



HAL
open science

Synthèses d'[alpha]-hydrazinopeptides : Isabelle Bouillon

► **To cite this version:**

Isabelle Bouillon. Synthèses d'[alpha]-hydrazinopeptides :. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006. Français. NNT : 2006INPL050N . tel-01752487

HAL Id: tel-01752487

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752487v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

(Spécialité Génie des Procédés et des Produits)

par **Isabelle Bouillon**

SYNTHESE D' α -HYDRAZINOPEPTIDES

Soutenue publiquement le 13 Octobre 2006

Membres du jury

Pr. J. Paris (ISPB, Lyon)	Rapporteur
Dr. G. Guichard (IBMC, Strasbourg)	Rapporteur
Dr. Y. Chapleur (SRSMC, Nancy)	Examineur
Pr. B. Jamart-Grégoire (LCPM, Nancy)	Directeur de thèse
Pr. N. Brosse (LCPM, Nancy)	Co-Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce présent travail a été réalisé au laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire, UMR CNRS-INPL 7568, de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy, au sein du Groupe Synthèse Organique et Biostructures, dirigé par Madame le Professeur Brigitte JAMART-GREGOIRE.

Je voudrais tout d'abord remercier Madame le Professeur Brigitte JAMART-GREGOIRE, pour la confiance qu'elle m'a accordée en me recrutant au sein de son équipe ainsi que pour avoir accepté de diriger ma thèse. Je la remercie vivement pour le sujet de cette thèse et je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour ses conseils éclairés et sa disponibilité.

Je ne saurais assez remercier Monsieur le Professeur Nicolas BROSSE, pour avoir co-dirigé cette thèse : travailler à son contact fut extrêmement enrichissant et j'ai beaucoup apprécié toute l'aide et les conseils qu'il m'a promulgués.

Je remercie Monsieur le Docteur Régis VANDERESSE, chargé de recherche CNRS, d'avoir collaboré à ce travail, pour sa patience et sa disponibilité. Je tiens à remercier Madame le Docteur Catherine HUMEAU, maître de conférence à l'INPL, pour toute la partie enzymatique.

Toute ma gratitude va à Madame le Professeur Joëlle PARIS, ainsi qu'à Monsieur le Docteur Gilles GUICHARD, chargé de recherche au CNRS, qui me font l'honneur de juger ce travail et d'en être les rapporteurs, ainsi qu'à Monsieur le Docteur Yves CHAPLEUR, directeur de recherche au CNRS, d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie également Marie-Christine PETIT, chargée de recherche au CNRS, pour l'étude structurale et surtout pour sa bonne humeur ainsi que Monsieur Olivier FABRE pour m'avoir formée à l'utilisation de la spectrométrie RMN et en particulier la RMN HR-MAS. J'associe à ces remerciements Madame Mathilde ACHARD pour son aide précieuse lors des

purifications par HPLC ainsi que Monsieur Jean-Marie GROSSE pour ses secours informatiques et ses renseignements.

Je remercie tout le personnel du LCPM de l'ENSIC et plus particulièrement le groupe synthèse organique et Biostructures, que j'ai pu côtoyer pendant ces quatre années. En particulier Madame le Docteur Axelle Arrault et Monsieur Reumeuneu pour tous les bons moments passés ensemble (Martinique, Lisbonne, Belle-Ile-en-Mer, Djerba et les nombreux cocktails) ainsi qu'Elise, Jacques, Nikos et sa tente, Auré, Beugnot (pour ses longues conversations), Fat (pour ses conseils avisés), Michel (pour les bières), Chrystel (vive les glaces!!), Pépette, Quinte98 pour sa drôle de bouill72, Abbas[altitude]33 (ou petite), Macé54 (pour ses excellents rendements et ses phrases chocs), Guenea15 (pour la modélisation moléculaire), Seb (pour les animes), Charbel, Magalie, Dominique et Jeanine (pour leur bonne humeur et leurs conseils)

Je remercie mes chers potes de phi-sciences : Aline, Seb (kiki ou chouquette), Alex, Marc, Sab, Arnaud, Lili, Aurore, B1B1, le Chat, la souris, Clém, Céc, Vince, Phil (merci pour m'avoir appris à « jouer » au bridge), Ricoch, Rom, Tib, Estelle et al. pour tous les excellents moments passés ensembles et particulièrement à Mat que je remercie pour sa présence son soutien et son aide inconditionnelle.

Je tiens à remercier tout particulièrement Dine pour sa quiche au saumon et le camping au lac du der ainsi qu'Estelle et Aline pour être des amies toujours présentes malgré la distance.

Je remercie également Nathalie (pour mon pied et pour les bons moments passés ensemble [open minibar]) ainsi que Christelle (la Bridget Jones française), Marie et Michael pour les excellentes vacances passées à la réunion.

Et enfin, je remercie toute ma famille, et en particulier mes parents, mon grand-père Emile et ma tante Tété pour leur soutien et pour m'avoir encouragé et cru en moi dans tout ce que j'entreprenais, mon frère et ma petite sœur. Merci à tous pour leur soutien.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION GENERALE	5

CHAPITRE I : SYNTHÈSE D' α -HYDRAZINOACIDES

I. Introduction	11
I.1. Substitution nucléophile.....	12
I.2. Amination réductrice d' α-cétoesters	12
I.3. Amination électrophile d'énolate portant un auxiliaire chiral.....	13
I.4. N-amination d' α-aminoacides	13
I.4.1. Le réarrangement de Shestakov d'une urée en hydrazine	14
I.4.2. Réduction d'un dérivé N-nitroso	14
I.4.3. N-amination au moyen d'oxaziridines.....	15
I.5. Réaction de Mitsunobu	16
II. Synthèse des α-hydrazinoesters phthaloylés βPht,αP-hXaa-OMe	19
II.1. Préparation des α-hydroxyesters 2.....	19
II.2. Condensation de Mitsunobu	20
III. Transprotection des composés βPht,αP-hXaa-OMe	21
III.1. Etude préliminaire	23
III.1.1. Méthode utilisant la méthylamine (Méthode A).....	23
III.1.2. Méthode utilisant la pyrrolidine (Méthode B)	27
III.1.3. Conclusion.....	31
III.2. Généralisation de la méthode de transprotection.....	31
III.3. Préparation des βFmoc,αZ-hXaa-OMe	33
III.4. Conclusion.....	34

IV. Déprotection de la fonction acide	34
IV.1. Cas des βBoc (ou Z ou Tfa)-hydrazinoesters	35
IV.2.1. Hydrolyse enzymatique	36
IV.2.2. Autres biocatalyseurs	37
IV.2.3. Saponification.....	39
IV.3. Conclusion	39
V. Synthèse des monomères sur support solide.....	40
V.1. Synthèse supportée d'α-hydrazinoacides par la voie 1.....	40
V.2. Synthèse supportée d'α-hydrazinoacides par la voie 2.....	42
VI. Conclusion	45

CHAPITRE II : ETUDE DE LA REACTIVITE DES α -HYDRAZINOACIDES EN SOLUTION ET SUR PHASE SOLIDE. APPLICATION A LA SYNTHESE D' α -HYDRAZINOPEPTIDES

I. Rappels sur la synthèse peptidique	47
I.1. Généralités sur la synthèse peptidique en solution.....	47
I.1.1. Définitions.....	47
I.1.2. Méthode de couplage	48
I.1.2.1. Réaction de Curtius	48
I.1.2.2. Les anhydrides mixtes.....	49
I.1.2.3. Les carbodiimides.....	50
I.1.2.4. Les esters activés	52
I.1.2.5. Les sels de phosphonium et d'uronium	53
I.1.2.6. Les halogénures d'acides.....	54
I.1.3. Racémisation	55
I.2. Généralités sur la synthèse peptidique sur phase solide	56
I.3. Suivi des réactions en synthèse sur support solide	59
II. Problèmes généraux posés par l'incorporation d'α-hydrazinoacides dans une chaîne peptidique.....	61
III. Etude de la réactivité des α-hydrazinoacides en solution	66

IV. Synthèse d'hydrazinopeptides sur phase solide	69
IV.1. Etude qualitative de la synthèse d'α-hydrazinopeptides par la stratégie 1.....	71
IV.1.1. Choix des résines.....	72
IV.1.2. Etude qualitative de la synthèse de pseudotripeptides.....	75
IV.1.3. Etude qualitative de la synthèse de pseudopentapeptide	80
IV.1.3.1. Stratégie Boc.....	80
IV.1.3.2. Stratégie Fmoc.....	83
IV.2. Etude quantitative et comparative de la synthèse d'α-hydrazinopeptides.....	86
IV.2.1. Stratégie 1.....	86
IV.2.1.1. Application à la synthèse de PFVh(Z)AL.....	86
IV.2.1.2. Application à la synthèse de PFh(Z)AVL.....	87
IV.2.2. Stratégie 2.....	88
IV.2.3 Stratégie 3.....	89
V. Conclusion.....	91
 CHAPITRE III : ETUDE PROSPECTIVE SUR LA SYNTHÈSE ET L'ETUDE STRUCTURALE D'UN α/HYDRAZINO-PEPTIDE 	
I. Introduction	93
II. Rappels bibliographiques	93
II.1. Liaisons hydrogène et éléments de structures secondaires dans les peptides.....	93
II.2. Liaisons hydrogène et éléments de structures secondaires dans certains pseudopeptides.....	98
II.2.1. Les β -peptides.....	98
II.2.2. Hydrazinopeptides : analogues azotés des β -peptides.	99
II.2.3. Les α/β -peptides	103
II.3. Méthodes et techniques d'études	104
II.1.1. Diffraction des rayons X.....	104
II.1.2. Modélisation moléculaire.....	105
II.1.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)	106
II.1.4. Dichroïsme circulaire (DC).....	107
II.1.5. Spectroscopie d'absorption Infrarouge (IR).....	107
III. Synthèse et étude structurale d'un α/hydrazino-peptide.....	108
III.1. Synthèse de Boc-(Phe-h(Z)Ala)₄-OMe	108

III.2. Etude structurale de Boc-(Phe-h(Z)Ala)₄-OMe	110
III.2.1. Modélisation moléculaire	110
III.2.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)	111
III.2.3. Dichroïsme circulaire (DC)	111
III.2.4. Spectroscopie d'absorption Infrarouge (IR)	112
III.2.4.1. Vibrations d'élongation des vibrateurs NH.....	113
III.2.4.2. Vibrations d'élongation des vibrateurs C=O.....	113
IV. Conclusion	115
CONCLUSION GENERALE	116

PARTIE EXPERIMENTALE

Indications générales	118
------------------------------------	------------

CHAPITRE I : SYNTHESE D' α -HYDRAZINOACIDES

II. Synthèse des hydrazinoesters phtaloylés βPht,αP-hXaa-OMe	120
II.1. Préparation des α-hydroxyesters 2	120
II.2. Condensation de Mitsunobu	122
II.2.1. Préparation des partenaires acides 1Boc et 1Z.....	122
II.2.2. Préparation des composés β Pht, α Z-hXaa-OMe.....	124
III Transprotection des composés βPht,αP-hXaa-OMe	129
III.1. Etude préliminaire	129
III.1.1. Méthode utilisant la méthylamine (Méthode A)	129
III.1.2. Méthode utilisant la pyrrolidine (Méthode B)	130
III.2. Généralisation de la méthode de transprotection	141
III.3. Préparation des βFmoc,αZ-hXaa-OMe	154
IV. Déprotection de la fonction acide	156
IV.1 Cas des βBoc (ou Z ou Tfa)-hydrazinoesters	156

IV.2. Cas des βFmoc-hydrazinoesters	163
IV.2.1. Hydrolyse enzymatique	163
IV.2.2. Saponification.....	163
V. Synthèse des monomères sur support solide.....	165
IV.1. Synthèse supportée d' α -hydrazinoacides par la voie 1.	165
V.2. Synthèse supportée d' α -hydrazinoacides par la voie 2.....	166
 CHAPITRE II : ETUDE DE LA REACTIVITE DES α-HYDRAZINOACIDES EN SOLUTION ET SUR PHASE SOLIDE. APPLICATION A LA SYNTHESE D'α-HYDRAZINOPEPTIDES 	
III. Etude de la réactivité des α-hydrazinoacides en solution.....	174
III.1. Méthode de couplage aux chloroformiates (anhydrides mixtes).....	174
III.2. Méthode de couplage par DCC / HOBt.....	174
III.3. Méthode de couplage au chlorure d'acide.....	174
III.4. Méthode de couplage par TBTU / HOBt / DIEA.....	175
III.5. Méthode de couplage par HATU / HOBt / DIEA	175
III.6. Méthode de couplage HATU/ NMM.....	175
III.7. Méthode de couplage aux fluorures d'acides	176
III.8. Méthode de couplage aux esters activés (OPfp, ONp, OSu).....	177
III.9. Méthode de couplage aux Uréthane <i>N</i> -carboxyanhydrides (ou UNCA).	177
IV. Synthèse d'hydrazinopeptides sur phase solide.....	180
IV.1. Préparation des synthons.....	180
IV.2. Synthèse sur phase solide.....	181
IV.2.1. Pseudotripeptide	186
IV.2.2. Pseudopentapeptide.....	186

CHAPITRE III : ETUDE PROSPECTIVE SUR LA SYNTHESE ET ETUDE STRUCTURALE D'UN α /HYDRAZINO-PEPTIDE

I. Déprotection du groupement Boc et de la fonction acide	188
II. Couplage HOBt / DCC / DIEA	188
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	193

LISTE DES ABREVIATIONS

Ala (ou **A**) : résidu alanine

APTS : acide *para*-toluène sulfonique

Arg (ou **R**) : résidu arginine

Asn (ou **N**) : résidu asparagine

Asp (ou **D**) : résidu acide aspartique

ATNBS : acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique

AtOH : 1-hydroxy-7-azabenzotriazole

Boc : *tert*-butyloxycarbone

Boc₂O : dicarbonate de di-*tert*-butyle

BOP : hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium

BTFFH : hexafluorophosphate de bis(tetraméthylène)fluoroformamidinium

Bzl : benzyle

ccm : chromatographie sur couche mince

CDI : carbonyldiimidazole

CLHP : chromatographie liquide haute performance

COSY : Correlation Spectroscopy

DBAD : di-*tert*-butylazodicarboxylate

DBU : 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-ène

DC : dichroïsme circulaire

DCC : dicyclohexylcarbodiimide

DCHU : dicyclohexylurée

DCM : dichlorométhane

DEAD : Diéthylazodicarboxylate

DHP : dihydropyrane

DIEA : diisopropyléthylamine

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

EDC : 1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide

éq. : équivalent

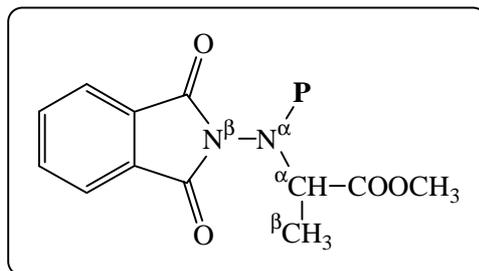
Fmoc : 9-fluorénylméthylèneoxycarbone

Fmoc-Cl : Chloroformiate de 9-fluorénylméthylènoxycarbonyle
Fmoc-OSu : 9-Fluorénylméthylènoxycarbonyle-*N*-hydroxysuccinimide
Glu (ou **E**) : résidu acide glutamique
Gly (ou **G**) : résidu glycine
hAla (ou **hA**) : résidu hydrazinoalanine
HATU : hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
hGly (ou **hG**) : résidu hydrazinoglycine
hIle (ou **hI**) : résidu hydrazinoisoleucine
hLeu (ou **hL**) : résidu hydrazinoleucine
HMPT : hexaméthylphosphotriamide
HOBt : benzotriazole
HOSu : *N*-hydroxysuccinimide
hPhe (ou **hF**) : résidu hydrazinophénylalanine
HR-MAS : High Resolution Magic Angle Spinning
hVal (ou **hV**) : résidu hydrazinovaline
ICF : isobutylchloroformiate
Ile (ou **I**) : résidu isoleucine
IR : infrarouge
Leu (ou **L**) : résidu leucine
M₂B₂ : 2-méthylbutan-2-ol
Met (ou **M**) : résidu méthionine
MM : mélange magique
MPH : *N*-méthylphtalhydrazide
NCA : *N*-carboxyanhydride
NMM : *N*-méthylmorpholine
ONp : *N*-hydroxyparanitrophénate
OPfp : *N*-hydroxypentafluorophénate
PAM : PhénylAcétamidoMéthyle
PCB : 2-(pyrrolidine-1-carbonyl)-benzoyl
Phe (ou **F**) : résidu phénylalanine
Pht : phtalimide
PPh₃ : triphénylphosphine
ppm : partie par million

- Pro** (ou **P**) : résidu proline
RMN : résonance magnétique nucléaire
Ser (ou **S**) : résidu sérine
SPPS : synthèse peptidique sur phase solide
T.A. : température ambiante
TBTU : tétrafluoroborate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
TFA : acide trifluoroacétique
Tfa : trifluoroacétyle
Tfa₂O : anhydride trifluoroacétique
TFFH : hexafluorophosphate de *N,N,N'',N''*-tétraméthylformamidinium
TFMSA : acide trifluorométhanesulfonique
THF : tétrahydrofurane
THP : tetrahydropyrane
Thr (ou **T**) : résidu thréonine
TMSOTf : trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle
TOSCY: Total Correlation Spectroscopy
Tyr (ou **Y**) : résidu tyrosine
UNCA : uréthane *N*-carboxyanhydride
UV : ultraviolet
Val (ou **V**) : résidu valine
Z : benzyloxycarbonyle
Z₂O : dicarbonate de dibenzyle

Afin de rendre le texte le plus clair possible, nous avons choisi d'adopter la nomenclature suivante : nos composés seront notés $\beta X, \alpha P$ -hXaa-R' où hXaa correspond au résidu hydrazino et X, P et R' les protections respectives en position *N*-beta, *N*-alpha et *C*-terminale. De plus, chaque composé sera décrit par un nombre (correspondant à sa famille, une famille rassemblant des composés qui ne diffèrent que par leur chaîne latérale) et une lettre (correspondant au code monolettre de l'acide aminé pour la chaîne latérale).

Par exemple, pour les α -hydrazinoalanines phtaloylées, nous avons deux familles suivant la protection du N ^{α} :



- P = Z le composé sera noté β Pht, α Z-hAla-OMe et portera le Numéro **3A** (**3** pour la famille et **A** pour Alanine)

- P = Boc le composé sera noté β Pht, α Boc-hAla-OMe et portera le Numéro **4A** (**4** pour la famille et **A** pour Alanine)

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les peptides jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques, notamment en tant qu'hormones, neurotransmetteurs, neuromodulateurs... C'est pourquoi, cette famille de molécules bioactives représente un enjeu important au niveau chimique, biologique et surtout pharmaceutique. Certains médicaments d'origine peptidique sont d'ailleurs disponibles sur le marché : l'insuline (traitement du diabète), la calcitonine (traitement de l'ostéoporose), la vasopressine (hypertension artérielle), la Thyrotropin-Releasing Hormone (traitement de l'hypothyroïdie).

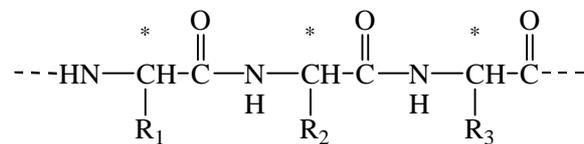


Figure 1 : peptides

Cependant des études pharmacocinétiques ont montré que l'utilisation directe des peptides comme agents thérapeutiques s'avère limitée pour les raisons suivantes :

- imperméabilité de certaines barrières physiologiques qui peuvent être franchies difficilement par les peptides¹
- biodégradation de la liaison peptidique par les enzymes protéolytiques^{2,3}
- manque de spécificité due à la géométrie flexible des peptides⁴ de faible taille.

On comprend ainsi aisément l'intérêt que suscite depuis quelques années la conception de nouvelles substances analogues de ces peptides bioactifs. Les analogues peptidiques conservent un squelette peptidique et diffèrent du peptide natif par un nombre de résidus et/ou la nature ou la position des chaînes latérales. Il est possible également d'apporter une modification chimique du squelette peptidique. On parle alors de pseudopeptides.

La modification du squelette peptidique et plus particulièrement de la liaison amide peut permettre :

- un accroissement de la résistance à l'hydrolyse par les peptidases, d'où une plus grande stabilité *in vivo*,

- une modulation du rapport hydrophilie/hydrophobie pour permettre le passage des barrières membranaires, d'où une meilleure diffusion à travers l'organisme,
- une modification de la structure secondaire du peptide qui, tout en gardant intacte la nature des chaînes latérales responsables de la reconnaissance avec le site actif, peut adopter une conformation permettant une meilleure affinité et une meilleure spécificité avec le récepteur ou un site actif de l'enzyme avec lequel le peptide interagit (liaisons hydrogène favorables, squelette peptidique rigidifié).

Les modifications du squelette peptidique vont impliquer soit l'échange d'une unité appartenant à la liaison amide de la chaîne peptidique (voire le remplacement complet de la liaison amide) de façon isoélectrique ou isotérique, soit l'extension de cette chaîne par l'introduction d'un élément additionnel ou encore le remplacement du CH^α par un autre atome. Les motifs pseudopeptidiques sont ainsi de nature très variée et font l'objet de nombreuses publications et revues⁵. Les modifications qui sont le plus souvent rencontrées sont rassemblées dans le tableau 1.

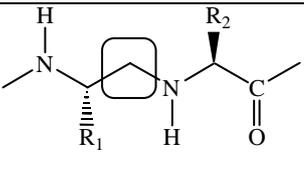
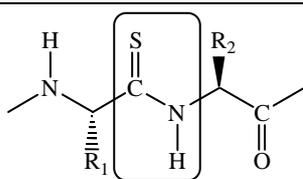
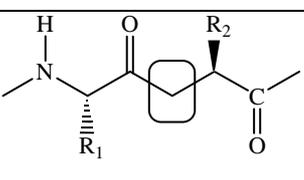
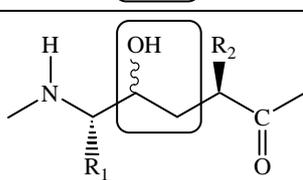
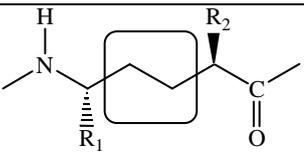
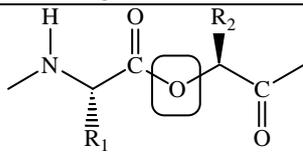
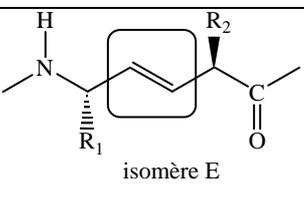
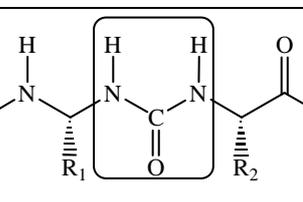
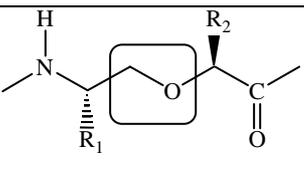
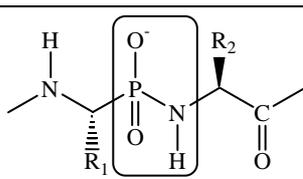
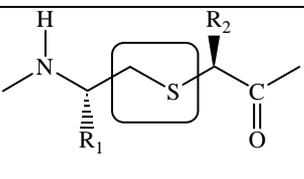
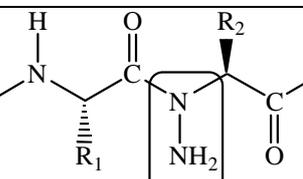
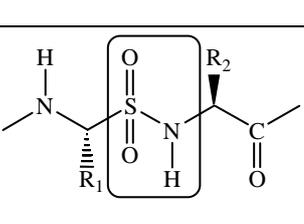
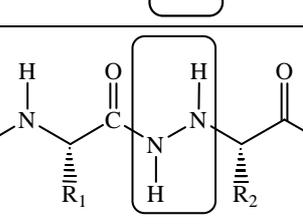
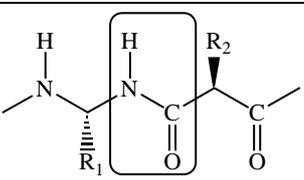
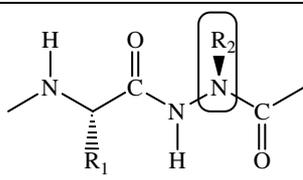
aminométhylène (peptide réduit) $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]$		thioamide $\psi[\text{CSNH}]$	
cétométhylène $\psi[\text{COCH}_2]$		hydroxyéthylène $\psi[\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2]$	
éthylène (carba) $\psi[\text{CH}_2\text{CH}_2]$		ester (dépsi-peptide) $\psi[\text{CO}_2]$	
Z or E oléfine (vinylogue) $\psi[\text{CH}=\text{CH}]$		urée $\psi[\text{NH-CO-NH}]$	
méthylénoxy $\psi[\text{CH}_2\text{O}]$		phosphonamide $\psi[\text{PO}_2\text{NH}]$	
thiométhylène $\psi[\text{CH}_2\text{S}]$		N-aminoamide $\psi[\text{CO-NH}(\text{NH}_2)]$	
sulfonamide $\psi[\text{SO}_2\text{NH}]$		hydrazino $\psi[\text{CO-NH-NH}]$	
rétro-inverso $\psi[\text{NH-CO}]$		aza (Az) $\psi[\text{CO-NH-NR}]$	

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des motifs pseudopeptidiques les plus utilisés

Parmi les pseudopeptides présentés, nous nous intéresserons dans ce mémoire aux hydrazinopeptides, pour lesquels la modification consiste en une insertion d'un azote supplémentaire dans le squelette peptidique. Il n'existe à notre connaissance que deux peptides naturels contenant un fragment hydrazinique (Figure 2).

- la linatine^{6,7}, extraite de la farine de lin, contient la *D*-hydrazinoproline, qui est fortement toxique pour le poulet et présente des propriétés antibactériennes (antagoniste à la vitamine B6). Elle augmente l'expression de la dystrophine dans les muscles squelettiques et cardiaques.
- la négamycine^{8,9}, extraite d'un champignon, contient de l'hydrazinosarcosine, qui est un antibiotique. Elle se lie à l'ARN ribosomal et permet de pallier la présence de codons stop empêchant la synthèse correcte de protéines, comme c'est le cas chez 10 à 15% des garçons atteints de dystrophie musculaire de Duchenne.

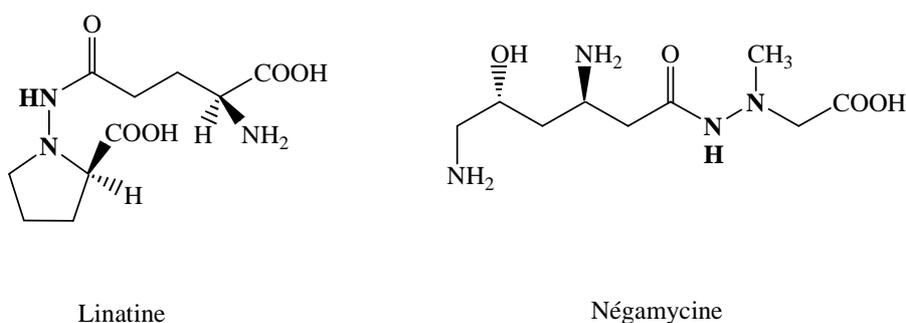


Figure 2

Les hydrazinopeptides ont été très peu étudiés tant sur le plan chimique que biologique¹⁰⁻²⁰, mais certaines études biologiques ont montré que le remplacement d'un acide aminé par un hydrazinoacide peut permettre au pseudopeptide d'avoir une activité biologique très proche de celle du composé naturel ainsi qu'une plus grande résistance aux enzymes²⁰.

Le nombre limité d'hydrazinopeptides étudiés dans la littérature peut s'expliquer par :

- la difficulté de synthèse des précurseurs qui sont les α -hydrazinoacides protégés ; en effet, les méthodes décrites dans la littérature pour la préparation stéréospécifique d' α -hydrazinoacides chiraux sont laborieuses à mettre en œuvre et/ou difficilement généralisables ;

- les difficultés rencontrées lors de l'incorporation des α -hydrazinoacides dans une chaîne peptidique : la présence d'un atome d'azote supplémentaire pose des problèmes de régiosélectivité du couplage avec le partenaire acide.

Le but du travail décrit dans ce mémoire consiste à mettre au point une nouvelle méthode permettant la préparation d' α -hydrazinopeptides. Notre démarche a consisté, dans un premier temps, en la mise au point d'une méthode de préparation d' α -hydrazinoacides protégés et potentiellement utilisables en synthèse peptidique. Ces composés possèdent une protection (P) temporaire sur l'azote β compatible avec les stratégies de synthèse en phase solide et une protection (X) semi-permanente sur l'azote α (Figure 3).

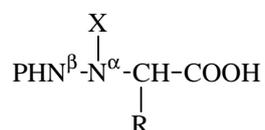


Figure 3

Dans un second temps, nous avons défini des conditions permettant de les insérer dans une chaîne peptidique en croissance. Une étude réalisée en phase homogène a permis de mettre au point les conditions de couplage de nos α -hydrazinoacides, nous avons ensuite adaptées ces conditions à la Synthèse Peptidique sur Phase Solide (SPPS). L'optimisation des conditions en SPPS a été possible grâce à une étude RMN HR-MAS effectuée directement sur la résine.

Enfin, dans une étude prospective nous avons voulu appliquer ces travaux à la synthèse et l'étude structurale d'un nouveau type d'oligomère mixte les α /hydrazino-peptides.

Ce mémoire s'articule donc en trois parties :

Chapitre I : Synthèse d' α -hydrazinoacides

Chapitre II : Etude de la réactivité des α -hydrazinoacides en solution et sur phase solide.
Application à la synthèse d' α -hydrazinopeptides

Chapitre III : Etude prospective sur la synthèse et l'étude structurale d'un α -hydrazino-peptide

CHAPITRE I :
SYNTHESE D' α -HYDRAZINOACIDES

I. Introduction

L'un de nos objectifs était la préparation d' α -hydrazinoacides utilisables dans les deux stratégies de synthèse peptidique sur phase solide (Fmoc et Boc). Le premier barrage à la synthèse d' α -hydrazinoacides est la présence d'un carbone asymétrique, qui demande la préparation de synthons optiquement purs. La deuxième difficulté est due à la présence d'un atome d'azote supplémentaire qui pose un problème de régiosélectivité du couplage peptidique. Ce deuxième point peut être résolu en utilisant des α -hydrazinoacides orthogonalement protégé en N^α et N^β . Il a fallu donc envisager la synthèse d' α -hydrazinoacides porteurs d'une protection temporaire sur l'azote β et d'une protection semi-permanente sur l'azote α . Nous avons choisi d'étudier la synthèse de deux types de monomères N^β -Fmoc (ou Boc)- N^α -Z- α -hydrazinoacides (figure 4).

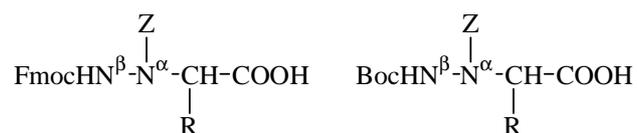


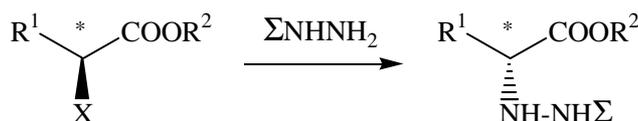
Figure 4

Pour l'atome d'azote β , les groupements Boc et Fmoc ont été choisis car ce sont les motifs protecteurs les plus utilisés en SPPS. Pour l'atome d'azote α , nous avons choisi le groupement Z pour sa résistance aux acides et aux bases faibles.

En 1896, Traube²¹ obtenait les premiers α -hydrazinoacides par réduction d' α -nitrosohydroxylamines dérivées des acides aminés correspondants, cette voie de synthèse ayant été reprise et étendue par Darapsky²² dans les années 1920. Depuis quelques méthodes ont été décrites pour la préparation spécifique d' α -hydrazinoacides, cependant celles-ci s'avèrent parfois laborieuses à mettre en œuvre et/ou difficilement généralisables. Nous avons regroupé ci-après les méthodes les plus utilisées dans la littérature. Cette liste non exhaustive des différentes synthèses utilisées pour la préparation d' α -hydrazinoacides et/ou d' α -hydrazinoesters montre que dans la plupart des cas, les méthodes ne sont pas généralisables, peu sélectives et ne permettent pas directement toutes les combinaisons de protection (azote N^α protégé et/ou N^β protégé).

I.1. Substitution nucléophile.

Une des stratégies permettant la synthèse d' α -hydrazinoesters implique une réaction de type S_N2 entre une hydrazine et un ester optiquement actif comportant un groupe partant en α du groupement fonctionnel (Schéma 1).



X : halogène, triflate, nosylate...

Σ : alkyle, Boc....

R^1, R^2 : alkyle

Schéma 1

Cette réaction, qui dans certaines conditions est limitée par le risque d'épimérisation²³, a néanmoins pu être réalisée avec de bons excès énantiomériques, d'abord par Carmi, à partir d' α -halogénoacides, mais avec de faibles rendements²⁴, puis par Hoffman²⁵. Après avoir effectué la substitution d'un nosylate par le *tert*-butylcarbазate ($\Sigma = \text{Boc}$) avec une perte importante de la pureté optique, il a privilégié la substitution d'un triflate (toujours par BocNH-NH_2), cette fois-ci avec de bons excès énantiomériques et de bons rendements. Cette méthode a ensuite été reprise par Thierry²⁶ sur un dérivé de la lysine avec d'excellents rendements. Cette méthode semble constituer une bonne voie de synthèse d' α -hydrazinoesters N^B protégés.

I.2. Amination réductrice d' α -cétoesters

En 1994, Burk et coll.²⁷ ont préparé des α -hydrazinoacides chiraux par amination réductrice d' α -cétoesters avec induction asymétrique (Schéma 2); ils ont effectué pour cela une hydrogénation énantiosélective de la liaison $C=N$ de la *N*-acylhydrazone obtenue, catalysée par un complexe au Rhodium (DuPHOS-Rh ; avec le 1,2-bis(phospholano)benzène comme ligand).

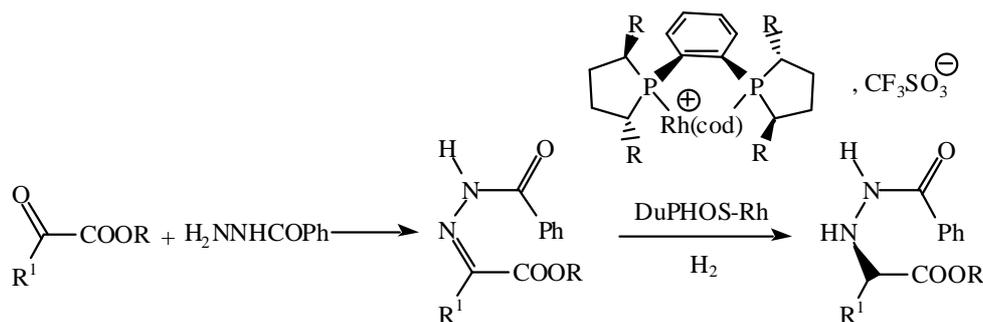


Schéma 2

Cette synthèse asymétrique permet d'obtenir les produits désirés avec des excès énantiomériques satisfaisants (l'hydrazinoalanine $R^1 = \text{CH}_3$ est formée avec un excès énantiomérique de 89%).

I.3. Amination électrophile d'énolate portant un auxiliaire chiral.

On trouve également dans la littérature des synthèses asymétriques par amination électrophile d'énolates portant un auxiliaire chiral (X^*)²⁸⁻³². Les auxiliaires chiraux les plus utilisés sont la *N*-méthyléphédrine, les 4-isopropyl- ou 4-benzyl-oxazolidinones ou le (-)-1-[dicyclohexylsulfonamidométhyl]-*endo*-norbornanol. Ces méthodes permettent d'obtenir avec de bons rendements et de bons excès énantiomériques des composés protégés en N^α et N^β par un groupement Boc (Schéma 3).

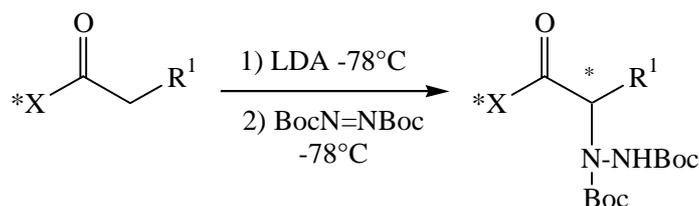


Schéma 3

I.4. *N*-amination d' α -aminoacides

Les réactions de *N*-amination respectant la configuration absolue du centre asymétrique représentent en principe une solution attrayante pour obtenir les α -hydrazinoacides optiquement actifs.

I.4.1. Le réarrangement de Shestakov d'une urée en hydrazine

Cette transposition (analogue du réarrangement d'Hoffmann des amides en amines), a été découverte en 1903 par Shestakov³³ sur l'urée $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ et a été appliquée en 1974 par Gustafsson et coll.^{34,35} au cas de la L-alanine. Les α-aminoacides sont préalablement transformés en acides hydantoïques, pour l'obtention d'α-hydrazinoacides optiquement purs³⁶. La réaction se fait avec rétention de configuration. Le rendement de la réaction, très faible lorsque l'hypochlorite de sodium (NaOCl) est utilisé pour effectuer la transposition, a été amélioré par Collet et coll., en employant l'hypochlorite de potassium (KOCl)³⁷ (Schéma 4).

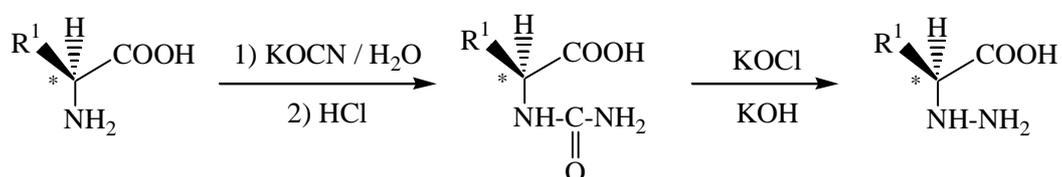


Schéma 4

Cette méthode, bien que donnant des résultats assez satisfaisants (bons rendements et hautes puretés optiques), ne constitue cependant pas une méthode directe de synthèse d'α-hydrazinoacides N^α et/ou N^β protégés.

I.4.2. Réduction d'un dérivé N-nitroso

La nitrosation directe d'un acide aminé n'a été réalisée que sur la proline dont l'azote est secondaire³⁸. On peut ainsi préparer les L et D-hydrazinoprolines (Schéma 5).

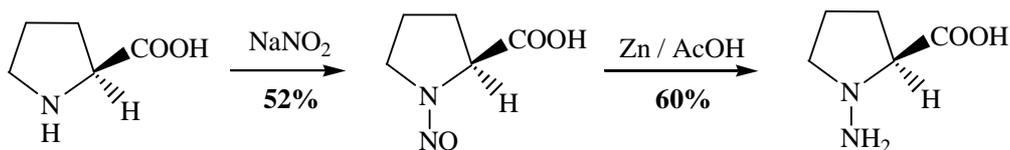


Schéma 5

Pour les autres α -aminoacides, l'amine primaire doit nécessairement être monoprotégée avant nitrosation pour éviter la désamination. Achiwa et Yamada³⁹ ont appliqué cette méthodologie à plusieurs aminoesters *N*-benzylés. (Schéma 6)

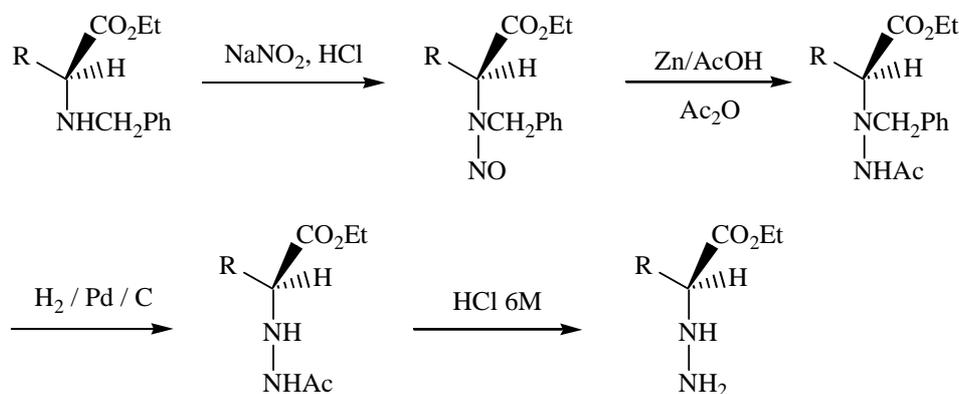


Schéma 6

Cette synthèse multi-étapes conduit à des L- α -hydrazinoacides optiquement purs, mais avec des rendements moyens.

I.4.3. *N*-amination au moyen d'oxaziridines

Schmitz et coll. ont développé, comme réactif de *N*-amination, l'oxaziridine⁴⁰⁻⁴² de la cyclohexanone. Le transfert du groupe NH₂ sur différents esters méthyliques d'aminoacides est de l'ordre de 60%. Toutefois, le produit isolé n'est pas l'hydrazinoacide mais l'hydrazone avec la cyclohexanone issue de l'oxaziridine initiale (Schéma 7).

