produit protégé sont hydrolysés sous agitation dans 0,5 mL d'éthanol et 1,5 mL d'HCl 6N pendant 1 nuit à température ambiante puis évaporée. Le produit est hydrogéné dans 0,5 mL d'éthanol et 0,5 mL d'eau sur 50 mg de Pd/C (5%) à température ambiante pendant 8h. La solution est alors centrifugée, le palladium est lavé à l'éthanol et à l'eau 3 fois puis le solvant est évaporé pour donner 66 mg de produit déprotégé pur. (Rdt = quant.).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,29 (6H, m, $2^*\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,32 (3H, s, CH_3); 1,46 (6H, m Me-5, CH_3); 1,60-2,20 (4H, m, $H-2'$, $H-1'$); 3,84 (1H, s large, $H-5$); 4,95-4,15 (5H, m, $2^*\text{CH}_2\text{CH}_3$, $H-2$); 4,40 (1H, d, $H-3$); 4,61 (1H, t, $H-4$).

$J_{4,3} = 6,0$; $J_{5,4} = 4,6$ Hz.

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 11,6 (Me-5); 16,1 ($2^*\text{CH}_2\text{CH}_3$); 21,5 ($C-1'$); 24,1 ($C-2'$); 57,4 ($C-5$); 61,0 ($C-2$); 64,1 ($2^*\text{CH}_2\text{CH}_3$); 72,3 ($C-4$); 76,1 ($C-3$).

$J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 5,7$; $J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6,4$; $J_{2',\text{P}} = 141,0$; $J_{2,\text{P}} = 4,2$; $J_{2,\text{P}} = 19,1$ Hz.

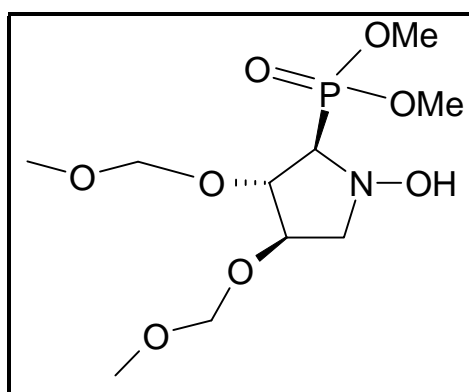
RMN ^{31}P (D_2O , TA): 34,3.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺) :

Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$: formule brute $\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{NP}$; m/z théorique 282,14704; m/z trouvée 282,170

- Synthèse par substitutions nucléophiles

(2R,3R,4R)-3,4-Bis(méthoxymethoxy)-N-hydroxypyrrolidine-1-phosphonate de diméthyle: 95



$\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{O}_8\text{NP}$
 $M = 315$ g/mol
 Huile brune
 CCM: $R_f = 0,15$
 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97/3)

Dans un cône de 1 mL sont placés 190 mg (0,93 mmol) de nitronne auxquels sont ajoutés 130 μL (1,5 éq. , 1,4 mmol) de diméthylphosphite. La solution est alors portée à 40 °C pendant une nuit. Le réactif en excès est alors évaporé et le produit purifié par HPLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97/3) pour donner 63 mg (Rdt = 22%) des deux isomères de l'hydroxylamine phosphatée.

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, TA): 3,1 (1H, dd, *Ha-5*); 3,39 (6H, d, POMe_2); 3,77 (1H, dd, *Hb-5*); 3,78 (1H, d, *H-2*); 3,79 (3H, s, OMe); 3,80 (3H, s, OMe); 4,18 (1H, m, *H-4*); 4,50 (1H, dddd, *H-3*); 4,69 (2H, 2d, OCH_2O); 4,72 (2H, 2d, OCH_2O); 6,05 (1H, s, *OH*)

$J_{2,3} = 6,4$; $J_{2,\text{P}} = 12,4$; $J_{3,4} = 2,2$; $J_{3,5a} = 0,9$; $J_{3,\text{P}} = 4,8$; $J_{4,5a} = 3,9$; $J_{4,5b} = 5,3$; $J_{4,\text{P}} = 2,2$; $J_{5,\text{P}} = 1,3$; $J_{5a,5b} = 12,3$; $J_{\text{OMe},\text{P}} = 7$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,5 MHz, TA): 52,5 (POMe); 53,2 (POMe); 55,6 (OCH_3); 55,9 (OCH_3); 63,1 (*C-5*); 68,5 (*C-2*); 79,3 (*C-3*); 80,5 (*C-4*); 95,7 (OCH_2O); 96,4 (OCH_2O).

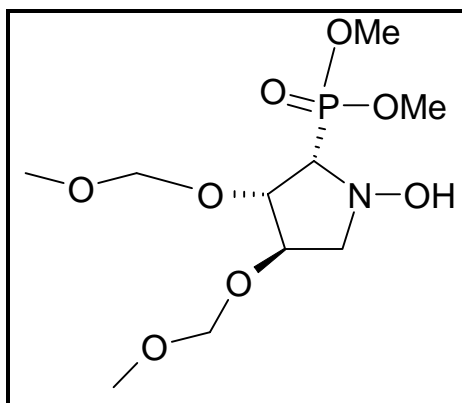
$J_{\text{Me},\text{P}} = 10,1$; $J_{\text{Me},\text{P}} = 10,0$; $J_{\text{C}_5,\text{P}} = 26,15$; $J_{\text{C}_2,\text{P}} = 278,5$; $J_{\text{C}_3,\text{P}} = 10,3$; $J_{\text{C}_4,\text{P}} = 18,4$ Hz.

RMN ^{31}P (δ , CDCl_3): 25,9 (P).

2S, 3R, 4R-3,4-Bis(méthoxymethoxy)-N-hydroxypyrrolidine-1-phosphonate de diméthyle: 96

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz, TA): 3,15 (1H, dd, *Ha-5*); 3,30(1H, dd, *H-2*); 3,37 (6H, d, POMe_2); 3,43 (1H, dd, *Hb-5*); 3,79 (3H, s, OMe); 3,80 (3H, s, OMe); 4,18 (1H, m, *H-4*); 4,32 (1H, dd, *H-3*); 4,69 (2H, 2d, OCH_2O); 4,72 (2H, 2d, OCH_2O); 6,53 (1H, s, *OH*).

$J_{2,3} = 5,3$; $J_{2,P} = 7,6$; $J_{2,5a} = 1,8$; $J_{2,5b} = 1,2$; $J_{2,4} = 1,8$; $J_{3,4} = 0$; $J_{3,5a} = 1,8$; $J_{3,5b} = 1,2$; $J_{3,P} = 13,1$; $J_{4,5a} = 5,4$; $J_{4,5b} = 1,8$; $J_{4,P} = 2,2$; $J_{5a,5b} = 11,0$; $J_{OCH_2O} = 7,0$; $J_{OMe,P} = 7$ Hz.



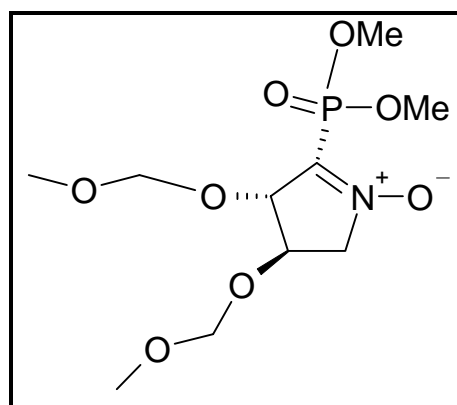
$C_{10}H_{22}O_8NP$
 $M = 315$ g/mol
 Huile brune
 CCM: Rf = 0,09
 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 97/3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,5 MHz, TA): 53,0 (POMe); 53,7 (POMe); 55,6 (OCH_3); 55,65 (OCH_3); 61,1 (C-5); 68,5 (C-2); 78,6 (C-3); 80,8 (C-4); 95,3 (OCH_2O); 95,5 (OCH_2O).
 $J_{OMe,P} = 10,1$; $J_{OMe,P} = 9,5$; $J_{C_5,P} = 27,1$; $J_{C_2,P} = 275,5$; $J_{C_3,P} = 13,9$; $J_{C_4,P} = 5,5$ Hz.

RMN ^{31}P ($\delta, CDCl_3$): 26,8 (P).

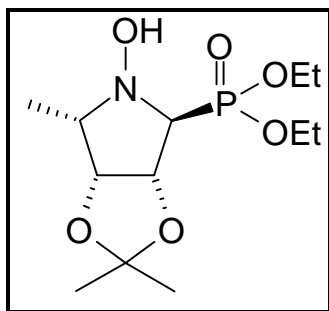
(3,4-Bis-methoxymethoxy-1-oxy-pyrrolidin-2-yl)-phosphonate de dimethyle: 110

A une solution de 10 mg d'hydroxylamine phosphorée dans $CDCl_3$, on ajoute 10 mg (1,2 éq.) d'oxyde de mercure et on laisse agiter pendant 24 h. Après centrifugation, lavage au dichlorométhane et évaporation, on obtient une nitrone avec oxydation du coté le plus substitué. Si on oxyde l'autre isomère phosphoré, on obtient un mélange des deux nitrones (double liaison du coté le plus substitué et le moins substitué).



$C_{10}H_{20}O_8NP$
 $M = 313$ g/mol
 Huile brune
 CCM: Rf = 0,24
 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98/2)

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz, TA): 3,39 (3H, s, OCH_3); 3,45 (3H, s, OCH_3); 3,86 (3H, d, POMe); 3,90 (3H, d, POMe); 3,93 (1H, dd, H-5b); 4,38 (1H, d, H-4); 4,53 (1H, dq, H-5a); 4,58 (2H, 2d, OCH_2O); 4,67 (2H, 2d, OCH_2O); 4,97 (1H, s, H-3).
 $J_{3,4} = 1,0$; $J_{3,5a} = 0,8$; $J_{3,5b} = 1,0$; $J_{3,P} = 1,2$; $J_{4,P} = 1,8$; $J_{4,5a} = 5,4$; $J_{4,5b} = 1,2$; $J_{5a,P} = 3,4$; $J_{5b,P} = 1,2$; $J_{5a,5b} = 15,0$; $J_{OCH_2O} = 7,0$ Hz.


 $C_{12}H_{24}O_6NP$
 $M = 309 \text{ g/mol}$

Huile jaune

 $[\alpha]_D^{20} = +22^\circ (c = 1; CHCl_3)$
CCM: 0,18 ($CH_2Cl_2/EtOH$ 98/2)

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, TA): 1,29 (3H, d, Me-5); 1,30 (3H, s, CH_3); 1,33 (3H, t, CH_2CH_3); 1,36 (3H, t, CH_2CH_3); 1,43 (3H, s, CH_3); 3,60 (1H, q, H-5); 3,88 (1H, d, H-2); 4,13-4,23 (4H, m, CH_2CH_3); 4,63 (1H, dd, H-4); 4,95 (1H, ddd, H-3); 6,26 (1H, s, OH).

 $J_{4,5} = 4,8; J_{4,3} = 6,5; J_{5,Me} = 6,3; J_{CH_2,CH_3} = 7; J_{2,3} = 1,3; J_{2,P} = 12,9; J_{3,P} = 8,3; J_{5,P} = 1,0 \text{ Hz.}$

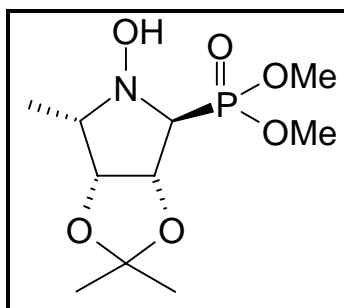
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, TA): 11,6 (Me-5); 16,2 (CH_2CH_3); 16,3 (CH_2CH_3); 24,2 (C-Me₂); 25,7 (C-Me₂); 61,3 (CH_2CH_3); 62,6 (CH_2CH_3); 63,9 (C-5); 69,4 (C-2); 78,9 (C-4); 83,8 (C-3); 111,3 (Cq-Me₂).

 $J_{2,P} = 141,3; J_{CH_3CH_2,P} = 6,0; J_{CH_2CH_3,P} = 7,0; J_{CH_2CH_3,P} = 6,4 \text{ Hz.}$

RMN ^{31}P ($CDCl_3$, TA): 23,9.