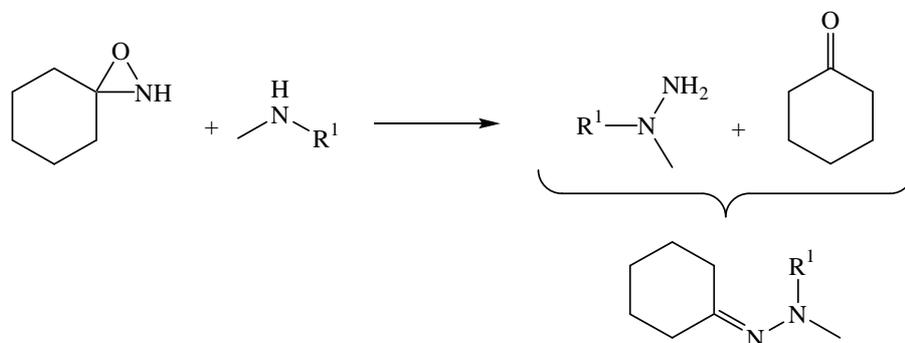


Schéma 7

Dans la perspective de la synthèse peptidique, Collet et coll. ont développé des oxaziridines *N*-substituées par des carbamates (Schéma 8). Des réactifs comme la *N*-Boc-3-(4-cyanophényl)oxaziridine (Collet et coll. Brevet WO 97/09303)⁴³ ou la *N*-Boc-3-trichlorométhylloxaziridine permettent d'obtenir directement des α -hydrazinoacides N^{β} -protégés par un groupement Boc, optiquement purs. Ces oxaziridines, composés solides et stables, sont capables de transférer leur fragment azoté protégé à un centre nucléophile.

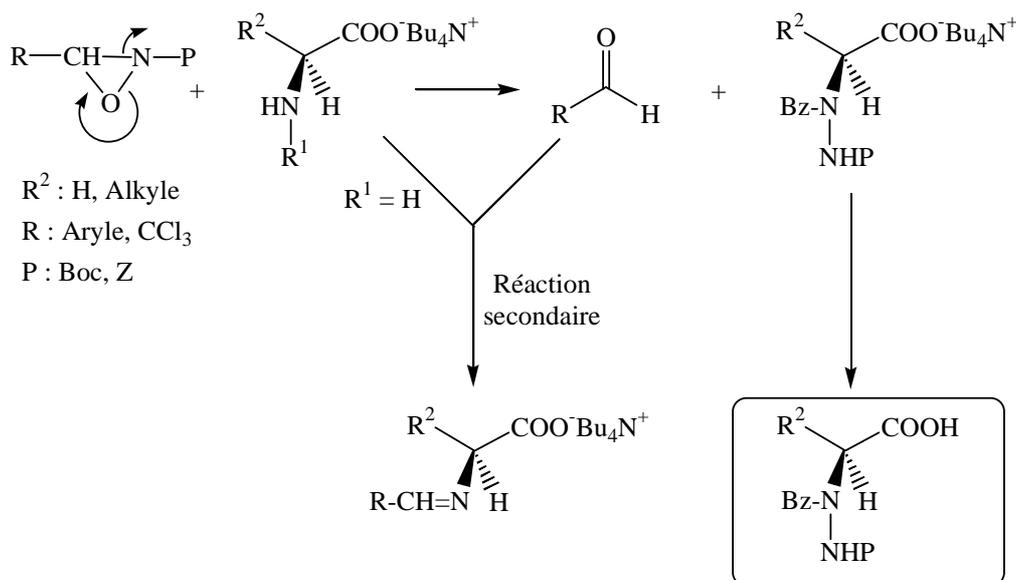


Schéma 8

Les rendements sont bons et il y a très peu de racémisation. La principale limitation de cette méthode est liée au fait que les amines primaires ($R^1 = H$) conduisent à de faibles rendements dus à la formation d'une base de Schiff. Cette procédure est donc surtout limitée aux amines secondaires (proline et acides aminés benzylés).

I.5. Réaction de Mitsunobu

Une tentative de synthèse d' α -hydrazinoesters chiraux protégés *via* un protocole dérivé de celui de Mitsunobu a été réalisée par Di Grandi⁴⁴. Contrairement à la procédure classique, il n'y a pas de partenaire acide ; le dialkylazodicarboxylate joue à la fois le rôle d'activant et de nucléophile. Cette réaction conduit tout d'abord au déhydrohydrazinoester correspondant **X'** et nécessite une étape supplémentaire de réduction par hydrogénation

catalytique ($H_2/10\%$ Pd/C) pour obtenir l' α -hydrazinoester **X** (Schéma 9). Le produit obtenu est isolé sous forme racémique.

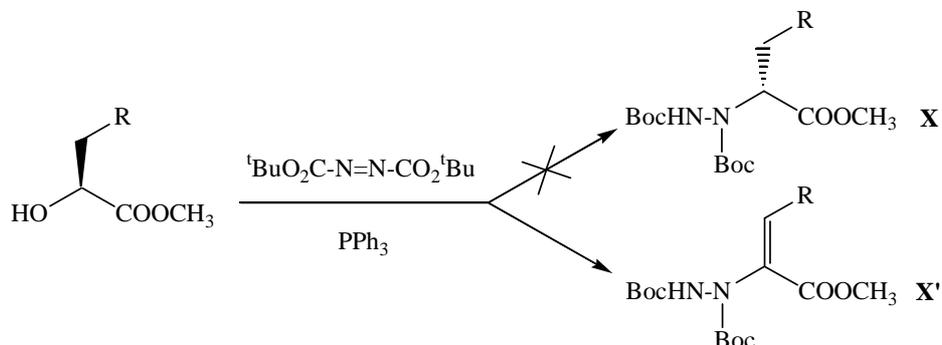


Schéma 9

Au laboratoire, la découverte de nouveaux partenaires acides pour la réaction de Mitsunobu dérivés du *N*-aminophthalimide (composés **1** schéma 10) a ouvert la voie à un nouveau mode de préparation d'alkylhydrazines. Ces composés ont la particularité de posséder un proton acide ($pK_a \approx 11$) dû à la présence de trois groupements électroattracteurs et de présenter un encombrement stérique limité de part l'implication des deux groupements carbonyles dans le motif phthalimide. Ces propriétés ont permis de considérer ce type de molécules en tant que partenaire acide dans des réactions de Mitsunobu. Il faut noter l'importance du motif phthalimide dans ce type de réaction. Lorsque celui-ci est remplacé par d'autres systèmes protecteurs activants, on observe une diminution forte des rendements, voire aucune réaction. Cette différence de réactivité, qui ne peut être attribuée à la variation d'acidité du NH (les valeurs de pK_a sont de même ordre), est expliquée par une diminution de l'accessibilité à ce site par encombrement stérique.

La réaction de Mitsunobu est connue pour être stéréospécifique et s'effectue avec inversion du centre chiral de l'atome de carbone porteur de la fonction hydroxyle. Une application particulièrement intéressante de ce travail consiste en la conversion d' α -hydroxyesters **2** en α -hydrazinoesters phthaloylés^[16] chiraux selon le schéma 10.

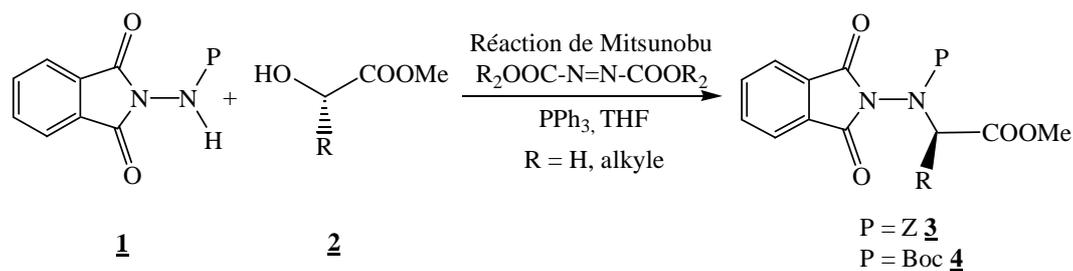


Schéma 10

Cette méthode permet d'aboutir en peu d'étapes à des hydrazinoesters dont les deux azotes de la fonction hydrazine sont orthogonalement protégés et ce avec de bons rendements. La pureté optique des α-hydrazinoesters phthaloylés obtenus a pu être vérifiée⁴⁵. Pour ce faire les composés formés ont été transformés en acides aminés puis comparés après dérivatisation avec les acides aminés chiraux authentiques en utilisant une méthode décrite dans la littérature^{29,32,46,47}. L'excès énantiomérique obtenu est supérieur à 98 %. La réaction se fait donc avec une complète inversion de configuration et s'accompagne d'une perte négligeable de la pureté énantiomérique (moins de 2 %) par rapport aux réactifs de départ.

Au début de notre étude, la voie de synthèse envisagée présentait néanmoins plusieurs limitations :

- la disponibilité des hydroxyesters chiraux **2** ; en effet, seuls quelques hydroxyacides (ou esters) optiquement purs sont disponibles commercialement et à un coût élevé,
- la présence du groupement phthalimide indispensable au succès de cette réaction (par ses effets stériques et électroniques)⁴⁸ dont l'élimination est parfois problématique et requiert des conditions réactionnelles dures (utilisation d'hydrazine ou de ses dérivés),
- la régénération de la fonction acide carboxylique par hydrolyse ou saponification de l'ester qui nécessite, là encore, la mise au point de conditions réactionnelles compatibles avec les groupes fonctionnels présents dans la molécule.
- Seule des méthodes de synthèse en solution avait été élaborées.

Le plan de ce chapitre s'articule donc en quatre parties :

- La synthèse des α -hydrazinoesters phtaloylés **3** et **4**
- La transprotection du motif phtalimide en Boc ou en Fmoc
- La déprotection de la fonction acide carboxylique des α -hydrazinoesters obtenus.
- Et enfin la transposition des méthodes utilisées à la phase solide.

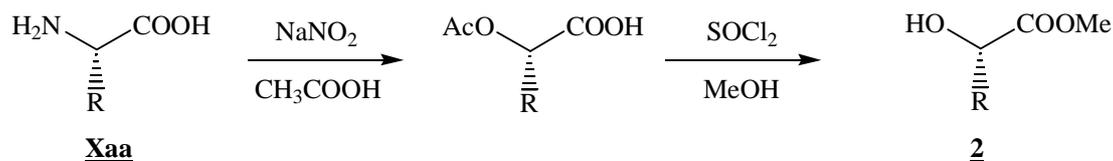
II. Synthèse des α -hydrazinoesters phtaloylés β Pht, α P-hXaa-OMe

Comme nous l'avons décrit précédemment, les α -hydrazinoesters phtaloylés **3** et **4** peuvent être obtenus grâce à une réaction de Mitsunobu entre des *N*-alkyloxycarbonyl-aminophtalimides **1** et des α -hydroxyesters **2**.

II.1. Préparation des α -hydroxyesters **2**

La réaction de Mitsunobu se réalise avec une inversion de configuration, en partant d' α -hydroxyesters de configuration absolue S (les plus simple à obtenir), on peut envisager la synthèse des composés hydrazinés correspondants de configuration R (et inversement). Plusieurs composés n'étant pas disponibles commercialement ou à un coût élevé, il convenait donc de définir une voie d'accès efficace à ce type de composés. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la préparation d' α -hydroxyesters porteurs notamment d'une chaîne latérale non fonctionnalisée.

Nous nous sommes tournés vers plusieurs méthodes décrites dans la littérature reposant toutes sur une réaction de nitrosation d'acides aminés naturels^{49,50}. Il a été montré que cette réaction se fait avec rétention de configuration. Parmi les voies réactionnelles envisagées, celle qui nous a donné les meilleurs résultats permet, à partir de l'acide aminé, d'obtenir directement l'hydroxyester correspondant en deux étapes⁴⁹ (Schéma 11). La première étape consiste à former l'hydroxyacide acétylé à partir de l'acide aminé en utilisant NaNO₂ dans l'acide acétique. Après extraction, on obtient l' α -hydroxyacide acétylé pur. Ce composé est ensuite dissous dans le méthanol et l'action du chlorure de thionyle permet d'obtenir l' α -hydroxyester correspondant pur après une simple évaporation. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 2.



Essai N°	Xaa	R	Rendements % ^(a)
1	Ile	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	2I : 50 %
2	Leu	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	2L : 59 %
3	Phe	-CH ₂ Ph	2F : 70 %
4	Val	-CH(CH ₃) ₂	2V : 82 %

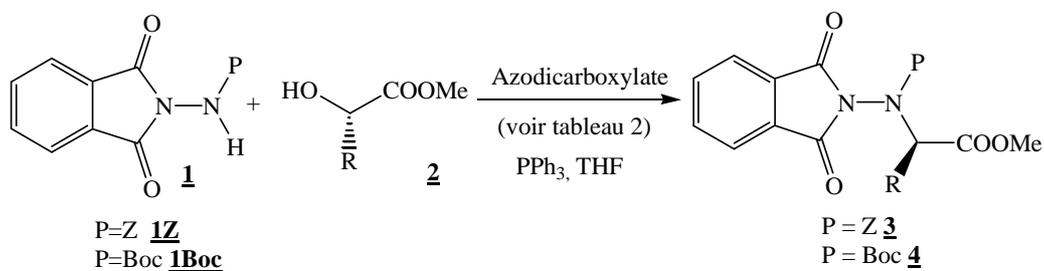
(a) rendements déterminés à partir de l'acide aminé **Xaa** de départ

Tableau 2

Cette méthode nous a permis de préparer une série d' α -hydroxyesters de configuration absolue *S* dérivés des acides aminés naturels avec de bons rendements.

II.2. Condensation de Mitsunobu

Selon les conditions expérimentales mises au point au laboratoire le *N*-benzyloxycarbonylamino-phthalimide **1Z** ou le *N*-*tert*-butyloxycarbonylamino-phthalimide **1Boc** ont été engagés comme partenaires acides dans une réaction de Mitsunobu⁴⁸. Les résultats sont rassemblés dans le schéma 12 et dans le tableau 3.



Essais	P	R	Azodicarboxylate	Temps en h	Rendements en % ^(a)
1	Z	-CH ₃	DBAD	1	3A : 96
2		-H	DBAD	2,5	3G : 93
3		-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	DEAD	3	3L : 97
4		-CH ₂ Ph	DEAD	3	3F : 64
5		-CH(CH ₃) ₂	DEAD	3	3V : 54
6		-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	DEAD	3	3I : 30
7	Boc	-CH ₃	DBAD	3	4A : 85

(a) rendements calculés par rapport aux composés **2**

Tableau 3

Certains essais avaient déjà été réalisés précédemment au laboratoire, nous les avons reproduits et dans certains cas améliorés. Ainsi pour **3A** et **3G**, nous avons optimisé l'étape de purification par chromatographie en utilisant du DBAD au lieu du DEAD. Pour **3L** nous avons amélioré le rendement précédemment obtenu en faisant varier le temps de réaction. Le dérivé de l'isoleucine **2I** (essai 7) qui n'avait jamais pu être isolé jusqu'à présent, a été obtenu avec un rendement relativement faible de 30 %.

Comme il était prévisible, la réaction de Mitsunobu étant sensible à l'encombrement stérique, les α -hydrazinoesters protégés en N ^{β} par le motif phthalimide et en N ^{α} par un groupement benzyloxycarboxyle (Z) peuvent être obtenus avec d'excellents rendements lorsque l' α -hydroxyester de départ est peu encombré. (R = H (**2G**), CH₃ (**2A**)). Par contre, on constate une diminution du rendement lorsque l'encombrement de R augmente (R = CH₂CH(CH₃)₂, CH₂Ph, CH(CH₃)₂). Le même phénomène est observé lorsque l'on compare les résultats obtenus avec **1Z** et avec ceux obtenus avec **1Boc** plus encombré.

III. Transprotection des composés β Pht, α P-hXaa-OMe

Une fois les conditions de synthèse des composés **3** et **4** définies et compte tenu du but que nous nous étions fixé, il était nécessaire de mettre au point des conditions réactionnelles permettant la substitution du motif phthalimide, en effet, les conditions nécessaires à son élimination ne sont, hélas, pas compatibles avec les méthodes généralement utilisées en chimie des peptides. Une étude antérieure effectuée au laboratoire avait montré que la

déprotection de l'atome d'azote β était possible en utilisant de la méthylhydrazine, mais uniquement à partir des α-hydrazinoesters porteurs de chaînes latérales peu encombrées (R = H, CH₃). Il nous fallait donc mettre au point une méthode générale permettant l'élimination du motif phtalimide. Par ailleurs, d'autres travaux menés au laboratoire sur la synthèse de pseudodipeptides *N*-aminoamides avaient permis de définir une méthode de transprotection permettant de transformer directement le motif phtalimide en groupement Boc⁵¹ (Schéma 13).

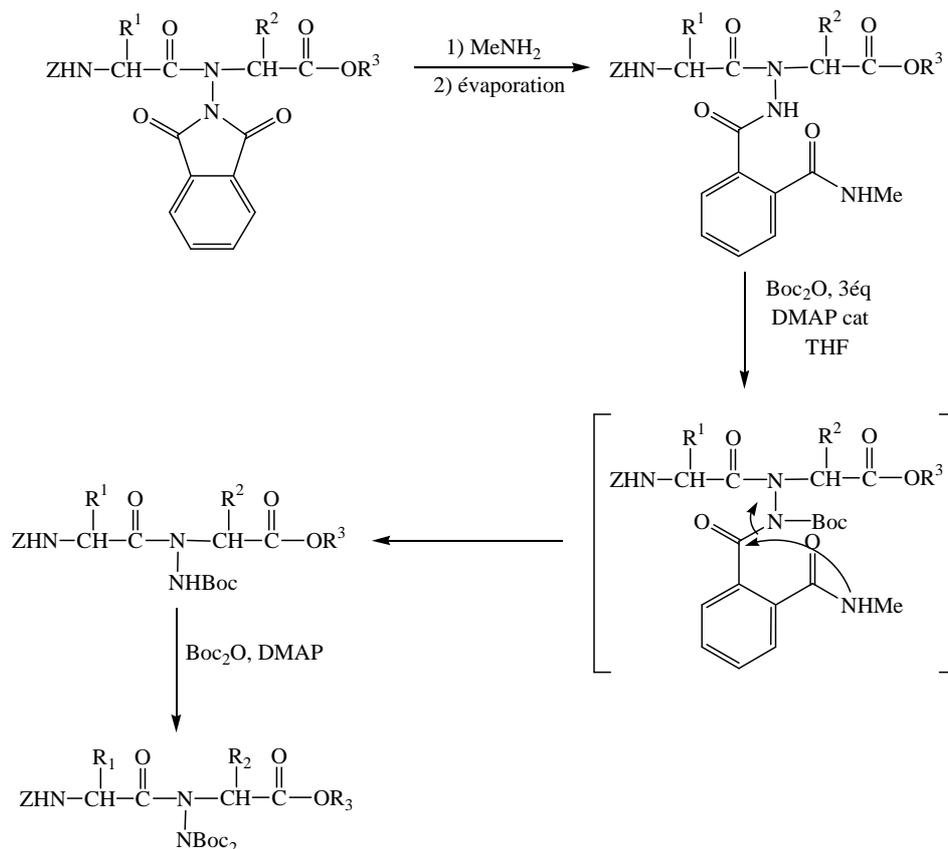


Schéma 13

Cette méthode consiste à ouvrir le motif phtalimide par addition d'une amine primaire, puis à introduire un groupement Boc sur l'azote β, favorisant ainsi la coupure de la liaison carbone-azote par une réaction de substitution intramoléculaire. La réaction conduit en fait à la formation des composés bisprotégés par deux groupements Boc sur l'atome d'azote latéral et non aux composés mono-protégés. Il est alors nécessaire d'utiliser dans un deuxième temps, le perchlorate de magnésium⁵² pour transformer le motif imidocarbone (NBoc₂) en motif carbamate (NHBoc).

Nous avons tout d'abord tenté d'adapter ce protocole pour préparer les α -hydrazinoesters β Boc, α Z-Xaa-OMe directement à partir des α -hydrazinoesters phtaloylés **3**. Par la suite nous avons tenté d'utiliser ce même protocole pour introduire d'autres groupements protecteurs en N $^{\beta}$, comme le groupement Fmoc pour obtenir les N $^{\beta}$ -Fmoc-N $^{\alpha}$ -Z- α -hydrazinoacides et les groupements Z et Tfa. Nous avons également utilisé ce protocole quand l'azote α est protégé par un groupement Boc. Ces groupements ont été choisis pour leur compatibilité avec la SPPS. Enfin, nous avons recherché des conditions permettant de nous affranchir de l'utilisation de perchlorate de magnésium qui n'est pas sans risque.

III.1. Etude préliminaire

Afin de définir les meilleures conditions de transprotection du motif phtalimide en groupement Boc, nous avons choisi d'effectuer une étude systématique sur les composés **3A** et **4A** (R = CH₃), dont le précurseur est facile d'accès et peu onéreux. Deux méthodes (A et B) ont été développées qui diffèrent par la nature de l'amine utilisée.

III.1.1. Méthode utilisant la méthylamine (Méthode A)

Les conditions expérimentales décrites au laboratoire pour la transfonctionnalisation du motif phtalimide en groupement Boc ont été appliquées aux composés **3A** et **4A** avec succès. Nous avons ensuite tenté de les généraliser aux groupements Z, Tfa, Fmoc. Les résultats sont rassemblés dans le schéma 14 et le tableau 4.

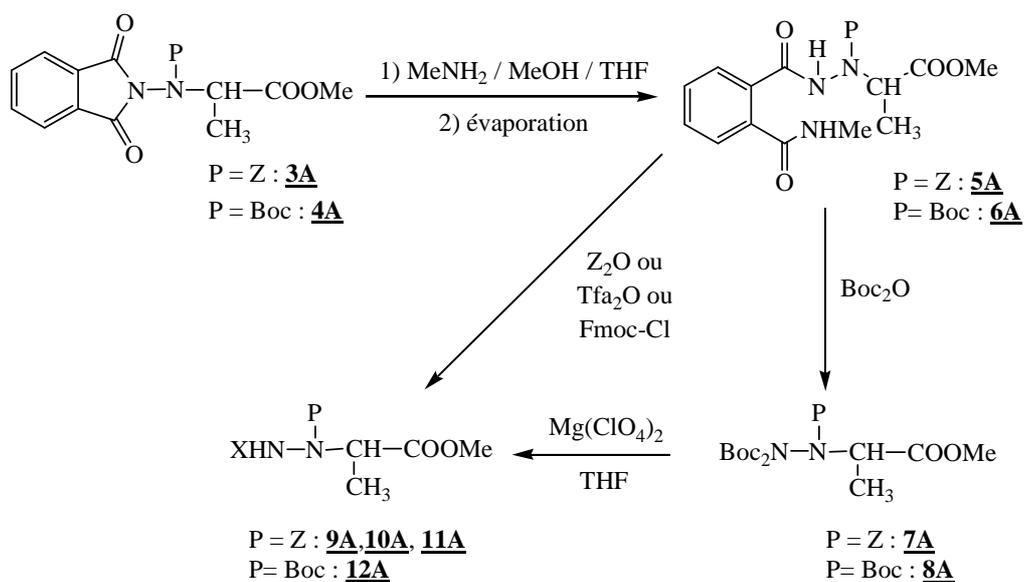


Schéma 14

Essais	P	X	Conditions	Temps en h	Rdt en % ^(a)
1	<u>3A</u> : Z	Boc	Boc ₂ O, DMAP _{cat} , THF	8	<u>7A</u> : 70 <u>9A</u> : 70
5	<u>4A</u> : Boc		Boc ₂ O, DMAP _{cat} , THF	4	<u>8A</u> : 87 <u>12A</u> : 87
2	<u>3A</u> : Z	Z	Z ₂ O, DMAP _{cat} , THF	4	<u>10A</u> : 70
3		Tfa	Tfa ₂ O à 0°C	12	<u>11A</u> : 56
4		Fmoc	Fmoc-Cl, DMAP _{cat} , THF	350	0
6	<u>4A</u> : Boc	Z	Z ₂ O, DMAP _{cat} , THF	12	0
7		Tfa	Tfa ₂ O à 0°C	12	0
8		Fmoc	Fmoc-Cl, DMAP _{cat} , THF	350	0

(a) Rendements calculés par rapport aux composés **3A** ou **4A**.

Tableau 4

L'utilisation de la méthylamine permet l'ouverture quantitative du motif phthalimide des composés **3** et **4** pour former les composés βMPH,αZ-hAla-OMe **5A** et βMPH,αBoc-hAla-OMe **6A**, obtenus purs après simple évaporation.

L'action de Boc_2O en présence d'une quantité catalytique de DMAP sur les composés **5A** et **6A** (essai 1 et 2) conduit à la formation exclusive des composés *bis*-protégés en β **7A** et **8A**. Enfin, l'action de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ nous a alors permis d'obtenir quantitativement les composés **9A** et **10A** monoprotégés attendus.

L'utilisation de Z_2O et de Tfa_2O (sans solvant ni co-réactif) à la place de Boc_2O , a conduit dans le cas où $\mathbf{P} = \mathbf{Z}$ directement aux composés monoprotégés, les produits *bis*-protégés n'ayant jamais été détectés. En revanche pour $\mathbf{P} = \text{Boc}$ l'emploi de l'anhydride trifluoroacétique conduit à la dégradation du substrat. L'utilisation de Z_2O ne nous a pas permis d'obtenir l' α -hydrazinoester $\beta\mathbf{Z},\alpha\text{Boc-hAla-OMe}$ attendu, ce qui peut s'expliquer, comme nous le verrons plus loin (voir schéma 19), par l'encombrement stérique du groupement Boc, qui gênerait l'approche du réactif.

Par contre, quelle que soit la nature de \mathbf{P} (\mathbf{Z} : **5A** ou Boc : **6A**), l'utilisation de Fmoc-Cl n'aboutit pas à la formation du produit recherché. Lors de ces tentatives de transprotection, nous avons remarqué la dégradation des réactifs en 9-méthylène-9H-fluorène et ce, quel que soit le dérivé utilisé (Fmoc-Cl, Fmoc-OSu en présence ou non de DMAP, Et_3N , Na_2CO_3 et NaH).

Le mécanisme que nous proposons pour la méthode A de transprotection est présenté dans le schéma 15.

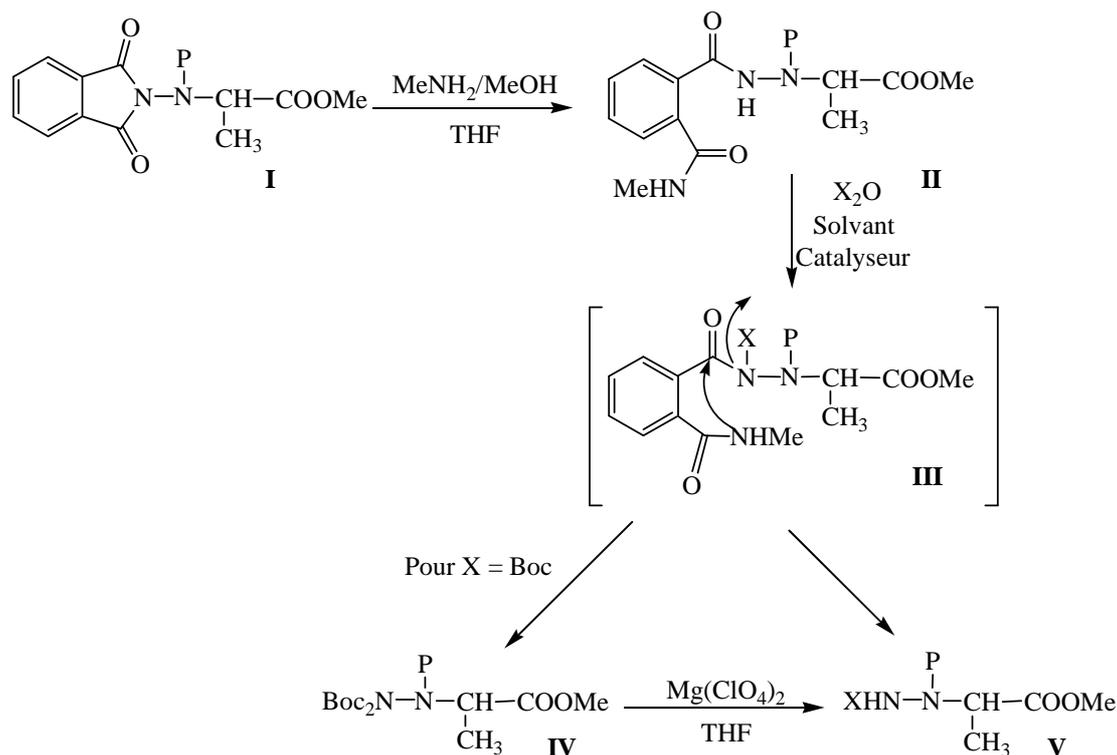


Schéma 15

D'après les résultats obtenus, nous pouvons proposer que Boc_2O et Z_2O (en présence de DMAP) et Tfa_2O seul sont des réactifs capables de générer des électrophiles pouvant réagir avec la fonction hydrazide des composé **II**, conduisant à l'intermédiaire fonctionnel **III** instable qui subit une attaque nucléophile intramoléculaire avec formation du composé monoprotégé **V**. L'utilisation de Boc_2O -DMAP conduit aux composés bis-protégés **IV**, dont la formation s'explique par une réaction ultérieure du réactif électrophile sur **V**. En se référant aux données de la littérature, nous pouvons proposer qu'en présence de DMAP, Boc_2O évolue vers la formation d'une espèce particulièrement électrophile capable de transformer la fonction carbamate (BocNH) en fonction imidodicarbonate (Boc_2N)^[22].

Même si la méthode A n'a pas pu être appliquée pour la synthèse d'α-hydrazinoesters porteurs d'un groupement Fmoc, nous avons montré que la réaction de transprotection était généralisable aux α-hydrazinoesters phtaloylés **3**, **4** et a pu être étendue à deux autres groupements protecteurs Z et Tfa. Cependant, cette méthode pose plusieurs problèmes liés, d'une part à l'utilisation d'ions perchlorates dangereux et d'autre part à des difficultés rencontrées dans l'étape de purification par chromatographie des composés **9A**, **10A**, **11A**, **12A** (purification rendue difficile par la présence de méthylphtalimide).

Tenant compte du mécanisme proposé, il semblait possible de s'affranchir de la formation du méthylphthalimide en utilisant une amine secondaire pour l'ouverture du phthalimide (schéma 16) et permettant ainsi d'isoler les intermédiaires **VII**. Une étape supplémentaire, impliquant la méthylamine permettrait de libérer l'hydrazinoesters. Cette technique devrait également permettre l'obtention des composés monoprotégés **IV**.

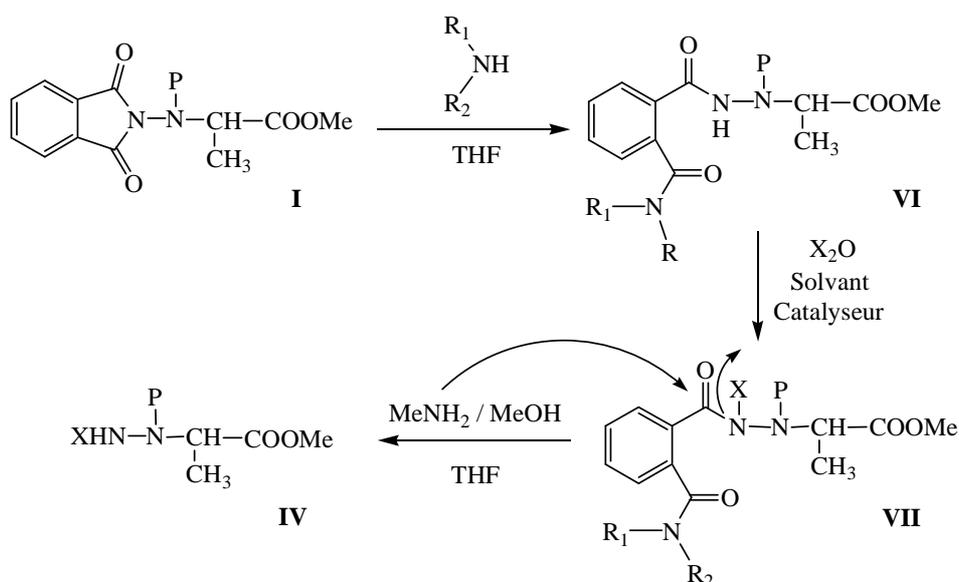


Schéma 16

III.1.2. Méthode utilisant la pyrrolidine (Méthode B)

Une variante de la méthode A a été définie en remplaçant la méthylamine par la pyrrolidine. Nous avons tout d'abord réalisé chaque étape et purifié chaque intermédiaire par chromatographie sur colonne de silice. La synthèse a été réalisée ensuite en partant des composés β Pht, α P-hXaa-OMe **3A** et **4A** en n'effectuant aucune purification intermédiaire à l'exception de simples évaporations entre les différentes étapes. Les résultats sont rassemblés dans le schéma 17 et le tableau 5.

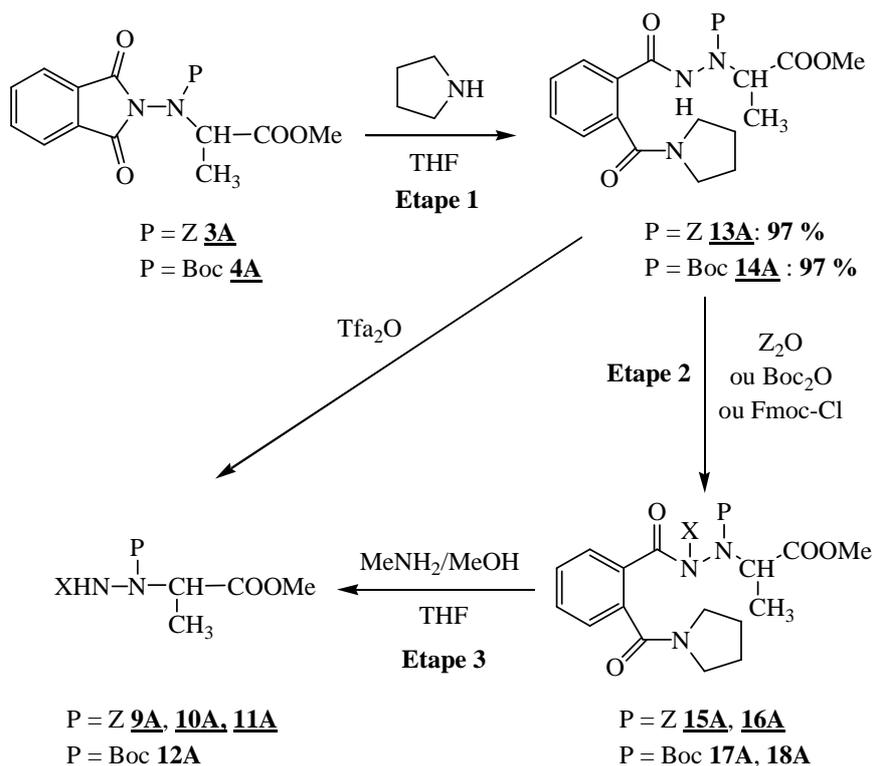


Schéma 17

Essai	P	X	Etape 2		Rdt Etape 3 % ^(b)	Rdt « one pot » % ^(c)
			Conditions	Rdt % ^(a)		
1	Z	Boc	Boc ₂ O, DMAP _{cat} , THF 4 heures	<u>15A</u> : 93	<u>9A</u> : 85	<u>9A</u> : 71
2		Z	Z ₂ O, DMAP _{cat} , THF 12 heures	<u>16A</u> : 98	<u>10A</u> : 70	<u>10A</u> : 64
3		Tfa	Tfa ₂ O à 0°C 12 heures	/	<u>11A</u> : 71	<u>11A</u> : 71
4	Boc	Boc	Boc ₂ O, DMAP _{cat} , THF 4 heures	<u>17A</u> : 99	<u>12A</u> : 75	<u>12A</u> : 33
5		Z	Z ₂ O, DMAP _{cat} , THF 4 heures	<u>18A</u> : 90	0	0
6		Tfa	Tfa ₂ O à 0°C 170 heures	0 ^l	0	0
7 et 8	Boc et Z	Fmoc	Fmoc-Cl, DMAP _{cat} , THF 170 heures	0	0	0

(a) rendements calculés à partir de 13A ou 14A (b) rendements calculés à partir des composés 15 ou 16 ou 17 ou 18A (c) rendement calculé à partir de 3A ou 4A.

Tableau 5

Les composés d'ouverture 13A et 14A sont obtenus avec d'excellents rendements à partir de 3A et 4A. Comme nous l'avons prévu, la pyrrolidine n'est pas assez nucléophile

pour réagir de façon intramoléculaire et éliminer le motif aromatique. Ce qui nous a permis d'isoler les intermédiaires **15A**, **16A**, **17A**, **18A**, stables et caractérisables, et qui par action de méthylamine conduisent directement aux produits monoprotégés **9A**, **10A**, **12A** avec de bons rendements.

De même que pour la méthode A, nous n'avons pas réussi à transprotéger le groupement phthalimide par le groupement Fmoc en utilisant la méthode B. Les produits de départ **3A** et **4A** ont été intégralement récupérés et ce quel que soit le protocole utilisé.

Pour X=Tfa, le composé **11A** est obtenu directement, le composé intermédiaire n'ayant jamais été observé. Cela peut s'expliquer par la présence du motif COCF_3 très attracteur qui facilite l'attaque d'un nucléophile (CF_3COO^- et/ou pyrrolidine) sur le carbonyle adjacent conduisant directement à la formation du composé **11A** selon le schéma 18.

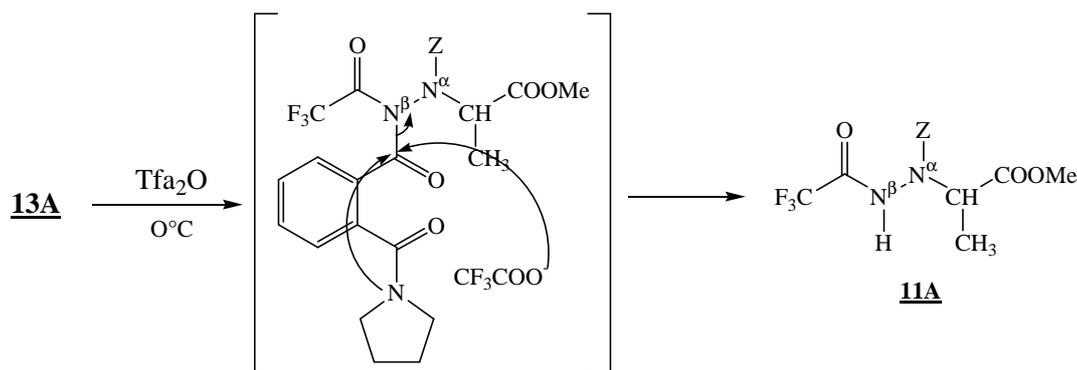


Schéma 18

Nous avons observé, de plus une différence de réactivité entre les composés **15A** et **16A**, suivant la nature du groupement protecteur (Boc ou Z) porté par l'atome d'azote β . En effet, lors de la synthèse du composé **10A** à partir de **16A**, nous avons constaté la formation du produit **13A** avec un rendement de 30 %, qui s'explique par une attaque nucléophile de la méthylamine sur le carbonyle du Z du composé selon le mécanisme donné dans le schéma 19. Ce mécanisme a pu être conforté par l'isolement et la caractérisation du benzylméthylcarbamate (ZNHMe), sous-produit de la réaction.

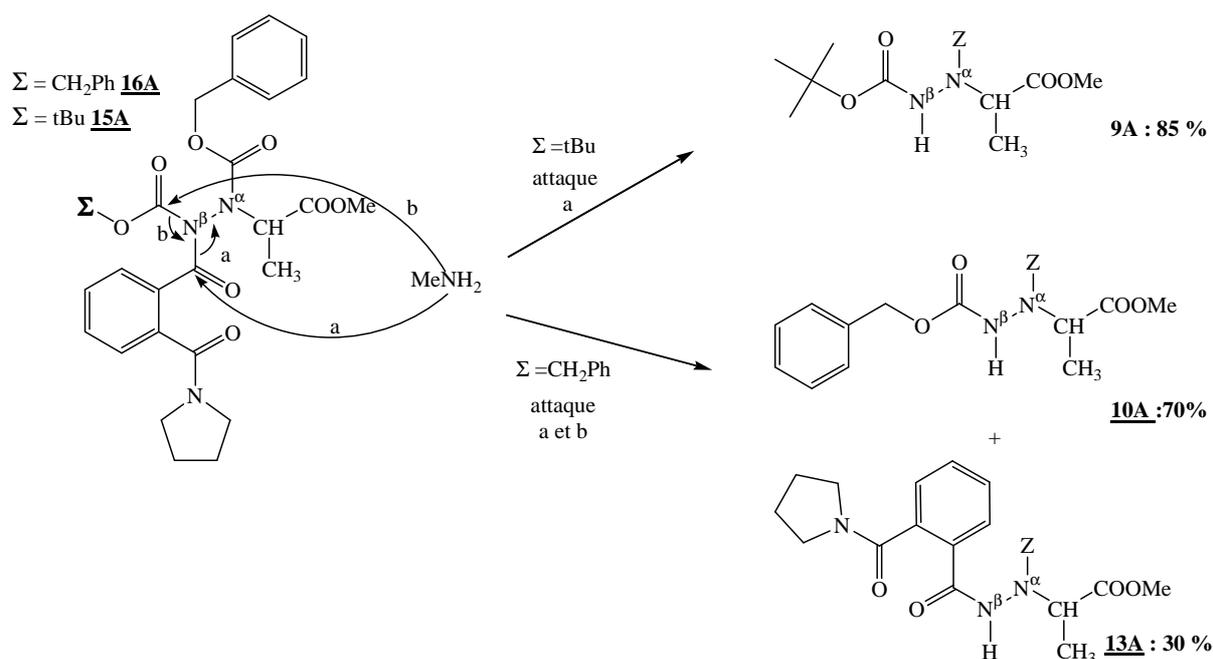


Schéma 19

Pour $\Sigma = \text{tBu}$ (protection Boc), la méthylamine réagit avec le carbonyle de la fonction hydrazide pour conduire uniquement à la formation du produit **9A** attendu (*attaque a*). Par contre, dans le cas de $\Sigma = \text{CH}_2\text{Ph}$ (protection Z) la formation minoritaire de **13A** peut s'expliquer par un encombrement stérique moindre du groupement protecteur Z (comparé au groupement Boc) permettant l'attaque nucléophile de la méthylamine sur le carbonyle de la fonction uréthane (*attaque b*).