Analyse élémentaire: Calculée: C 46,60	H 7,82	N 4,53	P 10,01
Trouvée: C 46,49	H 7,92	N 4,61	P 9,75

2S, 3R, 4R, 5S, N-Hydroxy-5-méthyl-3,4-isopropylidènedioxypyrrolidine-1-phosphonate de diméthyle: 98


 $C_{10}H_{20}O_6NP$
 $M = 281 \text{ g/mol}$

Huile jaune

 $[\alpha]_D^{20} = +30^\circ (c = 1; CHCl_3)$

CCM: 0,46 (Ether/MeOH 95/5)

160 μL (1,75 mmol, 1,5 éq.) de diméthylphosphite sont ajoutés à 200 mg (1,17 mmol) de nitrone. On agite à 40 °C pendant 20 h. On obtient alors une solution jaune très visqueuse. Une purification sur colonne de silice (Ether/MeOH 95/5) est réalisée afin d'obtenir 328 mg d'une huile jaune pâle (Rdt = quant).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, TA): 1,24 (3H, d, Me-5); 1,30 (3H, s, CH_3); 1,45 (3H, s, CH_3); 3,67 (1H, q, H-5); 3,78 (3H, d, OMe); 3,80 (3H, d, OMe); 3,82 (1H, d, H-2); 4,63 (1H, dd, H-4); 4,95 (1H, ddd, H-3); 5,90 (1H, s, OH).

 $J_{4,5} = 5,0; J_{4,3} = 6,6; J_{5,Me} = 6,4; J_{2,3} = 1,3; J_{2,P} = 11,8; J_{3,P} = 8,8; J_{OMe,P} = 10,6; J_{OMe,P} = 11,1 \text{ Hz.}$

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, TA): 11,7 (Me-5); 24,2 (C-Me₂); 26,0 (C-Me₂); 51,9 (OMe); 53,4 (OMe); 64,2 (C-5); 69,3 (C-2); 78,9 (C-3); 79,6 (C-4); 111,6 (Cq-Me₂).

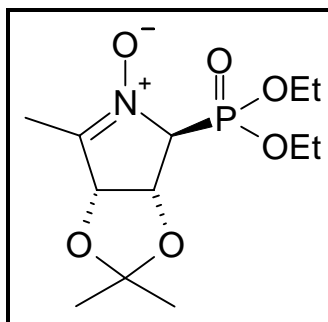
$J_{2,P} = 142,7$; $J_{OMe,P} = 5,7$; $J_{OMe,P} = 7,1$ Hz.

RMN ^{31}P ($CDCl_3$, TA): 26,3.

Analyse élémentaire: Calculée: C 42,71 H 7,17 N 4,98 P 11,01

Trouvée: C 42,79 H 7,28 N 4,70 P 10,28

(3R,4R,5S)-N-oxy-2-méthyl-3,4-isopropylidènedioxy-2-pyrroline-5-phosphonate de diéthyle: 111



$C_{12}H_{22}O_6NP$

$M = 307$ g/mol

Huile jaune

$[\alpha]_D^{20} = +14^\circ$ (c = 1; $CHCl_3$)

CCM: 0,48 (Ether/MeOH 9/1)

Une solution de 50 mg (0,16 mmol) d'hydroxylamine phosphorée dans 0,5 mL de chloroforme est agitée pendant 24 heures en présence de 42 mg (1,2 éq., 0,19 mmol) d'oxyde de mercure jaune. Le solide est éliminé par centrifugation et lavage au dichlorométhane. Après évaporation du solvant, la nitrone est purifiée sur plaque préparative de silice (éther/EtOH 97/3). Après 3 migrations, le produit est récupéré en éluant à l'éther puis au méthanol. On obtient alors 26 mg de mélange de nitrone (85/15) avec majoritairement oxydation du côté de méthyle (Rdt = 53 %).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, TA): 1,24 (3H, t, CH_2CH_3); 1,34 (3H, s, CH_3); 1,38 (3H, t, CH_2CH_3); 1,39 (3H, s, CH_3); 2,09 (3H, d, Me-5); 4,21-4,26 (4H, m, CH_2CH_3); 4,44 (1H, sextd, H-2); 4,13-4,23 (4H, m, CH_2CH_3); 4,96 (1H, ddd, H-3); 5,25 (1H, sextd, H-4).

$J_{4,3} = 6,0$; $J_{2,3} = 0,8$; $J_{2,P} = 14,0$; $J_{2,4} = 2,0$; $J_{2,Me} = 1,5$; $J_{3,P} = 6,8$; $J_{4,Me} = 1,5$; $J_{4,P} = 1,5$; $J_{Me,P} = 4,5$ Hz.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, TA): 10,7 (Me-5); 16,3 (CH_2CH_3); 16,3 (CH_2CH_3); 26,1 (C-Me₂); 27,2 (C-Me₂); 63,3 (CH_2CH_3); 64,6 ($CH_2CH_2CH_3$); 74,4 (C-3); 75,3 (C-2); 82,0 (C-4); 112,1 (Cq-Me₂); 143,7 (C-5).

$J_{2,P} = 154,0$; $J_{CH_2CH_3,P} = 5,7$; $J_{CH_2CH_3,P} = 6,4$; $J_{CH_2CH_3,P} = 7,1$; $J_{CH_2CH_3,P} = 6,4$; $J_{5,P} = 8,5$; $J_{Me,P} = 2,1$ Hz.

RMN ^{31}P ($CDCl_3$, TA): 17,0.

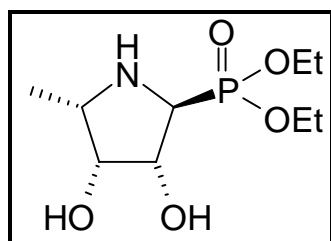
Analyse élémentaire: Calculée: C 46,91 H 7,22 N 4,56

Trouvée: C 46,69 H 7,44 N 4,41

(3,4-Dihydroxy-5-méthyl-pyrrolidin-2-yl)-phosphonate de diéthyle: 104

135 mg (0,44 mmol) de produit protégé est hydrogéné dans 1,5 mL d'éthanol et 2,2 mL d'HCl 1N sur 20 mg de Pd/C(5%) à température ambiante. Après 48h, le palladium

est centrifugée, puis lavé 3 fois à l'éthanol. Le solvant est ensuite évaporé pour donner 130 mg de produit brut déprotégé sous forme de chlorhydrate. Le produit est ensuite passé sur résine échangeuse d'ions Amberlite IR-120 (forme acide). La résine est lavée à l'eau jusqu'à pH neutre, le produit est ensuite déposé sur la résine puis la colonne est éluée à l'eau, au méthanol, à NH_4OH 0,5 N puis 1N. On recueille alors dans la phase ammoniacuée 73 mg de produit déprotégé (Rdt = 61 %).



$\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}_5\text{NP}$
 $M = 253 \text{ g/mol}$
 Huile brune
 CCM: 0,63 (EtOH)

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz, TA): 1,15 (d, 3H, Me); 1,33 (t, 3H, CH_2CH_3); 1,34 (t, 3H, CH_2CH_3); 3,11 (qd, 1H, H-5); 3,33 (t, 1H, H-2); 3,77 (dd, 1H, H-4); 4,18 (m, 4H, CH_2CH_3); 4,40 (ddd, 1H, H-3).

$J_{2,\text{P}} = 7,3$; $J_{2,3} = 7,6$; $J_{3,4} = 4,3$; $J_{3,\text{P}} = 16,4$; $J_{4,5} = 2,8$; $J_{5,\text{CH}_3} = 6,6$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,0 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz, TA): 14,0 (Me-5); 16,7 (CH_2CH_3); 16,8 (CH_2CH_3); 57,9 (C-5); 59,1 (C-2); 63,8 (CH_2CH_3); 64,0 (CH_2CH_3); 75,1 (C-4); 76,1 (C-3).

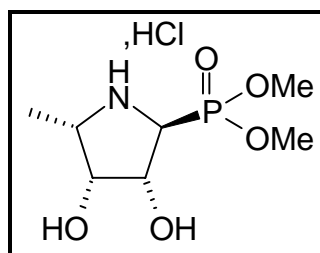
$J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 5,7$; $J_{5,\text{P}} = 4,9$; $J_{2,\text{P}} = 166,7$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 6,4$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 7,0$; $J_{4,\text{P}} = 7,1$; $J_{3,\text{P}} = 2,1 \text{ Hz}$.

RMN ^{31}P (CD_3OD , TA): 27,1.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺) :

Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$: formule brute $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{O}_5\text{NP}$; m/z théorique 254,11574; m/z trouvée 254,117

(3,4-Dihydroxy-5-méthyl-pyrrolidin-2-yl)-phosphonate de diméthyle: 103



$\text{C}_7\text{H}_{17}\text{O}_5\text{NPCl}$
 $M = 261,5 \text{ g/mol}$
 Huile jaune
 $[\alpha]_D^{20} = -13^\circ$ (c = 1; MeOH)
 CCM: 0,69 (MeOH)

88 mg (0,31 mmol) de produit protégé sont hydrogénéolysés dans 1 mL d'éthanol et 1,6 mL d' HCl 6 N sur 30 mg de Pd/C(5%) à température ambiante. Après 30h, le palladium est centrifugée, puis lavé 3 fois au méthanol. Le solvant est ensuite évaporé pour donner 30 mg de produit déprotégé sous forme de chlorhydrate (Rdt = 43 %).

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz, TA): 1,41 (3H, d, Me-5); 3,68(1H, t, H-2); 3,69 (1H, m, H-5); 3,89 (3H, d, OCH_3); 3,92 (3H, d, OCH_3); 4,05 (1H, t, H-4); 4,35 (1H, ddd, H-3).

$J_{2,\text{P}} = 10,8$; $J_{2,3} = 9,3$; $J_{3,4} = 3,5$; $J_{3,\text{P}} = 14,9$; $J_{4,5} = 2,1$; $J_{5,\text{CH}_3} = 6,6$; $J_{\text{OCH}_3,\text{P}} = 10,8$; $J_{\text{OCH}_3,\text{P}} = 11,1 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz, TA): 11,9 (*Me*-5); 54,6 (OCH_3); 55,1 (OCH_3); 55,2 (*C*-2); 60,3 (*C*-5); 72,9 (*C*-4); 74,6 (*C*-3).

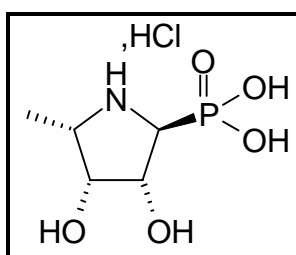
$J_{\text{OCH}_3,\text{P}} = 7,1$; $J_{5,\text{P}} = 2,1$; $J_{2,\text{P}} = 158,9$; $J_{4,\text{P}} = 9,9$ Hz.

RMN ^{31}P (CD_3OD , TA): 21,0.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺):

Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$: formule brute $\text{C}_7\text{H}_{17}\text{O}_5\text{NP}$; m/z théorique 226,08444; m/z trouvée 226,098

Acide (3,4-Dihydroxy-5-méthyl-pyrrolidin-2-yl)-phosphonique: 102



$\text{C}_5\text{H}_{13}\text{O}_5\text{NPCl}$

$M = 233,5$ g/mol

Huile brune

$[\alpha]_D^{20} = +20^\circ$ ($c = 1$; MeOH)

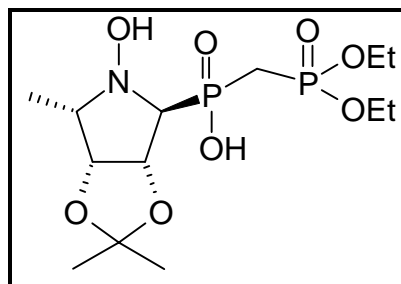
175 mg (0,4 mmol) de produit dibenzylé protégé sont hydrogénolysés dans 1,5 mL d'éthanol et 4 mL d'HCl 1N sur 50 mg de Pd/C (5%). Il y a alors formation d'un précipité blanc. Après 24 h à température ambiante, le solide est centrifugé, lavé 3 fois à l'éthanol puis les phases organiques sont évaporées. On obtient 94 mg de produit pur (Rdt = quant.).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,46 (3H, s, *Me*-5); 3,81 (1H, m, *H*-2); 3,94 (1H, m, *H*-5); 4,31 (1H, m, *H*-4); 4,61 (1H, m, *H*-3).