Cette hypothèse pourrait également expliquer le fait que nous n'ayons pas pu obtenir le composé $\beta\text{Z},\alpha\text{Boc-hAla-OMe}$ et ce quelle que soit la méthode utilisée (A ou B), la présence du groupement Boc en N^α défavorisant l'attaque a au profit de l'attaque b (Schéma 20).

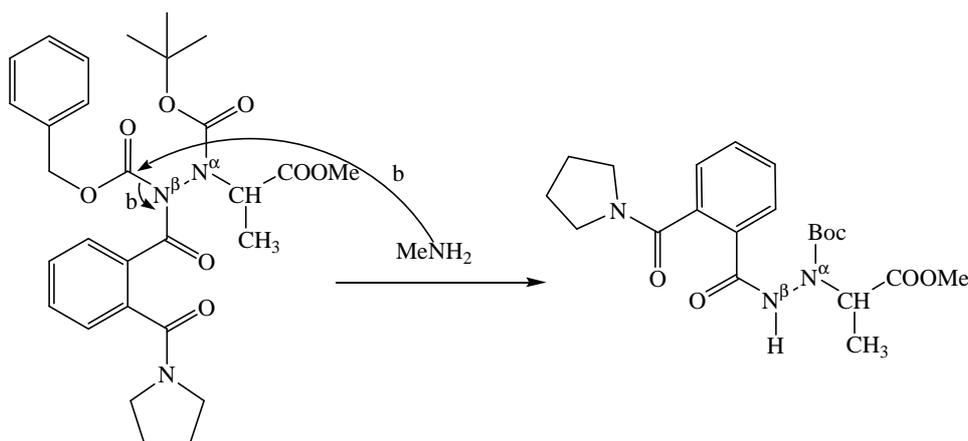


Schéma 20

III.1.3. Conclusion

Au cours de cette étude exploratoire réalisée à partir des composés **3A** et **4A**, deux méthodes de transprotection du motif phtalimide en groupement Boc ont été développées et étendues, dans certains cas, aux groupes protecteurs Z et Tfa. Ces deux méthodes A et B diffèrent par la classe de l'amine utilisée dans le protocole. Contrairement à la méthode A, la méthode B permet d'isoler directement les composés **9-12** monoprotégés sur l'atome d'azote β et peut être appliquée à des quantités importantes de substrats, les purifications étant simplifiées. C'est donc cette méthode que nous avons retenue et appliquée aux composés **3**.

III.2. Généralisation de la méthode de transprotection

Nous avons, dans un premier temps, réalisé la réaction de transprotection du motif phtalimide selon le schéma 21 en isolant et caractérisant les intermédiaires réactionnels. Dans un deuxième temps, la synthèse a été réalisée en un seul ballon à partir des composés **3**. L'ensemble des résultats est rassemblé dans le tableau 6.

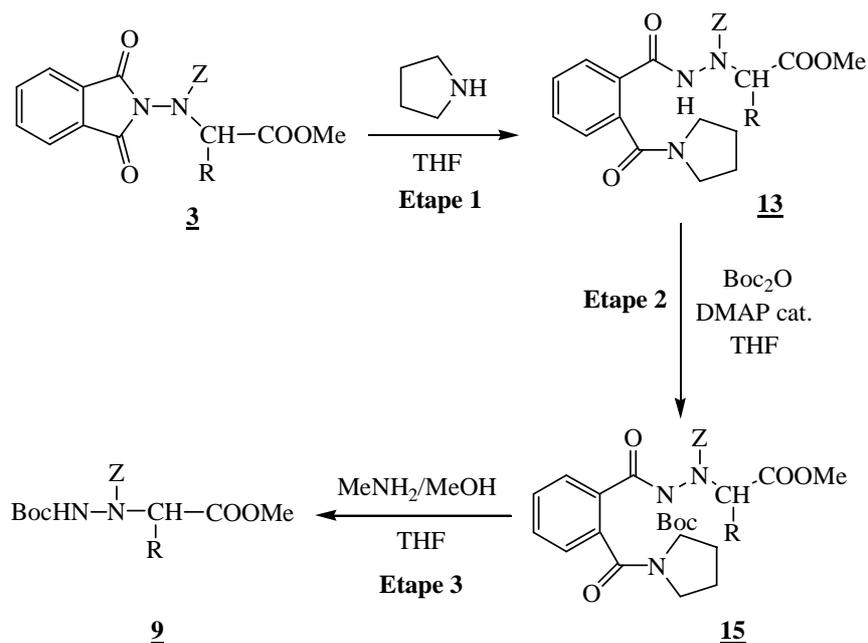


Schéma 21

Essai	P	R	Rdt Etape 1 % ^(a)	Rdt Etape 2 % ^(b)	Rdt Etape 3 % ^(c)	Rdt Global % ^(a)	Rdt One pot % ^(a)
1		-H	13G : 99	15G : 96	9G : 96	9G : 91	9G : 77
2		-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	13I : 63	15I : 81	9I : 74	9I : 38	9I : 70
3	Z	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	13L : 100	15L : 83	9L : 83	9L : 69	9L : 52
4		-CH ₂ Ph	13F : 79	15F : 76	9F : 72	9F : 43	9F : 71
5		-CH(CH ₃) ₂	13V : 65	15V : 70	9V : 93	9V : 42	9V : 66

(a) rendements calculés à partir des composés **3**, (b) rendements calculés à partir des composés **13**, (c) rendements calculés à partir des composés **15**.

Tableau 6

Les rendements en composés **9** sont bons quelle que soit la nature de la chaîne latérale (65 à 100 %). Il est à noter que la procédure en « un seul ballon » permet souvent d'améliorer le rendement global de la transformation.

III.3. Préparation des βFmoc,αZ-hXaa-OMe

Les méthodes décrites précédemment ne nous ont pas permis de synthétiser les hydrazinoesters protégés par un groupement Fmoc en N^β. Par conséquent, nous nous sommes tournés vers une stratégie indirecte, à partir des composés **9**, impliquant une déprotection du groupement Boc suivie d'une protection par un motif Fmoc selon les conditions rassemblées dans le schéma 22.

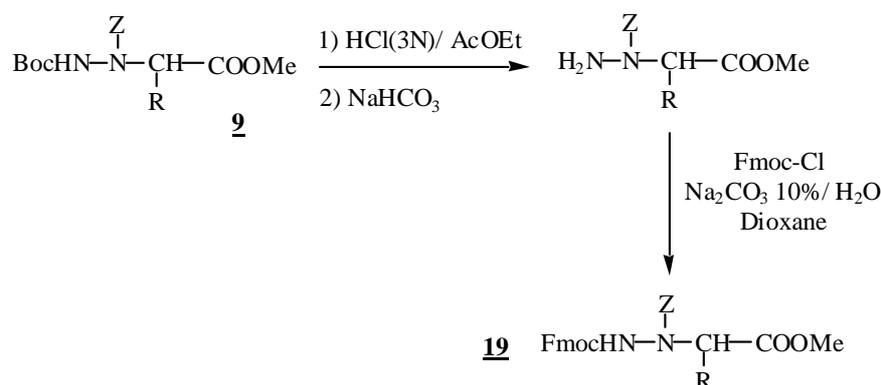


Schéma 22

Après purification sur colonne de silice, les composés **19A** et **19G** ont été obtenus avec des rendements de 75 et 98% respectivement. Les autres composés **19** de la famille (**19I**, **19F**, **19V**), ont été synthétisés selon la même procédure, mais leur purification par chromatographie s'est avérée plus problématique et l'obtention de produits purs impossible (dégradation sur silice).

Une alternative efficace à la méthode décrite précédemment pour l'introduction du motif Fmoc a consisté en l'utilisation d'un réactif supporté décrit dans la littérature^[14]. Le motif Fmoc est fixé sur le support solide (résine HOBt-PS) par formation d'une liaison carbonate. L'α-hydrazinoester (préalablement déprotégé en N^β) réagit par son extrémité NH₂ libre avec le motif Fmoc pour former l'α-hydrazinoester βFmoc,αZ-hAla-OMe pur **19A** en solution (Schéma 23).

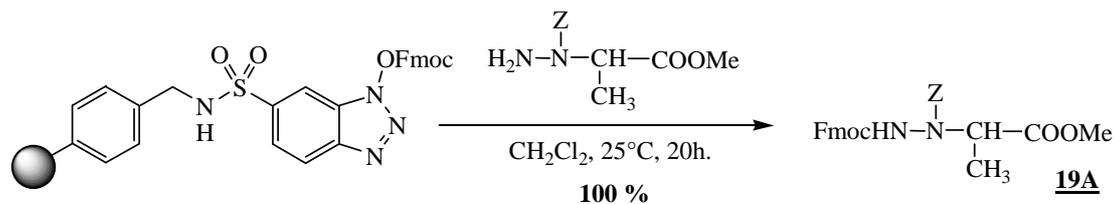


Schéma 23

Cette méthode a de nombreux avantages par rapport à la synthèse en solution. Elle permet d'obtenir un rendement quantitatif sans purification ultérieure. Cependant compte tenu du prix de la résine cette méthode n'a pas été retenue pour la suite de l'étude.

III.4. Conclusion

Nous avons montré au cours de ce paragraphe qu'il est possible de synthétiser des α-hydrazinoesters, dérivés des acides aminés correspondants, orthogonalement protégés par un groupement Z sur l'azote α et par un groupement Fmoc ou Boc sur l'azote β, et cela avec de bons rendements.

Pour répondre aux objectifs que nous nous étions fixés, à savoir la préparation d'α-hydrazinoacides, il nous restait à mettre au point des conditions de déprotection de la fonction acide carboxylique.

IV. Déprotection de la fonction acide

Dans le but d'utiliser les α-hydrazinoesters en tant que synthons dans un couplage peptidique il était nécessaire de libérer leur fonction acide carboxylique et donc de définir des conditions réactionnelles de déprotection compatibles avec la présence des motifs protecteurs de l'atome d'azote β (motifs Boc labile en milieu acide ou Fmoc en milieu basique).

IV.1. Cas des β Boc (ou Z ou Tfa)-hydrazinoesters

Afin de déterminer les meilleures conditions d'hydrolyse de la fonction ester, nous avons effectué une étude systématique, utilisant des conditions décrites dans littérature⁵³⁻⁵⁵, visant à faire varier la nature de la base, le solvant et les protocoles d'extraction. Cette étude a été effectuée sur le composé **9A** (Schéma 24).

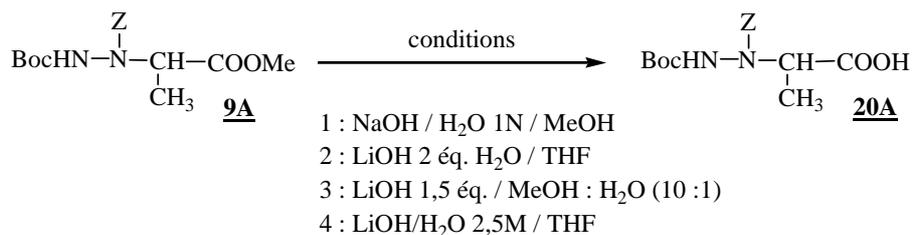


Schéma 24

Les conditions 1 à 3 nous ont bien permis d'obtenir l' α -hydrazinoacide **20A** correspondant, mais avec une pureté médiocre. De plus, toutes les tentatives de purifications envisagées (extraction liquide-liquide, chromatographie) ont abouti à la dégradation du produit. Par contre les conditions 4, mettant en jeu l'hydroxyde de lithium à 2,5M dans H₂O et le THF, nous a permis d'obtenir l' α -hydrazinoacide pur après extraction. Nous avons alors appliqué ce protocole aux autres α -hydrazinoesters. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 7.

<i>Essai</i>	<i>P</i>	<i>X</i>	<i>-R</i>	<i>Rdt %^(a)</i>
1	Z	Boc	-CH ₃	<u>20A</u> : 83
2			-H	<u>20G</u> : 98
3			-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	<u>20I</u> : 70
4			-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	<u>20L</u> : 80
5			-CH ₂ Ph	<u>20F</u> : 81
6			-CH(CH ₃) ₂	<u>20V</u> : 75
7		Z	-CH ₃	<u>21A</u> : 98
8		Tfa	-CH ₃	<u>22A</u> : 98
9	Boc	Boc	-CH ₃	<u>23A</u> : 99

(a) Rendements calculés par rapport aux hydrazinoesters de départ.

Tableau 7

Quelle que soit la nature des groupes protecteurs et de la chaîne latérale, les α -hydrazinoacides ont été isolés avec une bonne pureté et d'excellents rendements.

IV.2. Cas des β Fmoc-hydrazinoesters

Le groupement protecteur Fmoc étant très sensible au milieu basique, les conditions réactionnelles définies pour les composés protégés en N ^{β} par un groupement Boc ne sont pas utilisables. Il nous a donc fallu mettre point des conditions spécifiques de déprotection de la fonction acide compatibles avec ce groupe protecteur.

IV.2.1. Hydrolyse enzymatique

Nous avons envisagé dans un premier temps l'utilisation d'enzymes. En effet, la biocatalyse est généralement hautement sélective de part l'étape préalable de reconnaissance du substrat par l'enzyme mais aussi des conditions opératoires et de la nature du milieu dans laquelle se déroule la transformation. A cela s'ajoutent des conditions expérimentales (température, pression) généralement douces, limitant ainsi les risques de dégradations.

Parmi les différentes lipases disponibles, notre choix s'est porté dans un premier temps sur le Novozym 435. Cette enzyme a déjà fait preuve de son efficacité pour catalyser l'hydrolyse d'esters de structures chimiques très diverses⁵⁶⁻⁶⁰. Cette enzyme présente une grande stabilité vis-à-vis des hautes températures et des milieux organiques et existe sous forme supportée ce qui facilite son utilisation.

Une étude systématique qui n'est pas reportée ici, a été réalisée à partir du Z-Ala-OMe visant à faire varier les différentes conditions expérimentales : solvant, température, temps, pression. Les meilleurs résultats ont été obtenus à 50°C sous 400 mbar, dans un mélange 20 % THF ou dioxane et 80 % de tampon phosphate après 4 heures de réaction.

Dans un premier temps, nous avons appliqué ces conditions aux α-hydrazinoesters βFmoc,αZ-hXaa-OMe dérivés de la glycine (**19G**) et de l'alanine (**19A**) (Schéma 25).

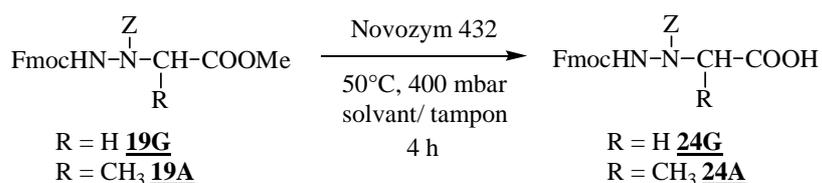


Schéma 25

Dans le cas de l'hydrazinoglycine **19G**, l'hydrolyse est possible dans les conditions réactionnelles retenues avec un excellent rendement de 90% (rendement déterminé par RMN). Par contre, les mêmes conditions réactionnelles appliquées au dérivé de l'alanine (**19A**, R=Me) ont conduit à un rendement inférieur à 5% après 3 jours de réaction. D'après ces résultats, il semble que la nature de la chaîne latérale de l'hydrazinoester joue un rôle primordial dans le phénomène de reconnaissance enzymatique. Compte tenu de ces observations, le biocatalyseur (Novozym) semble ne pas être le plus adapté pour l'hydrolyse de nos substrats. Pour la suite de l'étude nous avons alors testé d'autres enzymes.

IV.2.2. Autres biocatalyseurs

Une étude exploratoire a été menée à partir d'un α-hydrazinoester (βBoc,αZ-hLeu-OMe) afin de déterminer les conditions optimales d'hydrolyse en fonction de

la nature du catalyseur et du solvant de réaction. Une étude qualitative a été menée sur cinq enzymes commercialement disponibles dont 4 lipases (Lipozyme, lipase pancréatique porcine, lipase de *Pseudomonas cepacia* et Novozym 435) et une estérase de foie de porc.

Seules deux réactions ont conduit à la formation du produit d'hydrolyse détecté par RMN : le Lipozym, enzyme immobilisée de la lipase de *Mucor miehei* et la lipase de *Pseudomonas cepacia*. Compte tenu de ce résultat, mais aussi de la différence de prix d'achat des deux catalyseurs, le Lipozym a été retenu pour la suite de l'étude.

Une étude a été réalisée pour tenter de définir les meilleures conditions d'hydrolyse de β Boc, α Z-hLeu-OMe par le Lipozym. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 8:

<i>essai</i>	<i>solvant</i>	<i>Masse d'enzyme</i>	<i>Rdt en %^(a)</i>
1	THF	100 mg	18
2	Dioxane	100 mg	21
3	M ₂ B ₂	100 mg	25
4	M ₂ B ₂	200 mg	25

(a) rendements calculés à partir de l'hydrazinoester de départ et déterminés par RMN

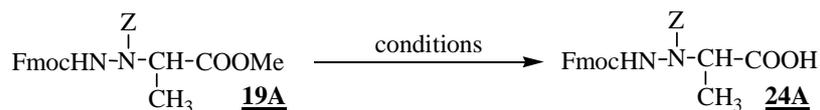
Tableau 8

Le Lipozym conduit bien à l' α -hydrazinoacide. Cependant quelle que soit la nature du solvant utilisé, les rendements réactionnels sont relativement faibles et varient de 18 à 25%. Il est donc intéressant de souligner que, dans le cas du Lipozym et contrairement au Novozym précédemment décrit, la nature du co-solvant organique semble jouer un rôle mineur dans l'évolution de la réaction. On constate néanmoins que le meilleur résultat est obtenu en utilisant le M₂B₂.

Nous avons étudié la faisabilité de la réaction d'hydrolyse biocatalysée des hydrazinoesters. L'hydrolyse enzymatique du dérivé de la glycine protégé par un groupement Fmoc a pu être réalisée avec un excellent rendement. Cependant, nous n'avons pas pu, à ce jour, généraliser avec succès cette réaction aux autres acides aminés de l'étude. Des études ultérieures d'optimisation seront nécessaires afin de définir les conditions opératoires les plus adaptées pour cette réaction. Nous nous sommes alors dirigés vers une méthode par voie chimique.

IV.2.3. Saponification

Le groupement Fmoc étant fragile et labile en milieu basique, il nous fallait définir des conditions de saponification adaptées. Pour cela, nous avons effectué une étude systématique en utilisant des méthodes décrites dans la littérature^{53-55,61-63}, visant à faire varier les conditions (solvant et temps de réaction). Les conditions sont rassemblées dans le schéma 26.



- 1 : NaOH / MeOH ; 0°C ; 2 h
- 2 : LiOH 0,2M THF ; 0°C ; 30 min
- 3 : 3 % Na₂CO₃ / CH₃CN ; T.A. ; 15 h
- 4 : 2,5M NaOH/TH ; 0°C ; 5 min
- 5 : HCl / dioxane ; reflux ; 6h
- 6 : NaOH 1,2 éq. 0,8M CaCl₂ dans iPrOH/H₂O (7: 3); T.A.; 4h
- 7 : NaOH 1,2 éq. 0,8M CaCl₂ dans iPrOH/H₂O (7: 3); T.A.; 7h

Schéma 26

Les méthodes 1 à 4 conduisent majoritairement à la déprotection du motif ester accompagnée de celle du groupe Fmoc. La méthode 5 nous a permis d'obtenir l'α-hydrazinoacide **24A** avec une pureté médiocre. Les méthodes 6 et 7 nous ont permis d'obtenir le composé **24A** avec respectivement 75% et 98% de rendement. Les conditions 7⁶³ ont également été appliquées au composé **19G** (βFmoc,αZ-hGly-OMe) et l'α-hydrazinoacide correspondant **24G** a été obtenu avec un rendements de 96 %.

IV.3. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons mis au point des conditions de saponification permettant la synthèse efficace d'α-hydrazinoacides orthogonalement protégés par un groupement Z sur l'azote α et par un groupement Fmoc ou Boc sur l'azote β.

V. Synthèse des monomères sur support solide

La synthèse sur support solide de petites molécules organiques suscite un intérêt grandissant. En effet, cette technique facilite la synthèse rapide d'un grand nombre de produits en un temps court.

Compte tenu de l'intérêt que peuvent présenter les α -hydrazinoacides ainsi que de la possibilité de faire varier plusieurs points de diversité (nature de la chaîne latérale et des différents groupements protecteurs), il nous a semblé intéressant de transposer les méthodes de synthèse décrites précédemment à la synthèse supportée. De plus, l'étape clé de la synthèse est, comme nous l'avons décrit plus haut, une condensation de Mitsunobu qui conduit à la formation de sous-produits en grande quantité, ce qui complique l'étape de purification lors de la synthèse en milieu homogène et rend donc particulièrement attrayante une stratégie de synthèse sur support solide.

Deux stratégies, représentées dans le schéma 27, ont été envisagées. Elles diffèrent par le mode d'ancrage de l'un des partenaires de la réaction de Mitsunobu : le motif aromatique de groupement phtalimide du partenaire acide^{64,65} (Voie 1) ou le motif acide carboxylique de l' α -hydroxyacide⁶⁶ (Voie 2).

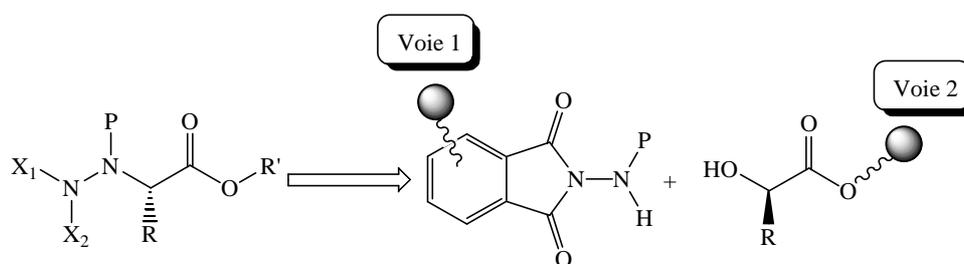
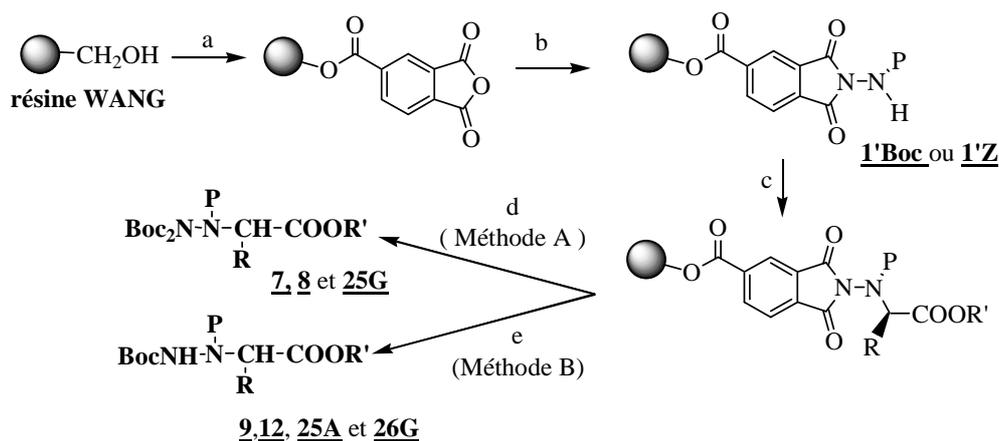


Schéma 27

V.1. Synthèse supportée d' α -hydrazinoacides par la voie 1

Cette synthèse a été réalisée à partir d'anhydride phtalique supporté obtenu par greffage de l'anhydride triméllitique sur une résine Wang (Schéma 28).



a) anhydride trimellitique (3 éq.), PPh₃ (3 éq.), DIAD (3 éq.), THF ; b) i. ZHNNH₂ ou BocHNNH₂ (3 éq.), THF ; ii. DCC (3 éq.), HOBT (3 éq.), THF ; c) RCH(OH)COOR' (3 éq.), PPh₃(3 éq.), DIAD (3 éq.), THF ; d) *Méthode A* : i. MeNH₂ (4 éq.), THF ; ii. Boc₂O (4 éq.), DMAP cat. ; e) *Méthode B* : i. pyrrolidine (4 éq.), THF ; ii. Boc₂O (4 éq.), DMAP (cat.) THF ; iii. MeNH₂ (4 éq.), THF.

Schéma 28

Les partenaires acides **1'Boc** et **1'Z**, analogues supportés des composés **1Boc** et **1Z** déjà cités, sont obtenus en deux étapes par addition de trois équivalents de carbazate sur l'anhydride supporté suivie d'une réaction de cyclisation impliquant du DCC-HOBT. La réaction de Mitsunobu est réalisée en utilisant 3 éq. du partenaire acide, de DIAD et de PPh₃ dans du THF comme solvant. Enfin, les réactions de transprotection du motif phtalimide décrites précédemment ont été mises à profit pour définir deux nouvelles méthodes de relargage originales et réalisables dans des conditions particulièrement douces permettant la préparation des α-hydrazinoesters bis protégés **7A**, **7G**, **8A**, **8G** et **25G** (méthode A) ou monoprotégés **9**, **12**, **26A** et **27G** (méthode B).

Les produits de réaction sont obtenus après simple évaporation du solvant. Dans le cas de la méthode A, une purification rapide sur colonne chromatographique est réalisée afin d'éliminer l'excès de Boc₂O.

Une série d'α-hydrazinoesters a été préparée en utilisant ces deux voies réactionnelles⁶⁷; ces synthèses permettent de gérer 3 points de diversité :

- la chaîne latérale de l'hydroxyester **R**
- la nature du groupe ester **R'**
- la nature du groupe protecteur **P** porté par l'azote α

Le tableau 9 rassemble les résultats obtenus.

<i>Essai</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>R'</i>	<i>Méthode</i>	<i>Rdt %^(a)</i>
1	Z	-CH ₃	CH ₃	A	<u>7A</u> : 62
2		-H	CH ₃		<u>7G</u> : 56
3		-H	CH ₂ Ph		<u>25G</u> : 55
4	Boc	-CH ₃	CH ₃		<u>8A</u> : 35
5	Z	-CH ₃	CH ₃	B	<u>9A</u> : 84
6		-CH ₃	CH ₂ CH ₃		<u>26A</u> : 80
7		-H	CH ₃		<u>9G</u> : 63
8		-H	CH ₂ Ph		<u>27G</u> : 65
9		-CH ₂ Ph	CH ₃		<u>9F</u> : 58
10	Boc	-CH ₃	CH ₃		<u>12A</u> : 40

(a) Les rendements sont calculés à partir du taux de substitution de la résine et la pureté des produits a été vérifiée par RMN et CCM.

Tableau 9

Pour P = Z et quelle que soit la nature de R et R', les rendements après 5 étapes varient de 55 à 80% ce qui correspond à un rendement par étape compris entre 89 et 96 %. Ces rendements sont sensiblement identiques à ceux obtenus en phase liquide.

Par contre, lorsque P = Boc plus encombré, les rendements sont plus faibles et varient de 35 à 40%. Ce qui est inférieur d'environ 20 % à ceux obtenus en phase liquide mais qui donne un rendement moyen pour chaque étape de 81 à 83 %. Ce résultat suggère une fois de plus que la réaction de Mitsunobu est sensible à l'encombrement stérique des réactifs mais aussi à celui du support.

V.2. Synthèse supportée d' α -hydrazinoacides par la voie 2

La seconde stratégie envisagée consiste à greffer l' α -hydroxyacide sur le support solide par sa fonction acide carboxylique terminale et d'y condenser le partenaire acide de la réaction de Mitsunobu (**1Z**). Cette voie réactionnelle qui, contrairement à la *voie 1*, est

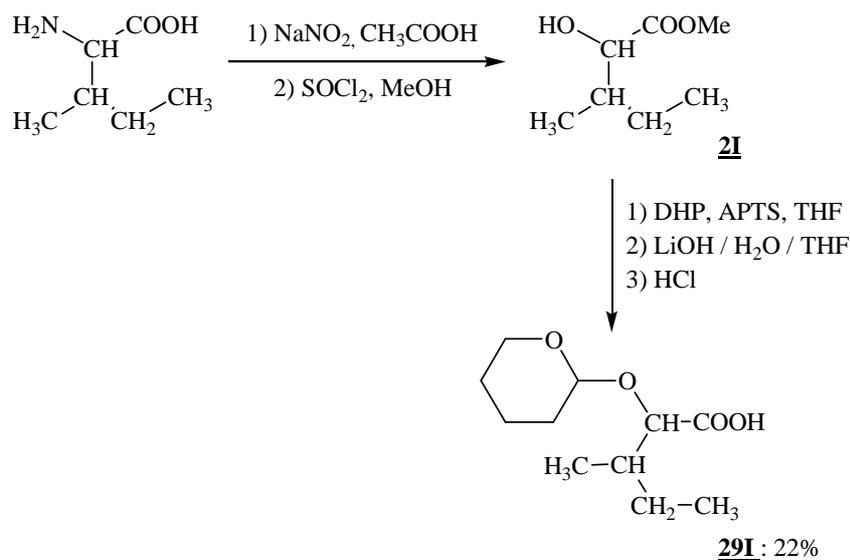
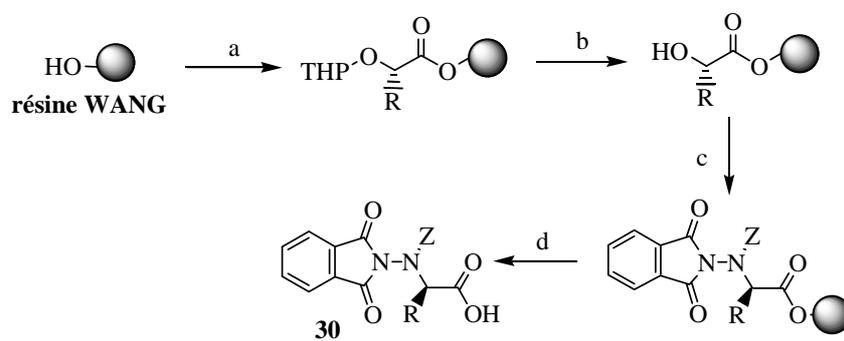


Schéma 30

A partir des α -hydroxyacides protégés **29**, la synthèse supportée d' α -hydrazinoacides **30** a été réalisée selon le schéma 31 donné ci-dessous.



a) THPOCH(R)COOH **29** (3 éq.), DIC (3 éq.), DMAP (cat.), THF; b) APTS, CH₂Cl₂/MeOH 97/3; c) PhN-NHZ (**1Z**) (3 éq.), PPh₃ (3 éq.), DIAD (3 éq.), THF ; d) TFA/CH₂Cl₂ 1/1.

Schéma 31

Les composés **29** ont été greffés sur la résine Wang en utilisant le DIC comme agent de couplage. Le motif THP a été déprotégé par action d'APTS dans le DCM. La réaction de Mitsunobu a été réalisée en utilisant le composé **1Z** comme partenaire acide et les α -hydrazinoacides phtaloylés **30** sont isolés après décrochage par un mélange TFA-DCM 1/1. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 11.

<i>Essai</i>	<i>R</i>	<i>Rdt %^(a)</i>
1	-CH ₃	30A :85
2	-H	30G : 71
3	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	30L : 45
4	-CH ₂ Ph	30F : 51
5	-CH(CH ₃) ₂	30V : 56
6	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	30I : 25

(a). Les rendements sont calculés à partir du taux de substitution de la résine.

Tableau 11

Nous avons obtenu une pureté de 95% vérifiée par RMN sans aucune étape de purification et avec des rendements variant de 25 à 85%. Nous avons estérifié le composé **30A**, afin de pouvoir le comparer avec le composé **3A** ainsi nous avons pu vérifier sur cet exemple le rendement et la pureté de nos synthèses.

Il est à noter que cette stratégie permet la préparation directe d' α -hydrazinoacides phtaloylés que nous n'avions pas pu isoler précédemment à partir des composés **3**. En effet, la saponification ou l'hydrolyse des composés **3** n'est pas compatible avec la présence du motif phtalimide.

Cette stratégie de synthèse semble donc ouvrir des perspectives tout à fait prometteuses, non seulement pour la synthèse supportée d' α -hydrazinoacides mais également d'hydrazinopeptides comme nous le montrerons ultérieurement (chapitre II).

VI. Conclusion

Les travaux menés au cours de cette étude avaient pour but la préparation d' α -hydrazinoacides orthogonalement protégés et utilisables en synthèse peptidique.

Nous avons montré que la méthode de transprotection définie préalablement au laboratoire et permettant la transformation dans des conditions douces d'un groupe phtalimide en groupe Boc pouvait être appliquée aux α -hydrazinoesters β Pht, α P-Xaa-OMe **3** et **4**. Cette méthode a été étendue à d'autres groupements protecteurs et améliorée. Les α -hydrazinoesters

porteurs d'un groupe protecteur Fmoc β Fmoc, α Z-hXaa-OMe **19** ont été isolés par une méthode indirecte en deux étapes : déprotection du Boc et introduction du groupement Fmoc.

Nous avons mis au point des méthodes de saponification efficaces et compatibles avec la présence des groupements protecteurs Boc ou Fmoc qui nous ont permis d'isoler les α -hydrazinoacides β Boc, α Z-hXaa-OH **20** et β Fmoc, α Z-hXaa-OH **24**.

Les méthodes décrites ont été transposées à la synthèse supportée ; nous avons ainsi défini deux protocoles de synthèse d' α -hydrazinoacides et d' α -hydrazinoesters qui diffèrent par le mode d'ancrage du substrat sur la matrice polymère. Ces stratégies originales simplifient considérablement les techniques de synthèse et permettent la préparation aisée de petites bibliothèques de produits.

Nous avons réussi à synthétiser une série d' α -hydrazinoacides orthogonalement protégés utilisables en synthèse peptidique sur phase solide aussi bien en stratégie Boc qu'en stratégie Fmoc.

CHAPITRE II :
ETUDE DE LA REACTIVITE DES α -HYDRAZINOACIDES EN
SOLUTION ET SUR PHASE SOLIDE
APPLICATION A LA SYNTHESE D' α -HYDRAZINOPEPTIDES

I. Rappels sur la synthèse peptidique

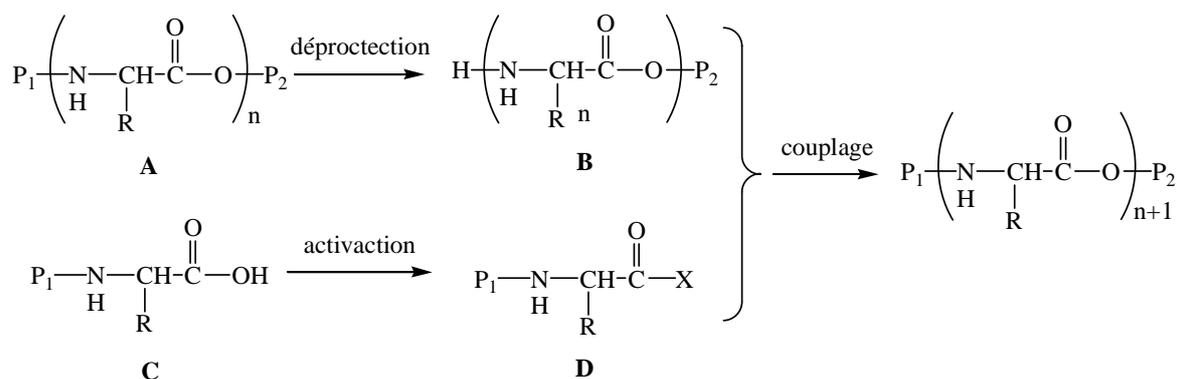
Afin de faciliter la compréhension de ce chapitre, nous allons procéder à un rappel des réactions les plus courantes utilisées en synthèse peptidique en phase liquide et sur support solide, ainsi que les méthodes de suivi des réactions en phase solide.

I.1. Généralités sur la synthèse peptidique en solution

I.1.1. Définitions

Un peptide est un polymère d'acides aminés reliés entre eux par une liaison peptidique. Par convention, on écrit les peptides en plaçant à gauche l'extrémité *N*-terminale et à droite leur extrémité *C*-terminale. Chaque liaison peptidique est obtenue en trois étapes (Schéma 32):

- déprotection du peptide **A**, libérant la fonction amine **B** ;
- activation de l'acide aminé **C** en intermédiaires réactifs **D** ;
- couplage entre **B** et **D**



P_1 : groupe amino-protecteur ; P_2 : groupe bloquant le carboxyle ; X : groupe partant

Schéma 32

L'allongement de la chaîne peptidique du côté *N*-terminal est ainsi réalisé par l'ajout d'un acide aminé (synthèse pas à pas), ce qui permet de limiter la racémisation pendant l'étape d'activation-couplage (*vide infra*).

La protection des fonctions non réagissantes est réalisée au moyen de groupes protecteurs appropriés. Les fonctions carboxyles sont bloquées sous formes d'esters (P_2). Les groupes amino-protecteur (P_1), très nombreux, visent à transformer l'amine primaire en amine plus substituée, en amide ou, le plus souvent, en uréthane. De ce dernier type citons les groupes Boc, Z et Fmoc. Le choix des conditions opératoires permet d'effectuer une déprotection sélective de chacun de ces groupes.

I.1.2. Méthode de couplage

Afin de procéder au couplage, le carboxyle de l'acide aminé *N*-protégé peut être activé sous différentes formes. Selon la méthode utilisée, l'intermédiaire activé est ou n'est pas isolé. Différentes procédures de couplage peptidique sont employées ; nous nous limiterons aux méthodes les plus utilisées.

I.1.2.1. Réaction de Curtius

La première réaction de couplage respectant la chiralité des acides aminés a été mise au point par Curtius (Schéma 33)⁶⁸. Cette méthode n'est plus guère utilisée de nos jours : la réaction est lente et génère de nombreux produits secondaires.

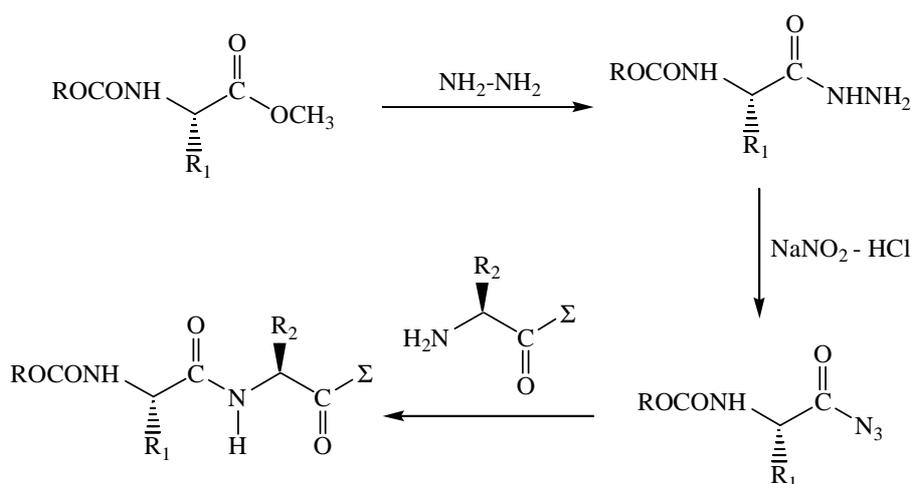


Schéma 33

I.1.2.2. Les anhydrides mixtes.

Les chloroformiates, le plus utilisé d'entre eux étant le chloroformiate d'isobutyle (ICF), conduisent en présence d'un acide carboxylique et d'une base comme la *N*-méthylmorpholine (NMM) à des anhydrides mixtes. Ces derniers ne sont pas isolés et réagissent *in situ* avec la fonction amine (Schéma 34)^{69,70}. C'est une méthode de couplage propre et efficace. Elle nécessite cependant d'être réalisée à -20°C pour la stabilité des anhydrides. A plus haute température on observe la formation irréversible d'esters.

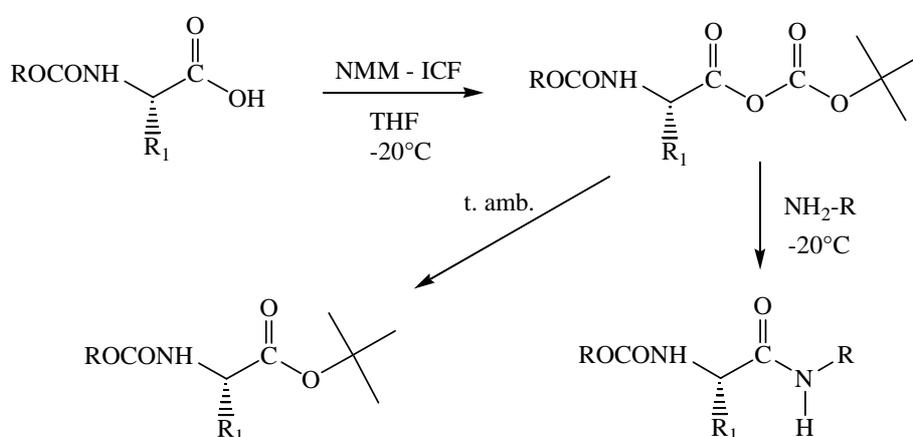


Schéma 34

Les anhydrides de Leuch ou *N*-carboxyanhydrides (NCAs)⁷¹⁻⁷³: ces composés constituent une catégorie intéressante d'anhydrides mixtes puisqu'ils comportent simultanément dans leur structure une fonction amine protégée sous forme de carbamate et une fonction acide activée sous forme d'anhydride. Ils sont donc potentiellement de très bons réactifs pour la synthèse peptidique. Les nucléophiles et notamment les amines réagissent sur la fonction acide activée du NCA (au niveau du carbone 5) et induisent l'ouverture du cycle générant ainsi un acide carbamique sur l'azote de l'acide aminé. L'acide carbamique ainsi formé est instable et se décarboxyle de façon spontanée pour donner naissance à une amine libre (Schéma 35).