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 8,74 (*Me*-5); 66,3 (*C*-2); 69,6 (*C*-5); 71,2 (*C*-4); 71,9 (*C*-3).
 $J_{2,\text{P}} = 147$ Hz.

RMN ^{31}P (D_2O): 8,13.

[Hydroxy-(5-hydroxy-2,2,6-triméthyl-tetrahydro-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyrrol-4-yl)-phosphinoylméthyl]-phosphonate de diéthyle: 101



$\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{O}_8\text{NP}_2$

$M = 415$ g/mol

Huile blanche

CCM: $R_f = 0,22$ (AcOEt/EtOH 7/3)

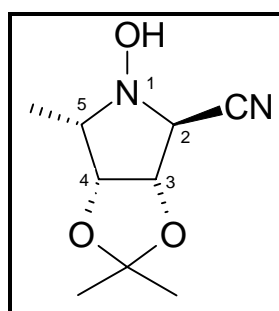
30 mg (0,12 mmol, 1,5 éq.) de méthylène phosphonate de diéthyle sont dissous dans 0,2 mL de THF puis ajouté à 15 mg (0,08 mmol) de nitron. La solution est agitée pendant 24h à 30 °C. On obtient une solution laiteuse blanche qui est évaporée. Le produit est purifié par plaque préparative (AcOEt/EtOH 3/2) pour donner 22 mg (Rdt = 60%) de produit.

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz, TA): 1,22 (3H, d, Me-5); 1,29 (3H, s, CH_3); 1,33 (3H, t, CH_2CH_3); 1,35 (3H, t, CH_2CH_3); 1,44 (3H, s, CH_3); 2,35-2,70 (2H, m, PCH_2P); 3,48 (1H, qd, H-5); 3,72 (1H, d, H-2); 3,96-4,05 (4H, m, CH_2CH_3); 4,56 (1H, dd, H-3); 4,92 (1H, t, H-4).
 $J_{2,\text{P}} = 5,5$; $J_{2,3} = 5,3$; $J_{3,4} = 6,5$; $J_{4,5} = 7,3$; $J_{5,\text{CH}_3} = 6,7$; $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 6,8$; $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 6,8$; $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 20,4$; $J_{\text{P},\text{CH}_2} = 15$ Hz.

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz, TA): 11,9 (Me-5); 17,0 ($2^*\text{OCH}_2\text{CH}_3$); 25,2 (C-Me₂); 26,8 (C-Me₂); 27,9 (PCH_2P); 64,2 ($2^*\text{OCH}_2\text{CH}_3$); 65,7 (C-5); 73,9 (C-4); 75,7 (C-2); 83,5 (C-3); 112,8 (Cq-Me₂).

RMN ^{31}P (CD_3OD , TA): 23,7; 26,0.

[2R,3S,4R,5S]-5-Méthyl-3,4-isopropylidènedioxy-N-hydroxy-2-carbonitrile: 93



$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_3\text{N}_2$
 $M = 198$ g/mol
 Cristaux blancs
 $[\alpha]_D^{20} = +90^\circ$ ($c = 1$; CHCl_3)
 $F = 72-75$ °C
 CCM: Rf = 0,9 (Ether/MeOH 9/1)

A 0°C, 170 mg (3,5 mmol) de NaCN sont mis en suspension dans 1,3 mL (2,6 mmol) d'HCl 2,1 M dans l'éther et 0,2 mL d'eau distillée pendant 15 min à 0°C. La solution est ensuite centrifugée afin d'éliminer les sels et est ajoutée à une solution de 100 mg (0,28 mmol) de nitroène dissoute dans 1 mL d'éther. On agite alors pendant 22 h puis on évapore pour obtenir 115 mg de cristaux blancs. (Rdt quant.).

IR (v en cm^{-1}): 632; 738; 872; 953; 1010; 1055; 1073; 1117; 1144; 1169; 1214; 1255; 1277; 1284; 1379; 1452; 1460; 2944; 2992; 3242; 3251.

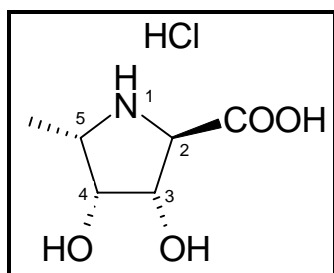
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TA): 1,29 (3H, s, CH_3); 1,31 (3H, d, Me-5); 1,44 (3H, s, CH_3); 3,11 (1H, quint., H-5); 4,27 (1H, s, H-2); 4,59 (1H, dd, H-4); 4,77 (1H, d, H-3); 6,72 (1H, s, OH).

$J_{4,5} = 4,9$; $J_{5,\text{Me}} = 6,3$; $J_{3,4} = 6,8$; $J_{2,3} = 0$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TA): 11,5 (Me-5); 24,4 (C-Me₂); 25,6 (C-Me₂); 62,4 (C-2); 63,7 (C-5); 77,9 (C-4); 78,3 (C-3); 112,1 (Cq-Me₂); 114,8 (CN).

Acide [2R,3S,4R,5S]-3,4-Dihydroxy-5-méthyl-pyrrolidine-2-carboxylic: 94

140 mg (0,7 mmol) de nitrile sont placés dans 1 mL d'HCl 6N et chauffés à 50°C pendant 72h. Après évaporation, le produit est dissout dans l'éthanol auxquels sont ajoutés 3 mL d'HCl 1N et 50 mg de Pd/C (5%). L'hydrogénolyse a lieu pendant 64h. Après centrifugation, lavage du palladium et évaporation du solvant, 133 mg d'huile marron sont obtenus. Le produit souhaité est obtenu en mélange avec un autre produit non déterminé. Aucune méthode de purification n'a été concluante afin d'obtenir l'acide souhaité pur.



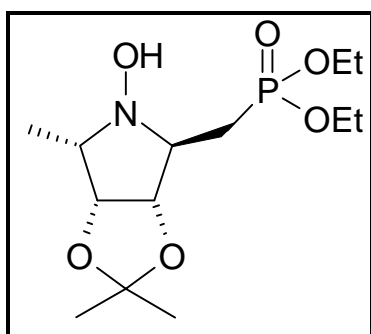
$C_6H_{12}O_4NCl$
 $M = 196,5 \text{ g/mol}$
 Huile marron

RMN 1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,43 (3H, d, Me-5); 3,87 (1H, qd, H-5); 4,22 (1H, d, H-2); 4,25 (1H, t, H-4); 4,62 (1H, dd, H-3).

$J_{4,5} = 2,3$; $J_{5,Me} = 6,6$; $J_{3,4} = 3,5$; $J_{3,2} = 8,3 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 9,0 (Me-5); 56,5 (C-5); 70,3 (C-2, C-4); 72,6 (C-3); 172,6 (COOH).

[2R,3S,4R,5S]-N-hydroxy-3,4-isopropylidènedioxy-5-méthylpyrrolidineméthane phosphonate de diéthyle: 105



$C_{13}H_{26}O_6NP$
 $M = 323 \text{ g/mol}$
 Huile incolore
 $[\alpha]_D^{20} = +26^\circ$ (c = 1; $CHCl_3$)
 CCM: 0,63 (Ether/MeOH 9/1)

50 mg (0,29 mmols) de nitrone sont dissous dans 1 mL de THF et placés à $-70^\circ C$. A une solution fraîchement distillée de phosphonate de méthyle 85 μL (2 éq. , 0,58 mmol) dissous dans 2 mL de THF et placé à $-70^\circ C$, 0,36 mL (2 éq. , 0,58 mmols) de butyllithium (1,6 M dans hexane) sont alors ajoutés goutte à goutte. La solution est agitée à $-70^\circ C$ pendant 15 min. Il y a formation d'un trouble blanc. Cette solution est ensuite transférée à la canule sur la solution de nitrone puis on laisse agiter à $-70^\circ C$ pendant 2h. La réaction est alors stoppée par ajout de NH_4Cl saturé, puis la solution est extraite 3 fois à l'AcOEt. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée puis évaporée pour donner 93 mg de produit propre (Rdt = 98 %).

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, TA): 1,16 (3H, d, Me-5); 1,19 (3H, s, CH_3); 1,25 (3H, t, CH_2CH_3); 1,27 (3H, t, CH_2CH_3); 1,34 (3H, s, CH_3); 1,44 (1H, dd, Ha-1'); 2,55 (1H, dd, Hb-1'); 2,81 (1H, qd, H-5); 3,56 (1H, td, H-2); 4,12 (4H, m, CH_2CH_3); 4,39 (1H, t, H-4); 4,64 (1H, d, H-3); 7,94 (1H, s, OH).

$J_{2,P} = 10,1$; $J_{2,1'a} = 2,5$; $J_{2,1'b} = 12,1$; $J_{1'a,1'b} = 15,4$; $J_{1'a,p} = 20,9$; $J_{1'b,p} = 18,1$; $J_{3,4} = 6,8$; $J_{4,5} = 5,3$; $J_{5,CH_3} = 6,3$; $J_{CH_2CH_3} = 7,2 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, TA): 11,9 (Me-5); 16,2 (CH_2CH_3); 16,3 (CH_2CH_3); 19,5 (C-1'); 24,0 (C-Me $_2$); 25,5 (C-Me $_2$); 60,2 (C-5); 61,7 (CH_2CH_3); 61,8 (CH_2CH_3); 63,9 (C-2); 77,3 (C-4); 80,0 (C-3); 110,7 (Cq-Me $_2$).

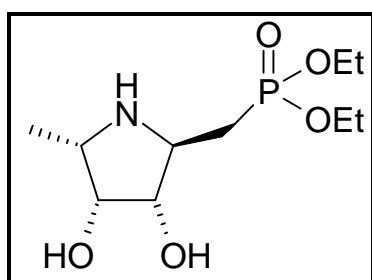
$J_{CH_2CH_3,P} = 6,4$; $J_{CH_2CH_3,P} = 6,4$; $J_{2',P} = 140,6$; $J_{CH_2CH_3,P} = 6,4 \text{ Hz}$.

RMN ^{31}P (CDCl_3 , TA): 31,7.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺) :

Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$: formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{O}_6\text{NP}$; m/z théorique 324,15760; m/z trouvée 324,208

[2R,3S,4R,5S]-(3,4-Dihydroxy-5-méthyl-pyrrolidin-2-ylmethyl)-phosphonic acide diéthyl ester: 106



$\text{C}_{10}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{NP}$

$M = 267 \text{ g/mol}$

Huile jaune

$[\alpha]_D^{20} = -35^\circ$ ($c = 1$; MeOH)

CCM: Rf = 0,53 (Ethanol)

200 mg (0,6 mmol) de produit protégé sont hydrolysés dans 2 mL d'éthanol et 3 mL d'HCl 1N sur 50 mg de Pd/C(5%) à température ambiante pendant 24h. Le palladium est lavé trois fois à l'éthanol et est éliminé par centrifugation puis l'éthanol est évaporé. Le produit est purifié sur résine acide Amberlite IR-120. La résine est lavée à l'eau distillée jusqu'à pH neutre, le produit est déposé puis élué à l'eau, à l'éthanol, à NH_4OH 0,5 N puis NH_4OH 1N. Après évaporation des phases ammoniacuées, on obtient 113 mg de produit déprotégé (Rdt = 68 %).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, TA): 1,32 (3H, d, Me-5); 1,35 (6H, t, CH_2CH_3); 2,31 (1H, td, $H_{a-1'}$); 2,45 (1H, dd, $H_{b-1'}$); 3,60 (1H, td, $H-2$); 3,66 (1H, qd, $H-5$); 4,10 (1H, td, $H-4$); 4,14 (1H, dd, $H-3$); 4,21 (4H, m, CH_2CH_3).

$J_{2,\text{P}} = 8,0$; $J_{2,3} = 8,8$; $J_{2,4} = 1,0$; $J_{2,1'a} = 10,1$; $J_{2,1'b} = 3,5$; $J_{1'a,1'b} = 15,8$; $J_{1'a,\text{P}} = 15,8$; $J_{1'b,\text{P}} = 19,6$; $J_{3,4} = 3,8$; $J_{4,5} = 3,0$; $J_{5,\text{CH}_3} = 6,8$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7,0 \text{ Hz}$.

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 12,1 (Me-5); 15,9 (CH_2CH_3); 15,9 (CH_2CH_3); 27,3 (C-1'); 55,8 (C-2); 56,8 (C-5); 64,2 (CH_2CH_3); 64,3 (CH_2CH_3); 72,8 (C-4); 77,3 (C-3).

$J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 6,4$; $J_{1',\text{P}} = 142$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3,\text{P}} = 6,4$; $J_{2,\text{P}} = 5,7$; $J_{4,\text{P}} = 1,4$; $J_{3,\text{P}} = 14,8 \text{ Hz}$.

RMN ^{31}P (D_2O , TA): 31,7.

Spectre de masse Haute Résolution (TOF MS ES⁺) :

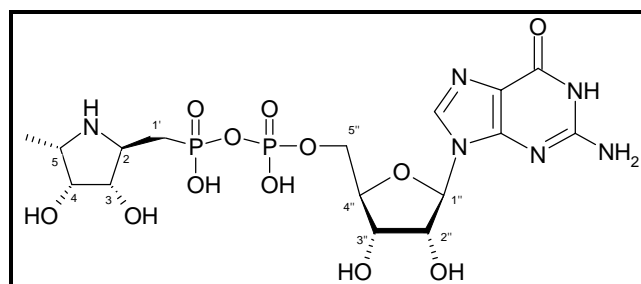
Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$: formule brute $\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{NP}$; m/z théorique 268,13139; m/z trouvée 268,147

- Synthèse du dérivé pyrophosphate

Guanosine phosphate-1- α -C-phosphonate-L-lyxose: 107

80 mg (0,3 mmol) de produit phosphoré éthylé sont dissous dans 0,8 mL de CH_2Cl_2 anhydre sous argon. 0,25 mL (1,8 mmol, 6 équ.) de bromure de triméthylsilyle sont additionnés au milieu. Après 1 nuit d'agitation à température ambiante sous argon, une solution MeOH/ Et_3N 9/1 est additionné au milieu, la solution est agitée pendant 1 h 30 puis évaporée et coévaporée 2 fois au toluène. On obtient alors le sel de triéthylammonium. Celui-ci est coévaporé 3 fois avec de la pyridine anhydre. Le vide de l'évaporateur rotatif est cassé sous

argon. 159 mg (0,22 mmol, 1,2 éq.) de GMP-morpholidate sont additionnés au milieu. Le milieu est alors coévaporé 3 fois avec de la pyridine anhydre et le vide est cassé sous argon. 1 mL de pyridine anhydre sont finalement ajoutés en présence de 1 mL (0,44 mmol, 2,4 éq.) de 1H-tétrazole (0,45M). La solution est agitée à température ambiante sous argon pendant 5 jours. On ajoute alors de l'eau. Le milieu trouble devient limpide et est évaporé puis coévaporé 2 fois avec de l'eau pour donner le produit attendu en mélange avec le produit de départ et le dimère.

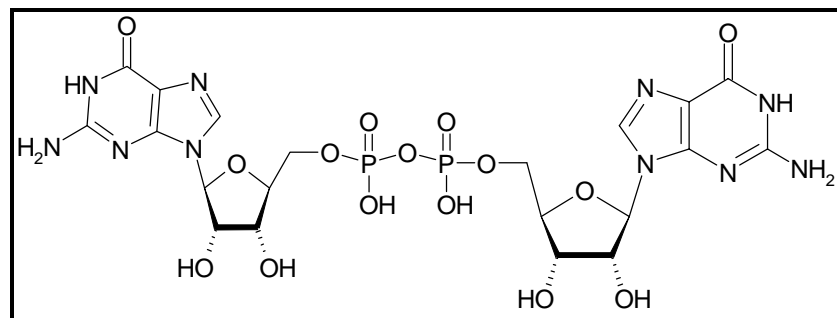


$C_{16}H_{24}O_{12}N_6P_2$
 M = 564 g/mol
 Mousse blanche

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 11,8 (*Me-5*); 29,5 (*C-1'*); 57,3 (*C-2*); 57,6 (*C-5*); 65,5 (CH_2-5''); 70,5 (*C-3''*); 71,8 (*C-4*); 76,7 (*C-3*); 74,6 (*C-2''*); 84,1 (*C-4''*); 88,2 (*C-1''*); 114,7 (NCCO); 137,5 (N-C=N); 151,5 (N-C-N); 154,6 (*C-NH₂*); 158,1 (CO).
 $J_{4'',P} = 9,2$; $J_{3,P} = 10,6$; $J_{1',P} = 135,6$ Hz.

RMN ^{31}P (D_2O , TA): -8,6; 12,5 Hz.

Diguanosine diphosphate: 108



$C_{20}H_{26}O_{14}N_{10}P_2$
 M = 692 g/mol
 Huile blanche

50 mg (0,07 mmol) de GMP-morpholidate sont coévaporés 3 fois avec de la pyridine anhydre. Le vide de l'évaporateur rotatif est à chaque fois cassé sous argon. 0,5 mL de pyridine puis 0,35 mL (2éq., 0,14 mmol) de 1H-tétrazole 0,45 M sont ensuite ajoutés au milieu. La solution est agitée à température ambiante sous argon pendant 5 jours puis évaporée et coévaporée 2 fois avec de l'eau. On obtient alors 66mg d'une huile blanche qui représente le dimère et le phosphate de la guanosine (GMP) dans les proportions 50/50.

RMN 1H (D_2O , 400 MHz, TA): 4,02-4,16 (2H, m, CH_2-5); 4,14 (1H, m, *H-4*); 4,29 (1H, t, *H-3*); 4,47 (1H, t, *H-2*); 5,64 (1H, d, *H-1*); 7,80 (1H, s, CH guanosine).
 $J_{2,3} = 4,8$; $J_{3,4} = 4,0$; $J_{2,1} = 5,3$ Hz.

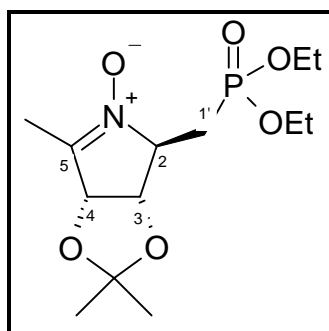
RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, TA): 65,5 (CH_2-5); 70,4 (*C-3*); 74,5 (*C-2*); 83,7 (*C-4*); 87,8 (*C-1*); 116,6 (NCCO); 137,59 (N-C=N); 151,6 (N-C-N); 154,3 (*C-NH₂*); 159,2 (CO).

$J_{5,P} = 3,5$; $J_{4,P} = 4,2$; $J_{2,P} = 19,1$ Hz.

RMN ^{31}P (D_2O , TA): -11,5.

- Inversion de la position pseudo-anomérique

(2,2,6-Triméthyl-5-oxy-4,6a-dihydro-3aH-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyrrol-4-ylméthyl)-phosphonic acid diethyl ester: 113



$\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{NP}$

$M = 321$ g/mol

Huile blanche

$[\alpha]_D^{20} = +7^\circ$ ($c = 0,5$; CHCl_3)

CCM: $R_f = 0,24$ (Ether/EtOH 9/1)

200 mg (0,62 mmol) d'hydroxylamine phosphorée est dissoute dans 2 mL d'éthanol et agitée pendant 20 h à température ambiante avec 201 mg (1,5 éq., 0,93 mmol) d'oxyde mercurique jaune. Le solide est ensuite centrifugé puis le solvant évaporé pour donner 198 mg de nitrone (Rdt quant.).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, TA): 1,35 (6H, t, $2^*\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,38 (6H, s, CH_3); 2,08 (3H, t, *Me*-5); 2,15 (1H, ddd, *Ha*-1'); 2,65 (1H, ddd, *Hb*-1'); 4,13 (4H, m, $2^*\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,25 (1H, qddd, *H*-2); 4,96 (1H, dt, *H*-3); 5,18 (1H, dq, *H*-4).

$J_{\text{CH}_3\text{CH}_2, \text{CH}_3\text{CH}_2} = 7,0$; $J_{1',a,P} = 18,9$; $J_{1',a,1'b} = 15,4$; $J_{1',a,2} = 3,3$; $J_{1',b,P} = 17,1$; $J_{1',b,2} = 10,1$; $J_{2, \text{Me}} = 1,5$; $J_{2,3} = 0,9$; $J_{2,P} = 19,9$; $J_{3,P} = 0,9$; $J_{3,4} = 6,3$; $J_{4,2} = 1,5$; $J_{4, \text{Me}} = 1,5$ Hz.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, TA): 10,8 (*Me*-5); 16,5 (CH_2CH_3); 25,8 (*C*- Me_2); 27,1 (*C*- Me_2); 26,4 (*C*-1'); 62,2 (CH_2CH_3); 62,5 (CH_2CH_3); 74,4 (*C*-2); 76,0 (*C*-3); 81,3 (*C*-4); 112,1 (*Cq*- Me_2).

$J_{\text{CH}_2\text{CH}_3, P} = 5,6$; $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3, P} = 6,4$; $J_{1', P} = 142,7$; $J_{2, P} = 1,4$ Hz.

PARTIE EXPERIMENTALE : TESTS ENZYMATIQUES

1. Généralités

- **Inhibiteur compétitif**
- **Evaluation du pouvoir inhibiteur**
 - Définitions
 - Représentations graphiques

2. Essais enzymatiques

- **Les glycosidases**
 - Description générale
 - Mode opératoire
 - Etude de stabilité
- **La fucosyltransférase III**
 - Description générales
 - Mode opératoire

Les essais enzymatiques sur les glycosidases ont été réalisés au laboratoire et les essais enzymatiques sur la fucosyltransférase de type III ont été effectués à l'université d'Orsay dans le laboratoire de Chimie Organique Multifonctionnelle du professeur A. Lubineau. Je remercie particulièrement le docteur C. Augé pour m'avoir accueillie et guidée dans la réalisation de ces tests.

1. Généralités

• Inhibiteur compétitif

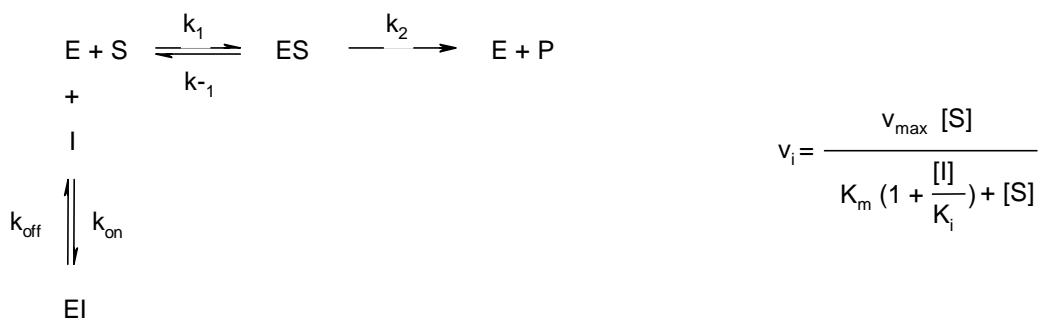
Tous les aminosucres testés sont des inhibiteurs de type compétitif^{179,180}.

Si un inhibiteur se lie à l'enzyme et empêche ainsi le substrat de s'y lier, on dit que le substrat et l'inhibiteur sont en compétition pour le site actif. L'inhibiteur est de type compétitif (schéma 1).



Schéma 1 . Modèle d'inhibiteurs compétitifs.

Dans le cadre du mécanisme Michaëlis-Menten, cette inhibition est représentée par l'équilibre et l'équation cinétique suivants:



- ❖ E = enzyme, S = substrat, ES = complexe enzyme-substrat, P = Produit, EI = complexe enzyme-inhibiteur, v_i = vitesse initiale
- ❖ $K_i = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$ = concentration représentative du pouvoir inhibiteur d'une molécule.
- ❖ K_m = constante qui constitue une mesure de l'affinité du substrat pour son enzyme.