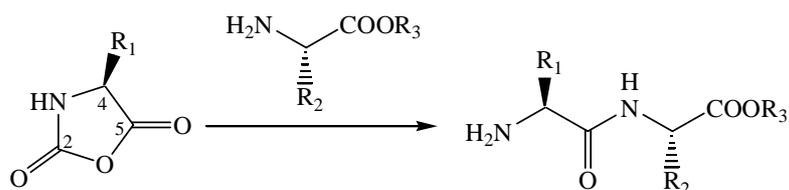


Schéma 35

Ces réactifs ne sont plus très utilisés aujourd'hui à cause d'un phénomène de polymérisation dû à la compétition d'attaque nucléophile entre l'amine désirée et celle générée après décarboxylation de l'acide carbamique⁷⁴. Mais grâce au développement d'un nouveau réactif, l'uréthane-NCA ou UNCA, les NCAs connaissent un nouvel intérêt en synthèse organique⁷⁵⁻⁷⁷ et peptidique⁷⁸. Il s'agit d'un *N*-carboxyanhydride dont l'azote est substitué par un groupement alkoxy-carbonyle. L'intérêt majeur de ce type de structure est de supprimer tout phénomène de polymérisation car après ouverture du cycle et décarboxylation, l'amine générée n'est pas libre comme dans le cas du NCA mais protégée sous forme de carbamate (Schéma 36).

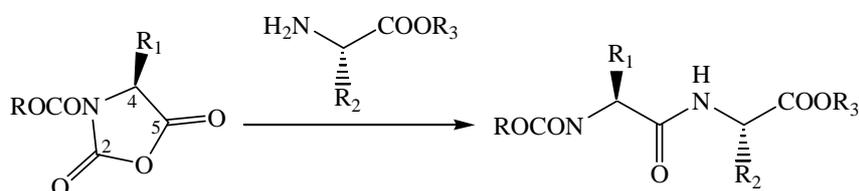


Schéma 36

I.1.2.3. Les carbodiimides

Les carbodiimides sont des agents de couplage très employés en synthèse peptidique. La plus connue est la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (figure 5)⁷⁹. Cette dernière génère une urée insoluble dans l'eau, la dicyclohexylurée (DCHU), qui ne s'élimine pas aisément. Pour cette raison son utilisation en phase liquide se trouve restreinte. La DCC est alors parfois remplacée par la 1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide [(EDC) ou WSC (Water Soluble Carbodiimide)] (Figure 5)⁸⁰ dont l'urée formée est soluble dans l'eau et peut être éliminée par lavage.

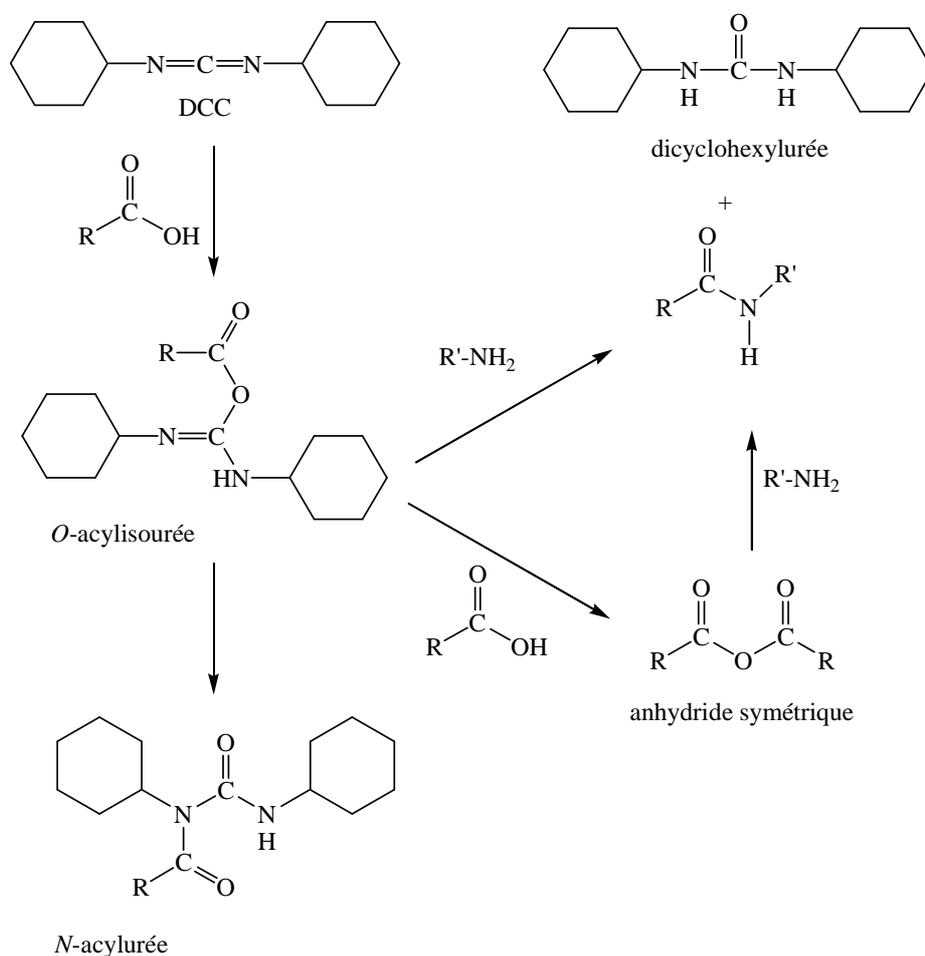


Schéma 37

Pour la minimiser, il convient d'ajouter des composés, comme le *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) qui vont réagir avec la *O*-acylisourée dès sa formation pour donner naissance à des intermédiaires moins réactifs⁸⁴. Ces derniers peuvent parfois être isolés et purifiés ; certains sont même commerciaux. On parle alors de méthode aux esters activés.

I.1.2.4. Les esters activés

Parmi les réactifs les plus couramment employés, on peut citer la *N*-hydroxysuccinimide (HOSu)⁸⁵, le *p*-nitrophénol (HONp)⁸⁶ et le pentafluorophénol (HOPfp)⁸⁷ (Figure 6).

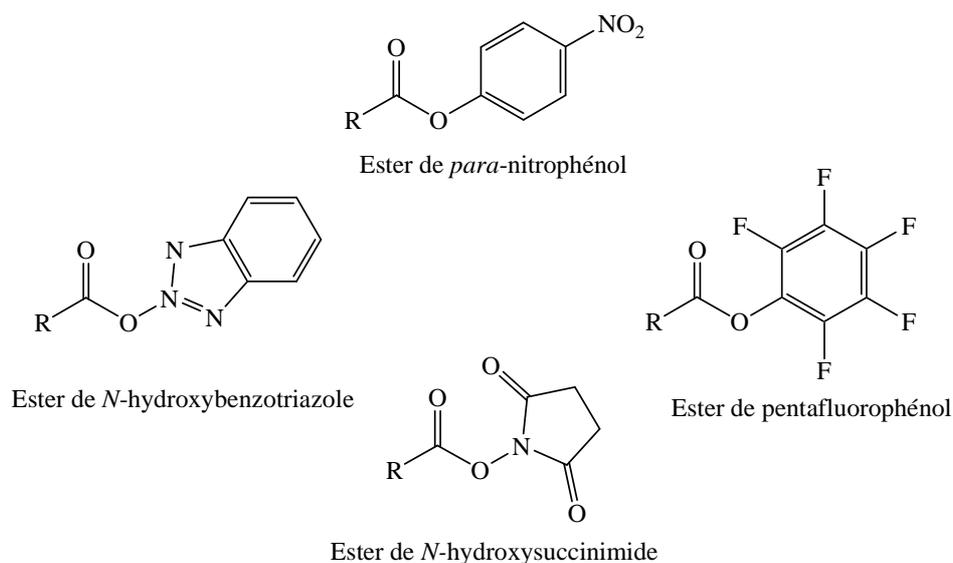


Figure 6

I.1.2.5. Les sels de phosphonium et d'uronium

Le plus connu est très certainement le réactif développé par Castro et coll., l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium ou BOP (Figure 7)⁸⁸⁻⁹⁰. Au cours du couplage, de l'hexaméthylphosphorotriamide (HMPT) potentiellement cancérigène est libéré. Par conséquent, l'utilisation du BOP est proscrite pour tout produit destiné à un usage thérapeutique. Il peut être remplacé par plusieurs autres réactifs dont le tétrafluoroborate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium ou TBTU⁹¹, le 2-(1*H*-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (HATU)^{92,93} (Figure 7). Les méthodes au TBTU et HATU sont très facilement mises en œuvre, ne demandent pas de précautions particulières et permettent d'atteindre des rendements satisfaisants avec des produits bruts relativement propres.

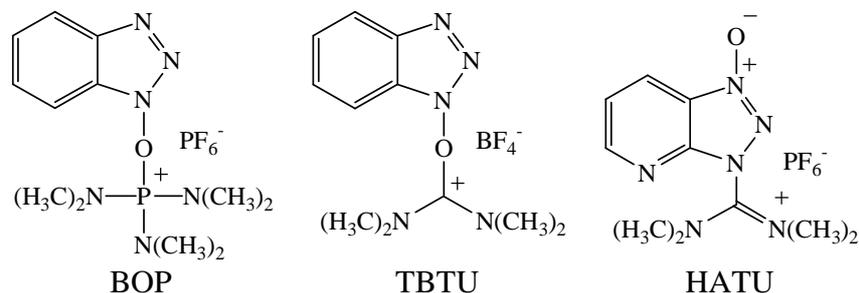


Figure 7

I.1.2.6. Les halogénures d'acides

Les chlorures d'acide, généralement obtenus par action du chlorure de thionyle⁹⁴⁻⁹⁶ (Schéma 38), sont de bons réactifs de couplage. Cependant, ils sont relativement peu utilisés en synthèse peptidique sur phase solide du fait de leur instabilité à température ambiante.

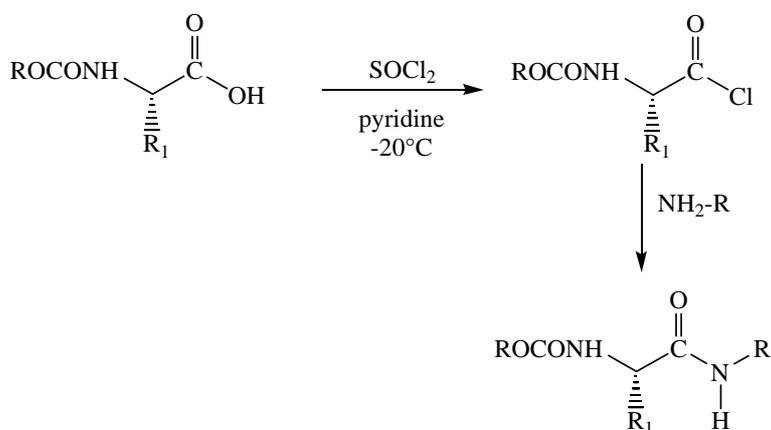


Schéma 38

Les fluorures d'acides peuvent être préparés par deux méthodes principales soit en utilisant comme agent fluorant le fluorure cyanuryle^{97,98} (Schéma 39), soit en utilisant les sels d'hexafluorophosphate (hexafluorophosphate de N,N,N'',N'' -tétraméthylformamidinium [TFFH] ou hexafluorophosphate de bis(tetraméthylène)fluoroformamidinium [BTFFH])⁹⁹ (Figure 8).

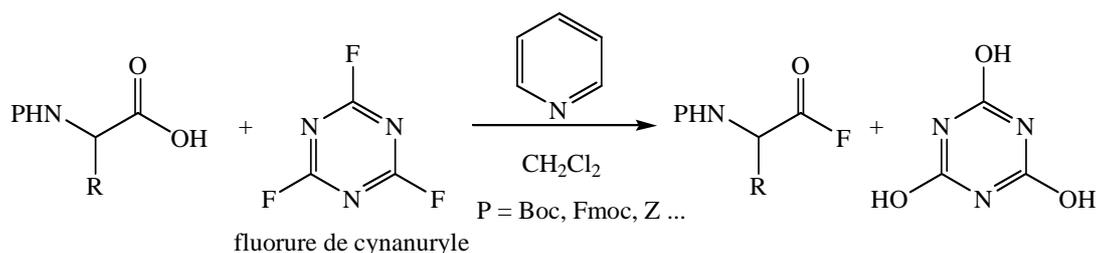


Schéma 39

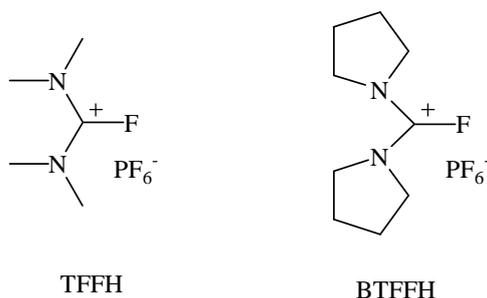


Figure 8

De même que pour les chlorures d'acides, les fluorures d'acides peuvent être isolés. Etant beaucoup plus stables que les chlorures d'acides correspondants, la réaction de couplage utilisant les fluorures d'acides peut être réalisée à température ambiante.

I.1.3. Racémisation

Quelques soit la méthode utilisée, le principal problème de la synthèse peptidique est la racémisation qui peut se produire au niveau de l'acide aminé utilisé pour le couplage. Elle conduit à l'apparition de peptides épimères qui diminuent le rendement et peuvent parfois être difficiles à séparer du produit désiré.

Les deux principaux mécanismes de racémisation, en milieu basique ou neutre, font intervenir l'énolisation directe de l'acide aminé couplé ou la formation d'oxazolone.

L'énolisation de l'acide aminé C-terminal peut se produire par abstraction du proton en α . Le choix de la méthode de synthèse utilisant des milieux neutres ou l'utilisation

d'amines tertiaires comme la DIEA ou la *N*-méthylmorpholine permet d'éliminer, en général, cette possibilité.

L'oxazolone formée à partir de l'intermédiaire activé, peut facilement échanger son proton en α , et donc conduire à un mélange d'énantiomères (Schéma 40).

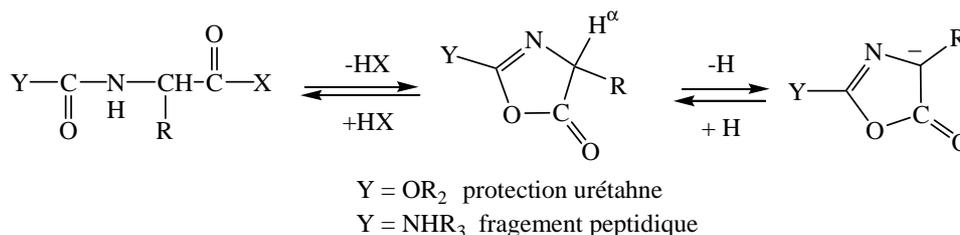


Schéma 40

La formation de l'oxazolone dépend de la nature du substituant fixé sur l'azote de l'acide aminé activé. Si celui-ci est engagé dans une liaison amide la formation de l'oxazolone est beaucoup plus facile que s'il est lié à un groupement protecteur de type uréthane, la racémisation étant minimisée par la faible acidité de l'hydrogène en α de l'oxazolone; celle-ci conserve sa chiralité et son aminolyse conduit au peptide $RCOHN R'$. Le problème reste cependant posé pour le couplage de segments peptidiques (synthèse convergente).

I.2. Généralités sur la synthèse peptidique sur phase solide

Depuis son introduction en 1963 par Merrifield¹⁰⁰, la synthèse sur phase solide a considérablement reculé les limites de la synthèse peptidique jusqu'alors réalisée en phase homogène. Merrifield a eu l'idée d'ancrer le premier acide aminé sur une matrice polymère insoluble. Ce nouveau mode de synthèse permettait donc d'éviter les réactions indésirables puisque avec l'immobilisation d'un des partenaires sur la phase solide, une seule fonction d'un acide aminé est disponible pour le couplage. Un autre avantage de l'immobilisation d'un acide aminé sur un polymère insoluble est que cela permet l'utilisation d'un excès du réactif en solution. Cet excès de réactif n'est plus considéré comme une impureté pour le produit final mais permet d'obtenir des rendements de couplage proche de 100%.

L'avantage sûrement le plus significatif de la synthèse en phase solide, est que toutes les étapes de purification entre chaque couplage sont supprimées puisque le peptide en croissance reste accroché sur le polymère insoluble, jusqu'au décrochage final. Les seules phases de purifications entre les étapes se limitent à de simples lavages, d'où un gain de temps considérable. En fin de synthèse, le peptide est alors décroché du polymère par coupure chimique avant d'être purifié, le plus souvent par CLHP.

L'avancée réalisée par la chimie peptidique sur phase solide a contribué au développement de nombreux supports solides, ainsi qu'à celui de nouvelles chimies pour l'activation et la protection des acides aminés. Actuellement deux grandes stratégies sont utilisées pour la synthèse peptidique sur phase solide. Ces deux stratégies reposent sur l'utilisation de deux types de protections temporaires Fmoc ou Boc, pour la protection de la fonction amine.

La différence principale entre les deux types de groupes protecteurs est liée à leur mode de déprotection. La déprotection du groupement Fmoc s'effectue en milieu basique alors que la déprotection du groupement Boc s'effectue en milieu acide. Actuellement la stratégie Fmoc/tBu est la plus utilisée car la coupure finale du peptide du support solide utilise du TFA concentré alors que la stratégie Boc/Bnl nécessite l'utilisation d'acide fort comme l'acide trifluorométhanesulfonique (TFMSA)¹⁰¹⁻¹⁰³, le trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf)^{104,105} ou le fluorure d'hydrogène (HF)¹⁰⁶.

Bien que ces deux types de motifs se déprotègent selon deux protocoles différents, le protocole utilisé pour le couplage des différents acides aminés est le même. La première étape consiste à greffer le premier acide aminé sur la résine, si elle n'est pas déjà substituée par ce résidu. On trouve en effet dans le commerce un certain nombre de résines portant déjà le premier acide aminé. Il convient ensuite de déprotéger la fonction amine de ce premier acide aminé. Le deuxième résidu est introduit sous forme *N*-protégée. La croissance du peptide se poursuit ainsi, de manière récurrente, par succession de couplage et de déprotections. Lors de l'ultime étape, le peptide est coupé de la résine (Schéma 41).

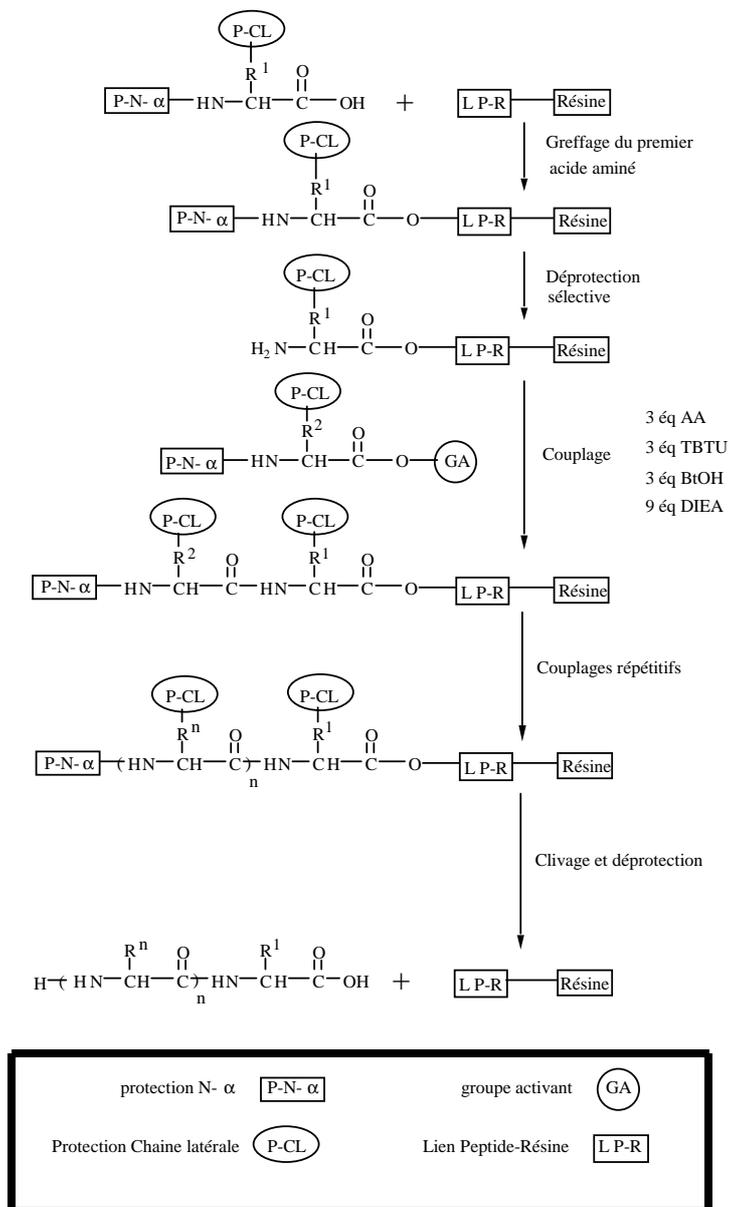


Schéma 41 : principe de la synthèse peptidique sur phase solide

Une seule étape de purification est nécessaire après décrochage du peptide de son support. Elle est effectuée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) préparative.

I.3. Suivi des réactions en synthèse sur support solide

Lors de la synthèse de peptides sur phase solide, des tests colorimétriques permettent d'évaluer l'efficacité d'un couplage ou d'une déprotection. Trois tests sont couramment utilisés pour ce contrôle. Le test de Kaiser¹⁰⁷ est un mélange de ninhydrine et de phénol en solution dans l'éthanol et de cyanure de potassium dans la pyridine. Il entraîne une coloration bleue à violette. Le test à l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (ATNBS)¹⁰⁸ entraîne une coloration orange à rouge. Ces deux tests sont efficaces sur un groupement amine primaire libre. Pour contrôler les couplages et déprotections sur un résidu proline, qui possède un groupement amine secondaire, on utilise un test au chloranil¹⁰⁹ qui entraîne une coloration bleu-vert intense des billes de résines avec la fonction amine libre.

Ces tests qualitatifs colorimétriques qui ont montrés leur utilité en synthèse peptidique classique apportent néanmoins une information limitée, surtout dans le contexte de synthèse de pseudopeptides.

C'est pour ces raisons que des techniques permettant l'analyse d'une molécule ancrée sur un support solide ont été développées. Parmi elles, la RMN est sans doute l'une des méthodes les plus performante. Cependant la majeure difficulté rencontrée lorsque l'on veut étudier une molécule ancrée sur un support solide par RMN est l'importance de la largeur des raies. Dans le cas d'un échantillon purement solide, la largeur de raie peut dépasser 10 kHz. Cet élargissement des raies provient notamment de l'interaction dipôle-dipôle (interaction dipolaire). Une autre contribution à l'élargissement des raies provient des inhomogénéités de susceptibilité magnétique. Ces variations de susceptibilité proviennent de l'hétérogénéité de l'échantillon et peuvent être décrites comme une interaction dipolaire entre le spin et un dipôle macroscopique¹¹⁰.

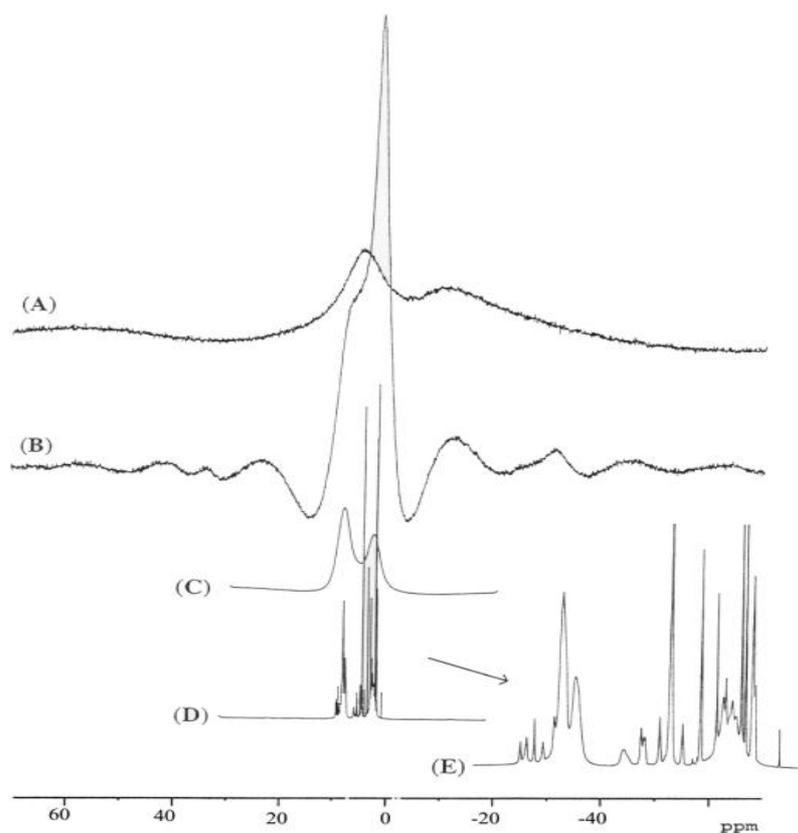
Dans le cas d'un échantillon de résine gonflée, il existe un gradient de mobilité allant de mouvements lents pour le polymère, vers des mouvements plus rapides pour la molécule ancrée sur le support par l'intermédiaire d'un bras d'espacement, souvent appelé « linker ». Même si la mobilité des molécules ancrées à l'extrémité du « linker » se rapproche des comportements rencontrés en solution, la largeur de raie reste importante et ne permet pas

l'obtention de spectres exploitables. De plus, si on ajoute à cela une inhomogénéité importante de susceptibilité magnétique due à l'importante hétérogénéité de l'échantillon, cette inhomogénéité contribue aussi à l'élargissement des raies. En effet lorsque la résine est gonflée, elle n'est plus un solide pur et comporte différentes zones, certaines contenant du solvant, d'autres étant constituées de domaines non solubles à mobilité réduite, ou encore des domaines de grande mobilité. Toutes ces zones vont créer à l'intérieur de l'échantillon des grandes différences de susceptibilité magnétique, qui à leur tour vont contribuer à l'élargissement de raies.

La RMN HR-MAS¹¹¹ appliquée à la synthèse en phase solide repose sur deux conditions. Contrairement à la RMN du solide, l'échantillon doit être gonflé dans un solvant approprié. Le bon gonflement du polymère garantit une mobilité importante des molécules ancrées grâce à leur solvation adéquate et réduit au moins partiellement les interactions dipolaires qui sont propres aux solides. Du fait du rapport gyromagnétique élevé du proton, l'interaction dipolaire et les effets de susceptibilité magnétique sont exacerbés et dans ce cas le gonflement de la résine n'est pas suffisant pour moyenniser ces interactions.

La deuxième condition est que l'enregistrement des spectres doit être effectué en utilisant la technique de rotation de l'échantillon à l'angle magique ($54,7^\circ$). Tandis que le gonflement de la résine permet une solvation des molécules et leur confère ainsi une mobilité accrue par rapport à la résine sèche, la rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique permet de moyenniser les différences de susceptibilité magnétique, ainsi que l'effet dipolaire résiduel, ce qui permet d'obtenir des spectres résolus en ^1H , ^{13}C pour la molécule ancrée sur le support.

En combinant le gonflement de la résine et la rotation à l'angle magique (« magic angle spinning »), le comportement des signaux RMN des molécules ancrées sur le support solide tend à se rapprocher des composés rencontrés en RMN liquide haute résolution (Figure 9). Toutes les séquences impulsives utilisées sont celles empruntées à la RMN du liquide.



(A) Spectre statique de la résine-peptide sèche. (B) spectre sous MAS de la résine-peptide sèche. (C) Spectre statique de la résine-peptide gonflée dans le DMF-d⁶. (D) et (E) spectre sous MAS de la résine-peptide gonflée dans le DMF-d⁶.

Figure 9

II. Problèmes généraux posés par l'incorporation d' α -hydrazinoacides dans une chaîne peptidique

Du fait de la présence des deux groupements azotés N^α et N^β , l'acylation d'un α -hydrazinoacide peut conduire à trois types de composés, β - ou α -monoacylés (α -hydrazinopeptide **I** ou aminopeptide **II**), et α,β -diacylés (peptide branché **III**) (Schéma 42).

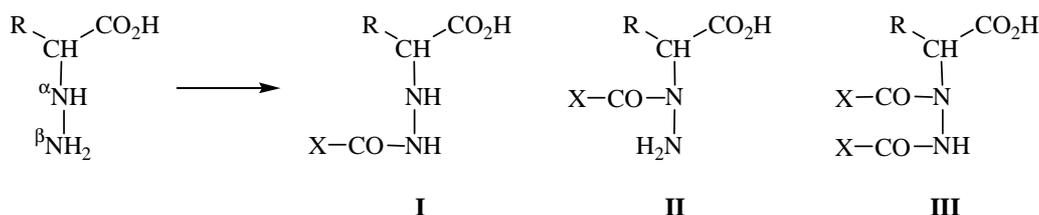


Schéma 42

Le premier problème de l'utilisation d' α -hydrazinoacides en synthèse peptidique est donc lié à la réactivité respective des deux atomes azotes vis-à-vis des réactifs d'acylation. Il est donc nécessaire de connaître cette réactivité.

Deux études parallèles conduites par Niedrich²⁰ et Dubar¹¹² concernant des études d'acylation d'hydrazinoesters montrent une compétition N^α/N^β ; cependant, une augmentation de l'encombrement de la chaîne latérale semble favoriser une acylation en position β .

Plus récemment, Viret¹¹³ puis Lecoq^{114,115} ont examiné la régiosélectivité de la réaction d'addition d'un électrophile vis-à-vis des azotes α et β de l'hydrazinoglycine (H_2N^β - HN^α - CH_2 - $COOEt$). La conclusion de ces travaux est que les proportions relatives des deux isomères varient considérablement suivant les réactifs et les conditions réactionnelles utilisés ; quelques exemples sont reportés dans le schéma 43.

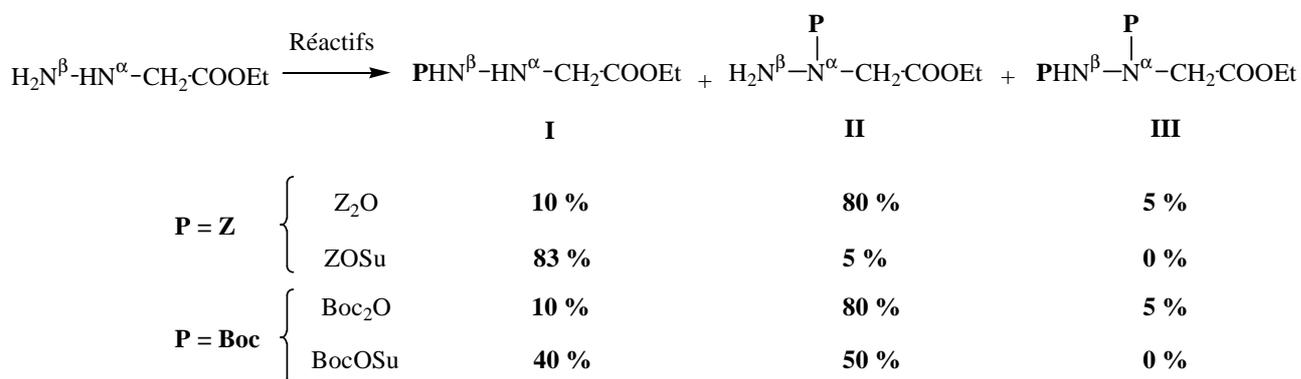


Schéma 43

Peu d'études ont trait à la synthèse de pseudopeptides hydrazinés. L'incorporation d'un motif hydraziné dans un peptide a été décrites pour la première fois dans les années 1960 par Niedrich et coll. lors de préparation de neuf analogues d'un undécapeptide : l'élédoïsine^{18,20,116-122} (Figure 10).

pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂

élédoïsine

Figure 10

Lors du couplage de la partie C-terminale d'un hydrazinoacide N^{β} -protégé avec la fonction amine libre d'un peptide en croissance, des produits secondaires peuvent se former^{112,123}. Par exemple l'utilisation de la méthode aux anhydrides mixtes n'est pas applicable aux hydrazinoacides non N^{α} -protégés. On note en effet un transfert du groupement alkyloxy-carbonyle de l'anhydride mixte vers l'azote α , qui se trouve alors bloqué quasi irréversiblement¹¹³. D'autre méthode de couplage comme la méthode aux esters activés conduisent à des piperazine-2,5-diones ou dicétopipérazines (DCP) et à des oligomères¹²³. (Schéma 44).

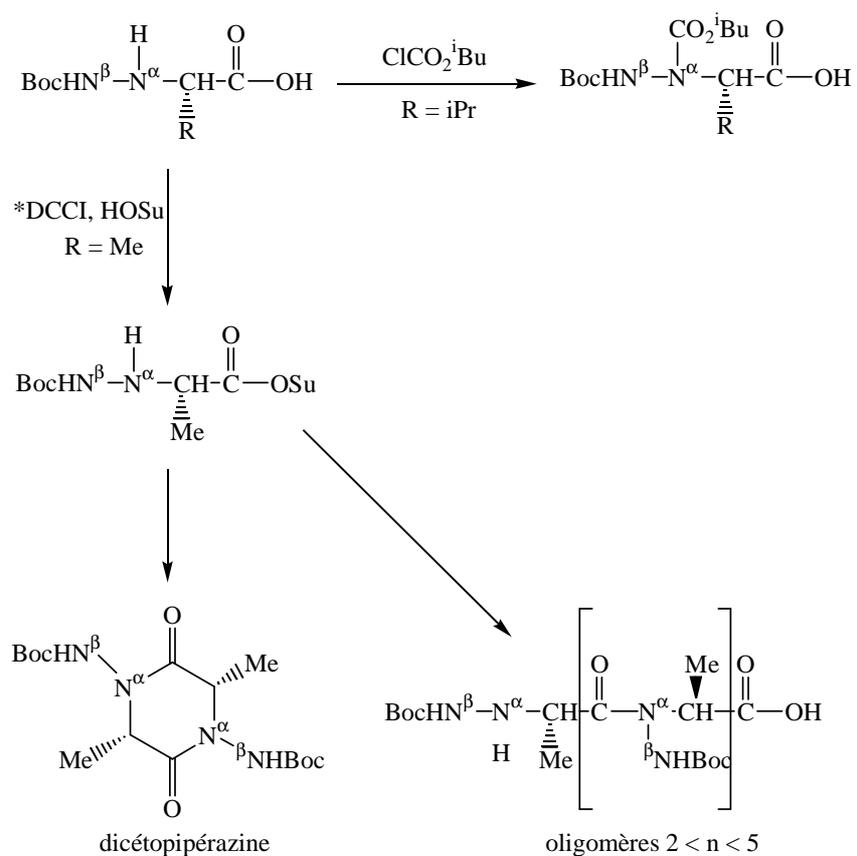


Schéma 44 : Réactions parasites lors du couplage d' α -hydrazinoacides non N^α -protégés

Lors de la synthèse d'inhibiteur de l'élastase leucocytaire humaine (ELH). Guy et coll.¹²³ ont effectué différents essais de couplage de la fonction N -terminale d' α -hydrazinoacides (avec ou sans protection de l'azote α) en faisant varier les méthodes de couplage. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 12.

Essai	Esters activés	Fragment hydrazino	Hydrazinopeptide obtenus	Rdt %
1	Z-Val-OSu	H-hAla -Ala-NH ⁱ Pr	Z-Val- hAla -Ala-NH ⁱ Pr	40
2	Boc-Ala-Ala-Pro-OSu	H-hVal -Ala-Ala-NH ⁱ Pr	Boc-Ala-Ala-Pro- hVal -Ala-Ala-NH ⁱ Pr	25
3	Z-Ala-Ala-Pro-OCO ₂ ^t Bu	H-hVal -Ala-Ala-NH ⁱ Pr	Z-Ala-Ala-Pro- hVal -Ala-Ala-NH ⁱ Pr	55
4	Z-Val-OCO ₂ ^t Bu	H-hIle -Leu-OMe	Z-Val- hIle -Leu-OMe	60
5	Boc-Ala-OSu	H-hPro -Val-Ala-Ala-NH ⁱ Pr	Boc-Ala- hPro -Val-Ala-Ala-NH ⁱ Pr	42
6	Boc-Val-OSu	H-h(Bzl)Ala -Ala-NH ⁱ Pr	Boc-Val- h(Bzl)Ala -Ala-NH ⁱ Pr	0
7	Boc-Val-OCO ₂ ^t Bu	H-h(Bzl)Ala -Ala-NH ⁱ Pr	Boc-Val- h(Bzl)Ala -Ala-NH ⁱ Pr	22
8	Boc-Val / PyBop	H-h(Bzl)Ala -Ala-NH ⁱ Pr	Boc-Val- h(Bzl)Ala -Ala-NH ⁱ Pr	28
9	Boc-Val-NCA	H-h(Bzl)Ala -Ala-NH ⁱ Pr	Boc-Val- h(Bzl)Ala -Ala-NH ⁱ Pr	60

Tableau 12

Les rendements sont plutôt moyens, voire faibles quelle que soit la méthode utilisée. En revanche quand le N ^{α} est protégé par un groupement benzyle, les réactions secondaires sont évitées mais la réactivité du N ^{β} semble diminuée, voire nulle dans le cas de l'activation par la méthode aux esters activés (essai 6).

Récemment Lelais et coll.¹²⁴ ont synthétisé des polyhydrazinopeptides à partir d' α -hydrazinoacides protégés en N ^{α} par un groupement benzyle. Ils ont utilisé le HATU comme activant. Cette méthode semble être la plus efficace pour les di et trimères qui ont été obtenus respectivement avec 88 et 84 %. Cependant lorsqu'on augmente la taille de la chaîne pseudopeptidique le couplage s'avère problématique, voire impossible. Seule la méthode utilisant le PyBop (bromotris(pyrrolidine)phosphonium hexafluorophosphate) leur a permis d'obtenir l'hexamère avec un rendement global de 14 %.

Au vu des ces résultats, il semble donc que l'incorporation d'un α -hydrazinoacide dépende fortement de la nature de la protection de l'azote α ainsi que de la méthode

d'activation utilisée. Il était donc indispensable d'effectuer une étude systématique afin de définir les meilleures conditions de couplages de nos α -hydrazinoacides.

Si l'incorporation de motifs hydrazino dans des peptides a déjà été décrite en phase liquide^{18,123}, un seul exemple sur phase solide est exposé dans le travail de thèse de Dubar¹¹². Il s'agit de la synthèse d'un analogue du fragment 52-61 de l'épitope T de l'ELH du lysozyme de poulet. Une des techniques employées est une méthode semi-convergente où l' α -hydrazinoacide (sans protection de l'azote α) est incorporé d'abord au sein d'un segment en phase liquide en utilisant la méthode aux anhydrides mixtes (rendement de 67%), puis ce segment a été couplé au reste du peptide sur la résine. Ces mêmes auteurs ont également essayé une méthode pas à pas en utilisant le DCC/HOBt. Ces synthèses sont décrites comme longues et fastidieuses, aucun rendement n'est donné. Il nous a donc paru intéressant, au vu de ces résultats de relever le défi de mettre au point de nouvelles méthodologies de synthèse pour la préparation d' α -hydrazinopeptides sur support solide.

Le plan de ce chapitre s'articulera donc en deux parties :

- Etude de la réactivité des α -hydrazinoacides en solution
- Synthèse d' α -hydrazinopeptides sur phase solide

III. Etude de la réactivité des α -hydrazinoacides en solution

Nous avons réalisé une étude systématique engageant l'hydrazinoester β H, α Z-hAla-OMe et Fmoc-Ala-OH. Nous avons testé les principales méthodes de couplage citées précédemment. Les résultats sont rassemblés dans le schéma 45 et le tableau 13.

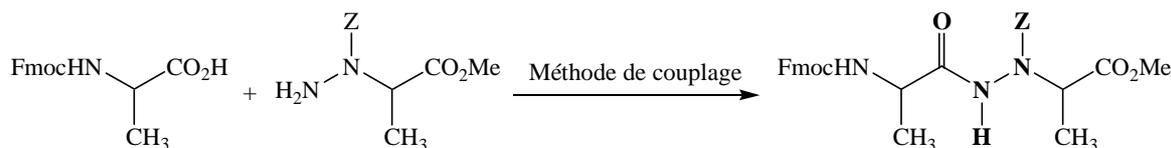


Schéma 45

Essai	Méthode de couplage	T°C	Rdt en % ^(a)
1	HOSu / HOBt / THF	T.A.	0
2	HONp / HOBt / THF	T.A.	0
3	HOPfp / HOBt / THF	T.A.	0
4	UNCA / THF	T.A.	0
5	HOBt / TBTU / DIEA / THF	T.A.	50
6	HOBt / DCC / THF	T.A.	73
7	HATU / HOBt / DIEA / THF	T.A.	19
8	HATU / NMM / DCM	T.A.	30
9	Chlorure d'acide / DCM	-20	90
10	ICF / NMM / THF	-20	86
11	Fluorure d'acide / DCM	T.A.	98

(a) rendements calculés à partir de l'hydrazinoester de départ.