- ❖ K_m = constante de Michaëlis = $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

- ❖ $V_{\text{max}} = k_2 / [E]$

- **Evaluation du pouvoir inhibiteur**

- **Définitions**

- ❖ **Pourcentage d'inhibition**

Pratiquement, il s'agit de la première mesure d'inhibition réalisée sur chaque molécule synthétisée. Ces mesures sont effectuées pour une concentration en inhibiteur de 1 mM. La vitesse d'hydrolyse initiale V_0 du substrat en absence d'inhibiteur est comparée à la vitesse d'hydrolyse V_i en présence d'inhibiteur. On détermine alors le pourcentage d'inhibition de l'enzyme dans des conditions précises de concentration en substrat et en enzyme:

$$\% I = 100 * \left(1 - \frac{V_i}{V_0} \right)$$

- ❖ **IC₅₀**

La valeur de l'IC₅₀ correspond à la concentration d'inhibiteur nécessaire pour obtenir une diminution de moitié de la vitesse initiale de réaction enzymatique. Cette grandeur dépend de la concentration en substrat dans un système d'inhibition compétitive, selon l'équilibre décrit dans le paragraphe 1.

$$IC_{50} = K_i \left(1 + S/K_m \right)$$

- ❖ **Ki: constante d'inhibition**

Cette valeur est la plus représentative du pouvoir inhibiteur d'une molécule. Deux représentations graphiques sont généralement employées: la représentation selon Lineweaver-Burk, où l'inverse de la vitesse initiale $1/v_i$ est exprimé en fonction de la concentration en substrat $1/[S]$, ou le traitement de Dixon qui exprime de la même manière $1/v_i$ en fonction de la concentration en inhibiteur $[I]$.

- **Représentations graphiques**

Dans ce paragraphe, nous nous attacherons à la détermination des grandeurs d'inhibitions pour les inhibiteurs compétitifs¹⁷⁹. Il est à noter que pour ce type d'inhibiteur, on obtient pour $v_i = 0,5 v_{max}$, $IC_{50} = K_i (1 + [S]/K_m)$. Il est donc possible d'évaluer la constante K_i directement à partir de la valeur de l'IC₅₀.

- ❖ **Représentation de Lineweaver-Burk**

Ce traitement exprime $1/v_i = f(1/[S])$ et l'équation cinétique devient alors:

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Sa représentation graphique est la suivante (schéma 2):

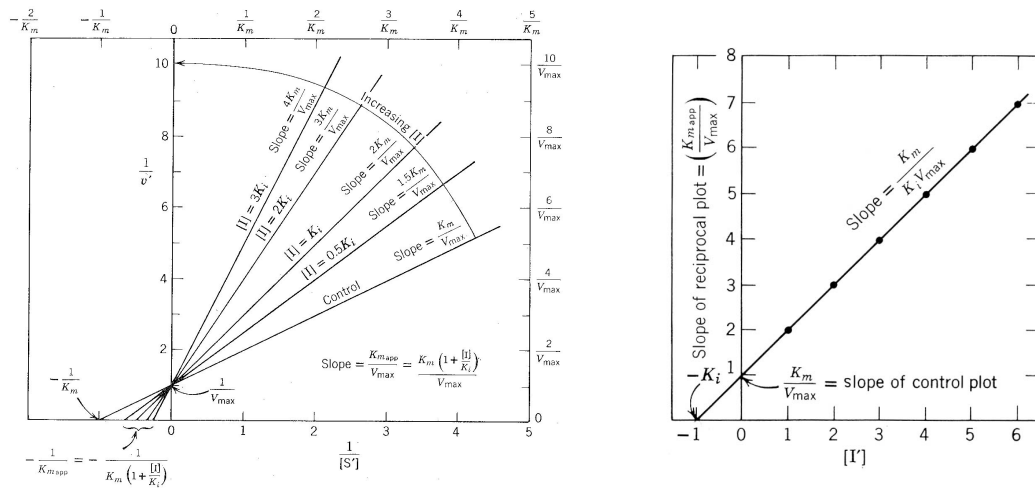


Schéma 2 . Représentation de Lineweaver-Burk pour un inhibiteur compétitif.

La valeur de K_i est déduite des pentes de cette représentation exprimée en fonction de $[I]$. Cette méthode permet de déterminer plus facilement le type d'inhibition.

❖ Représentation de Dixon

L'équation est formulée afin de donner $1/v_i = f([I])$:

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_{max} K_i [S]} [I] + \frac{1}{v_{max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)$$

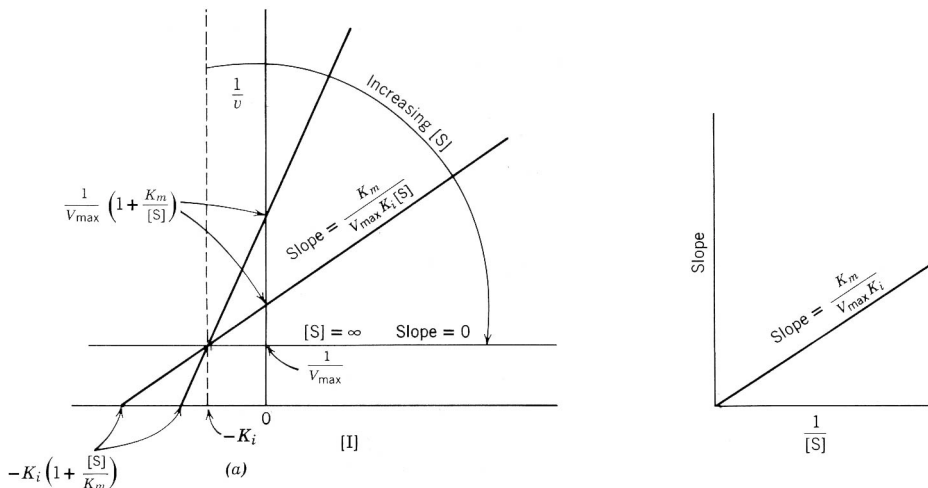


Schéma 3 . Représentation de Dixon pour un inhibiteur compétitif.

Par cette représentation, on obtient directement la valeur de K_i d'après le graphique. D'autre part, la représentation graphique de la pente en fonction de l'inverse de la concentration en substrat $1/[S]$ permet de prouver la compétitivité d'un inhibiteur si on obtient une droite passant par l'origine.

Cette méthode donne un accès plus rapide au pouvoir inhibiteur et permet d'obtenir directement l' IC_{50} d'une molécule donnée où $IC_{50} = K_i (1 + [S]/K_m)$. La valeur de l' IC_{50} est alors utilisée lorsque l'inhibiteur testé possède un pouvoir d'inhibition faible.

2. Essais enzymatiques

- **Les glycosidases**

- **Description générale**

Les tests enzymatiques sont basés sur l'hydrolyse catalytique *in vitro* d'un substrat synthétique, le glycoside de *para*-nitrophényle, dont la configuration correspond à la spécificité de l'enzyme que nous voulons étudier. Lors de la réaction, le substrat hydrolysé libère alors le sucre correspondant et le chromophore, le paranitrophénol qui absorbe à une longueur d'onde $\lambda = 405$ nm avec $\epsilon = 17,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (schéma 4).

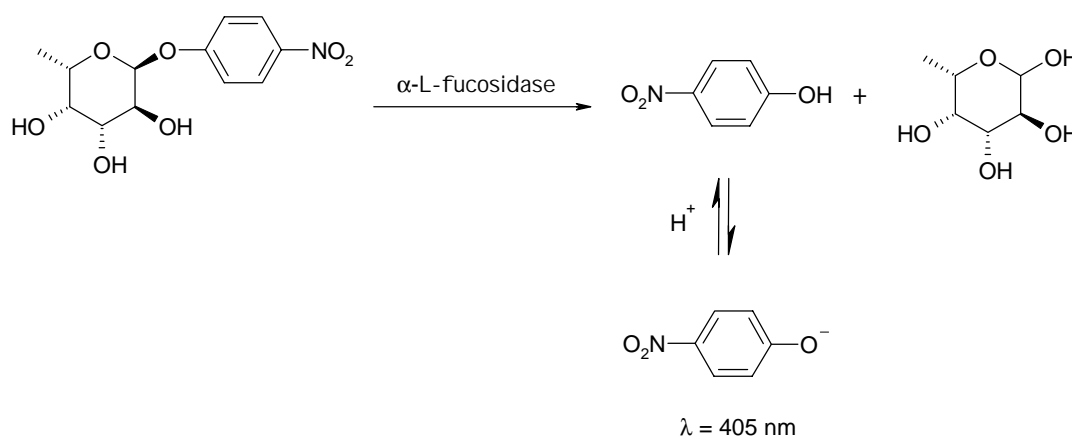


Schéma 4 . Réaction enzymatique *in vitro*: exemple du substrat de la fucosidase.

La réaction est suivie par mesure de la densité optique (DO) à $\lambda = 405$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre HP-8453, et à une température de 30°C. Dans le cas de la β -D-mannosidase où le pH d'optimum d'activité est acide (pH = 4,0), les mesures sont alors réalisées à une longueur d'onde de $\lambda = 380$ nm.

- **Mode opératoire**

Les tests ont été réalisés sur sept enzymes commerciales. Les conditions expérimentales pour chacune d'entre elles sont rapportées dans le tableau 1.

La variation de Do est mesurée sur une durée de 20 minutes et le volume final de chaque expérience est de 1 mL . Les vitesses initiales d'hydrolyse du substrat sont calculées à partir de ces données.

Le K_m de chaque enzyme a été déterminé par la méthode graphique de Lineweaver-Burk et les cinétiques ont été réalisées pour des concentrations en substrat proche des valeurs des K_m .

Enzyme	Source	K _m (mol.l ⁻¹)	pH	Tampon	[E] (mU/mL)
α-D-glucosidase EC 3.2.1.20	Levure de boulanger	3,0.10 ⁻⁴	7,0	K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ (20 mM)	10
β-D-glucosidase EC 3.2.1.21	Amandes	1,3.10 ⁻³	5,0	AcOH / AcOK (50 mM)	100
α-D-galactosidase EC 3.2.1.22	Graines de café vert	2,5.10 ⁻⁴	6,5	K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ (20 mM)	5,4
β-D-galactosidase EC 3.2.1.23	<i>Escherichia coli</i>	6,5.10 ⁻⁴	7,0	K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ (20 mM)	100
α-D-mannosidase EC 3.2.1.24	Fèves Jack (haricot sabre)	1,0.10 ⁻³	4,5	AcOH / AcOK (50 mM)	50
β-D-mannosidase EC 3.2.1.25	Poudre acétonique d'escargot	1,3.10 ⁻³	4,0	AcOH / AcOK (50 mM)	20
α-L-fucosidase EC 3.2.1.51	Reins de boeuf	3.10 ⁻⁴	5,5	AcOH / AcOK (50 mM)	5,2

Tableau 1. Tableau récapitulatif des conditions expérimentales inhérentes aux enzymes testées.

Une première mesure d'inhibition des produits est réalisée pour une concentration en inhibiteur de 1 mM et $[S] = K_m$. Le pourcentage d'inhibition est alors déterminé et si celui-ci est supérieur à 50 %, une série de mesure permettant de déterminer l'IC₅₀ ou le K_i est alors effectuée. Afin d'obtenir ces derniers, une représentation graphique de Dixon est en général utilisée.

▪ Etude de stabilité

Nous avons mis au point les conditions expérimentales sur l'α-D-galactosidase afin de déterminer les concentrations en substrat et en enzyme à utiliser pour obtenir des contrôles linéaires. Les expériences ont donc été réalisées à 25 °C avec $[S] = 1$ mM, $[E] = 1$ mU/mL et l'inhibiteur a été placé en excès à $[I] = 2$ IC₅₀ = 0,5 μM. Les temps de demi-vie ont été estimés par comparaison de solutions d'inhibiteur, dans le tampon phosphate ou Hepes à pH = 7, laissées à température ambiante de 0 à 24 heures et d'un aliquote d'une solution fraîche de ce même inhibiteur conservé à -20 °C. Nous avons alors pu déterminer les variations du pouvoir inhibiteur dans le tampon phosphate et une stabilité de la constante d'inhibition pour le tampon Hepes.

- La fucosyltransférase III

▪ Description générale

La réaction servant à mesurer l'inhibition de la fucosyltransférase (FucT) est le transfert d'une unité fucose d'un donneur, le GDP-fucose, vers un disaccharide accepteur afin de former un trisaccharide (schéma 5).

Le substrat accepteur que nous utilisons est le Galβ-(1,3)-GlcNacβ-O- (CH₂)₆-NH-dansyl dit de type I. Il nous permet de mesurer l'activité inhibitrice des produits par suivi fluorimétrique grâce au groupement dansyl.

La préparation contenant l'enzyme utilisée est un surnageant concentré de culture de cellules d'insectes infectés par un baculovirus recombinant qui a incorporé le clone de la FucT III humaine sous forme soluble.

Pour nos essais préliminaires, nous n'avons effectué qu'un seul point afin de déterminer si les produits ont un pouvoir inhibiteur à forte concentration.

Etant donné qu'un seul de nos produits comporte le groupement diphosphate guanosine, les autres produits ont été testés en synergie. Ainsi les inhibiteurs potentiels ont été testés avec ajout de guanosine monophosphate (GMP) pour les produits ayant déjà une fonction phosphate ou par ajout de guanosine diphosphate (GDP) pour les produits ne comportant aucune fonction phosphate.

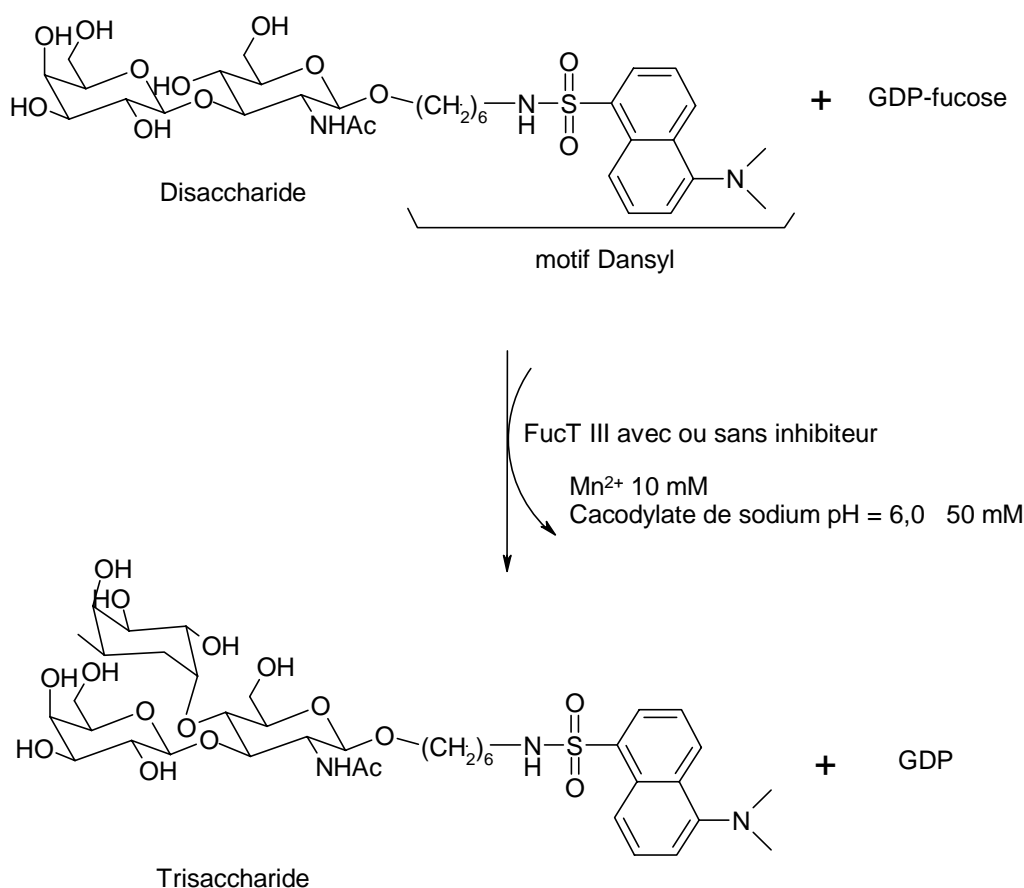


Schéma 5. Réaction enzymatique.

▪ Mode opératoire

Les conditions optimales de réaction ont été déterminées en vérifiant l'activité de l'enzyme et en déterminant les bonnes concentrations de GDP ou de GMP à mettre par rapport à la concentration en GDP-fucose présente dans le milieu. Les tests sont réalisés avec un volume final d'incubation de 40 μL . Les différents réactifs mis en présence dans cet essai enzymatique sont les suivants et décrits dans le tableau ci-dessous.

Les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 10 minutes, temps pour lequel le pourcentage de conversion de produit en substrat est inférieur ou égal à 10 % (afin de rester dans les conditions de vitesse initiale) puis ils sont incubés à 100 °C dans le but de dénaturer

l'enzyme et donc de stopper la réaction enzymatique. Les résultats de la réaction enzymatique sont alors observés soit par CCM, soit par HPLC.

PRODUITS	CONCENTRATION FINALE
Tampon cacodylate de sodium 0,5 M pH = 6	62,5 mM
Chlorure de manganèse 100 mM	10 mM
Disaccharide accepteur 1 mM $K_m = 0,9$ mM	0,2 mM
GDP-fucose 1mM $K_m = 50$ μ M	0,1 mM
Enzyme FucT III 0,02 mU	
Inhibiteur	10 ou 25 mM
GDP ou GMP 1 mM	0,1 mM
H ₂ O si volume différent de 40 μ L	

❖ Par CCM

Le suivi par CCM consiste à déposer les échantillons sur des plaques de silice qui révèlent la fluorescence. Ainsi nos produits étant fluorescent grâce au groupement dansyl, nous pouvons suivre l'évolution de la réaction enzymatique pour différentes concentrations. Les plaques sont observées sous lampe UV à une longueur d'onde $\lambda = 354$ nm.

Les systèmes d'éluant utilisés sont:

- AcOEt / AcOH / H₂O 3/1/1
- AcOEt / *iPr*OH / H₂O 3/2/2 (pour les produits étudiés en synergie)

On peut alors observer sur cette plaque le disaccharide et la formation du trisaccharide s'il y en a mais aussi observé ou non une inhibition de la réaction (schéma 6).

Si une inhibition est observée, le résultat est ensuite affiné par HPLC.

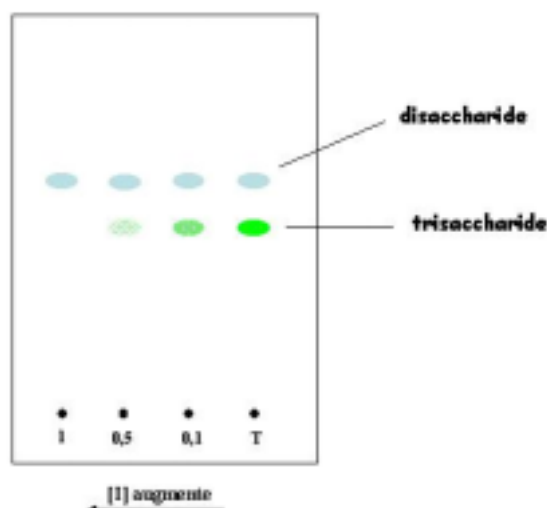


Schéma 6. Représentation schématique d'une plaque CCM.

❖ Par CLHP

Les mesures sont effectuées sur « HPLC Waters 600 Controller » équipée d'une colonne phase inverse C18 Nucléosil, Hypersyl 200*4,6 mM 5 μ .

Les produits sont détectés par un fluorimètre couplé à l'HPLC. Ce fluorimètre Perkin Elmer LS 50B permet de détecter et de mesurer la présence du groupe dansyl. Le fluorimètre est relié à un ordinateur où le logiciel FLWinlab nous permet de quantifier les mesures.

L'HPLC est réglée avec un débit de 1 mL / min et l'éluant est 63 % H₂O– 37 % CH₃CN. Un chromatogramme comportant deux pics est alors obtenu (schéma 7).

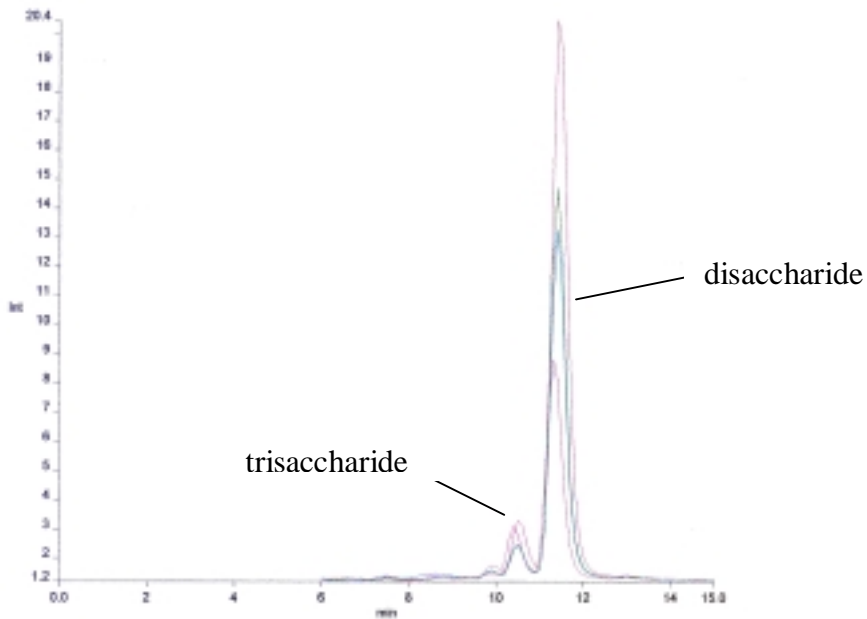


Schéma 7. Exemples de chromatogrammes obtenus.

De la même manière que par la méthode CCM, un inhibiteur à une certaine concentration peut être décelé si le pic du trisaccharide diminue voire disparaît par rapport à un chromatogramme témoin (schéma 8).

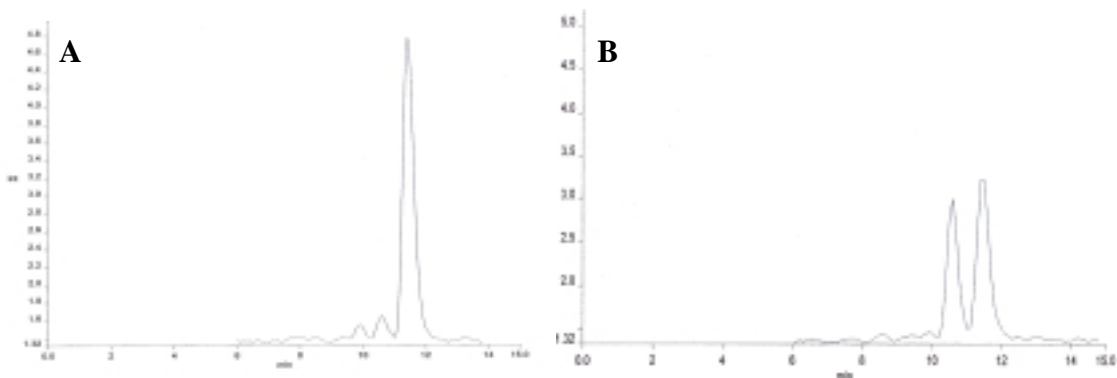


Schéma 8. Exemples de chromatogrammes de produits inhibiteurs (A) et non inhibiteurs (B).

L'intégration de ces deux pics permet ainsi de calculer le pourcentage de conversion du trisaccharide par rapport au disaccharide.

Ainsi en comparant le pourcentage obtenu à celui d'un témoin sans inhibiteur, il est possible de déceler s'il y a inhibition ou pas.

La réaction enzymatique est réalisée pour différentes concentrations en inhibiteur et la vitesse est alors calculée. L' IC_{50} ou le K_i du produit est déterminé grâce à la relation de Dixon.