Tableau 13

Il apparaît au travers de cette étude que le rendement de la réaction varie fortement en fonction de la nature de l'agent de couplage utilisé. Ainsi, des méthodes fréquemment utilisées dans la littérature pour la synthèse de peptides ne conduisent à aucun résultat dans le cadre de notre étude : c'est le cas lors de l'utilisation des esters activés utilisés (OSu [essai 1], ONp [essai 2], OPfp [essai 3]), où nous avons récupéré intégralement l'hydrazinoester de départ. De même l'utilisation des uréthanes *N*-carboxyanhydrides (UNCA, essai 4), n'a pas abouti au pseudodipeptide attendu.

Les trois essais suivants, (5, 6 et 7) correspondent aux méthodes les plus utilisées en synthèse peptidique sur phase solide. On constate que mise à part la méthode au DCC/ HOBt (essai 6), qui conduit à un rendement de 73 %, les rendements sont moyens, voire médiocres.

Les conditions de Lelais et coll.¹²⁴, (essai 8) décrites dans l'introduction de ce chapitre pour donner les meilleurs résultats n'ont conduit dans notre cas qu'à 30 % de rendement.

Les meilleurs rendements ont été obtenus en utilisant les conditions des essais 9, 10 et 11. Les essais 9 et 10 réalisés à -20°C conduisent respectivement à 86 et 90% de rendement. L'essai 11 impliquant le fluorure d'acide, réalisé à température ambiante, nous a permis d'obtenir, quant à lui un rendement de 98%. Les synthèses des essais 9 et 10, bien qu'efficaces se réalisent dans des conditions de température qui rendent difficile leur utilisation en phase solide. Nous retiendrons donc pour la suite de cette étude la méthode aux fluorures d'acides.

Nous avons appliqué ces conditions à la synthèse de nouveaux hydrazinodipeptides. Les résultats sont rassemblés dans le schéma 46 et le tableau 14.

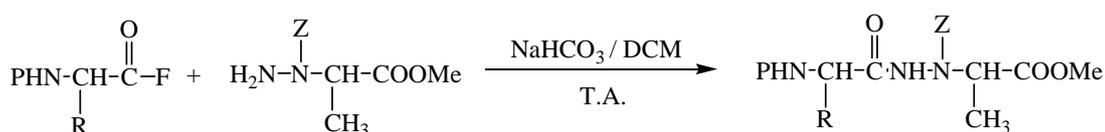


Schéma 46

Essai	P	R	Rdt en % ^(a)
1	Fmoc	-CH ₃	98
2	Fmoc	-CH(CH ₃) ₂	78
3	Fmoc	-CH ₂ Ph	96
4	Boc	-CH ₂ Ph	53 0°C 93

(a) rendements calculés à partir de l'hydrazinoalanine de départ.

Tableau 14

Il ressort de cette étude que la méthode aux fluorures d'acides est applicable à d'autres acides aminés. Néanmoins on peut s'apercevoir que les rendements diminuent lorsque l'encombrement de la chaîne latérale du fluorure d'acide augmente. Le remplacement du groupement Fmoc par le groupement Boc contribue à une diminution des rendements à température ambiante ce qui peut s'expliquer par la libération à température ambiante de HF ce qui déprotège le N ^{α} du fluorure d'acide. Le rendement a pu être amélioré en réalisant la réaction à 0°C.

En conclusion, cette étude nous a permis de constater la faible réactivité de l'azote β de nos hydrazinoesters qui peut s'expliquer par les effets stéréoélectroniques exercés par le groupe Z. Ainsi, l'effet inductif attracteur conjugué à un encombrement stérique au niveau de l'atome d'azote β exercé par ce groupement aurait pour effet de diminuer les propriétés nucléophiles de l'atome α . Par contre, l'utilisation d'anhydrides mixtes, de chlorures ou des fluorures d'acides nous a permis d'obtenir d'excellents rendements. Il est à noter que le rendement diminue lorsque la chaîne latérale du partenaire acide est encombrée. Pour la suite de l'étude, nous avons retenu la méthode aux fluorures d'acides pour former le lien hydrazide, qui nous semblait plus adaptée à la synthèse supportée car utilisable dans les deux stratégies Boc et Fmoc et avec de bons rendements.

IV. Synthèse d'hydrazinopeptides sur phase solide

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction de ce chapitre, un seul exemple de synthèse d'hydrazinopeptides sur phase solide est décrit dans un travail de thèse¹¹². Cette synthèse est décrite comme longue et fastidieuse. Il nous a donc paru intéressant de mettre au point de nouvelles méthodologies de synthèse pour la préparation d'hydrazinopeptides sur support solide. Nous avons comparé trois stratégies de synthèse :

- **Stratégie 1** : pas à pas pour laquelle les α -hydrazinoacides orthogonalement protégés sont introduits comme des acides aminés classiques en synthèse peptidique sur phase solide (Schéma 47).

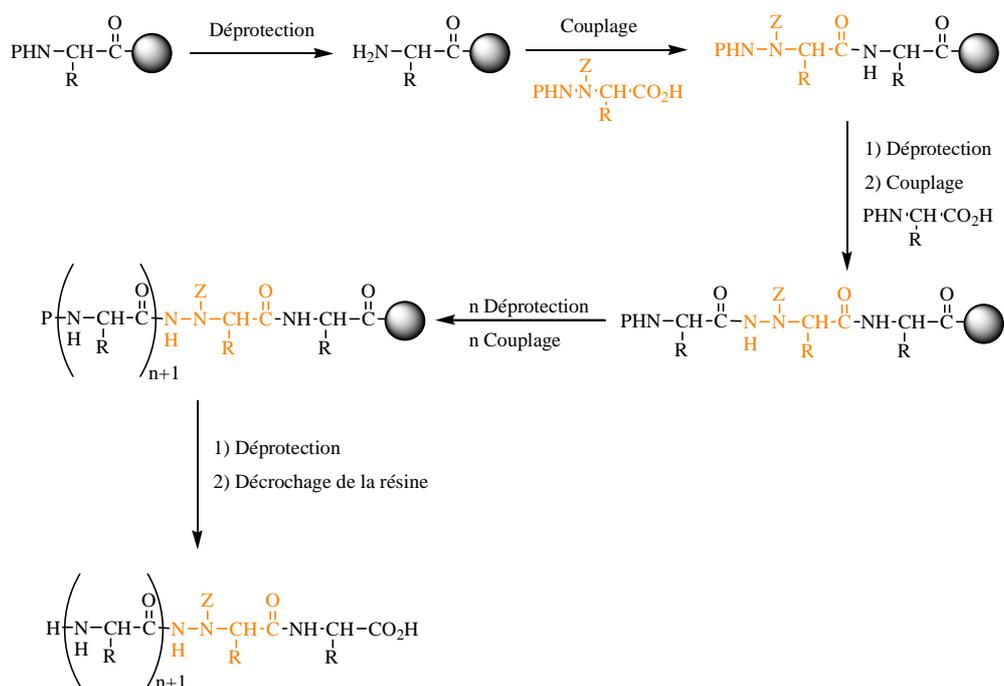


Schéma 47 : Stratégie 1

- **Stratégie 2**: semi-convergente par insertion d'un hydrazinodipeptide préalablement préparé en phase liquide (Schéma 48).

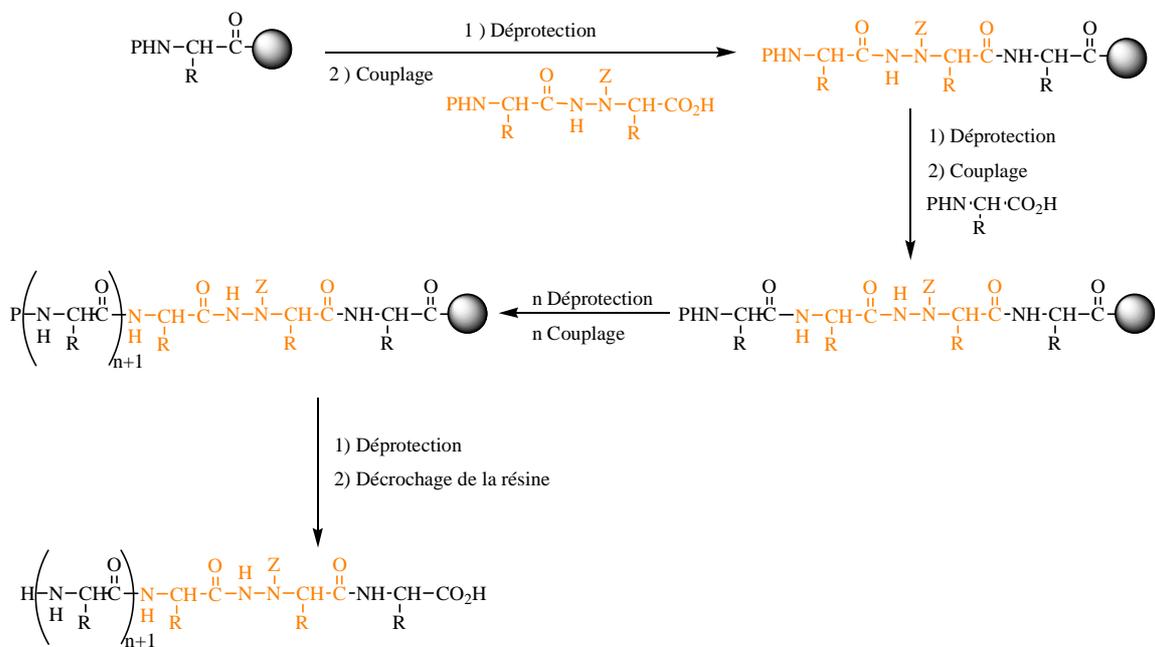


Schéma 48 : Stratégie 2

- **Stratégie 3** : pas à pas, mais pour laquelle un hydroxyacide protégé est greffé sur la résine par sa fonction acide carboxylique, l'introduction du motif hydrazino est réalisée sur le support solide selon la méthode décrite dans le premier chapitre de ce mémoire (Schéma 49).

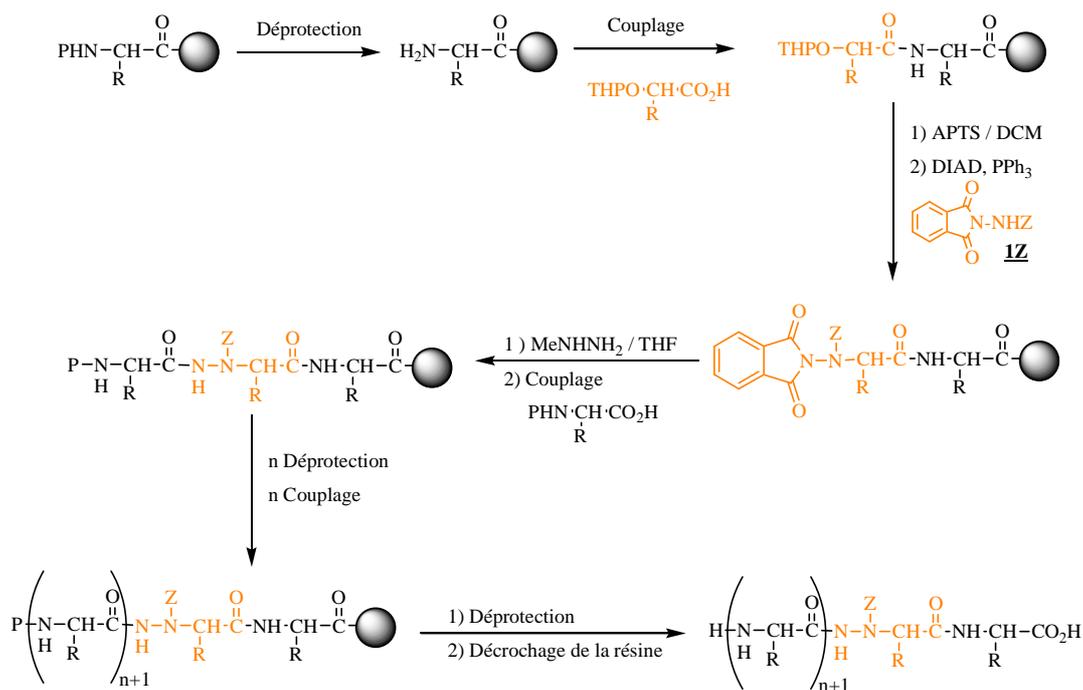


Schéma 49 : Stratégie 3

Afin de définir au mieux les conditions de synthèse, nous avons tout d'abord réalisé une étude qualitative avec suivi HR-MAS de la stratégie 1 suivi d'une étude quantitative utilisant les trois stratégies différentes.

IV.1. Etude qualitative de la synthèse d' α -hydrazinopeptides par la stratégie 1

Lors d'essais préliminaires (non rapportés) d'incorporation sur phase solide d'hydrazinoacides, utilisant la méthode aux fluorures d'acides, nous n'avons pas obtenu les pseudopeptides désirés mais des mélanges complexes de produits difficilement analysables. Compte tenu de ces difficultés, il nous a semblé important d'effectuer un contrôle des différentes étapes afin de mettre au point les meilleures conditions d'incorporation de nos

hydrazinoacides sur phase solide. Les tests colorimétriques n'étant pas efficaces pour contrôler les synthèses d'hydrazinopeptides nous nous sommes tournés vers la RMN HR-MAS.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à définir les conditions opératoires permettant l'incorporation d'un hydrazinoacide dans un tripeptide, puis nous avons étudié la synthèse d'une séquence pseudo-peptidique plus longue dans le but d'étudier l'impact de la modification sur la réactivité globale du peptide en croissance.

IV.1.1. Choix des résines

Les résines ont été choisies pour leur compatibilité avec les synthèses étudiées mais également afin de pouvoir suivre celle-ci par RMN HR-MAS.

De manière générale, toutes les résines utilisées pour la synthèse en phase solide sont organisées de la même façon. On peut décomposer le support solide en trois zones (Figure 11).

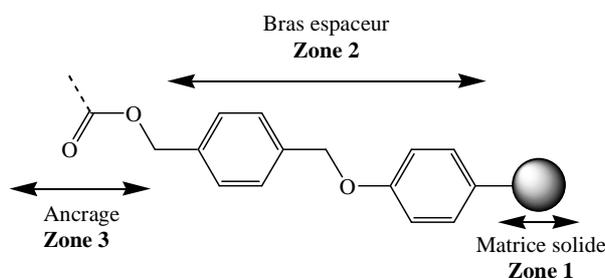
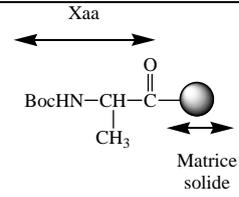
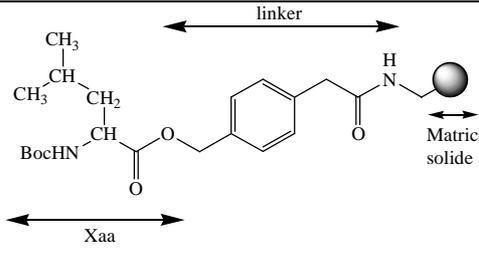
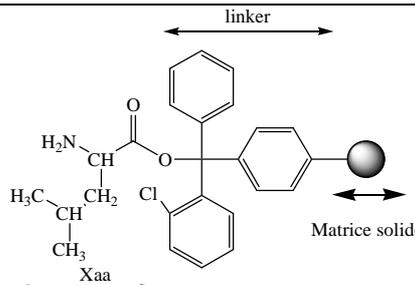


Figure 11 : Représentation schématique d'une résine pour la synthèse en phase solide

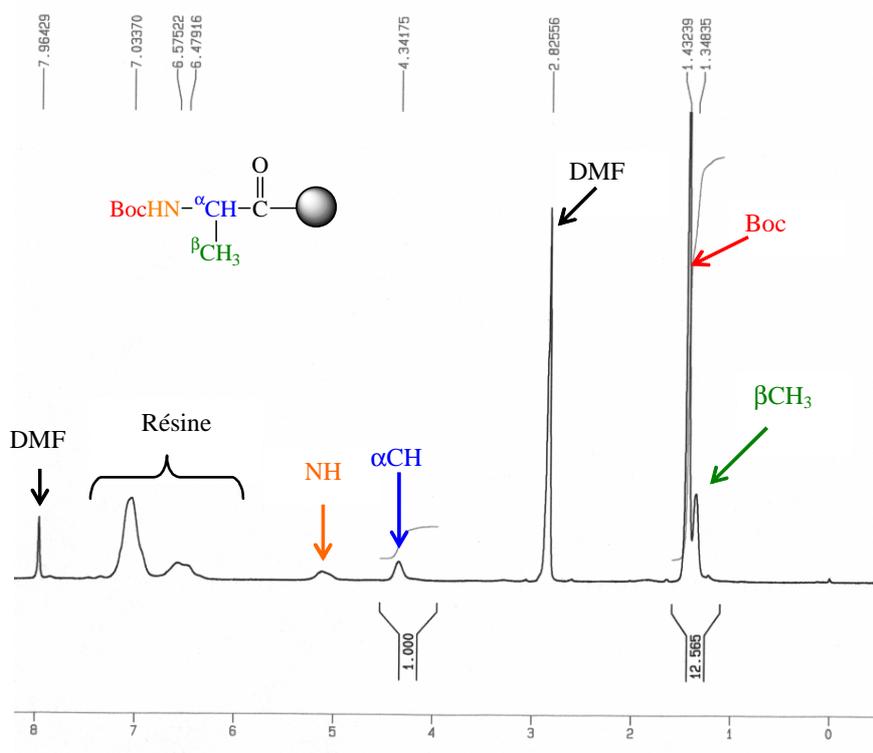
Le premier domaine est la matrice solide qui constitue le corps principal du support solide. Ce support est en général une résine, c'est à dire une matrice réticulée, constituée principalement de polystyrène réticulé par 1 ou 2% de divinylbenzène comme dans les résines Merrifield, Wang, PAM, MBHA, 2-chlorotrityle... (Zone 1).

Le second domaine est considéré comme le bras espaceur ou « linker ». Ce bras espaceur est chimiquement inerte et de longueur variable (Zone 2).

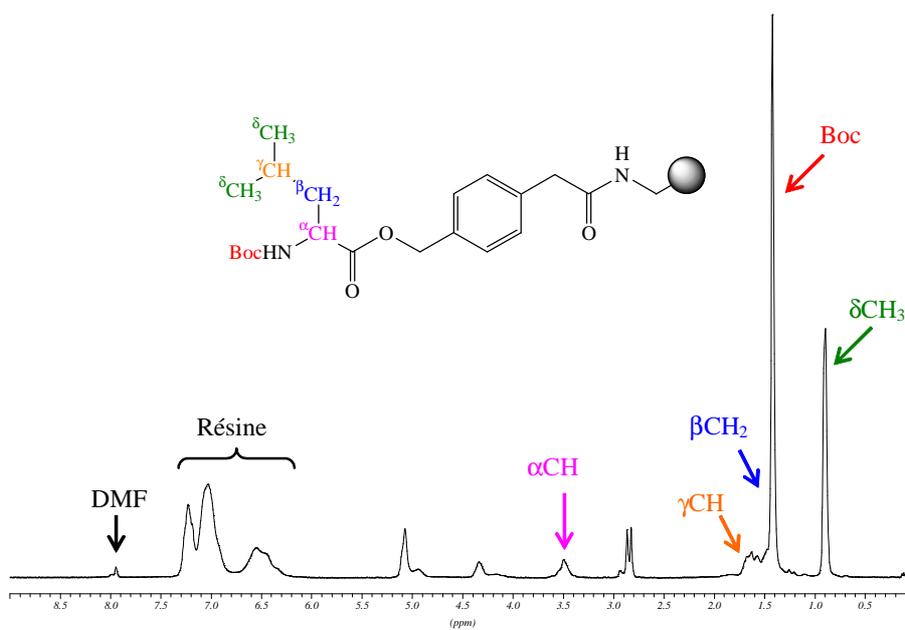
Enfin, à l'extrémité du bras espaceur, se trouve le groupe fonctionnel qui va servir d'ancrage au peptide (Zone 3). La nature du groupement chimique qui servira d'ancrage détermine le mode de coupure de la molécule synthétisée du support solide. Les différents domaines qui constituent les résines utilisées en synthèse organique en phase solide, en font un système hétérogène avec des caractéristiques propres qui contribuent aux difficultés rencontrées pour l'analyse par RMN de ce type de support. Pour cette étude nous avons choisi d'utiliser 3 résines différentes :

<p><u>Boc-Ala-Merrifield</u> : nous avons choisi cette résine pour la synthèse des pseudotriptides. Cette résine ne possèdent pas de linker, nous avons pensé qu'il serait plus facile de distinguer les différents protons des résidus.</p>	
<p><u>Boc-Leu-PAM</u> : cette résine à été choisie pour la synthèse du pseudopentapeptide en stratégie Boc car la présence du linker permet d'augmenter la mobilité du pseudopeptide sur le support solide et par conséquent peut améliorer la qualité des spectres RMN HR-MAS.</p>	
<p><u>H-Leu-2-chlorotrityle-PS</u> : cette résine a été choisie pour la synthèse du pseudopentapeptide en stratégie Fmoc. Nous verrons par la suite l'utilité de l'encombrement du linker.</p>	

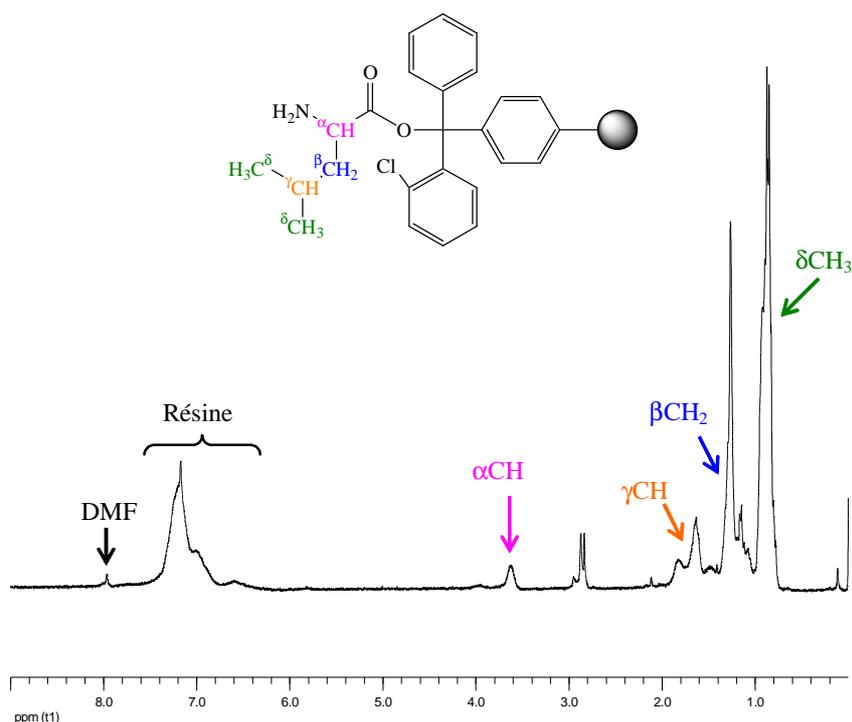
Il nous a fallu dans un premier temps définir les paramètres RMN HR-MAS, afin d'éliminer au maximum les signaux de la résine sans supprimer ceux des résidus. Ces paramètres ont été optimisés pour chaque synthèse à partir de la résine de départ. Les spectres RMN ont été enregistrés à 300 MHz en utilisant la séquence CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)^{125,126} à une vitesse de 2500 Hz. Nous avons optimisé les paramètres 11 (nombre de tour de boucle du programme) et d20 (délai d'acquisition pour éliminer les phénomènes de diffusion et les effets de couplage).



Spectre 1 : Résine Boc-Ala-Merrifield, $11 = 100$; $d20 = 1$ ms



Spectre 2 : Résine Boc-Leu-PAM, $11 = 40$; $d20 = 1$ ms



Spectre 3: Résine H-Leu-2-chlorotrityle-PS, $\tau_1 = 40$; $d_{20} = 1$ ms.

IV.1.2. Etude qualitative de la synthèse de pseudotriptides

Afin de définir les meilleures conditions de synthèse pour former le lien hydrazide, nous avons effectué une étude préliminaire en faisant varier les conditions de couplage entre le fluorure d'acide et l'hydrazinoacide ancré sur la résine. Cette étude a été effectuée sur la résine Boc-Ala-Merrifield. Nous avons choisi deux séquences données ci-après contenant trois résidus et une modification de type hydrazino :

- (1) H-Pro-**hGly**-Ala-OH,
- (2) H-Pro-**hLeu**-Ala-OH

Et ce pour trois raisons principales :

- ⇒ les acides aminés qui les composent possèdent une chaîne latérale non fonctionnalisée, ce qui permet de décrocher le pseudopeptide du polymère en fin de synthèse sans ajout de piège à cations et à radicaux « scavenger », ce qui facilite le traitement final ;

- ⇒ ils sont facilement discernables par RMN, ce qui facilite la caractérisation du peptide ;
- ⇒ la séquence (2) possède un acide aminé modifié qui présente une chaîne latérale *iso*-butyle permettant l'établissement aisé d'un rendement par RMN grâce au rapport d'intégration.

Trois synthèses supportées ont été réalisées qui diffèrent par les conditions de formation du lien hydrazide. Les liens amide ont été effectués dans tous les cas en utilisant la méthode TBTU, HOBt et DIEA dans la DMF.

Dans un premier temps, nous avons utilisé les conditions définies en phase liquide pour le couplage du partenaire acide activé sous forme de fluorure d'acide avec l'hydrazinoleucine supporté (Schéma 50).

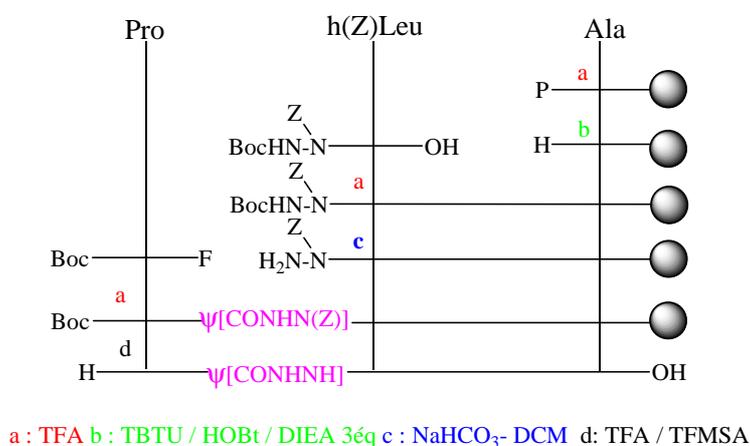
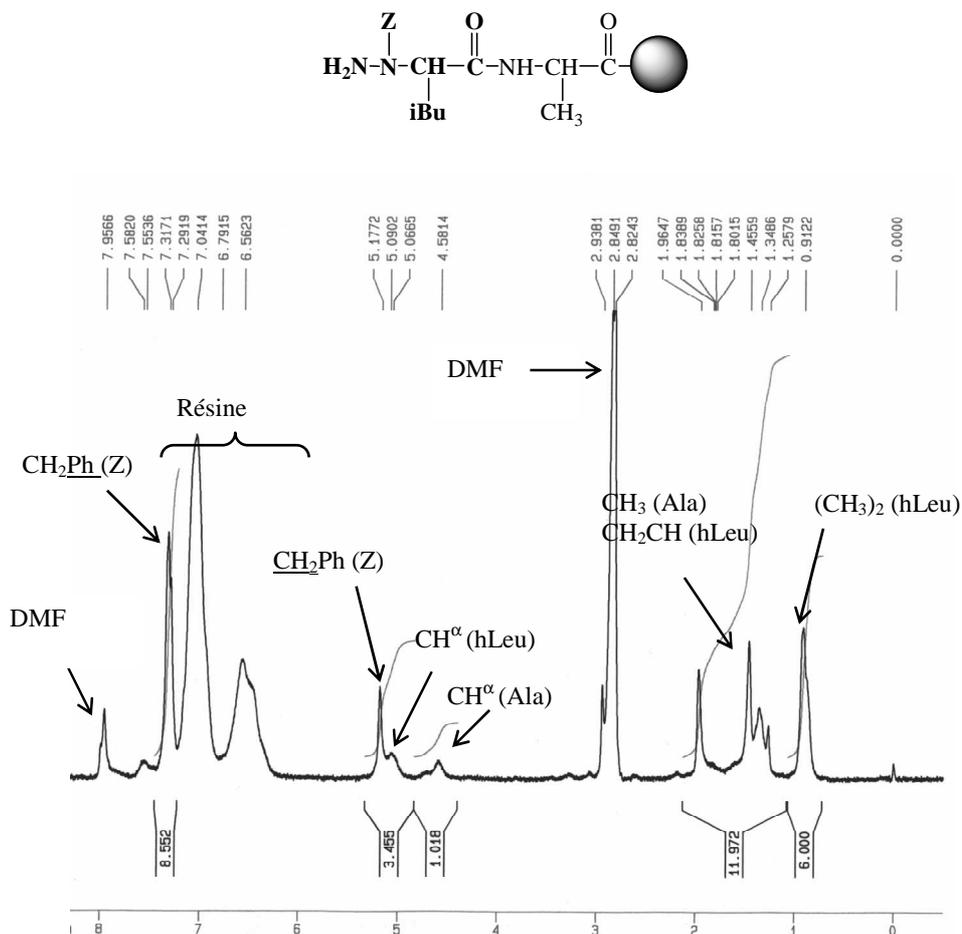


Schéma 50

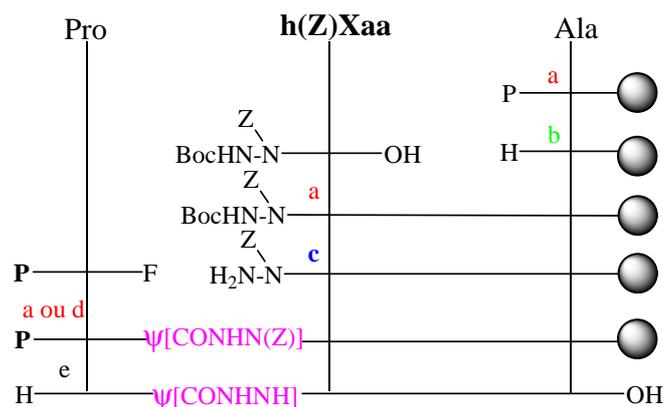
Le spectre HR-MAS a été réalisé après le couplage de la Boc-Pro-F (spectre 4).



Spectre 4

L'utilisation des conditions de couplage définies en phase liquide ($\text{NaHCO}_3\text{-DCM}$) ne nous a pas permis d'obtenir le pseudotripeptide attendu. En effet, le spectre 4 correspond au pseudodipeptide supporté H-h(Z)Leu-Ala-résine. Le couplage du N^β de l'hydrazinoleucine avec le fluorure d'acide semble donc poser problème. Il fallait donc trouver des conditions de couplage spécifique pour la phase solide.

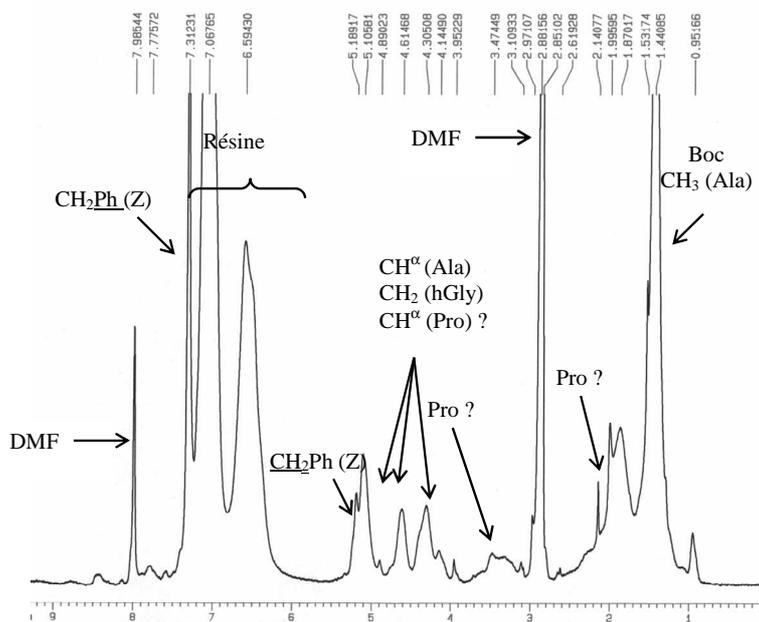
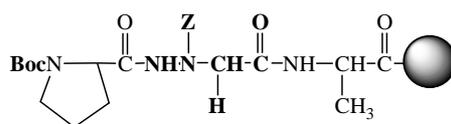
Nous avons alors changé les conditions de couplage ainsi que la nature de l'hydrazinoacide et du groupement protecteur (Boc ou Fmoc) porté par l'acide activé. Les conditions sont rassemblées sur le schéma 51. Les spectres RMN HRMAS ont été réalisés en fin de synthèse afin d'estimer leur efficacité.



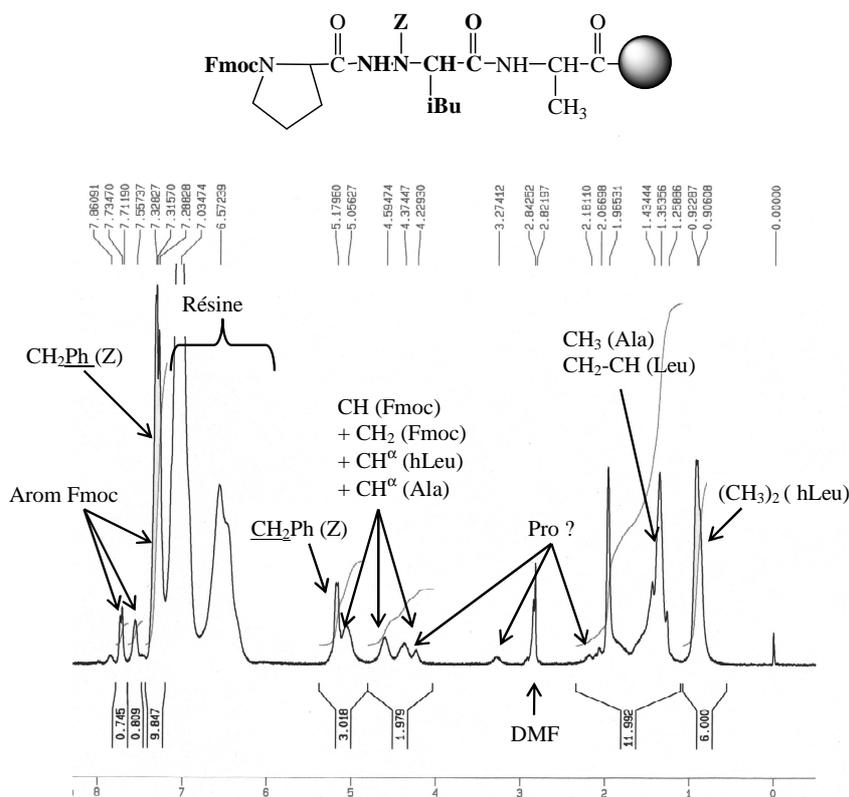
a : TFA b : TBTU / HOBt / DIEA 3 \AA c : DIEA-DMF d : si P = Fmoc 25% pipéridine /DMF
e : TFA / TFMSA

P = Boc : h(Z)Gly
P = Fmoc : h(Z)Leu

Schéma 51



Spectre 5 : Boc-Pro-h(Z)Gly-Ala-résine, P= Boc et hXaa = h(Z)Gly



Spectre 6: Fmoc-Pro-h(Z)Leu-Ala-résine, P =Fmoc et hXaa = h(Z)Leu

Nous avons utilisé des conditions couramment utilisées en SPPS c'est-à-dire la DMF comme solvant et la DIEA comme base. Dans les deux cas ces conditions ont conduit à la formation du pseudotripeptide supporté désiré. Malheureusement, nous n'avons pas pu estimer le rendement de la synthèse par RMN pour le spectre 4 car le motif CH_2 du résidu glycine modifié est difficile à discerner. Par contre, le spectre 5 (correspondant à Fmoc-Pro-hLeu-Ala-résine) nous a permis d'estimer un rendement de couplage grâce aux rapports d'intégration entre les signaux correspondant aux protons de la chaîne latérale du résidu hydrazinoleucine par rapport à ceux du motif Fmoc. Ce rendement a été établi à environ 35 % par HR-MAS. Après décrochage de la résine et purification CLHP, les deux pseudotripeptides ont pu être caractérisés.

Cette étude nous a donc permis de définir des conditions de couplage spécifiques à la phase solide permettant la formation du lien hydrazide. Nous avons également mis en évidence qu'il était possible de coupler un fluorure d'acide présentant une chaîne latérale encombrée (iBu) avec un hydrazinoacide supporté. Néanmoins le rendement de cette réaction

étant modeste, pour la suite de l'étude les couplages engageant le lien hydrazino ont été répétés plusieurs fois.

IV.1.3. Etude qualitative de la synthèse de pseudopentapeptide

Nous avons appliqué les conditions définies dans le paragraphe précédent à la synthèse d'un pseudopeptide plus long contenant 5 résidus dont 3 en aval de la modification pseudopeptidique, afin de déterminer l'impact de l'insertion d'un lien hydrazino sur les couplages suivants. Suite à des essais systématiques (non rapportés ici), nous avons utilisé un mélange de solvant DCM/DMF au lieu de la DMF seule pour la réaction de couplage aux fluorures d'acides. La séquence PFVhAL a été choisie pour les mêmes raisons que celles évoquées pour la synthèse des pseudotriptides (chaînes sans groupement fonctionnels et résidus facilement discernables par RMN). De plus, l'utilisation d'un résidu présentant une chaîne latérale particulièrement encombrée (iPr) pour l'étape de formation du lien hydrazino et qui a conduit à des rendements plus faibles lors de l'étude réalisée en phase homogène (voir III.) nous permettra de définir les limites de la méthode. Cette séquence a été réalisée tout d'abord en stratégie Boc puis en stratégie Fmoc, avec cette fois-ci un suivi HR-MAS étape par étape.

IV.1.3.1. Stratégie Boc

Cette synthèse a été réalisée sur la résine Boc-Leu-PAM (Figure 12). La synthèse a été conduite comme le montre le schéma 52. Après solvatation de la résine par la DMF, le groupement Boc est éliminé par action du TFA. Les acides aminés suivants sont successivement couplés en présence de TBTU, HOBt et DIEA. Le couplage impliquant le fluorure d'acide est réalisé dans un mélange DMF/DCM avec comme base la DIEA. Après chaque étape de couplage et de déprotection la résine est séchée et un spectre RMN HR-MAS est réalisé. La figure 13 représente les spectres RMN HR-MAS ^1H de la résine de départ (spectre 1) et des différentes étapes de couplage (spectres 2, 4, 6 et 8 [vert]) et de déprotection (spectres 3, 5, 7 et 9 [rouge]) de la synthèse.

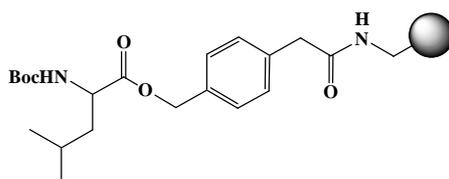


Figure 12: Boc-Leu-PAM

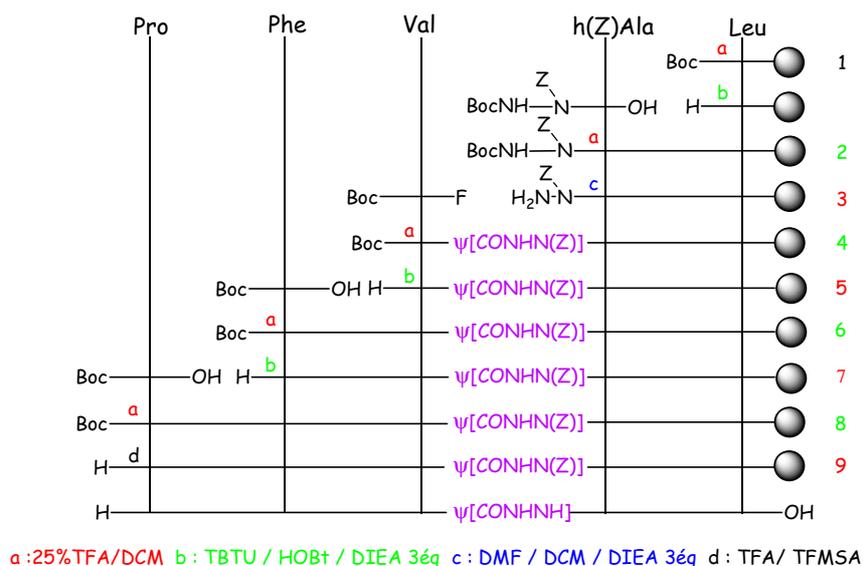


Schéma 52

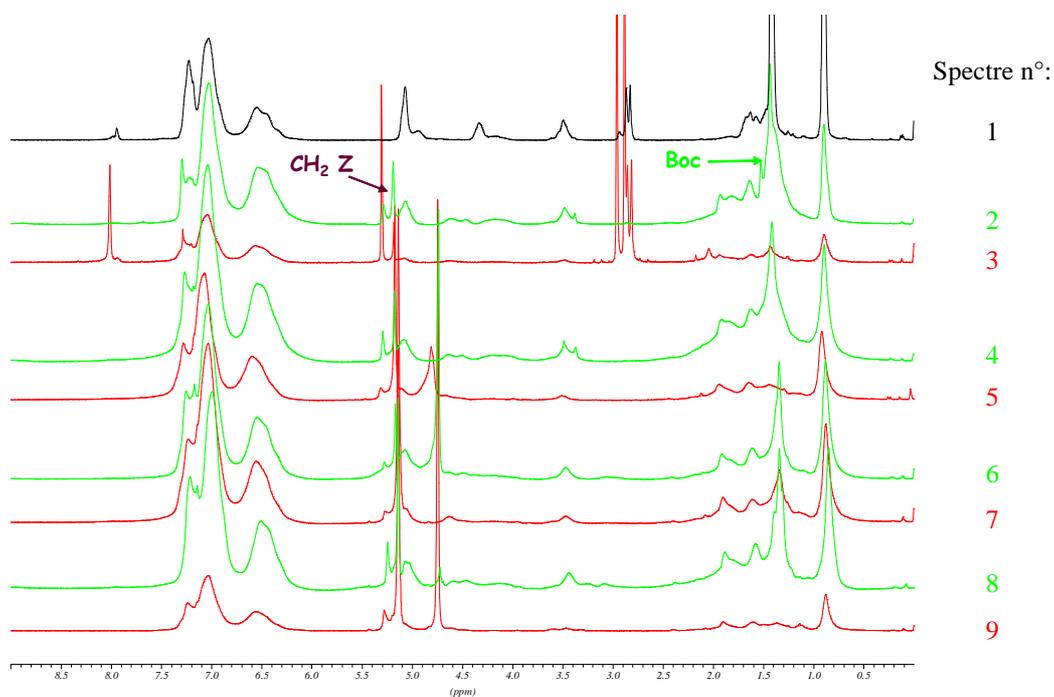


Figure 13

Le spectre 2 qui montre la présence simultanée du motif méthylène du groupement Z (signal à 5,2 ppm) et du groupement Boc (signal à 1,5 ppm) confirme l'ancrage du résidu modifié Boc-h(Z)Ala-OH.