Dans notre cas, nous avons testé tous les produits à forte concentration, c'est-à-dire avec un seul point, pour vérifier leur pouvoir inhibiteur. Seuls les composés **107** et **108** ont été approfondis et l' IC_{50} a été déterminé par la relation de Dixon.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ D. Voet, J. G. Voet, dans *Biochemistry*, **1995**, chapitre 14: enzymatic catalysis, 2nd Ed., John Wiley et Sons, 331-410.
- ² G. Legler, dans *Carbohydrate Mimics, concepts and methods*, **1998**, Ed. Y. Chapleur, WILEY VCH, 463-490.
- ³ B. Henrissat, G. Davies, *Curr. Op. Struct. Biol.*, **1997**, 7, 637-644.
- ⁴ A. Vasella, G. J. Davies, M. Böhm, *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2002**, 6, 619-629.
- ⁵ S. G. Withers, *Carbohydrate Pol.*, **2001**, 44, 325-337.
- ⁶ D. L. Zechel, S. G. Withers, *Acc. Chem. Res.*, **2000**, 33, 11-18.
- ⁷ G. Legler, A. E. Stütz, H. Immich, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 272, 17-30.
- ⁸ T. D. Heightmann, A. T. Vasella, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 750-770.
- ⁹ N. Asano, R. J. Nash, R. J. Molyneux, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron: Asym.*, **2000**, 11, 1645-1680.
- ¹⁰ D. D. Schmidt, W. Frpmmer, L. Muller, B. Junge, W. Wingender, E. Truscheit, *Naturwissenschaften*, **1977**, 64, 535.
- ¹¹ W. Puls, U. Keup, H. P. Krause, G. Thomas, F. Hoffmeister, *Naturwissenschaften*, **1977**, 64, 536.
- ¹² S. Horii, H. Fukase, T. Matsuo, Y. Kameda, N. Asano, K. Matsui, *J. Med. Chem.*, **1986**, 29, 1038.
- ¹³ A. Frankowski, J. Streith, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **1998**, t.1, Série Iic, 681-700.
- ¹⁴ B. Winchester, G. W. J. Fleet, *Glycobiology*, **1992**, 2(3), 199-210.
- ¹⁵ V. H. Lillelund, H. H. Jensen, X. Liang, M. Bols, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 515-553.
- ¹⁶ D. P. Dumas, T. Kajimoto, K. K-C. Liu, C-H. Wong, D. B. Berkowitz, S. J. Danishefsky, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1992**, 2(1), 33-36.
- ¹⁷ O. Tsuruta, H. Yuasa, H. Hashimoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, 6(16), 1989-1992.
- ¹⁸ S. Ogawa, A. Maruyama, T. Odagiri, H. Yuasa, H. Hashimoto, *Eur. J. Org. Chem*, **2001**, 967-974.
- ¹⁹ Z. Witczak, D. Boryczewski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8, 3265-3268.
- ²⁰ A. R. Becham, K. H. Smelt, K. Biggadike, C. J. Britten, L. Hackett, B. G. Winchester, R. J. Nash, R. C. Griffiths, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 151-154.
- ²¹ G. W. J. Fleet, A. N. Shaw, S. V. Evans, L.E. Fellows, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1985**, 13, 841-842.

-
- ²² B. Winchester, C. Barker, S. Baines, G. S. Jacob, S. K. Namgoong, G. W. J. Fleet, *Biochem. J.*, **1990**, *265*, 277-282.
- ²³ S. Takayama, R. Martin, J. Wu, K. Laslo, G. Siusdak, C-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 8146-8151.
- ²⁴ E. Shitara, Y. Nishimura, F. Kojima, T. Takeuchi, *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, 343-352.
- ²⁵ R. Wischnat, R. Martin, S. Takayama, C-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 3353-3358.
- ²⁶ Y. Nishimura, E. Shitara, T. Takeuchi, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 2351-2354.
- ²⁷ D. J. A. Schedler, B. R. Boxen, B. Ganem, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*(23), 3845-3848.
- ²⁸ F. Moris-Varas, X-H. Qian, C-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*(33), 7647-7652.
- ²⁹ I. Robina, A. J. Moreno-vargas, J. G. Fernandez-Bolanos, J. Fuentes, R. Demange, P. Vogel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 2555-2559.
- ³⁰ G. C. Look, C. H. Fotsch, C-H. Wong, *Acc. Chem. Res.*, **1993**, *26*, 182-190.
- ³¹ C-H. Wong, L. Provencher, J. A. Porco, S-H. Jung, Y-F. Wang, L. Chen, R. Wang, D. H. Steensma, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 1492-1501.
- ³² L. Bierer, *Dissertation*, **1999**, Universität Stuttgart.
- ³³ M. Joubert, A. Defoin, C. Tarnus, J. Streith, *Synlett*, **2000**, 1366.
- ³⁴ G. Legler, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1990**, *48*, 319-384.
- ³⁵ M. E. Sinnott, *Chem. Rev.*, **1990**, *90*, 1171-1202.
- ³⁶ K. K. C. Liu, T. Kajimoto, L. Chen, Z. Zhong, Y. Ichakawa, C-H. Wong, *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 6280-6289.
- ³⁷ G. W. J. Fleet, S. K. Namgoong, C. barker, S. Baines, G. S. Jacob, B. Winchester, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*(33), 4439-4442.
- ³⁸ W. H. Pearson, D. A. Hutta, W-K. Fong, *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*(24), 8326-8332.
- ³⁹ J. B. Behr, A. Erard, G. Guillermin, *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, *7*, 1256-1262.
- ⁴⁰ H. Yoda, H. Katoh, K. Takabe, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*(40), 7661-7665.
- ⁴¹ A. Goti, S. Cicchi, M. Cacciarini, F. Cardona, V. Fedi, A. Brandi, *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 3633-3645.
- ⁴² J. B. Behr, A. Defoin, N. Mahmood, J. Streith, *Helv. Chim. Acta.*, **1995**, *78*, 1166-1177.
- ⁴³ J. B. Behr, A. Defoin, J. Pires, J. Streith, L. Marko, M. Zehnder, *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 3283-3302.
- ⁴⁴ H. Dulphy, J-L. Gras, T. Lejon, *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 8517-8524.
- ⁴⁵ A. E. Mc Caig, K. P. Meldrum, R. H. Wightmann, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 9429-9446.

-
- ⁴⁶ S. Cicchi, J. Höld, A. Brandi, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 5274-5275.
- ⁴⁸ R. Ballini, E. Marcantoni, M. Petrini, *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 1316-1318.
- ⁴⁸ R. W. Murray, K. Iyanar, J-X. Chen, J. T. Wearing, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 8099-8102.
- ⁴⁹ J. Skarzewski, A. Gupta, *Tetrahedron: Asym.*, **1997**, 8(11), 1861-1867.
- ⁵⁰ H. Paulsen, *Liebigs Ann. Chem.*, **1965**, 683, 187-198.
- ⁵¹ F. Popowycz, S. Gerber-Lemaire, R. Demange, E. Rodriguez-Garcia, A. T. Carmona Asenjo, I. Robina, P. Vogel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 2489-2493.
- ⁵² Y. J. Kim, A. Takatsuki, N. Kogoshi, T. Kitahara, *Tetrahedron*, **1999**, 55, 8353-8364.
- ⁵³ S. Ogawa, T. Morikawa, *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, 10, 1047-1050.
- ⁵⁴ S. Ogawa, T. Morikawa, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 9, 1499-1504.
- ⁵⁵ R. A. Farr, N. P. Peet, M. S. Kang, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31(49), 7109-7112.
- ⁵⁶ M. Joubert, *Thèse*, **2000**, Université de Mulhouse.
- ⁵⁷ H. Rossiter, R. Alon, T. S. Kupper, *Molecular Medicine Today*, **1997 May**, 214-222.
- ⁵⁸ T. Maeder, *Pour la Science*, **Septembre 2002**, 299, 70-77.
- ⁵⁹ S. M. Chervin, J. B. Lowe, M. Koreda, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 5654-5662.
- ⁶⁰ E. E. Simanek, G. J. Mc Garvey, J. A. Jablonowski, C-H. Wong, *Chem. Rev.*, **1998**, 98(2), 833-862.
- ⁶¹ P. Sears, C-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 2300-2324.
- ⁶² S. Takayama, C-H. Wong, *Current. Org. Chem*, **1997**, 1, 109-126.
- ⁶³ a) N. Kaila, B. E. Thomas IV, *Expert. Opin. Ther. Patents.*, **2003**, 13(3), 305-317.
b) N. Kaila, B. E. Thomas IV, *Med. Res. Rev.*, **2002**, 22(6), 566-501.
- ⁶⁴ A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1994**, 33(2), 178-180.
- ⁶⁵ L. A. Larsky, *Sciences*, **1992**, 258, 964-969.
- ⁶⁶ J.J. Archelos, H-P. Hartung, *Molecular Medicine Today*, **1997 July**, 310-321.
- ⁶⁷ P. Sears, C-H. Wong, *Chem. Commun.*, **1998**, 1161-1169.
- ⁶⁸ A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1994**, 91, 7390-7397.
- ⁶⁹ K. Ohmori, K. Kanda, C. Mitsuoka, A. Kanamori, K. Kurata-Miura, K. Sasaki, T. Nishi, T. Tamatani, R. Kannagi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, 278, 90-96.
- ⁷⁰ Y. Ichikawa, Y-C. Lin, D. P. Dumas, G-J. Shen, E. Garcia-junceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 9283-9298.
- ⁷¹ S.A. Defrees, F. C. A. Gaeto, Y-C. Lin, Y. Ichikawa, C-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 7549.

- ⁷² N. Kaila, B. E. Thomas IV, *Med. Res. Rev.*, **2002**, 22(6), 566-601.
- ⁷³ M. Aebi, T. Hennet, *TRENDS in Cell Biol.*, **2001**, 11(3), 136-141.
- ⁷⁴ H. H. Freeze, V. Westpal, *Biochimie*, **2001**, 83, 791-799.
- ⁷⁵ J. Bartunkova, P. Maly, K. Smetana Jr, A. Sediva, R. Klubal, D. Mayerova, A. Sedlacek, V. Splichalova, *APMIS*, **2000**, 108, 409-416.
- ⁷⁶ K. Lühn, M. K. Wild, M. Eckhardt, R. Gerardy-Schahn, D. Vestweber, *Nature Genet.*, **2001**, 28, 69-72.
- ⁷⁷ T. Lübke, T. Marquardt, K. von Figura, C. Körner, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(37), 25986-25989.
- ⁷⁸ M. De Vleeschauwer, M. Vaillancourt, N. Goudreau, Y. Guindon, D. Gravel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1109-1112.
- ⁷⁹ G. Thoma, F. Schwarzenbach, *Helv. Chim. Acta*, **2003**, 86, 855-864.
- ⁸⁰ S. Hanessian, V. Mascitti, O. Rogel, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3346-3354.
- ⁸¹ S. M. Chervin, J. B. Lowe, M. Korceda, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 5654-5662.
- ⁸² A. Marinier, A. Martel, C. Bachand, S. Plamondon, B. Turmel, J-P. Daris, J. Banville, P. Lapointe, C. Ouellet, P. Dextraze, M. Menard, J. J. K. Wright, J. Alford, D. Lee, P. Stanley, X. Nair, G. Todderud, K. M. Tramosch, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 1395-1427.
- ⁸³ P. Compain, O. R. Martin, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 3077.
- ⁸⁴ C-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, 521-546.
- ⁸⁵ C. Breton, J. Mucha, C. Jeanneau, *Biochimie*, **2001**, 83, 713-718.
- ⁸⁶ M. Kaneko, T. Kudo, H. Ixasaki, Y. Ikehara, S. Nishihara, S. Nakagawa, K. Sasaki, Y. Shiina, H. Inoko, N. Saitou, H. Narimatsu, *FEBS Lett.*, **1999**, 452, 237-242.
- ⁸⁷ J. L. Clarke, W. M. Warkins, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271(17), 10317-10328.
- ⁸⁸ K. Shinoda, Y. Morisha, K. Sasaki, Y. Matsuda, I. Takahashi, T. Nishi, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272(51), 31992-31997.
- ⁸⁹ T. de Vries, R. M. A. Knegtel, E. H. Holmes, B. A. Macher, *Glycobiology*, **2001**, 11(10), 119R-128R.
- ⁹⁰ K. Sasaki, K. Kurata, K. Funayama, M. Nagata, E. Watanabe, S. Ohta, N. Hanai, T. Nishi, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269(20), 14730-14737.
- ⁹¹ W. Weninger, L.H. Ulfman, G. Cheng, N. Souchkova, E. J. Quackenbush, J. B. Lowe, U. H. von Adrian, *Immunity*, **2000**, 12, 665-676.
- ⁹² B. W. Murray, S. Takayama, J. Schulta, C-H. Wong, *Biochemistry*, **1996**, 35, 11183-11195.