Chaque étape de déprotection (spectres 3, 5, 7 et 9 [rouge]) a été vérifiée par la disparition du signal du groupement Boc à 1,5 ppm. Le succès des étapes de couplage (spectres 2, 4, 6 et 8 [vert]) a été confirmé par l'apparition de ce même signal.

Ce contrôle systématique par HR-MAS des différentes étapes nous a permis non seulement de confirmer la formation de chaque intermédiaire de la synthèse mais également de mettre en évidence la nécessité de répéter certaines étapes. Ainsi :

- l'étape de couplage a été répétée quatre fois pour obtenir une incorporation conséquente du résidu valine. Ce résultat confirme ceux obtenus lors de l'étude décrite précédemment en phase liquide (voir III) montrant une réactivité faible de l'atome d'azote β du motif hydrazino ;
- de façon surprenante, les étapes de déprotection du groupement Boc (étapes 4, 6 et 8) situé en aval de la modification se sont avérées problématiques et ont dû être également triplées.

Après décrochage de la résine, les principaux constituants du brut réactionnel ont été séparés par CLHP (C18), puis analysés par RMN 1D et 2D. Le pseudopeptide cible PFVhAL a été caractérisé ainsi que d'autres produits correspondant à des peptides tronqués. Parmi ceux-ci, nous avons obtenu le tripeptide PFV pour lequel les 2 résidus en position C-terminale sont manquants. La formation de ce tripeptide peut s'expliquer par une cyclisation en triazépane résultant de l'attaque nucléophile du N^β sur la fonction carbonyle du résidu $i+1$ après déprotection du groupement Boc de l'hydrazinoacide. Le mécanisme de cette réaction indésirable est donné dans le schéma 53 et correspond à celui bien connu de la formation de dicétopipérazines.

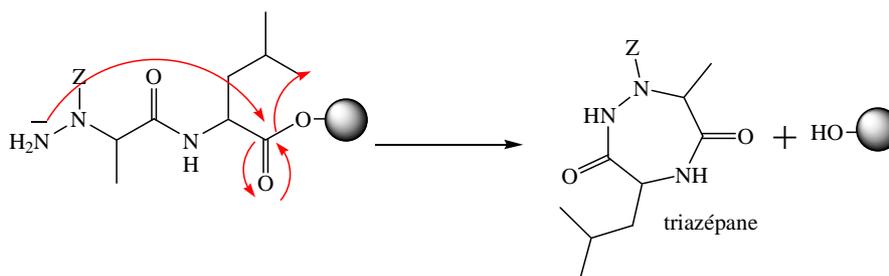


Schéma 53

Bien que nous n'ayons que cette hypothèse pour expliquer la formation du tripeptide, cette réaction de cyclisation impliquant l'atome d'azote β du résidu modifié est cependant surprenante compte tenu des difficultés rencontrées lors des réactions de couplage visant à former le lien hydrazide et qui tendaient à montrer une faible nucléophilie de cet atome.

IV.1.3.2. Stratégie Fmoc

Afin de minimiser la formation de triazépane observé précédemment, nous nous sommes tournés vers l'utilisation d'une résine plus encombrée. La synthèse de PFVh(Z)AL a donc été conduite comme indiqué dans le schéma 54 sur une résine porteuse d'un lien 2-chlorotrityle plus encombré (H-Leu-2-chlorotrityl-PS (Figure 14)) en stratégie Fmoc.

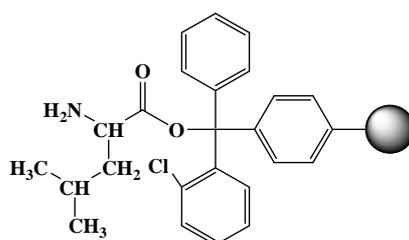


Figure 14 : H-Leu-2-chlorotrityl-PS

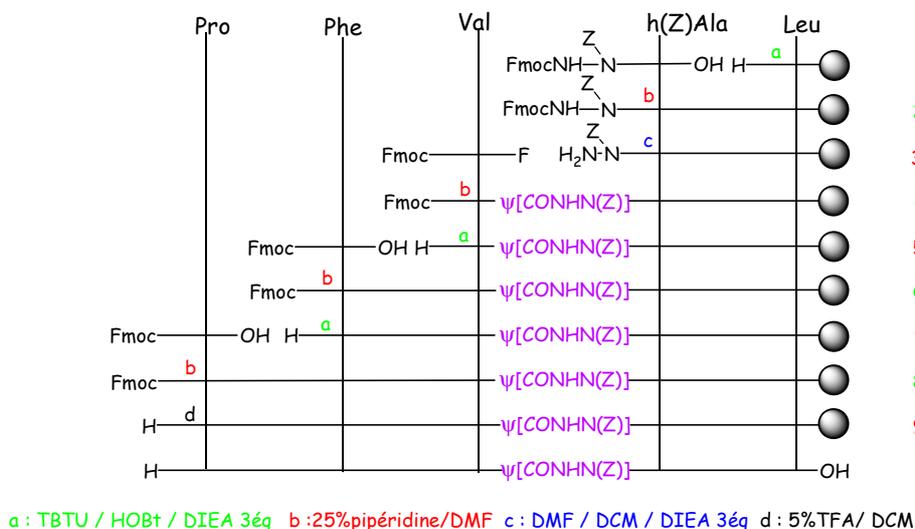


Schéma 54

Après chaque étape de couplage et de déprotection la résine est séchée et un spectre HR-MAS est réalisé. La figure 15 représente les spectres RMN HR-MAS ^1H de la résine de départ (spectre 1) et des différentes étapes de couplage (spectres 2, 4, 6 et 8 [vert]) et de déprotection (spectres 3, 5, 7 et 9 [rouge]) de la synthèse.

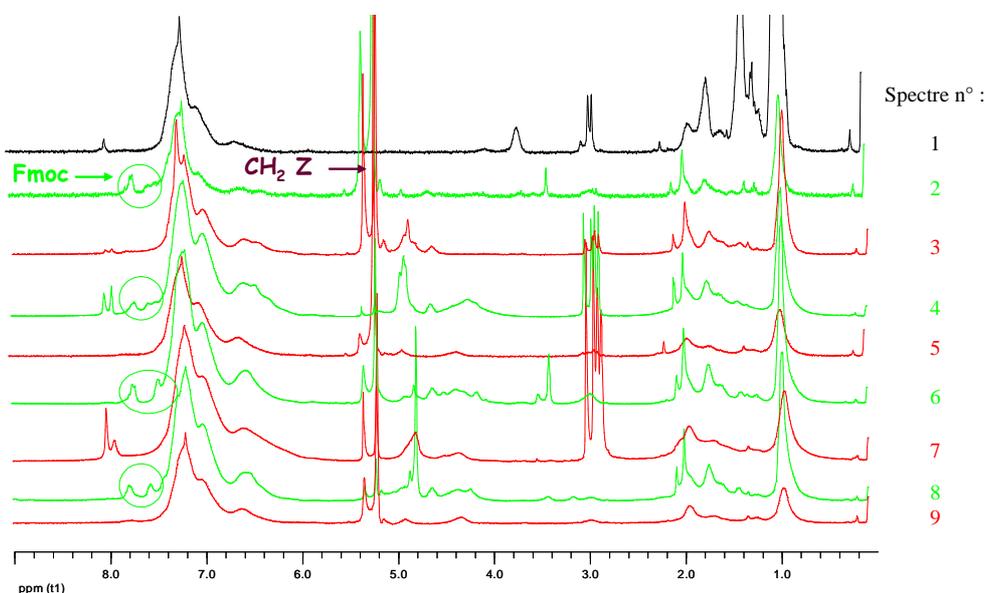


Figure 15

Là encore, l'étude par RMN de chaque intermédiaire permet d'effectuer un suivi efficace de la synthèse. En effet, chaque étape de déprotection du motif Fmoc (spectres 3, 5, 7

et 9 [rouge]) a pu être confirmée par la disparition du doublet caractéristique des protons aromatiques du groupement Fmoc à 7,5 ppm. Inversement, le succès des étapes de couplage (spectres 2, 4, 6 et 8 [vert]) a été confirmé par l'apparition de ce même doublet qui confirme l'introduction d'un motif Fmoc. Le succès du greffage du résidu modifié (Fmoc-h(Z)Ala-OH) a été attesté par la présence simultanée sur le spectre 2 des signaux du motif méthylène du groupement Z et des protons aromatiques du groupement Fmoc.

Ce contrôle systématique des différentes étapes a permis:

- de confirmer, là encore, la très faible réactivité du N ^{β} vis-à-vis d'un acide activé : deux couplages successifs ont été nécessaires pour incorporer de façon conséquente le fluorure d'acide Fmoc-Val-F ;
- de même, qu'observé précédemment, les étapes de déprotection du groupement Fmoc réalisées après introduction de l' α -hydrazinoacide s'avèrent plus difficiles et ont dû être triplées.

Après décrochage de la résine, le brut réactionnel a été purifié par CLHP (C18) et le pseudopentapeptide a été isolé et caractérisé par spectrométrie de masse et par RMN 1D et 2D. La même synthèse effectuée cette fois sans prélèvement a permis d'obtenir un rendement de 13%. Nous avons pensé que ce faible rendement pouvait être lié à un problème d'accessibilité des réactifs, du à une structuration du pseudopeptide sur la résine. En effet, comme nous le verrons dans la dernière partie de ce mémoire, la présence d'un lien hydrazino peut entraîner une structuration du pseudopeptide par formation de liaisons hydrogène supplémentaires créant ainsi un coude¹²⁷. Un tel repliement de la chaîne pseudopeptidique sur le support solide aurait pour conséquence une diminution importante de l'accessibilité de la fonction chimique présente en position N-terminale.

IV.2. Etude quantitative et comparative de la synthèse d' α -hydrazinopeptides

IV.2.1. Stratégie 1

Compte tenu des résultats obtenus et des difficultés rencontrés précédemment, la suite de l'étude a été réalisée en utilisant une résine encombrée (H-Leu-2-chlorotrityl-PS) et dans des mélanges de solvants décrits dans la littérature comme destructurants (« mélanges magiques »)¹²⁸ composé de 33% de DMF, 33% de DCM et 33% NMP pour les étapes de couplages et de 25% pipéridine, 25% de DMF, 25% NMP et de 25% de toluène pour les étapes de déprotection.

IV.2.1.1. Application à la synthèse de PFVh(Z)AL

La synthèse « pas à pas » du pseudopeptide PFVh(Z)AL a été réalisée selon le schéma de synthèse donné ci-dessous :

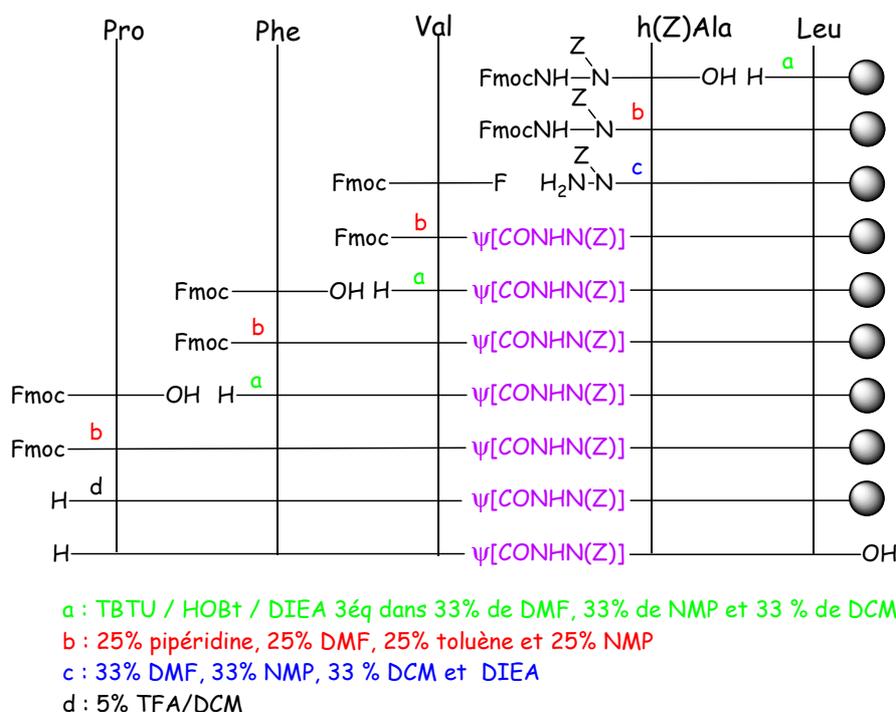


Schéma 55

Le pseudopeptide PFVh(Z)AL a été obtenu avec un rendement satisfaisant de 27 %. Il est à rappeler que cette synthèse réalisée dans les mêmes conditions mais dans le DMF comme solvant (sans « mélange magique ») avait conduit à un rendement nettement plus faible de 13 %. Il apparaît donc au travers de cette étude que l'utilisation du « mélange magique » aurait un effet bénéfique sur la synthèse ce qui conforte notre hypothèse basée sur une structuration du pseudopeptide en croissance sur la résine.

Cette synthèse a également été réalisée dans les mêmes conditions mais en présence d'un tensioactif non ionique (le triton), conditions décrites dans la littérature¹²⁹, ces conditions ne nous ont pas permis d'isoler le pseudopeptide recherché.

IV.2.1.2. Application à la synthèse de PFh(Z)AVL

Nous avons également synthétisé le pseudopeptide présentant la séquence PFh(Z)AVL (présentant une inversion hydrazinoalanine-valine), afin de déterminer l'influence de l'encombrement stérique du partenaire acide activé impliqué dans l'étape de formation du lien modifié sur le rendement de la synthèse. Les conditions réactionnelles préalablement définies ont été utilisées (résine : H-Leu-Chlorotrityle et mélange magique) et sont résumées dans le schéma 56.

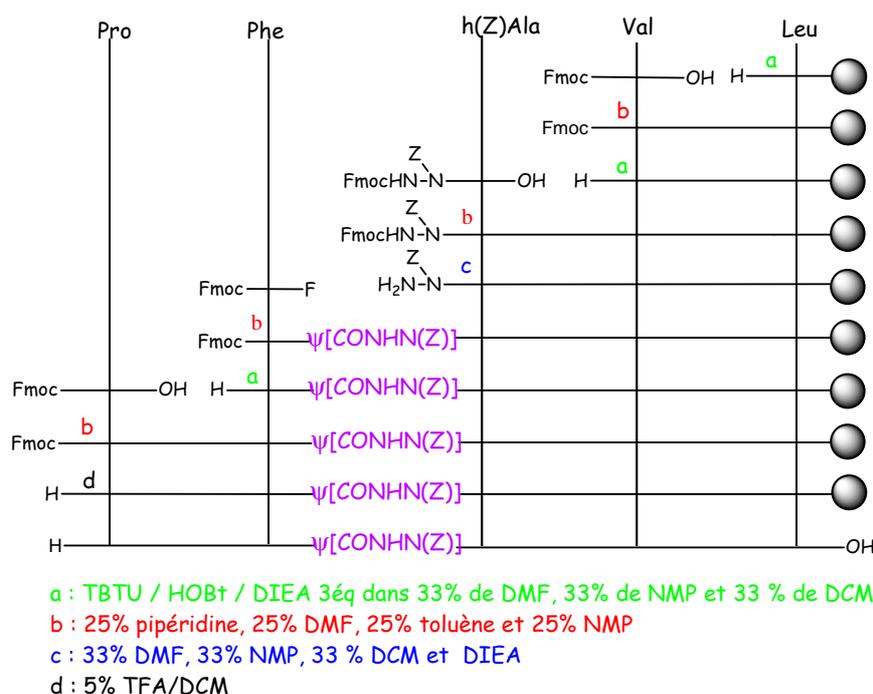


Schéma 56

Le pseudopeptide a été obtenu avec un rendement de 36 %, rendement nettement supérieur à celui obtenu pour la séquence PFVh(Z)AL précédente. Comme nous l'avons montré dans le paragraphe III, la réaction de couplage impliquant le motif hydrazino est sensible à l'encombrement stérique de la chaîne latérale du partenaire acide. Ainsi, l'utilisation de phénylalanine activée, moins encombrée, conduit à un rendement supérieur à celui obtenu à partir de la valine.

IV.2.2. Stratégie 2

Nous avons ensuite effectué une synthèse semi convergente par incorporation du synthon Fmoc-Val-h(Z)Ala-OH ; la synthèse a été réalisée selon la stratégie mise au point précédemment (schéma 57) dans la DMF puis dans le «mélange magique (MM)» comme solvant.

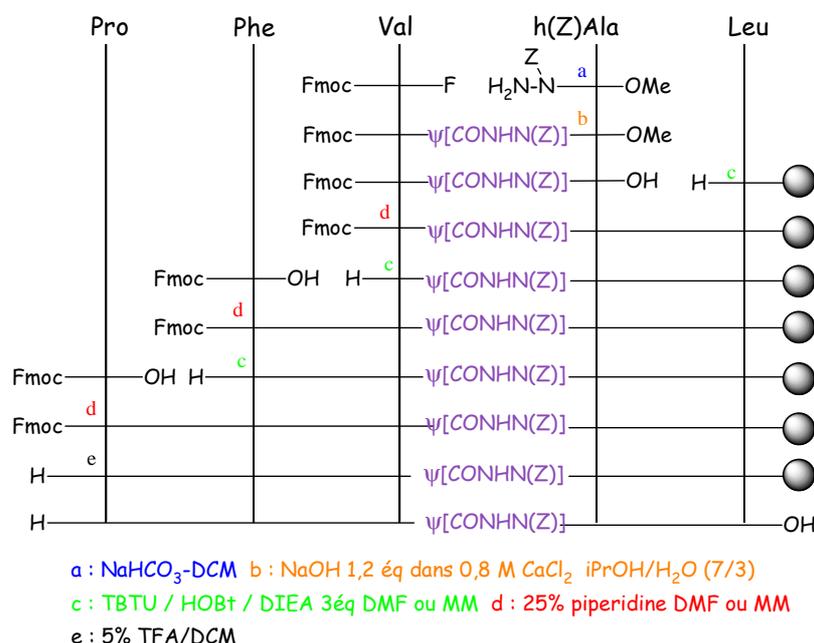


Schéma 57

Lorsque la synthèse est réalisée dans la DMF comme solvant, après décrochage de la résine et purification CLHP, nous avons obtenu le pseudopeptide attendu avec un rendement de 32%. Toute chose étant égale par ailleurs, la même synthèse réalisée dans le mélange

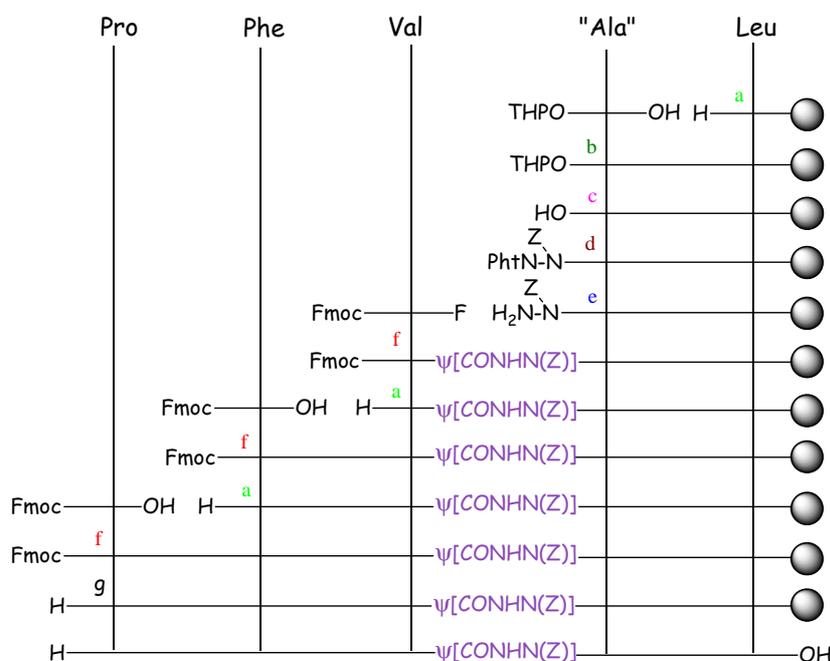
magique (33% de DMF, 33% de DCM et 33% NMP) nous a permis d'isoler le produit de réaction avec un rendement de 46%.

Ces rendements de réactions sont nettement supérieurs à ceux obtenus pour les synthèses « pas à pas » ce qui semble montrer que la formation du lien hydrazide constitue bien l'une des étapes limitantes. De plus nous avons confirmé que l'utilisation d'un solvant déstructurant tend à améliorer là encore les rendements de réaction.

IV.2.3 Stratégie 3

Dans le chapitre 1, nous avons montré qu'il était possible de synthétiser des hydrazinoacides phtaloylés β Pht, α Z-Xaa-OH **30** sur support solide à partir d'hydroxyacides THPO-Xaa-OH **29**. Nous avons tiré profit de ce résultat pour imaginer la stratégie 3.

Ainsi, la stratégie consiste à incorporer un hydroxyacide protégé dans un peptide en croissance ; après déprotection du groupe hydroxyle, le lien hydrazino protégé est introduit par une réaction de Mitsunobu réalisée sur le support solide. Le schéma de synthèse est donné ci-dessous :



a : TBTU / HOBt / DIEA 3 éq. dans MM b : APTS/DCM c : PhN-NHZ **1Z**, PPh₃, DIAD d : MeNHNH₂ 2M in THF
e : DIEA-MM f : 25% piperidine/25% DMF/ 25% toluène/25% NMP g : 5% TFA/DCM

Schéma 58

Le composé **29A** (THPO-Ala-OH) a été greffé sur la résine H-Leu-2-Chlorotrityle-PS en utilisant le TBTU, HOBT et DIEA (a) comme agent de couplage. Le motif THP a ensuite été déprotégé par action d'APTS dans le DCM (b). La réaction de Mitsunobu a été réalisée en utilisant le composé **1Z** (PhtN-NHZ) comme partenaire acide (c). L'élimination du motif phtalimide a été effectuée par action de méthylhydrazine (d). La suite de la synthèse a été réalisée selon les méthodes décrites précédemment (utilisation de fluorure d'acide pour la formation du lien hydrazide, utilisation de « solvants magiques » pour les étapes de couplage et de déprotection en aval du lien modifié).

Après décrochage de la résine et purification CLHP, le produit voulu n'a pas été observé. La réaction de Mitsunobu étant très sensible à l'encombrement, nous avons formulé l'hypothèse d'une gêne stérique due à l'encombrement du lien trityle. Pour confirmer notre hypothèse nous nous sommes tournés vers une résine moins encombrée (Fmoc-Leu-Wang).

En utilisant les mêmes conditions opératoires que précédemment, le produit désiré a bien été isolé avec un rendement de 6 % ce qui montre la faisabilité de la stratégie. Cependant, le produit de la réaction est accompagné d'un peptide présentant la séquence PFV avec un rendement de 12 %. L'obtention de ce peptide tronqué montre donc que l'utilisation d'un lien moins encombré, même s'il tend à favoriser la réaction de Mitsunobu conduit également à la formation de triazépane par cyclisation intramoléculaire. L'utilisation d'un lien moins encombré semble donc à la fois favoriser la réaction de Mitsunobu, mais aussi la réaction indésirable de cyclisation intramoléculaire. Une des possibilités d'amélioration des rendements de cette stratégie est l'utilisation du composé **1Z** tetrachloré comme partenaire acide (Figure 16).

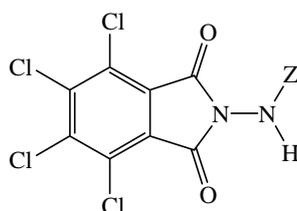


Figure 16 : composé **1Z** tetrachloré

En effet, il a été montré au laboratoire⁴⁸ que ce composé permet d'augmenter le rendement de la réaction de Mitsunobu mais pose en phase liquide de gros problèmes de purification. Dans notre cas, la réaction de Mitsunobu se réalisant sur support solide, les problèmes lors de la purification devraient être supprimés. Cette stratégie reste donc prometteuse.

V. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons démontré que malgré la faible réactivité de l'azote β des hydrazinoacides, l'utilisation de fluorures d'acides permet de former le lien hydrazide avec de bons rendements en phase liquide.

Nous avons également montré qu'il était possible de synthétiser des hydrazinopeptides sur phase solide en stratégie Boc et Fmoc. Lors de ces synthèses, le suivi HR-MAS nous a permis de mettre au point les conditions de couplage et de déprotection.

Nous avons également constaté que la formation de triazépane pouvait être évitée par l'utilisation d'une résine encombrée.

Lors des premiers essais sur phase solide, nous avons supposé qu'une structuration du pseudopeptide sur la résine pouvait générer un problème d'accessibilité des réactifs. L'utilisation d'un mélange de solvants destructurants nous a permis de pallier ce problème. Nous avons pu ainsi réaliser la synthèse d'hydrazinopeptides selon trois stratégies :

1. Pas-à-pas avec incorporation d'un hydrazinoacide
2. Semi-convergente par incorporation d'un pseudodipeptide
3. Pas-à-pas par incorporation d'un hydroxyacide.

Les avantages et les inconvénients de ces stratégies sont regroupés dans le tableau suivant :

	<i>Stratégie 1 :</i>	<i>Stratégie 2 :</i>	<i>Stratégie 3 :</i>
<i>Avantages</i>	- toutes les combinaisons de polhydrazinopeptides sont possibles (1 sur 1 ; 1 sur 2 ; 1 sur 3..).	- rendement supérieur (suppression de l'étape limitante) - méthode de choix pour la synthèse de polhydrazinopeptides 1 sur 2	- gain de temps (synthèse de l'hydrazinoacide directement sur la résine). - possibilité de synthèse en Boc et en Fmoc avec le même synthon
<i>Inconvénients</i>	- rendements inférieurs	- besoin d'une chimiothèque de 400 synthons - synthèse de polhydrazinopeptides 1 sur 1 impossible, - perte de temps en phase liquide	- utilisation d'une résine peu encombrée (réaction de Mitsunobu sensible à l'encombrement) donc formation de triazépane

Suivant le pseudopeptide à synthétiser ces trois stratégies nous permettent d'envisager toutes les possibilités. La stratégie 1 permet toutes les combinaisons. La stratégie 2 conduit à de meilleurs rendements mais nécessite la préparation de synthons pseudodipeptides en phase liquide. Par contre la stratégie 3, même si elle reste à optimiser, est prometteuse car elle permet de réaliser un maximum d'étapes sur phase solide.

CHAPITRE III :
ETUDE PROSPECTIVE SUR LA SYNTHÈSE
ET L'ETUDE STRUCTURALE D'UN
 α /HYDRAZINO-PEPTIDE

I. Introduction

Il est connu que l'activité biologique des peptides et des protéines dépend en grande partie de leur structure secondaire. Ce sont les liaisons hydrogène intra et intermoléculaires qui contribuent principalement à cette structuration. Depuis quelques années maintenant, il a été montré que des pseudopeptides pouvaient également s'autostructurer. Afin de tirer profit des résultats obtenus dans le chapitre 1 et 2, nous avons effectué une étude prospective visant à la synthèse et l'étude structurale d'un α /hydrazino-peptide. Bien que cette étude soit loin d'être complète elle marque le début des recherches concernant un nouveau type de foldamères jamais décrit à ce jour.

Afin de situer le contexte de cette étude, nous rappellerons tout d'abord les données de la littérature concernant les principaux types de structures secondaires rencontrés dans les peptides et dans certains pseudopeptides ainsi que les différentes techniques permettant l'analyse structurale de ces composés. Nous décrirons ensuite la synthèse d'un α /hydrazino-peptide et les prémices de son étude structurale.

Le plan de ce chapitre s'articulera donc en deux parties :

- rappels bibliographiques sur les peptides et les pseudopeptides
- synthèse et étude structurale d'un α /hydrazino-peptide

II. Rappels bibliographiques

II.1. Liaisons hydrogène et éléments de structures secondaires dans les peptides

Un certain nombre de conventions a été établi pour décrire la disposition dans l'espace des atomes constituant les peptides. Trois angles dièdres, notés ϕ , ψ et ω permettent de définir complètement la géométrie du squelette peptidique. Ils représentent respectivement les angles de torsion autour des liaisons N-C $^\alpha$, C $^\alpha$ -CO, CO-N (Figure 17). Ils sont comptés positivement lorsque l'observateur, situé du côté N-terminal voit la partie C-terminale tourner dans le sens des aiguilles d'une montre. L'angle nul correspond à une disposition éclipsée des atomes.

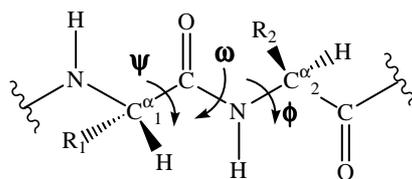


Figure 17 : Représentation des angles dièdres caractérisant la structure du squelette peptidique

La liaison amide se comporte comme une double liaison. Les six atomes C^{α}_1 , O, C, N, H et C^{α}_2 sont sensiblement situés dans le même plan. La valeur de l'angle ω est donc voisine soit de 0° , soit de 180° selon que la liaison peptidique est dite respectivement *cis* ou *trans*. (Ne sont tenus en compte dans cette nomenclature que les atomes du squelette peptidique).

Une liaison hydrogène s'établit entre un site donneur de proton, un NH amide par exemple, et un site accepteur comme un groupement carbonyle. Dans les peptides, une liaison hydrogène entre le CO d'un résidu i et le NH d'un résidu $i+x$ se manifeste par une distance $N \cdots O$ comprise entre 2,8 et 3,3 Å et un angle (N-H,O) dont la valeur varie entre -20 et $+20^\circ$. Elle ferme alors un pseudocycle à n atomes, noté C_n , qui caractérise les différents types de structures secondaires (Figure 18).

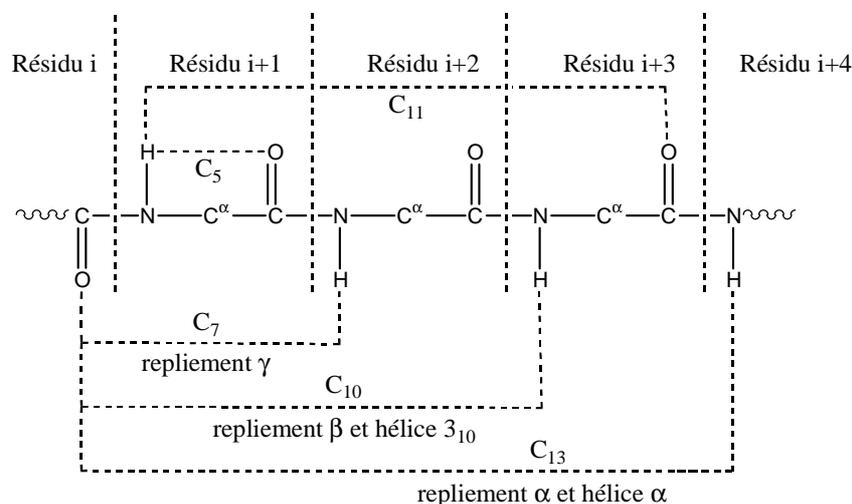


Figure 18 : Représentation des principales interactions à courte distance dans les peptides

Formé par une liaison hydrogène interne à un résidu, le pseudocycle à 5 atomes (C_5) est caractéristique d'une structure étirée.

Le repliement γ est stabilisé par une liaison hydrogène de type $i+2 \rightarrow i$, fermant un pseudocycle à 7 atomes (C_7). Il a été mis en évidence lors d'études de dipeptides en

solution^{130,131} et de protéines¹³². La chaîne latérale du résidu $i+1$ peut occuper une position pseudo axiale ou pseudo équatoriale par rapport au plan moyen du cycle, cette dernière étant la plus stable (Figure 19).

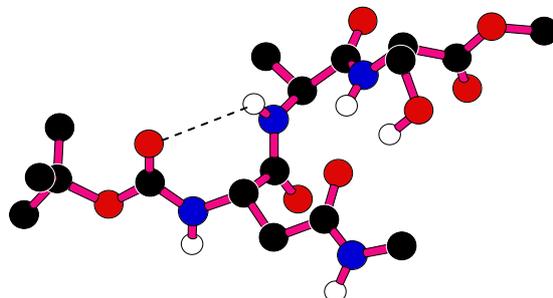


Figure 19: Repliement γ

Une liaison hydrogène entre le CO d'un résidu i et le NH d'un résidu $i+3$, fermant un pseudocycle à 10 atomes (C_{10}), donne naissance à un repliement de type β dont plusieurs familles ont été identifiées (Figure 20)¹³³. Les principales caractéristiques des différents sous-types connus à ce jour sont rassemblées dans le tableau 15. Par la suite le terme de repliement β a été étendu à toute forme repliée, stabilisée ou non par liaison hydrogène, dont la distance entre le C^α des résidus i et $i+3$ reste inférieure à 7 Å.

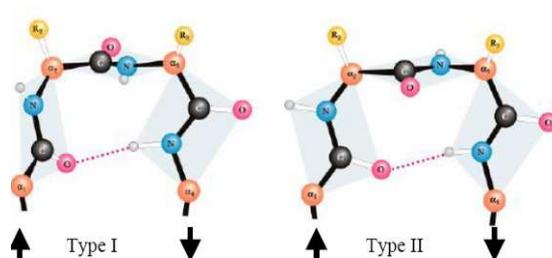


Figure 20 : Schéma des coudes de type I et II

Types	Φ_{i+1}	Ψ_{i+1}	Φ_{i+2}	Ψ_{i+2}	ω_{i+2}
I	-60°	-30°	-90°	0°	180°
I'	60°	30°	90°	0°	180°
II	-60°	120°	80°	0°	180°
II'	60°	-120°	-80°	0°	180°
III	-60°	-30°	-60°	-30°	180°
III'	60°	30°	60°	30°	180°
V	-80°	80°	80°	-80°	180°
V'	80°	-80°	-80°	80°	180°
VIII	-60°	-30°	-120°	120°	180°
VII a1	-60°	120°	-90°	0°	0°
VII a2	-120°	120°	-60°	0°	0°
VI b	-135°	135°	-75°	160°	0°
IV	-	-	-	-	-

Tableau 15 : Angles dièdres moyens dans les coudes β

Il est à noter que les coudes β de type VI ne sont présents que lorsque le résidu $i+2$ possède une liaison peptidique cis ($\omega = 0^\circ$) donc essentiellement lorsque ce résidu est une proline.

En pratique, pour caractériser un type de coude β , on accorde une tolérance de $\pm 30^\circ$ sur trois des angles et une tolérance de $\pm 45^\circ$ sur le quatrième¹³⁴. Quand seul le critère de distance inférieure à 7 Å entre le $C_{\alpha i}$ et $C_{\alpha i+3}$ est respecté, c'est-à-dire quand la valeur des angles dièdres ne permet pas, malgré la tolérance accordée, de pouvoir le classer dans un des types précédemment définis, alors ce coude β sera classé type IV.

La répétition de pseudocycle conduit à l'établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires, on parle alors d'hélices. On utilise l'écriture « hélice a_b » où a et b représentent respectivement le nombre de résidus aminoacides par pas d'hélice et le nombre d'atomes qui participent à la formation du pseudocycle. Le pas de l'hélice est caractérisé par sa longueur en Å (distance entre deux points homologues) et par son enroulement vers la gauche (M) ou vers la droite (P). Dans les protéines, l'hélice α , caractérisée par un pas droit de 5,4 Å correspondant dans cette nomenclature à l'hélice-3,6₁₃ (Figure 21).

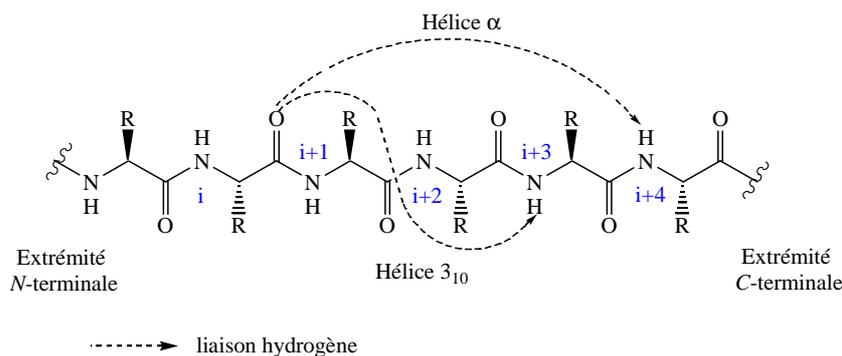


Figure 21 : (L)- α -peptide

Des liaisons hydrogène intramoléculaires peuvent se former à plus longue distance dans l'enchaînement peptidique entre atomes d'oxygène et d'hydrogène amidiques. On parle alors de brin β , structure proche des structures étendues avec des valeurs standards d'angles dièdres $\phi = -120^\circ$ et $\psi = +120^\circ$.

Deux ou plusieurs brins β peuvent s'associer en feuillet β grâce à des liaisons hydrogène caractéristiques ; il en existe, entre autres, deux types principaux (Figure 22) : le feuillet β anti-parallèle dont l'orientation des brins successifs est inversée avec des angles dièdres $\phi = -139^\circ$ et $\psi = +135^\circ$; le feuillet β parallèle dont l'orientation des brins successifs est la même, avec des angles dièdres $\phi = -119^\circ$ et $\psi = +113^\circ$.

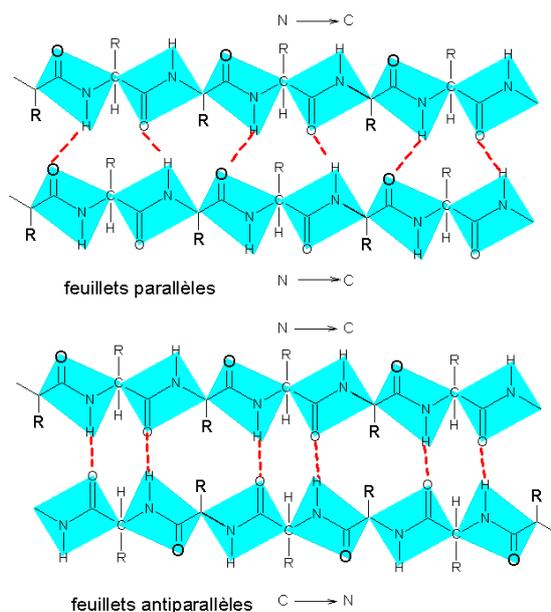


Figure 22 : Schéma de feuillets β parallèles et anti-parallèles

II.2. Liaisons hydrogène et éléments de structures secondaires dans certains pseudopeptides

Les propriétés structurales des peptides ayant été largement explorées, les recherches se sont également orientées vers l'étude d'analogues pseudopeptidiques. Les équipes de Seebach, Gellman et DeGrado ont montré notamment que les β -peptides, en dépit d'une flexibilité *a priori* encore plus grande que celle des α -peptides naturels, pouvait adopter des structures secondaires variées conférant à ces derniers des activités biologiques ciblées¹³⁵⁻¹³⁹. Gellman a proposé d'utiliser le terme "foldamère"¹⁴⁰, contraction de « fold » et « oligomère », pour qualifier tout oligomère capable d'adopter une conformation bien définie en solution par auto-organisation structurale générée par des interactions non covalentes entre unités monomériques¹⁴¹⁻¹⁴³. Nous décrivons ici brièvement quelques motifs pseudopeptidiques utilisés pour la synthèse de foldamères en rapport avec notre travail.

II.2.1. Les β -peptides

Les β -peptides sont constitués de l'assemblage de β -aminoacides, homologues supérieurs des α -aminoacides naturels. Par rapport à ces derniers, le squelette d'un β -aminoacide incorpore un carbone supplémentaire (Figure 23). De ce fait, une ou plusieurs chaînes latérales peuvent être introduites en position 2 et/ou 3 du groupe carboxylique, avec des stéréochimies contrôlées. Le squelette β -peptidique autorise donc une grande modulation structurale qui a été largement exploitée.

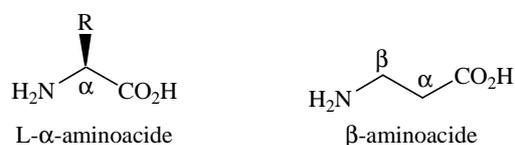


Figure 23

Les équipes de Gellmann^{140,144-148} et Seebach¹⁴⁹ ont identifié 6 structurations possibles dans les β -peptides reportées sur la figure 24.

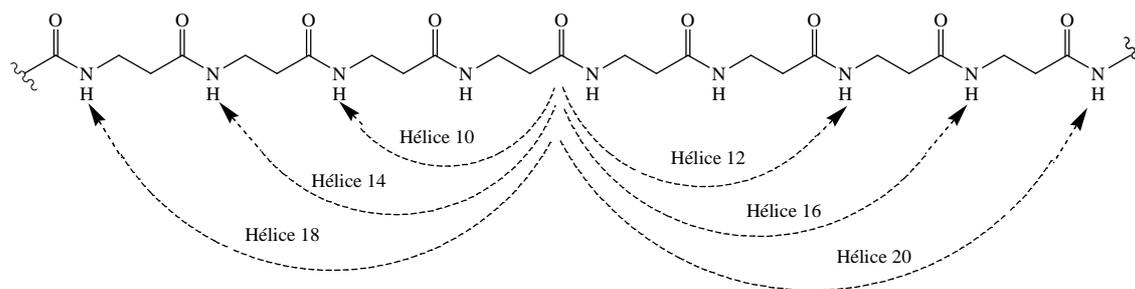


Figure 24 : squelette d'un poly(β -aminoacide). Les flèches indiquent les six hélices possibles.

La structuration la plus favorable est l'hélice 3_{14} obtenue par un réseau de liaisons hydrogène CO---HN de direction opposée à celle de l'hélice α .

II.2.2. Hydrazinopeptides : analogues azotés des β -peptides.

Les premières études structurales par diffraction des rayons X, réalisées par Aubry et coll. sur des séquences de petites tailles (2 ou 3 résidus) ont montré que le lien hydrazide pouvait apporter de fortes modifications structurales par rapport au lien peptidique^{127,150}. Ainsi, la présence de la liaison N-N dans l'hydrazinopeptide introduit non seulement un allongement de la chaîne peptidique, mais aussi une possibilité supplémentaire de rotation. En effet, les plans $C'-N^{\beta}-N^{\alpha}$ et $N^{\beta}-N^{\alpha}-C^{\alpha}$ de la liaison hydrazide sont approximativement perpendiculaires. De plus, certains des composés étudiés adoptent des conformations étendues stabilisées par des dispositions repliées particulières aux hydrazinopeptides. C'est le cas de Piv-Pro- N^{β} H- N^{α} Bzl- CH_2 -CO-NHiPr et de Moc- N^{β} H-Pro-OH (Figure 25) dans lesquels les résidus hGly et hPro sont repliés par une liaison hydrogène bifide : le site donneur (iPr)NH ou OH y est lié à la fois au carbonyle hydrazide et à la paire électronique libre de l'azote α (sp^3)¹²⁷.

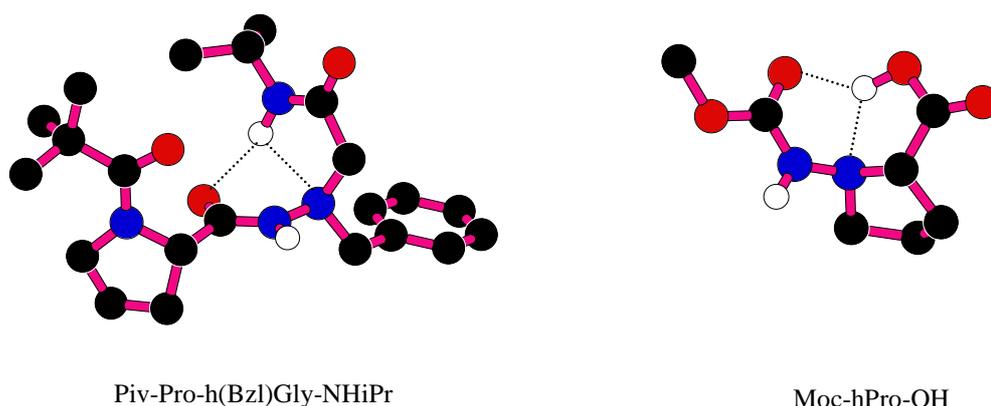


Figure 25 : Conformation à l'état solide de Piv-Pro-h(Bzl)Gly-NHiPr et Moc-hPro-OH

Dans une étude théorique, Günther et Hofmann proposent en 2001 une extension du concept de β -peptides à travers les hydrazinopeptides¹⁵¹, le carbone en β étant substitué par un azote (Figure 26).

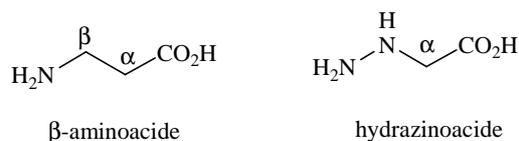


Figure 26

Il ressort de cette étude théorique que la présence du fragment $\text{N}^{\alpha}\text{H}$ ouvre de nouvelles possibilités pour l'établissement de structures secondaires. Il peut potentiellement intervenir comme accepteur et/ou donneur de liaisons hydrogène et combiner son action à celle des contacts $\text{CO}\cdots\text{HN}$ classiques. Ces auteurs ont envisagé l'ensemble des réseaux de liaisons hydrogène intramoléculaires qui pourraient apparaître dans les hydrazinopeptides et modélisé les conformations résultantes (Figure 27).

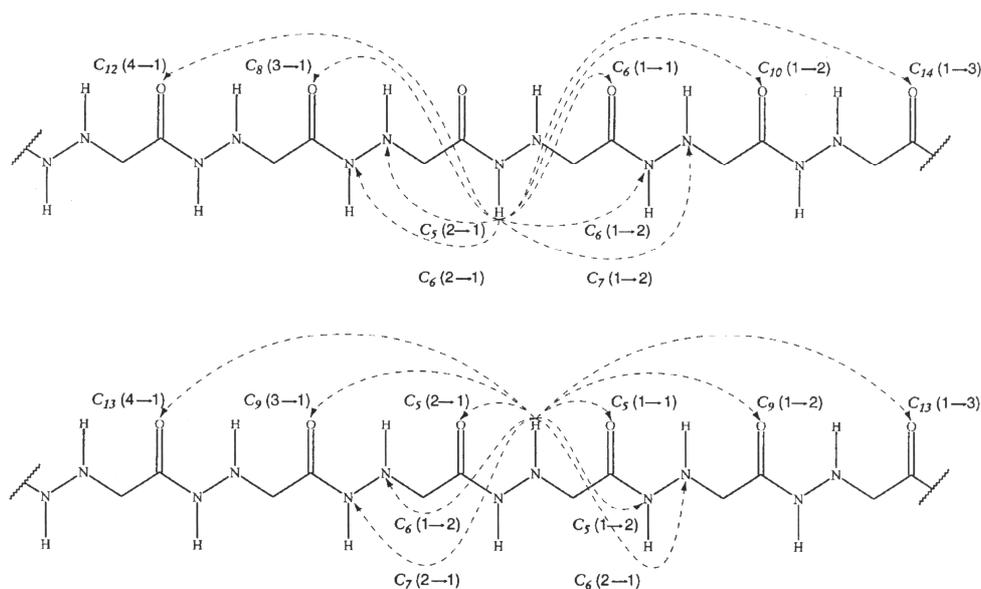


Figure 27 : réseaux de liaisons hydrogène dans les hydrazinopeptides

Différents modes de calcul des énergies relatives font ressortir une structure en hélice $3,3_{14}$ (H14 type II), comme la conformation la plus favorable. La topologie distincte de celle-ci, par rapport à l'hélice 3_{14} (H14 type I) des β -peptides, se justifierait par une interaction supplémentaire impliquant le doublet de l'azote N^α . Une autre hélice de type $1,7_5$ reposant sur une interaction classique CO--HN entre résidus adjacents et possédant une énergie proche de la précédente est également possible.

Cette analyse théorique montre que les hydrazinopeptides peuvent adopter une large variété de structures secondaires. De plus, il semble que l'azote α joue un rôle stabilisant par les effets donneurs de son doublet et non par un effet donneur d'hydrogène.

Lelais et. Seebach¹²⁴ se sont intéressés à la synthèse et à l'analyse conformationnelle d'un hydrazinohexapeptide¹²⁴ (Figure 28).

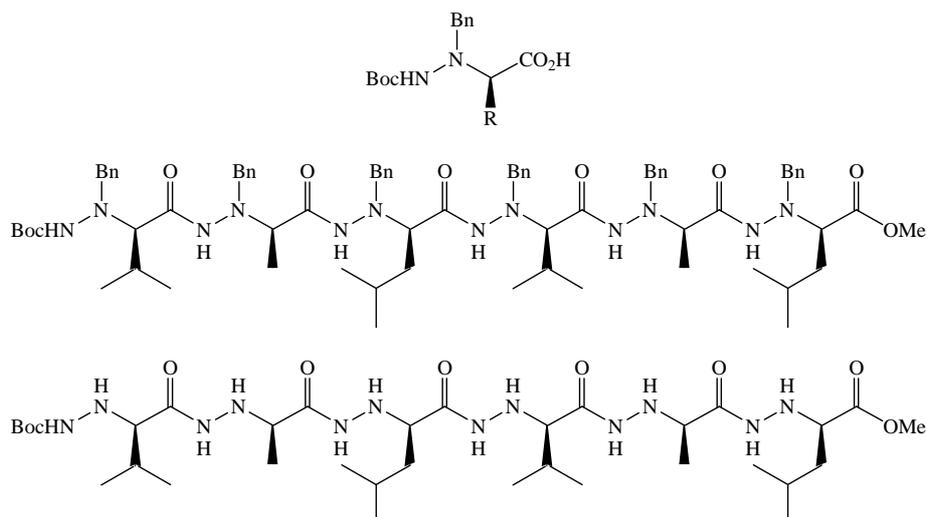


Figure 28 : hydrazinohexapeptides

A l'inverse de la courbe de dichroïsme circulaire obtenu pour le composé benzylé, qui ne révèle aucune structuration particulière, l'allure de celle du dérivé déprotégé évoque la courbe CD associée à l'hélice 3_{14} (P) observée pour les β -peptides. Malheureusement l'analyse RMN n'a permis d'accéder à aucune information structurale supplémentaire ; les signaux des $N^{\beta}H$ sont superposés et mal définis et ceux des $N^{\alpha}H$ ne sont pas identifiables. L'utilisation de divers solvants n'a pas suffi à lever cet obstacle.

Salaün et coll.¹⁵² ont, quant à eux synthétisé des aza- β^3 -peptides dérivés de l'acide hydrazinoacétique N^{α} -substitués. La chiralité de ces composés est portée par l'atome d'azote α (Figure 29).

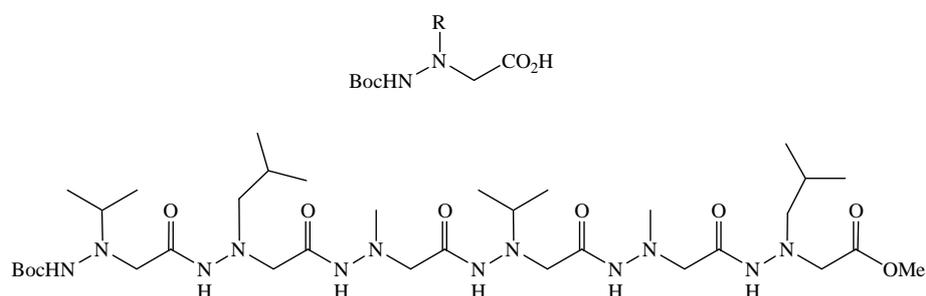


Figure 29 : Aza- β^3 -peptides

Ils ont observé une structuration de ces composés par formation de pseudocycles en C_8 obtenus par un réseau de liaisons hydrogène du cœur du squelette de l'oligomère, entre un $N^{\beta}H$ et le carbonyle d'un carbazate à l'extrémité *N*-terminale, et entre le carbonyle hydrazidique et un NH amide ou un OH d'acide à l'extrémité *C*-terminal (Figure 30).

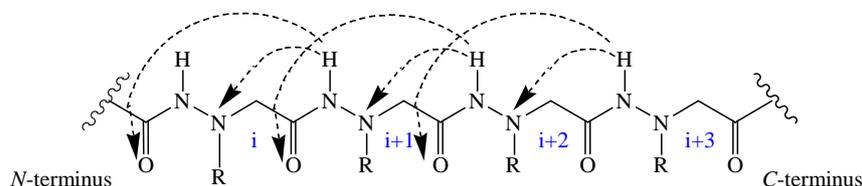


Figure 30 : réseaux de liaisons hydrogène des aza- β^3 -peptides

L'étude conformationnelle de ces molécules a montré deux conformations privilégiées de l'azote α , dont notamment une conformation étirée faisant apparaître une configuration absolue identique des atomes d'azotes α et une conformation cyclique faisant apparaître une alternance *R,S* pour la configuration absolue des azotes α .

II.2.3. Les α/β -peptides

Récemment l'équipe de Gellman a synthétisé des pseudopeptides mixtes α,β ^{137,153,154}. Lors de cette étude ils ont montré que ces pseudopeptides mixtes continuaient à s'autostructurer et adoptaient des formes identiques aux β -peptides telles que les hélices 11, 14/15, 18 (Figure 31).

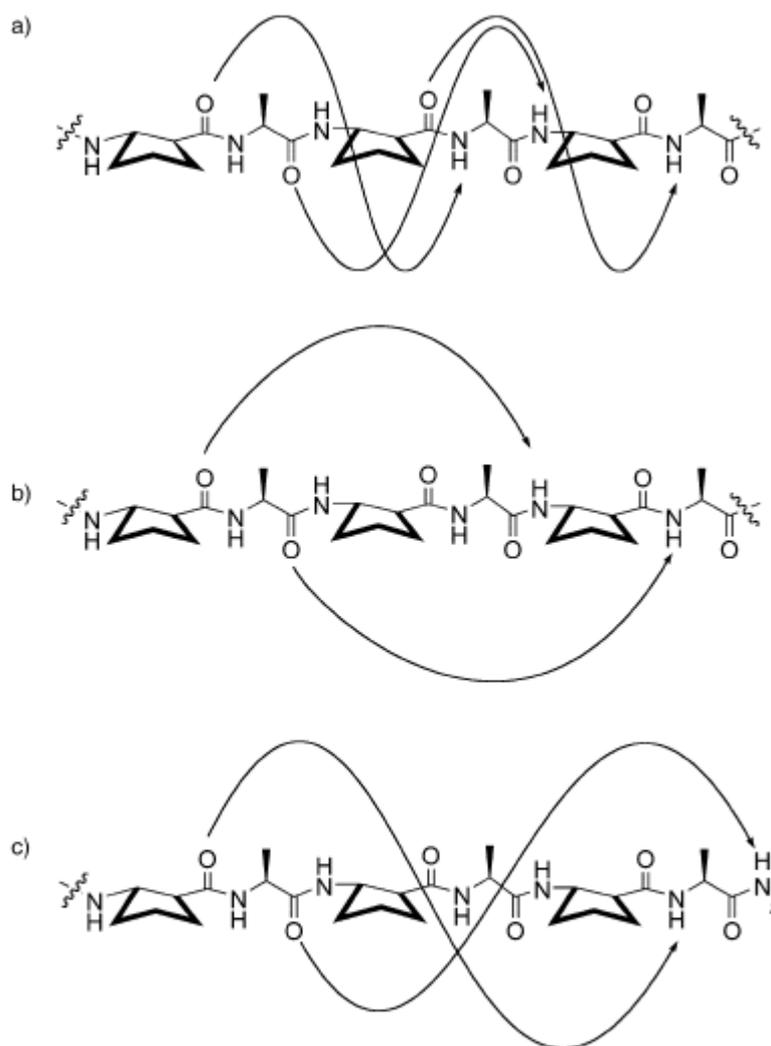


Figure 31 : α/β -peptides a) hélice 11, b) hélice 14/15 c) Hélice 18

II.3. Méthodes et techniques d'études

Les outils physiques qui permettent la mise en évidence des interactions responsables de ces structurations sont brièvement présentés dans ce paragraphe.

II.1.1. Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X est une méthode qui permet d'accéder avec certitude à une conformation privilégiée au sein d'une molécule. Elle fournit des informations sur les paramètres géométriques (longueurs et angles de liaison) et sur la présence d'interactions inter et intramoléculaires (liaisons hydrogène). Cette méthode *a priori* très performante connaît

cependant des limites. Son utilisation reste d'abord conditionnée par l'obtention de monocristaux de bonne qualité. Tous les produits ne cristallisent pas et certains demeurent des huiles. Par ailleurs, dans un cristal, les forces d'empilement et de cohésion peuvent s'exercer au détriment des interactions intramoléculaires potentielles. La conformation déterminée par radiocristallographie ne correspond donc pas forcément à celle du composé en solution très diluée ou sous forme bioactive.

II.1.2. Modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est aujourd'hui un outil indispensable pour accompagner la recherche et la synthèse de nouveaux composés chimiques. En effet, la modélisation moléculaire est une technique permettant d'une part, de représenter les propriétés et les réactions chimiques d'un système et d'autre part, de manipuler les structures 3D des molécules.

Différentes méthodes de calculs ont été développées au cours des années suivant les moyens informatiques mis en jeu, les systèmes impliqués ainsi que les propriétés étudiées :

- Les méthodes *ab initio* basées sur la résolution d'équations de la mécanique quantique. Elles permettent ainsi de connaître les propriétés qui dépendent de la distribution électronique mais sont consommatrices de beaucoup de temps de calculs et seules l'étude de petites molécules de quelques dizaines d'atomes n'est possible par ces méthodes.
- La mécanique moléculaire et la dynamique moléculaire basées sur la résolution des équations de la mécanique classique. Dans cette méthodes un certain nombre de données ont été introduites, elles forment le champ de forces. Elles proviennent de données expérimentales de spectroscopie vibrationnelle, de données de diffraction des RX ou de valeurs obtenues par les méthodes *ab initio* : c'est donc une méthode purement empirique mais qui a l'avantage d'être rapide.
- Les méthodes semi-empiriques qui sont un mélange des méthodes *ab initio* et empiriques.

II.1.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Le principe de la RMN repose sur l'interaction entre une onde électromagnétique et le moment dipolaire magnétique porté par certains noyaux comme ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{17}O ... En présence d'un champ magnétique homogène et stable, les spins de ces noyaux subissent un mouvement de précession dont on peut, après une excitation appropriée du système, détecter la fréquence. Cette fréquence est caractéristique du noyau observé. Les informations classiquement fournies par la RMN sont :

- les déplacements chimiques
- les constantes de couplages
- les effets Overhauser nucléaires
- les temps de relaxation liés à la largeur et donc l'intensité des signaux.

Ces informations permettent l'étude des propriétés conformationnelles des peptides, par le biais notamment de la mise en évidence de liaisons hydrogène et de la détermination des angles de torsion pour les petites molécules.

L'attribution univoque des signaux et éventuellement le séquençage ultérieur des pseudopeptides sont établis grâce aux techniques particulières de la RMN à deux dimensions.

La séquence COSY (CORrelated SpectroscopY) permet de corréler les signaux provenant de noyaux couplés scalairement et dont la valeur de la constante de couplage n'est pas nulle. Elle est utilisée pour identifier ou repérer les systèmes de spins intrarésidus, sans toutefois pouvoir effectuer une attribution univoque lorsque plusieurs résidus identiques sont présents^{155,156}.

Pour l'attribution de tous les spins au sein d'un même résidu, on a recours à une méthode plus sophistiquée, la séquence TOCSY (TOTally CORrelated SpectroscopY)¹⁵⁷.

Pour l'établissement de la séquence d'un peptide comportant une dizaine de résidus (ou plus) parfois identiques, on a recours à d'autres méthodes expérimentales, à savoir la séquence ROESY (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY) ou NOESY (Nuclear, Overhauser Effect SpectroscopY)^{157,158}. L'effet Overhauser repose sur les couplages

dipolaires (interactions dipôle-dipôle) entre noyaux, à travers l'espace. Ces couplages dipolaires ne sont observables que pour les distances interprotoniques inférieures à 4Å. Cette technique renseigne sur les distances interatomiques de groupements non directement liés de façon covalente.

Ainsi la recherche des corrélations $C^\alpha H_i / NH_i$ et $C^\alpha H_i / NH_{i+1}$ dans une carte NOESY permet le séquençage univoque de l'enchaînement peptidique étudié.

On peut également étudier l'évolution des déplacements chimiques des protons amides, ou hydrazides en fonctions de la température ou du milieu (solvants, pH)¹⁵⁹.

II.1.4. Dichroïsme circulaire (DC)

Cette technique spectroscopique repose sur la capacité qu'ont les structures optiquement actives d'absorber de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite et la lumière polarisée circulairement à gauche. Dans le cas des protéines, les spectres renseignent sur la nature des différents types de structures secondaires. L'allure d'un spectre DC dépend de l'organisation locale de la liaison peptidique, ce qui permet donc de distinguer les hélices α , les feuillets β , les coudes et les structures désordonnées. L'enregistrement des spectres DC permet d'évaluer les changements d'états conformationnels d'une protéine en fonction de nombreux facteurs.

II.1.5. Spectroscopie d'absorption Infrarouge (IR)

Les mouvements de vibration des atomes d'une molécule qui s'accompagnent d'une modification soit en amplitude, soit en direction, de son moment dipolaire électrique, sont à l'origine d'absorption de type vibrationnel dans le domaine des ondes infrarouges.

Dans le spectre IR des amides et des peptides, les bandes les plus intéressantes correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons C=O (bande amide I dans le domaine 1580-1720 cm^{-1}) et N-H (Bande A dans le domaine 3200-3520 cm^{-1}). Ces vibreurs jouent en particulier le rôle de sondes spectroscopiques dans la mise en évidence de liaisons hydrogènes intramoléculaires de type C=O...H-N. Quand ils sont impliqués dans une telle interaction,

leurs bandes d'absorption sont déplacées vers les faibles fréquences, et les variations relatives des fréquences reflètent la force des interactions mises en jeu.

L'établissement de la structure secondaire d'une molécule ne peut être en aucun cas le résultat d'une seule de ces techniques. Seule la cohérence des données obtenues par l'utilisation de plusieurs outils peut permettre de définir une structuration.

III. Synthèse et étude structurale d'un α /hydrazino-peptide

Au vu de l'ensemble de ces données bibliographiques, il nous a paru intéressant de synthétiser, à partir de l'un des pseudodipeptides présenté dans le chapitre II, un nouveau type de foldamère mixte présentant une alternance lien amide/liens hydrazide. En plus, de l'alternance de lien amide/hydrazide ces composés ont la particularité de présenter l'alternance *R* et *S* des carbones asymétriques. En effet, compte tenu du mode de synthèse adoptée le carbone asymétrique des motifs hydrazinoacides est inversé par rapport à celle des carbones asymétriques des aminoacides. Cette structure nous a paru intéressante à étudier, ces composés pouvant être considérés comme des analogues azotés d'oligomères mixtes α/β .

III.1. Synthèse de Boc-(Phe-h(Z)Ala)₄-OMe

Nous avons effectué la synthèse et l'étude structurale de Boc-(Phe-h(Z)Ala)₄-OMe. Ce pseudopeptide a été synthétisé à partir de Boc-Phe-h(Z)Ala-OMe selon le schéma 59.

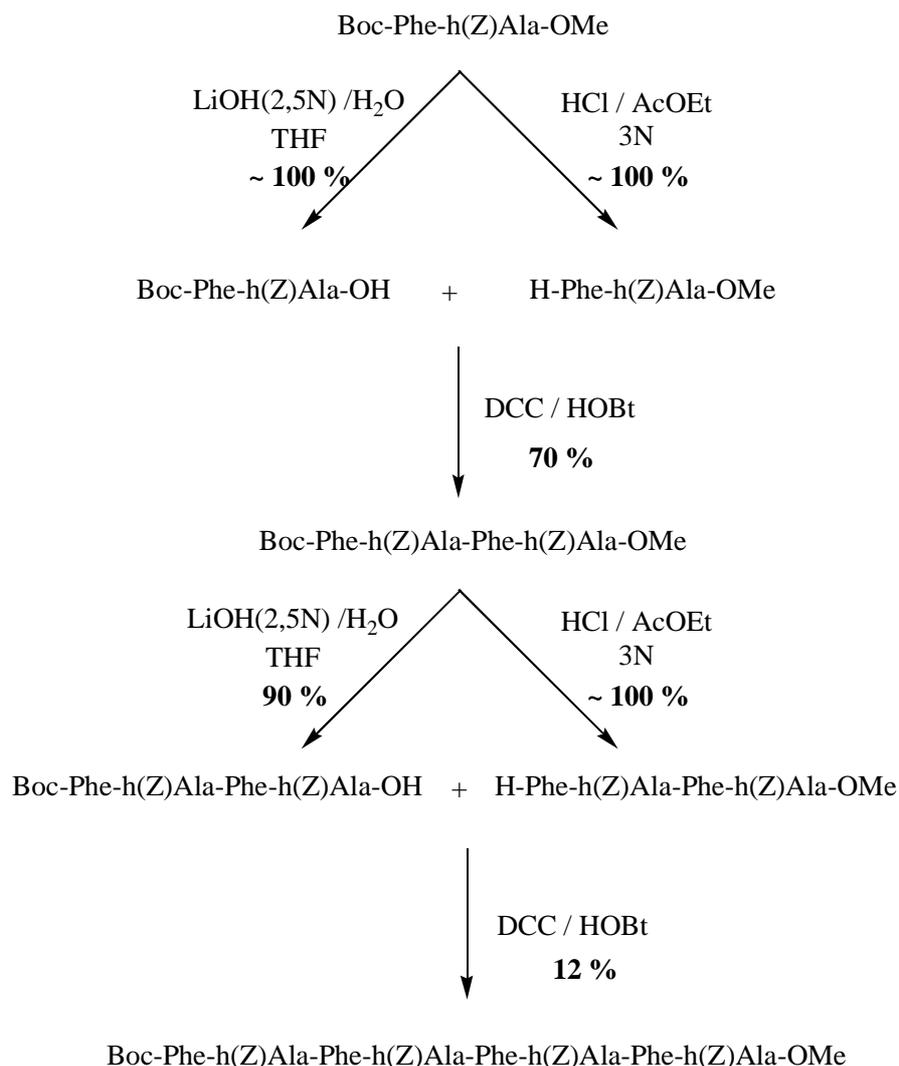


Schéma 59

Les étapes de déprotection des parties C et N-terminales des pseudodipeptides ont été réalisées en utilisant les conditions opératoires définies dans le chapitre 1 (respectivement LiOH (2,5M)/ H₂O et THF et HCl dans l'AcOEt 3N) ; les étapes de couplage utilisent le couple DCC / HOBt. Il est à noter que pour l'étape de couplage conduisant au pseudooctapeptide et impliquant deux pseudotétrapeptides un rendement faible de 12% a été obtenu.

III.2. Etude structurale de Boc-(Phe-h(Z)Ala)₄-OMe

III.2.1. Modélisation moléculaire

Nous avons réalisé une étude en mécanique et dynamique moléculaire utilisant les logiciels Insight II et Amber 8.0, installé sur une console graphique SGI octane. Ces logiciels ont l'avantage de pouvoir être adaptés aux molécules de nature non entièrement peptidique. Les simulations ont été réalisées dans un solvant explicite (chloroforme), c'est-à-dire que les molécules de solvant sont explicitement représentées. Les calculs de dynamique moléculaire ont été effectués dans l'ensemble NTP pour lequel le nombre de particules (N), la température (T) ainsi que la pression (P) restent constants au cours de la simulation.

Cette simulation montre que ce type de molécules peut s'autostructurer par établissement de liaisons hydrogène. La conformation la plus probable est issue de la formation de pseudocycles à 12 atomes inversés dus à la liaison hydrogène entre le H du N ^{β} du résidu *i* avec le C=O du groupement Z du résidu *i*+3. Ainsi, sur l'oligomère synthétisé deux pseudocycles peuvent être mis en évidence (Figure 32 et 33).

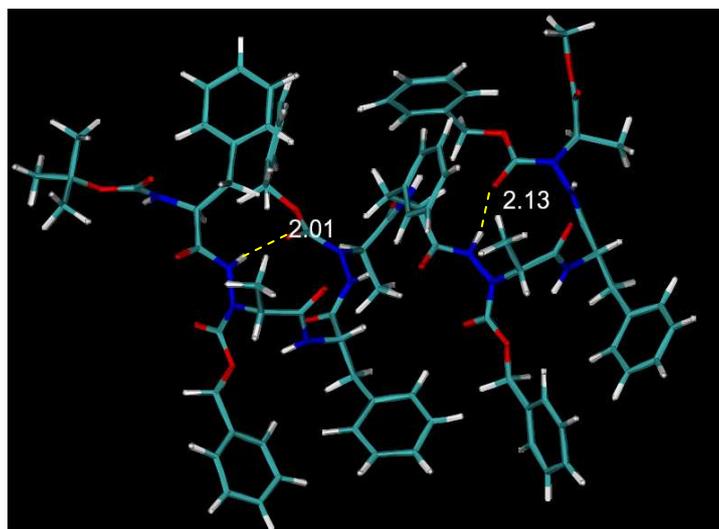


Figure 32 : Structure de plus basse énergie pour Boc-(Phe-h(Z)Ala)₄-OMe dans le chloroforme

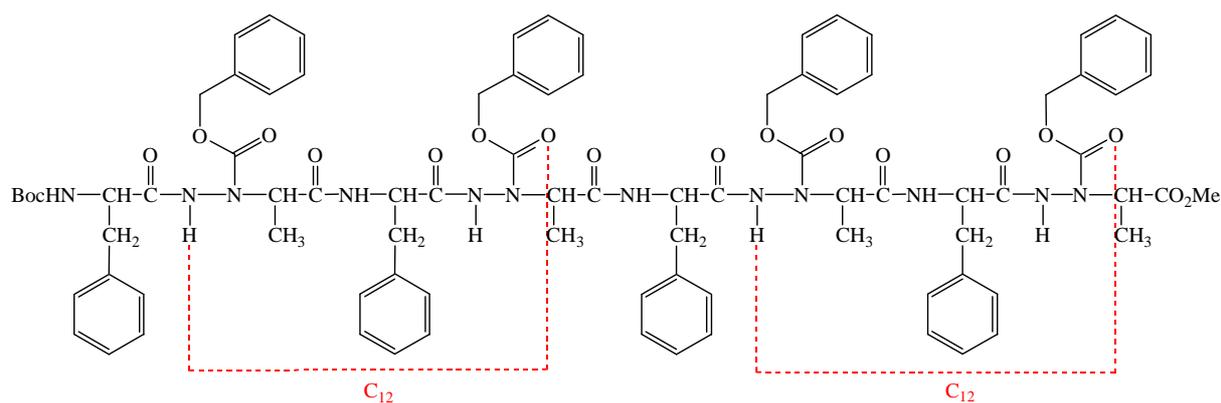


Figure 33 : réseaux de liaisons hydrogène dans Boc-(Phe-h(Z)Ala)₄-OMe

Cette structuration en C₁₂ inversée a déjà été rencontrée dans les β -peptides^{149,160,161}. La particularité dans notre cas réside dans l'implication du C=O d'un motif Z et non d'un C=O du squelette peptidique. Afin de confirmer cette structuration nous avons tenté d'effectuer des études en RMN, dichroïsme circulaire et IR.

III.2.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Nous avons effectué des expériences RMN COSY, TOCSY, NOESY, ROESY dans différents solvants deutérés (chloroforme, pyridine, méthanol, DMSO), ainsi qu'à différentes températures. Malheureusement, l'allure des spectre obtenus constitués de signaux larges et mal définis ne nous a pas permis de conclure à une quelconque structuration.

III.2.3. Dichroïsme circulaire (DC)

Les spectres ont été réalisés à température ambiante dans le méthanol sur un dichrographe Jobin-Yvon CD6 à des longueurs d'ondes comprises entre 190 à 500 nm. Le spectre obtenu est représenté sur la figure 34.

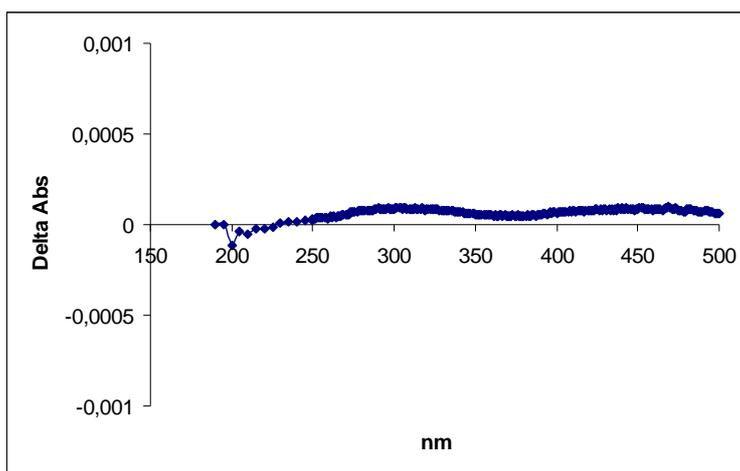


Figure 34 : Spectre de Boc-[Phe-h(Z)Ala]₄-OMe

Aucun signal dichroïque n'a été détecté, ceci ne prouve en aucun cas qu'il n'y a pas de structuration. En effet, le DC est une méthode d'analyse de peptides et de protéines et n'est donc pas toujours adapté pour les pseudo-peptides. De plus, si l'on se réfère aux résultats de la modélisation moléculaire mettant en évidence une structuration avec formation de pseudocycles à 12 atomes, il semble évident qu'une éventuelle structuration ne pourra être caractérisé que sur un oligomère plus long.

III.2.4. Spectroscopie d'absorption Infrarouge (IR)

A des fins de comparaison, nous avons enregistré les spectres IR des pseudo-peptides Boc-Phe-h(Z)Ala-OMe, Boc-[Phe-h(Z)Ala]₂-OMe (tétramère) et Boc-[Phe-h(Z)Ala]₄-OMe (octamère). Les spectres ont été effectués dans une cuve de CaF₂ de 3 mL, avec un trajet optique de 500 μ m et à une concentration de $3 \cdot 10^{-3}$ mol.L dans le DCM, ramené à la concentration de NH. Nous avons ciblé les zones d'absorption des vibreurs NH (Figure 35) et C=O (Figure 36).

III.2.4.1. Vibrations d'élongation des vibrateurs NH

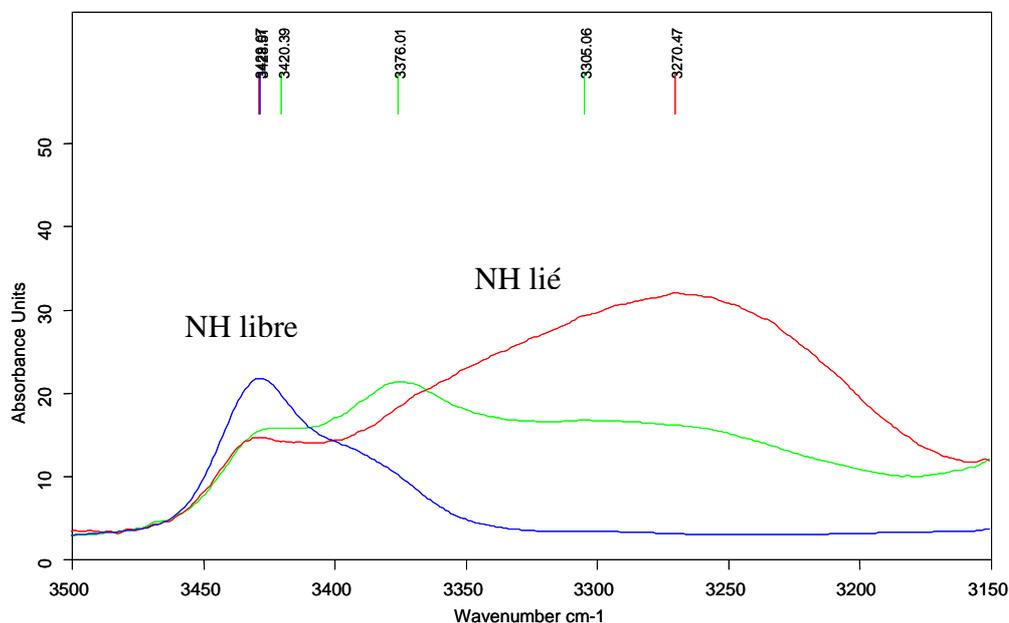


Figure 35 : Absorption IR correspondant aux vibrations d'élongation des vibrateurs NH de Boc-Phe-h(Z)Ala-OMe, Boc-[Phe-h(Z)Ala]₂-OMe et Boc-[Phe-h(Z)Ala]₄-OMe.

L'examen des molécules étudiées montre la présence de 2 ou 3 types de NH différents, NH Boc, N^βH pour toutes les molécules et en plus le NH de la liaison amide pour le tétramère et l'octamère.

Le spectre IR du pseudodipeptide présente deux bandes : l'une à 3428 cm⁻¹ et l'autre à 3376 cm⁻¹. Compte tenu de l'expérience acquise au laboratoire et des fréquences données dans la « Spectral database for organic compounds », il ne semble pas déraisonnable de penser que la bande à 3428 cm⁻¹ correspondent au NHBoc et que celle à 3376 cm⁻¹ au N^β. De plus, ces valeurs des nombres d'ondes correspondent à des vibrateurs NH libres. Par contre, les valeurs mesurées à 3305 cm⁻¹ et 3270 cm⁻¹ respectivement pour le tétramère et l'octamère semblent, quant à elles correspondre à des vibrateurs NH liés. Ces observations semblent signifier l'établissement de liaisons hydrogène dans le tétramère et l'octamère. Néanmoins, à ce stade de l'étude, il est impossible d'identifier le type de vibrateur NH impliqué dans ces liaisons hydrogène.

III.2.4.2. Vibrations d'élongation des vibrateurs C=O

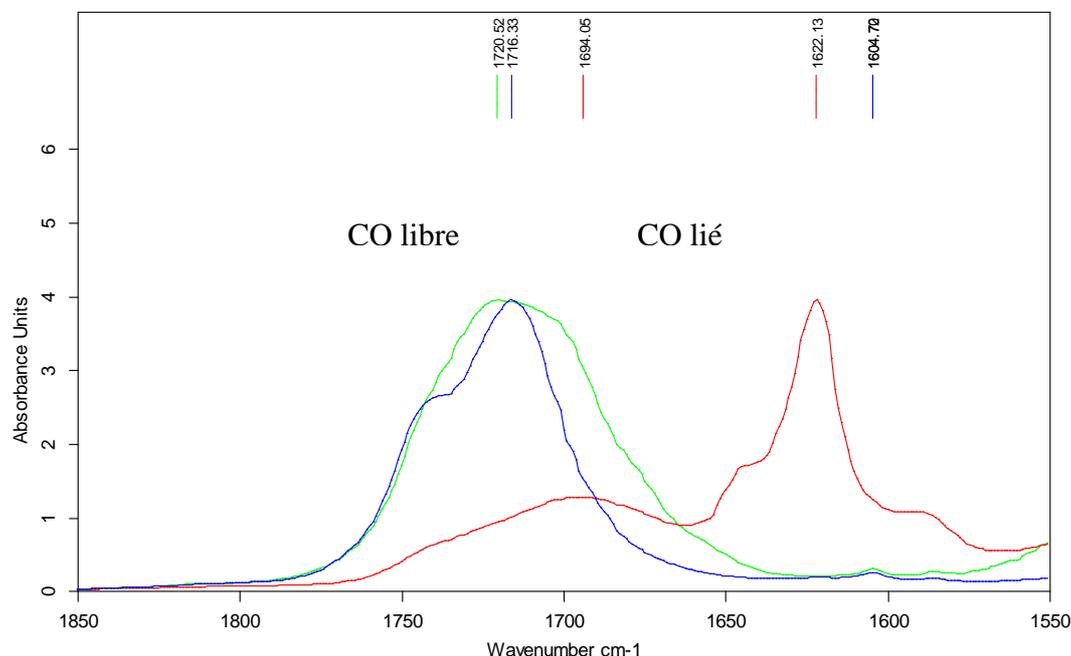


Figure 36 : Absorption IR correspondant aux vibrations d'élongation des vibrateurs C=O de Boc-Phe-h(Z)Ala-OMe, Boc-[Phe-h(Z)Ala]₂-OMe et Boc-[Phe-h(Z)Ala]₄-OMe

L'examen des molécules étudiées montre l'existence de 4 types de vibrateurs carbonyle dans le pseudodipeptide : C=O du Boc, C=O de la liaison hydrazide, C=O du Z et C=O de l'ester méthylique ainsi que d'un C=O supplémentaire pour la liaison amide dans le cas du tétra et de l'octamère.

Pour le pseudodipeptide et le tétramère, les signaux d'absorption des vibrateurs C=O sont indiscernables les uns des autres et tous situés à peu près dans la même zone correspondant à des vibrateurs libres. Seul le spectre de l'octamère présente en plus des bandes d'absorption situées vers des fréquences plus faibles correspondant à des vibrateurs C=O liés. Là encore, bien que le déplacement des signaux des vibrateurs C=O vers des fréquences plus faibles soit le signe de l'établissement de liaisons hydrogène au sein de la molécule, il est impossible de connaître la nature du vibrateur impliqué.

IV. Conclusion

Au cours de ce chapitre nous avons montré qu'il était possible de synthétiser un α -hydrazino-peptide. L'analyse structurale nous a permis de mettre en évidence la présence de liaisons hydrogène mais en aucun cas de conclure sur la structure obtenue.