- ⁹³ B. W. Murray, V. Wittmann, M. D. Burkart, S-C. Hung, C-H. Wong, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 823-831.
- ⁹⁴ G. L. Qiao, B. W. Murray, M. Shimazaki, J. Schultz, C-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 7653-7662.
- ⁹⁵ M. D. Burkart, S. P. Vincent, A. Düffels, B. W. Murray, S. V. Ley, C-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, 1937-1946.
- ⁹⁶ U. M. Unligil, J. M. Rini, *Current Opin. Struct. Biol.*, **2000**, *10*, 510-517.
- ⁹⁷ G. A. van der Marel, B. M. Heskamp, G. H. Veenemann, C. A. A. van Boeckel, J. H. van Boom, in *Carbohydrate Mimics, Concepts and Methods*, **1998**, Ed. Y. Chapleur, WILEY-VCH, 491-510.
- ⁹⁸ R. Wischnat, R. Martin, C-H. Wong, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 8361-8365.
- ⁹⁹ G. Baisch, R. Ohrlein, *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*(2), 383-391.
- ¹⁰⁰ B. M. Heskamp, G. H. Veeneman, G. A. van der Marel, C. A. A. van Boeckel, J. H. Van Boom, *Tetrahedron*, **1995**, *51*(30), 8397-8406.
- ¹⁰¹ G. Carchon, F. Chrétien, P. Delannoy, A. Verbert, Y. Chapleur, *Tetrahedron. Lett.*, **2001**, *42*, 8821-8824.
- ¹⁰² I. Jefferies, B. R. Bowen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *17*(9), 1171-1174.
- ¹⁰³ M. L. Mitchell, F. Tain, L. V. Lee, C-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*(16), 3041-3043.
- ¹⁰⁴ R.R. Schmidt, K. Frische, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, *3*, 1747.
- ¹⁰⁵ Y-F. Wang, D. P. Dumas, C-H. Wong, *Tetrahedron. Lett.*, **1993**, *34*(3), 403-406.
- ¹⁰⁶ M. Schuster, S. B. Blechert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 1809-1811.
- ¹⁰⁷ M. L. Mitchell, L. V. Lee, C-H. Wong, *Tetrahedron. Lett.*, **2002**, *43*, 5691-5693.
- ¹⁰⁸ M. L. Mitchell, F. Tian, L. V. Lee, C-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*(16), 3041-3044.
- ¹⁰⁹ S-I. Murahashi, H. Mitsui, T. Shiota, T. Tsuda, S. Watanabe, *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 1736-1744.
- ¹¹⁰ H. M. I. Osborn, N. Gemmel, L. M. Harwood, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2002**, 2419-2438.
- ¹¹¹ S-I. Murahashi, T. Shiota, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 2383-2386.
- ¹¹² R. W. Murray, K. Iyanar, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 8099-8102.
- ¹¹³ R. H. Wightmann, A. E. McCaig, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 3939-3942.
- ¹¹⁴ W. W. Zajac, T. R. Walters, M. G. Darcy, *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 5856.

- ¹¹⁵ A. Brandi, S. Cicchi, V. Paschetta, D. Gomez Pardo, J. Cossy, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 9357-9359.
- ¹¹⁶ R. Alibés, P. Blanco, P. de March, M. Figueredo, J. Font, A. Alvarez-Larena, J. F. Piniella, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 523-525.
- ¹¹⁷ S. Hanessian, M. Bayrakdarian, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 967-971.
- ¹¹⁸ A. Hall, K. P. Meldrum, P.R. Therond, R. H. Wightmann, *Synlett*, **1997**, 123-125.
- ¹¹⁹ S-I. Murahashi, Y. Imada, H. Ohtake, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 6170-6172.
- ¹²⁰ R. Ballini, E. Marcantoni, M. Petrini, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 1316-1318.
- ¹²¹ A. Goti, S. Cicchi, F. M. Cordero, V. Fedi, A. Brandi, *Molecules*, **1999**, *4*, 1-12.
- ¹²² Sk. A. Ali, M. I. M. Wazeer, *Tetrahedron*, **1993**, *49*(20), 4339-4354.
- ¹²³ J. Markandu, H. A. Dondas, M. Frederickson, R. Grigg, *Tetrahedron*, **1997**, *53*(38), 13165-13176.
- ¹²⁴ H. A. Dondas, M. Frederickson, R. Grigg, J. Markandu, M. Thornton-Pett, , *Tetrahedron*, **1997**, *53*(42), 14339-14354.
- ¹²⁵ R. Grigg, J. Markandu, T. Perrior, S. Surendrakumar, W. J. Warnock, *Tetrahedron*, **1992**, *48*(33), 6929-6952.
- ¹²⁶ O. R. Martin, F. E. Khamis, S. P. Rao, *Tetrahedron*, **1989**, *30*, 6143.
- ¹²⁷ J. Hamer, A. Macaluso, *Chem. Rev.*, **1964**, *64*, 473-495.
- ¹²⁸ C. F. Lane, *Synthesis*, **1975**, 135-146.
- ¹²⁹ J. Seyden-Penne, *Réductions par les alumino-et borohydrures en synthèse organique*, **1988**, Ed. Technique et Documentation-Lavoisier.
- ¹³⁰ Dagoneau, Tomassini, Denis, Vallee, *Synthesis*, **2001**, *1*, 150-154.
- ¹³¹ Trombini, Lombardo, *Synthesis*, **2000**, *6*, 759-774.
- ¹³² A. Mercier, Y. Berchadsky, Badrudin, S. Pietri, P. Tordo, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*(19), 2125-2128.
- ¹³³ W. Karpiesiuk, A. Banaszek, *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 2965-2974.
- ¹³⁴ T. Duvold, G. W. Francis, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *38*(18), 3153-3156.
- ¹³⁵ A. Vasella, *Helv. Chim. Acta*, **1977**, *60*(4), 1273-1295.
- ¹³⁶ K. S. Ramasy, R. C. Tam, J. Bard, D. R. Averett, *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 1019-1028.
- ¹³⁷ A. Wagner, M. P. Heitz, C. Mioskowsky, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*(22), 3141-3144.
- ¹³⁸ J. Kiss, R. D'Souza, J. A. van Koevinge, W. Arnold, *Helv. Chim. Acta*, **1982**, *65*(149), 1522-1537.
- ¹³⁹ R. P. Short, R. M. Kennedy, S. Masamune, *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 1755-1756.

-
- ¹⁴⁰ P. M. Collins, A. S. Travis, *J. Chem. Soc., Perkin I*, **1980**, 779-786.
- ¹⁴¹ H. Dulphy, J-L. Gras, T. Lejon, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 8517-8524.
- ¹⁴² S. Krishnamurthy, H. C. Brown, *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 276-280.
- ¹⁴³ A. Vasella, *Helv. Chim. Acta*, **1977**, 60, 426-438.
- ¹⁴⁴ C. W. Holzapfel, R. Crous, *Heterocycles*, **1998**, 48(7), 1337-1341.
- ¹⁴⁵ E. J. Corey, A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94(17), 6190-6191.
- ¹⁴⁶ S. Cicchi, M. Corsi, A. Brandi, A. Goti, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 1678-1681.
- ¹⁴⁷ A. Hansen, T. M. Tagmose, M. Bols, *Chem. commun.*, **1996**, 2649-2650.
- ¹⁴⁸ H. Liu, X. Liang, H. Sohoel, A. Bülow, M. Bols, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 5116-5117.
- ¹⁴⁹ H. H. Jensen, A. Jensen, R. G. Hazell, M. Bols, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 1190-1198.
- ¹⁵⁰ V. Ulgar, J. G. Fernandez-Bolanos, M. Bols, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 1242-1246.
- ¹⁵¹ R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1967**, 6, 16.
- ¹⁵² P. Pérez, L. R. Domingo, M.J. Aurell, R. Contreras, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 3117-3125.
- ¹⁵³ K. V. Gothelf, K. A. Jorgensen, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 863-909.
- ¹⁵⁴ A. Rauk, *Orbital Interaction Theory of Organic Chemistry*, 2nd Ed., **2001**, John Wiley and Son, Wiley-Interscience, 171-174.
- ¹⁵⁵ M. Frederickson, *Tetrahedron*, **1997**, 53(2), 403-425.
- ¹⁵⁶ S. Kanemasa, T. Vemura, E. Wada, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 7889.
- ¹⁵⁷ E. J. Corey, T-P. Loh, T. D. Roger, M. D. Azimiora, M. C. Noe, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 6, 1441.
- ¹⁵⁸ M. Takayanagi, T. Flessner, C-H. Wong, *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 3811-3815.
- ¹⁵⁹ St. Matysiak, H-P. Fitznar, R. Scnell, W. Pleiderer, *Helv. Chim. Acta*, **1998**, 81, 1545-1566.
- ¹⁶⁰ P. Bayon, P. de March, M. Figueredo, J. Font, *Tetrahedron*, **1998**, 15691-15700.
- ¹⁶¹ A. Defoin, A. Brouillard-Poichet, J. Streith, *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 75, 109-123.
- ¹⁶² S-I Murahashi, H. Mitsui, T. Shiota, T. Tsuda, S. Watanabe, *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 1736-1744.
- ¹⁶³ T. Oshikawa, M. Yamashita, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, 63, 2728-2730.
- ¹⁶⁴ G. Tong, J. W. Perich, R. B. Johns, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31(26), 3759-3762.
- ¹⁶⁵ R. M. Valerio, P. F. Alewood, R. B. Johns, *Synthesis*, **1988**, 786-789.
- ¹⁶⁶ T. Tatsuoka, K. Imao, K. Susuki, *Heterocycles*, **1986**, 24(3), 617-620.

- ¹⁶⁷ A. Mercier, Y. Berchadsky, Badrudin, S. Pietri, P. Tordo, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32(19), 2125-2128.
- ¹⁶⁸ P. Bisseret, J. Eustache, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 8451-8453.
- ¹⁶⁹ H. Choo, Y. Chong, G. K. Chu, *Org. Lett.*, **2001**, 3(10), 1471-1473.
- ¹⁷⁰ P. G. Mattingly, M. J. Miller, *J. Org. Chem.*, **1980**, 45, 410-415.
- ¹⁷¹ M. Bosco, P. Bisseret, C. Bouix-Peter, J. Eustache, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 7949-7952.
- ¹⁷² K. Adelhorst, G. M. Whitesides, *Carbohydrate Research*, **1993**, 242, 69-76.
- ¹⁷³ V. Wittmann, C-H. Wong, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 2144-2147.
- ¹⁷⁴ Sk. A. Ali, M. I. M. Wazeer, *Tetrahedron*, **1993**, 49(20), 4339-4354.
- ¹⁷⁵ J. J. Tufariello, J. M. Puglis, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27(13), 1489-1492.
- ¹⁷⁶ J. J. Tufariello, G. B. Mullen, J. J. Tegeler, E. J. Trybulski, S. C. Wong, Sk. A. Ali, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 2435-2442.
- ¹⁷⁷ K. Nagasawa, H. Koshino, T. Nakata, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 4155-4158.
- ¹⁷⁸ Sk. A. Ali, M. I. M. Wazeer, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34(1), 137-140.
- ¹⁷⁹ I. H. Segel, dans *Enzyme kinetics*, **1975**, Wiley- Intersciences.
- ¹⁸⁰ J. C. Chottard, J. C. Depezay, J. P. Leroux, dans *Chimie fondamentale –étude biologique et médicales- Partie III: Réactions organiques et enzymatiques*, **1982**, Ed. Hermann.