Si l'on se réfère aux résultats de la modélisation moléculaire mettant en évidence une structuration avec formation d'un pseudocycle à 12 atomes inversé, il semble clair compte tenu de la taille de ces pseudocycles qu'une éventuelle structuration ne pourra être mise en évidence que sur un oligomère plus long. De plus, il est également important de noter que ces pseudocycles sont obtenus par liaisons hydrogène impliquant le C=O du groupement protecteur Z. Il n'est pas déraisonnable de penser qu'un autre type de structuration pourra s'établir si ce groupement Z était remplacé. Ainsi, on peut envisager soit la déprotection du N $^{\alpha}$, soit le remplacement du groupement Z par un méthyle. Dans ce dernier cas, il est à noter qu'en plus d'un éventuel effet sur la structuration, le remplacement du Z par un CH₃ au niveau des matières premières devrait être favorable à la formation du lien hydrazide.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Le présent travail de thèse est consacré à la synthèse et à l'étude d' α -hydrazinopeptides.

Dans un premier temps nous avons mis au point des méthodes de synthèse, en solution et sur phase solide, utilisant la réaction de Mitsunobu qui permet d'obtenir des α -hydrazinoacides énantiomériquement purs et orthogonalement protégés utilisables en synthèse peptidique aussi bien en stratégie Boc qu'en stratégie Fmoc.

Malgré la faible réactivité de l'azote β des α -hydrazinoacides étudiés, nous avons montré qu'ils pouvaient réagir avec des fluorures d'acides d'acide aminé et conduire à des hydrazinodipeptides avec de bons rendements.

Nous nous sommes intéressés par la suite à la synthèse d' α -hydrazinopeptides sur phase solide. Grâce à un suivi réactionnel des synthèses sur la résine par RMN HR-MAS, nous avons constaté que l'utilisation d'une résine peu encombrée (PAM, WANG) conduisait à la formation de triazépane comme produit secondaire et que la présence de motifs hydrazides semblait conduire à une structuration du pseudopeptide sur la résine ce qui diminuait l'accessibilité des réactifs. Nous avons contourné ces problèmes en utilisant une résine encombrée (2-Chlorotrityle-PS) et un mélange de solvants déstructurants. Ces travaux nous ont permis de mettre au point trois stratégies de synthèses sur phase solide:

- pas à pas avec incorporation d'hydrazinoacide
- pas à pas avec incorporation d'hydroxyacide
- semi-convergente avec incorporation de pseudodipeptide

Les avantages et les inconvénients de ces stratégies ont été mis en évidence et il conviendra d'utiliser celle la mieux adaptée à la synthèse du composé désiré.

Une des applications possibles de ce travail consiste en la synthèse d'oligomères capables de s'autostructurer. Dans une étude prospective, nous avons montré que l'utilisation

des techniques de synthèse mises au point en solution permettait l'obtention d'un octamère mixte de type α /hydrazino-peptide. L'étude structurale effectuée n'a pas permis de mettre en évidence de façon univoque l'autostructuration de ce type de composé. Nous pensons cependant que l'étude d'homologues diversement substitués devrait nous aider à résoudre ce problème.

PARTIE EXPERIMENTALE

Indications générales

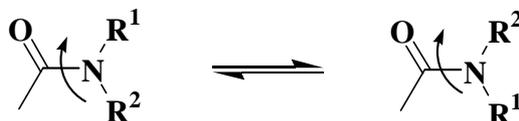
Les réactifs et produits de départ proviennent de différents fournisseurs (Aldrich, Acros, Fluka, Merck, Lancaster, Senn, Novabiochem, ...) et sont utilisés sans purification préalable. Le THF est fraîchement distillé sur sodium et benzophénone.

L'avancement des diverses réactions mises en jeu a été suivi par chromatographie sur couche mince. Les plaques de silice Kieselgel 60 F₂₅₄ (MERCK) ont été révélées aux ultraviolets et à l'acide phosphomolybdique.

Les produits formés au cours de ce travail ont été en partie isolés par chromatographie liquide-solide (Silice Kieselgel 63-200 µm). Les rendements ont été calculés sur les produits isolés.

Les composés ont été caractérisés par résonance magnétique nucléaire. Les spectres ont été effectués sur un appareil BRUKER AVANCE (300 MHz), en solution dans le chloroforme deutérié (CDCl₃) ou dans le diméthylsulfoxyde deutérié (DMSO-*d*⁶). Les déplacements chimiques (δ) en RMN sont donnés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence interne.

Dans certains spectres ¹H et ¹³C, on observe un dédoublement des signaux qui s'explique par une isomérisation Z/E due à la rotation lente de la liaison CO-N des fonctions amide ou hydrazide selon le schéma suivant :



Les spectres HR-MAS ont été réalisés sur un BRUKER AVANCE (300 MHz) équipé d'une sonde 4 mm avec un gradient simple axe à 2500Hz.

Les spectres Infrarouge ont été effectués sur un appareil BRUKER TENSOR 27. Pour

l'étude structurale, tous les spectres ont été enregistrés sur 512 scan.

Les spectres de Masse Haute Résolution en ionisation chimique ont été effectués sur appareil ProMALDI/FTMS au Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser (Université de Metz).

Les températures de fusion instantanées ont été mesurées sur banc Köfler.

Les mesures de DC ont été réalisés à température ambiante sur un dichrographe Jobin-Yvon CD6 avec un chemin optique de 10 nm. Le temps d'acquisition était de 5 min par scan, avec une largeur de bande de 1 nm et une résolution de 0,1 nm. 3 spectres ont été accumulés pour améliorer le rapport signal sur bruit.

Abréviation : s, singulet ; d, doublet ; q, quadruplet ; m, massif ; arom, aromatique ; Pht, phtalimide ; pyrro, pyrrolidine ; THP, térahydropyrane.

CHAPITRE I :
SYNTHESE D' α -HYDRAZINOACIDES

II. Synthèse des hydrazinoesters phtaloylés β Pht, α P-hXaa-OMe.

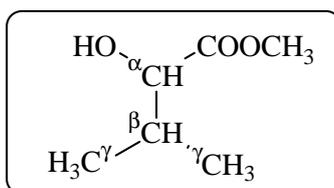
II.1. Préparation des α -hydroxyesters **2**.

*Procédure générale pour la préparation des hydroxyesters **2** à partir des acides aminés correspondants.*

A 0°C, on additionne par petites portions, 0,2 mol de NaNO₂ (13,8 g) à une solution d'acide aminé (0,1 mmol) sont dans 300 ml d'acide acétique glacial. Une fois l'addition terminée, la réaction est laissée 3 heures à température ambiante, puis l'acide acétique est chassé sous pression réduite. Le résidu est repris dans d'eau et la phase aqueuse est extraite plusieurs fois à l'éther. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄ et évaporées pour donner l'hydroxyacide acétylé correspondant.

L'hydroxyacide acétylé obtenu est repris dans 200 ml de méthanol absolu. A - 40°C, on additionne goutte à goutte 0,11 mol (8,1 ml) de chlorure de thionyle. La réaction est laissée 48 heures à température ambiante. Le méthanol est évaporé sous pression réduite pour donner l' α -hydroxyester **2** pur.

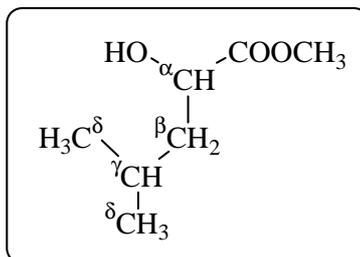
2-Hydroxy-3-méthylbutanoate de méthyle **2V** :



Formule brute : C₆H₁₂O₃ ; **M** = 132 g.mol⁻¹ ; Huile.⁴⁹

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 4,22-3,95 (m, 1H, α CH), 3,93-3,62 (m, 3H, O-CH₃), 3,01-2,54 (m, 1H, -OH), 2,19-1,88 (m, 1H, β CH), 1,11-0,94 (m, 3H, γ CH₃), 0,93-0,68 (m, 3H, γ CH₃).

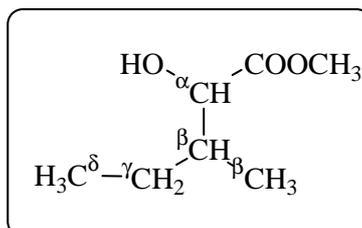
2-Hydroxy- 4-methylpentanoate de méthyle 2L :



Formule brute : C₇H₁₄O₃ ; **M** = 146 g.mol⁻¹ ; Huile⁴⁹

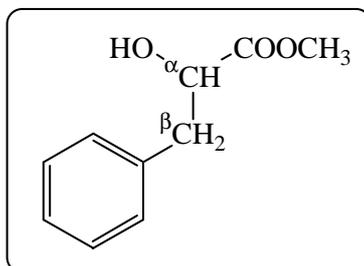
RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 4,14-3,98 (m, 1H, αCH), 3,74-3,49 (m, 3H, O-CH₃), 3,45-3,15 (m, 1H, -OH), 1,80-1,57 (m, 1H, γCH), 1,51-1,28 (m, 2H, βCH₂) et 0,87-0,64 (m, 6H, δCH₃).

2-Hydroxy-3-methylpentanoate de méthyle 2I :



Formule brute : C₇H₁₄O₃ ; **M** = 146 g.mol⁻¹ ; Huile¹⁶².

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 4,26-3,95 (m, 1H, αCH), 3,90-3,58 (m, 3H, O-CH₃), 3,17-2,81 (m, 1H, -OH), 1,96-1,64 (m, 1H, βCH), 1,53-1,09 (m, 2H, γCH₂) et 1,07-0,65 (m, 6H, γ,δCH₃).

3-Phenyllactate de méthyle 2F:

Formule brute : $C_{10}H_{12}O_3$; **M** = 180 $g \cdot mol^{-1}$; Huile⁴⁹.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : $CDCl_3$) : δ (ppm) 7,45-7,04 (m, 5H, arom.), 4,54-4,33 (m, 1H, α CH), 3,92-3,60 (m, 3H, O- CH_3) et 3,23-2,70 (m, 3H, -OH et β CH₂).

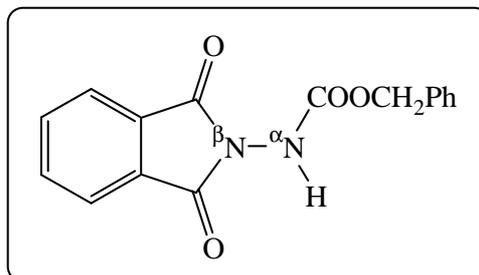
II.2. Condensation de Mitsunobu**II.2.1. Préparation des partenaires acides 1Boc et 1Z**

Procédure Générale pour la préparation des N-Alkyloxycarbonylaminophthalimides 1:

Dans un monocol surmonté d'un Dean-Stark et équipé d'un réfrigérant, un mélange équimolaire d'anhydride phtalique et de carbazate ($BocNHNH_2$ ou $ZNHNH_2$) est mis en suspension dans du toluène anhydre (100 ml pour 20 mmol). Le milieu réactionnel est porté à reflux durant 3 heures. Le mélange est refroidi et les N-Alkyloxycarbonylaminophthalimides précipitent. Le solide obtenu est filtré et recristallisé.

Le N-benzyloxycarbonylaminophthalimide 1Z est recristallisé dans un mélange $CHCl_3/ CCl_4$

Le N-tert-butyloxycarbonylaminophthalimide 1Boc est recristallisé dans AcOEt.

N-benzyloxycarbonylaminophtalimide **1Z :**

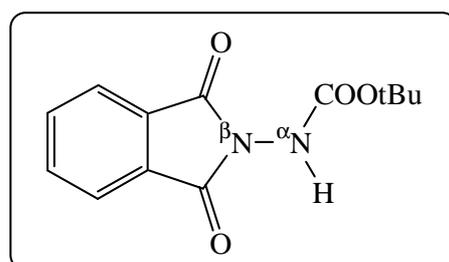
Formule brute : $C_{16}H_{12}N_2O_4$; **M** = 296 $g \cdot mol^{-1}$; **F** : 140°C ; solide blanc.

IR (NaCl) ν_{max}/cm^{-1} : 3284, 3031 (NH), 1797, 1741 (C=O).

RMN 1H (300 MHz) (solvant: $CDCl_3/DMSO-d_6$): δ (ppm) 10,34-10,04 (m, 1H, α NH), 7,89-7,76 (m, 4H, arom Pht), 7,43-7,25 (m, 5H, arom Ph), 5,19 (s, 2H, CH_2 Z).

RMN ^{13}C (solvant: $CDCl_3/DMSO-d_6$): δ (ppm) 165,8 (O=C-Pht), 155,9 (N-COO CH_2 C $_6$ H $_5$), 135,6 (CH arom Pht), 130,2 (C arom Pht), 129,1, 128,9, 128,8 (CH arom), 124,3 (CH arom Pht), 68,2 (CH_2 Z).

SMHR calculé pour $C_{16}H_{12}N_2O_4$ m/z 296,0797, trouvé 296,0790.

N-tert-Butyloxycarbonylaminophtalimide **1Boc:**

Formule brute : $C_{13}H_{14}N_2O_4$; **M** = 262 $g \cdot mol^{-1}$; **F** : 215-216°C ; solide blanc.

IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3395 (NH), 1706, 1740, 1783 (C=O).

RMN 1H (300 MHz) (solvant: $CDCl_3$): δ (ppm) 9,60 (s, 1H, α NH), 7,89-7,83 (m, 2H, arom. Pht), 7,82-7,76 (m, 2H, arom. Pht), 1,50 (s, 9H, Boc).

RMN ^{13}C (solvant: $CDCl_3$): δ (ppm) 165,9 (O=C-Pht), 153,8 (N-COOCBoc), 135,1 (CH arom. Pht), 130,3 (C arom. Pht), 124,3 (CH arom. Pht), 83,4 (CBoc), 28,4 (CH_3 Boc).

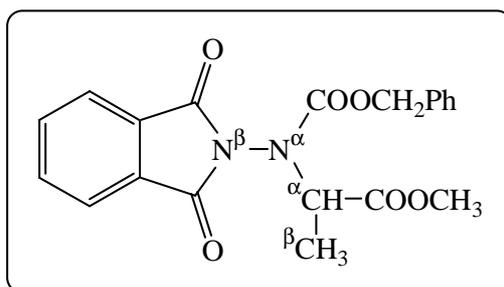
SMHR calculé pour $C_{13}H_{14}N_2O_4$ [$M+H^+$] m/z 263,1032, trouvé 263,1034.

II.2.2. Préparation des composés β Pht, α Z-hXaa-OMe

Procédure générale pour la préparation des composés 3 et 4

Dans un tricol de 100 mL muni d'une agitation magnétique, sous atmosphère d'azote et à 0°C, sont mises en solution 5 mmol du partenaire acide 1, 7,5 mmol de triphénylphosphine (1,5 éq), 5 mmol de l'hydroxyester 2 (1 éq.) dans 50 mL de THF anhydre. On additionne en une fois 7,5 mmol d'azodicarboxylate (DBAD ou DEAD cf tableau 3). Le milieu réactionnel est maintenu à 0°C pendant 15 min puis agité à température ambiante durant le temps indiqué dans le tableau 3. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice avec comme éluant AcOEt / éther de pétrole.

Ester méthylique du *N*-benzyloxycarbonyl-*N*-phthalimidoalanine 3A:

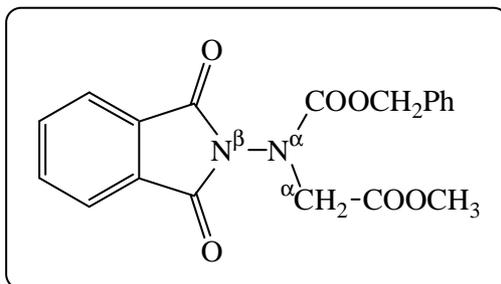


Formule brute: $C_{20}H_{18}N_2O_6$; $M = 382 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1799, 1747 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): δ (ppm) 7,84-7,76 (m, 2H, aromPht), 7,73-7,66 (m, 2H, aromPht), 7,38-7,24 (m, 2H, arom. Z), 7,20-7,03 (m, 3H, arom. Z), 5,29-4,90 (m, 3H, CH_2 Z et CH), 3,73 (s, 1,2H, O- CH_3), 3,66 (s, 1,8H, O- CH_3) et 1,39 (d, $J = 8 \text{ Hz}$, 3H, βCH_3).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : δ (ppm) 170,8 ($\text{C}=\text{O}$), 165,8 (O= C -Pht), 154,2 (N- $\text{C}=\text{O}$), 135,7 (C arom), 135,3 (CH arom Pht), 129,0 (C arom Pht), 128,7, 128,4, 127,6 (CH arom), 124,4 (CH arom Pht), 69,7, 67,0 (CH_2 Z), 57,1, 56,0 (αCH), 52,6 (O- CH_3) et 15,6 (βCH_3).

Ester méthylique du *N*-benzyloxycarbonyl-*N*-phthalimidoglycine 3G :

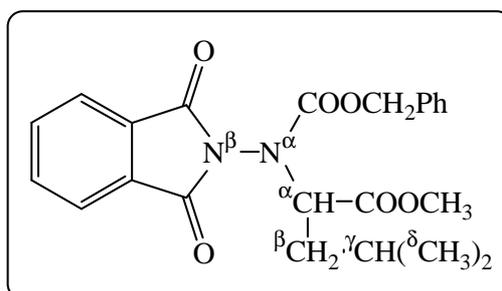
Formule brute: C₁₉H₁₆N₂O₆; **M** = 368 g.mol⁻¹; **F**: 100°C; solide blanc.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1799, 1742 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 7,90-7,81 (m, 2H, arom Pht), 7,80-7,60 (m, 2H, arom Pht), 7,32-7,19 (m, 2H, arom Z), 7,19-7,02 (m, 3H, arom Z), 5,15 (s, 0,8H, CH₂ Z), 5,05 (s, 1,2H, CH₂ Z), 4,42 (s, 1,2H, αCH₂), 4,38 (s, 0,8H, αCH₂), 3,62 (s, 1,8H, O-CH₃) et 3,59 (s, 1,2H, O-CH₃).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 168,3 (C=O-COOCH₃), 164,9, 164,6 (O=C-Pht), 154,5, 154,0 (N-COOCH₂C₆H₅), 135,6, 135,5 (C arom), 135,3 (CH arom Pht), 130,0, 129,9 (C arom Pht), 129,0, 128,8, 128,4, 127,6 (CH arom), 124,3 (CH arom Pht), 69,6, 69,1 (CH₂ Z), 52,6 (O-CH₃) et 52,6, 52,1 (αCH₂).

SMHR calculé pour C₁₉H₁₆N₂O₆ m/z 368,1008, trouvé 368,1007.

Ester méthylique du *N*-benzyloxycarbonyl-*N*-phthalimidoleucine 3L :

Formule brute: C₂₃H₂₄N₂O₆; **M** = 424 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1800, 1746 (C=O).

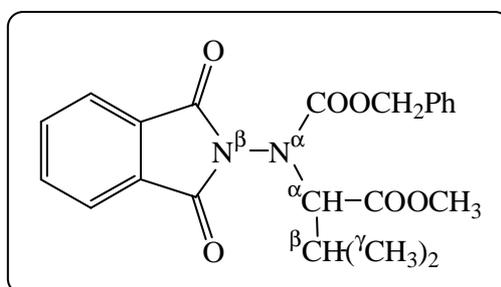
RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 7,91-7,80 (m, 2H, arom Pht), 7,80-7,70 (m, 2H, arom Pht), 7,44-7,28 (m, 2H, arom Z), 7,25-7,06 (m, 3H, arom Z), 5,31-4,97 (m, 3H,

αCH et CH₂ Z), 3,75 (s, 1,8H, O-CH₃), 3,72 (s, 1,2H, O-CH₃), 1,87-1,59 (m, 3H, γCH et βCH₂) et 1,02-0,81 (m, 6H, δCH₃).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 170,5, 170,4 (C=O), 166,2, 165,9, 165,5 (O=C-Pht), 154,2, 154,1 (N-COOCH₂C₆H₅), 135,9 (C arom), 135,3 (CH arom Pht), 130,2, 130,1 (C arom Pht), 129,0, 128,7, 128,4, 127,5 (CH arom), 124,4 (CH arom Pht), 69,7, 69,1 (CH₂ Z), 59,4, 58,2 (αCH), 52,8 (O-CH₃), 38,4, 38,2 (βCH₂) 24,8, 24,7 (γCH) et 22,8, 22,7 (δCH₃).

SMHR calculé pour C₂₃H₂₄N₂O₆ m/z 424,1634 trouvé 424,1644.

Ester méthylique du N-benzyloxycarbonyl-N-phthalimidovaline 3V :



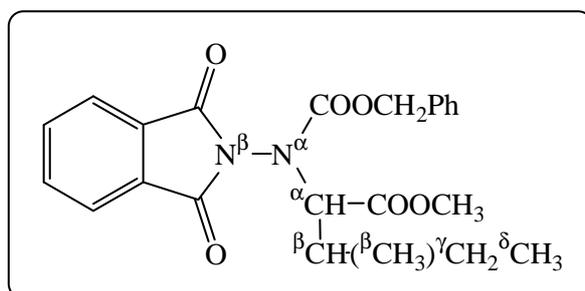
Formule brute: C₂₂H₂₂N₂O₆; **M** = 410 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) ν_{max}/cm⁻¹: 1799, 1741 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 7,91-7,78 (m, 2H, arom Pht), 7,75-7,69 (m, 2H, arom Pht), 7,44-7,28 (m, 2H, arom Z), 7,22-7,06 (m, 3H, arom Z), 5,30-5,06 (m, 2H, CH₂ Z), 4,88 (d, 0,6H, J = 12 Hz, αCH), 4,64 (d, 0,4H, J = 12 Hz, αCH), 3,71 (s, 3H, O-CH₃), 2,18-2,03 (m, 1H, βCH), 1,34-1,22 (m, 3H, γCH₃) et 0,93-0,85 (m, 3H, γCH₃).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 169,5, 169,3 (C=O), 166,4, 165,9, 165,5 (O=C-Pht), 154,5, 154,3 (N-COOCH₂C₆H₅), 135,7 (C arom), 135,2 (CH arom Pht), 130,3, 130,0 (C arom Pht), 129,0, 128,7, 128,4, 127,5 (CH arom), 124,3 (CH arom Pht), 69,7, 69,1 (CH₂ Z), 67,6, 66,2 (αCH), 52,9 (O-CH₃), 29,1 (βCH) et 19,7, 19,3 (γCH₃).

SMHR calculé pour C₂₂H₂₂N₂O₆ m/z 410,1478 trouvé 410,1475.

Ester méthylique du *N*-benzyloxycarbonyl-*N*-phthalimidoisoleucine 3I :

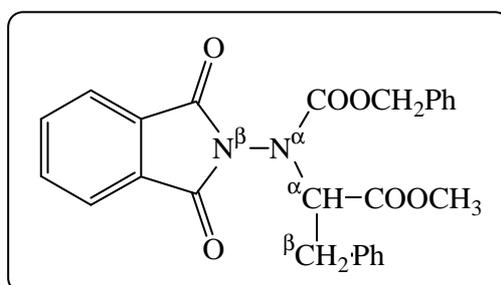
Formule brute: $C_{23}H_{24}N_2O_6$; $M = 424 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1800, 1739 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 7,89-7,85 (m, 2H, arom Pht), 7,81-7,72 (m, 2H, arom Pht), 7,39-7,33 (m, 2H, arom Ph), 7,20-7,12 (m, 3H, arom Ph), 5,32-5,00 (m, 2H, CH_2 Z), 4,87 (d, 0,6H, $J = 11,2 \text{ Hz}$, αCH), 4,65 (d, 0,4H, $J = 12 \text{ Hz}$, αCH), 3,71 (s, 3H, O- CH_3), 2,04-1,72 (m, 2H, γCH_2), 1,42-1,22 (m, 4H, βCH et γCH_3) et 1,00-0,74 (m, 3H, δCH_3).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 169,9, 169,7 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 166,7, 116,3, 166,2, 165,8 ($\text{O}=\underline{\text{C}}$ -Pht), 154,9, 154,7 ($\text{N}-\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 136,0 (C arom), 135,5, 135,4 (CH arom Pht), 130,7, 130,3 (C arom Pht), 129,3, 129,1, 129,0, 128,8, 128,7, 127,7 (CH arom), 124,6 (CH arom Pht), 70,1, 69,4 (CH_2 Z), 66,9, 65,6 (αCH), 53,5 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 35,4 (βCH), 26,3 (γCH_2), 15,3 (βCH_3) et 12,0 (δCH_3).

SMHR calculé pour $C_{23}H_{24}N_2O_6 [M+\text{Na}^+]$ m/z . 447,1527, trouvé 447,1527.

Ester méthylique du *N*-benzyloxycarbonyl-*N*-phthalimidophenylalanine 3F :

Formule brute: $C_{26}H_{22}N_2O_6$; $M = 458 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

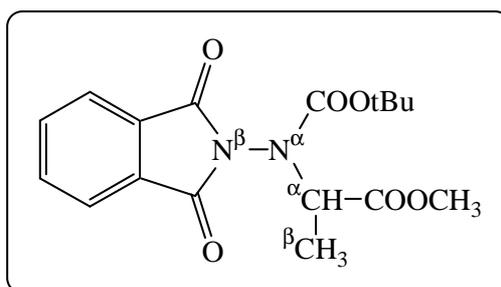
IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1799, 1744 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 7,94-7,84 (m, 2H, arom Pht), 7,82-7,66 (m, 2H, arom Pht), 7,44-7,10 (m, 10H, arom Ph), 5,50 (dd, , 0,6H, *J*' = 12 Hz, *J*'' = 5,6 Hz, αCH), 5,31-5,10 (m, 2,4H, 0,4 αCH, CH₂ Z), 3,66 (s, 1,8H, O-CH₃), 3,62 (s, 1,2H, O-CH₃) et 3,34-3,19 (m, 2H, βCH₂).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 169,5, 169,4 (C=O), 166,2, 165,9, 165,7, 165,3 (O=C-Pht), 154,0, 153,7 (N-COOCH₂C₆H₅), 136,6, 136,4, 135,6 (C arom), 135,4 (CH arom Pht), 130,3, 130,2, 130,1, 130,0 (C arom Pht), 129,7, 129,0, 128,9, 128,8, 128,5, 128,4, 127,7, 127,3 (CH arom), 124,5 (CH arom Pht), 69,8, 69,2 (CH₂ Z), 62,8, 61,5 (αCH), 52,8 (O-CH₃) et 36,5, 36,1 (βCH₂).

SMHR calculé pour C₂₆H₂₂N₂O₆ *m/z* 458,1478, trouvé 458,1482.

Ester méthylique du *N-tert*-butyloxycarbonyl-*N*-phthalimidoalanine **4A**:



Formule brute: C₁₇H₂₀N₂O₆; **M** = 348 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) *v*_{max}/cm⁻¹: 1799, 1741 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 7,76-7,64 (m, 4H, arom Pht), 4,94 (q, *J* = 7 Hz, 0,6H, αCH), 4,70 (q, *J* = 7 Hz, 0,4H, αCH), 3,68 (s, 1,2H, O-CH₃), 3,64 (s, 1,8H, O-CH₃), 1,41 (s, 3,6H, tBu), 1,35 (s, 5,4H, tBu), 1,29 (d, *J* = 8 Hz, 1,2H, CH₃) et 1,25 (d, *J* = 8 Hz, 1,8H, βCH₃).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 171,1 (C=O), 166,3, 166,1, 165,8, 165,5 (O=C-Pht), 152,5, 152,4 (N-COObu), 135,3, 135,2 (CH arom Pht), 130,1, 129,9 (C arom Pht), 124,2 (CH arom Pht), 83,9, 83,1 (C-Boc), 57,2, 55,0 (αCH), 52,6 (O-CH₃), 28,2, 28,0 (CH₃ Boc) et 15,0, 14,6 (βCH₃).

III Transprotection des composés β Pht, α P-hXaa-OMe

III.1. Etude préliminaire

III.1.1. Méthode utilisant la méthylamine (Méthode A)

Procédure générale de la méthode A

Dans un monocol de 100 mL, muni d'un barreau aimanté, sont placées 3 mmol du composé **3A** ou **4A** dans 20 mL de THF anhydre. On additionne en une fois 1,5 éq. (4,5 mmol) de méthylamine 2N dans le MeOH. La disparition totale du produit de départ, suivie par ccm, est observée après 3 heures. Le solvant et l'excès de méthylamine sont évaporés sous pression réduite.

Nous avons vérifié la formation du composé **6A** (P = Boc) : RMN ^1H (300 MHz) (solvant : CDCl_3) : δ (ppm) 8,97-7,91 (m, 1H, NH), 7,52-7,05 (m, 4H, arom), 6,10-6,08 (m, 1H, NH-Me), 5,02-4,55 (m, 1H, αCH), 3,75-3,26 (m, 3H, O- CH_3), 2,87-2,40 (m, 3H, NH- CH_3), 1,50-0,90 (m, 12H, Boc et βCH_3).

Les composés β MPH, α P-hXaa-OMe (3 mmol) sont repris dans 20 mL de THF anhydre. 3 éq. de X_2O ou Fmoc-Cl sont ajoutés en présence ou non de DMAP en quantité catalytique suivant les données du tableau 4. La réaction est maintenue sous agitation durant le temps indiqué dans le tableau 4. La réaction est suivie par ccm. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié sur colonne de silice avec comme éluant un mélange AcOEt / éther de pétrole.

Monodéprotection sélective d'un groupement tert-butyloxycarbone par $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$

Les composés **7A** ou **7G** (20 mmol) sont dissous dans 20 mL THF anhydre et 0,2 éq. de perchlorate de magnésium est ajouté. Le suivi de la réaction se fait par ccm. Après 60 minutes, le mélange réactionnel est jeté sur glace et est extrait 3 fois à l'éther. Les phases

organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé. Le résidu est alors purifié par colonne de silice avec comme éluant un mélange AcOEt / éther de pétrole.

III.1.2. Méthode utilisant la pyrrolidine (Méthode B).

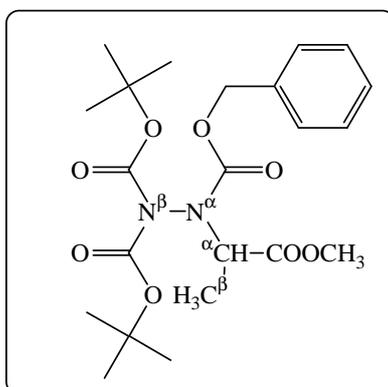
Procédure générale de la méthode B.

Dans un monocol de 100 mL, muni d'un barreau aimanté, sont introduites 3 mmol du composé **3A** ou **4A** dans 20 mL de THF anhydre. On additionne en une fois 3 éq. de pyrrolidine (9 mmol). La disparition totale du produit de départ, suivie par ccm, est observée après 4 heures. Le solvant et l'excès de pyrrolidine sont évaporés sous pression réduite. Soit le produit est utilisé en l'état, soit il est purifié sur colonne de silice avec un éluant AcOEt / éther de pétrole.

Les composés $\beta\text{PCB}, \alpha\text{P-hXaa-OMe}$ (3 mmol) sont repris dans 20 mL de THF anhydre. On additionne 1,5 éq. de X_2O ou Fmoc-Cl en présence ou non d'une quantité catalytique de DMAP suivant les données du tableau 5. La disparition totale du produit de départ, suivie par ccm, est observée après le temps indiqué dans le tableau 5 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Soit le produit est utilisé en l'état, soit il est purifié sur colonne de silice avec un éluant AcOEt / éther de pétrole.

Le résidu est repris dans le THF sec, on additionne en une fois 1,5 éq. de méthylamine 2N dans le MeOH. La disparition totale du produit de départ, suivie par ccm est observée après 3 heures. Le solvant et l'excès de méthylamine sont chassés sous pression réduite et le produit est purifié sur colonne de silice avec comme éluant un mélange AcOEt / éther de pétrole.

β Boc₂, α Z-hAla-OMe 7A:



Formule brute: C₂₂H₃₂N₂O₈; **M** = 452 g.mol⁻¹; Huile.

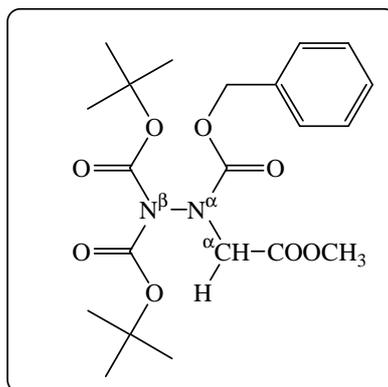
IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1800, 1764, 1734 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): δ (ppm) 7,38-7,26 (m, 5H, arom), 5,29-5,17 (m, 2H, CH₂ Z), 4,58 (q, *J* = 7 Hz, 1H, α CH), 3,68 (s, 3H, O-CH₃), 1,48, 1,47, 1,40 (3s, 18H, Boc) et 1,26 (d, *J* = 7 Hz, 3H, β CH₃).

RMN ¹³C (solvant: CDCl₃): δ (ppm) 173,1 (COOCH₃), 155,5 (COOCH₂Ph), 150,3 (COOtBu), 136,3, 135,4, 130,6, 130,2 (CH arom), 128,8, 128,7, 128,6, 128,4 (CH arom), 84,0 (CBoc), 68,7 (CH₂ Z), 54,9 (α CH), 53,9 (O-CH₃), 28,1 (CH₃ Boc) et 14,7 (β CH₃).

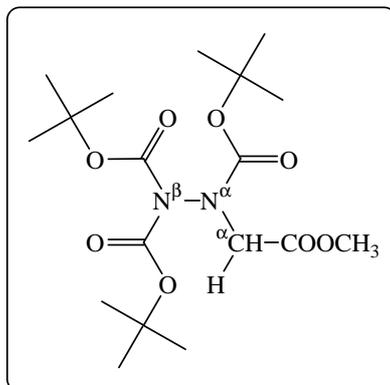
SMHR calculé pour C₂₂H₃₂N₂O₈ [M+Na⁺] *m/z* 475,2051, trouvé 475,2052.

β Boc₂, α Z-hGly-OMe 7G:



Formule brute: C₂₁H₃₀N₂O₈; **M** = 438 g.mol⁻¹; Solide blanc

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1790, 1733, 1717 (C=O).

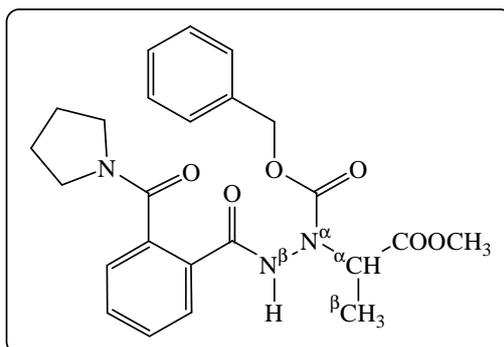
βBoc₂,αBoc-hGly-OMe 8G:

Formule brute: C₁₈H₃₂N₂O₈; **M** = 404 g.mol⁻¹; huile.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1733, 1717 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): δ (ppm) 4,37-4,15 (m, 2H, αCH₂), 3,81-3,55 (m, 3H, O-CH₃) et 1,64-1,33 (m, 27H, Boc).

RMN ¹³C (solvant: CDCl₃): δ (ppm) 171,5, 168,5, 168,4 (C=O), 150,7, 150,5 (C=O), 84,7, 84,5, 84,3 (C-Boc), 53,5 (O-CH₃), 52,4 (αCH₂) et 28,4, 28,3 (CH₃ Boc).

βPCB,αZ-hAla-OMe 13A :

Formule brute: C₂₄H₂₇N₃O₆; **M** = 453 g.mol⁻¹; Huile.

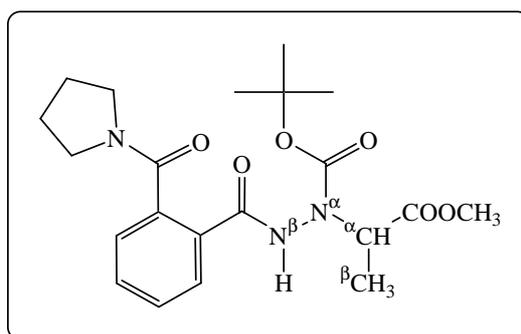
IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3247 (NH), 1786, 1742, 1716 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 9,19-8,43 (m, 1H, βNH), 7,90-7,06 (m, 9H, arom Phe), 5,29-4,74 (m, 3H, CH₂ Zet αCH), 3,81-3,34 (m, 5H, O-CH₃ et CH₂ pyrro), 3,17-2,92 (m, 2H, CH₂ pyrro), 2,02-1,54 (m, 4H, 2CH₂ pyrro) et 1,43 (d, *J* = 7 Hz, 3H, βCH₃).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 172,6 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 169,8, 169,5 (OC- pyrro), 168,6, 168,1 ($\text{N-}\underline{\text{C}}\text{OC}_6\text{H}_4$), 160,0, 155,7 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$), 137,5 (C arom), 136,8, 136,3 (C arom), 130,8, 129,6, 128,8, 128,0 (CH arom), 68,6, 68,5 (CH_2 Z), 56,5 (αCH), 52,9 ($\text{O-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 49,3, 46,1, 26,1, 24,8 ($\text{N-}(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_4$) et 14,6 (βCH_3).

SMHR calculé pour $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] m/z 476,1792, trouvé 476,1793.

β PCB, α Boc-hAla-OMe 14A:

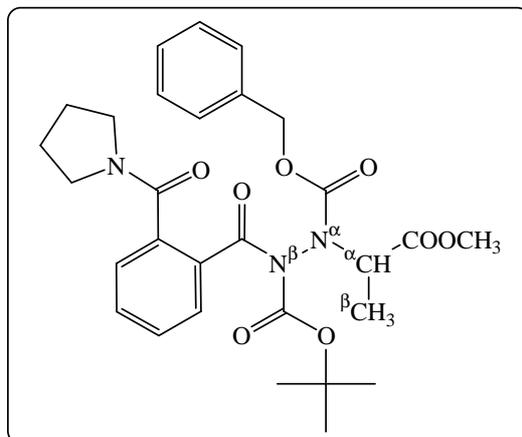


Formule brute: $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$; $\text{M} = 467 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3294 (NH), 1796, 1739, 1713 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 8,60-8,31 (m, 1H, βNH), 7,78-7,49 (m, 1H, H arom), 7,44-7,24 (m, 2H, arom), 7,21-7,08 (m, 1H, arom), 5,02-4,46 (m, 1H, αCH), 3,74-3,34 (m, 5H, O- CH_3 et pyrro), 3,16-2,91 (m, 2H, pyrro), 1,98-1,63 (m, 4H, pyrro), 1,47-1,19 (m, 12H, βCH_3 et Boc).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 172,8 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 169,3 (OC- pyrro), 167,3 ($\text{N-}\underline{\text{C}}\text{OC}_6\text{H}_4$), 154,7 ($\underline{\text{C}}\text{OOtBu}$), 137,3 (C arom), 135,3 (C arom), 131,6, 131,2, 129,6, 129,2, 128,8, 126,6, 125,2 (CH arom), 82,2, 82,0 ($\underline{\text{C}}\text{Boc}$), 53,8, 52,6 (αCH), 52,3 ($\text{O-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 49,1, 46,0, 26,6, 24,7 ($\text{N-}(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_4$), 28,1 (CH_3 Boc) et 14,9, 14,4 (βCH_3).

βPCB,Boc,αZ-hAla-OMe 15A :

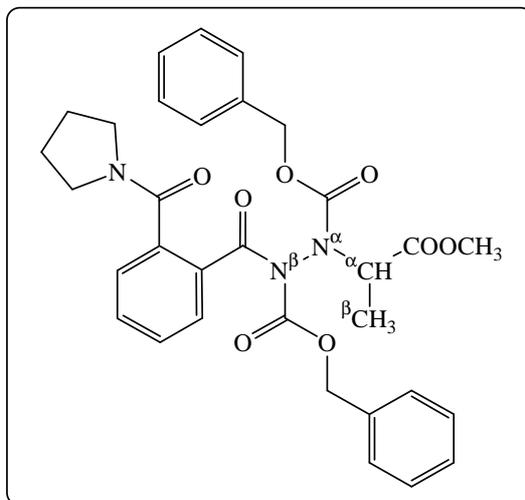
Formule brute: $C_{29}H_{35}N_3O_8$; **M** = 554 $g \cdot mol^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) ν_{max}/cm^{-1} : 1825, 1733, 1684 (C=O).

RMN 1H (300 MHz) (solvant : $CDCl_3$) : δ (ppm) 7,69-7,12 (m, 9H, arom), 5,22-5,01 (m, 2H, CH_2 Z), 4,92 (q, $J = 7$ Hz, 0,26H, α CH), 4,84 (q, $J = 7$ Hz, 0,20H, α CH), 4,71 (q, $J = 7$ Hz, 0,33H, α CH), 4,62 (q, $J = 7$ Hz, 0,24H, α CH), 3,66-3,52 (m, 5H, O- CH_3 et pyrro), 3,39-3,19 (m, 2H, pyrro), 2,01-1,73 (m, 4H, pyrro) et 1,55-1,35 (m, 12H, β CH $_3$ et Boc).

RMN ^{13}C (solvant : $CDCl_3$) : δ (ppm) 171,5, 171,3, 171,2 ($\underline{C}OOCH_3$), 171,1, 170,0, 169,7, 169,5 ($\underline{O}C$ -pyrro), 168,2, 168,1, 168,0 (\underline{N} - $\underline{C}OC_6H_4$), 154,9, 154,8, 154,7 ($\underline{C}OOCH_2Ph$), 151,4, 151,2, 151,1 ($\underline{C}OOtBu$), 137,3, 137,1, 136,9, 136,0, 135,8, 134,8 (C arom), 128,7, 128,5, 128,3, 127,6, 127,3, 126,9 (CH arom), 85,0, 84,9, 84,8 ($\underline{C}Boc$), 68,9, 68,8 (CH_2 Z) 58,8, 58,1, 57,7, 56,7 (α CH), 52,6, 52,5 (\underline{O} - $\underline{C}H_3$), 49,2, 45,9, 26,3, 24,8 (\underline{N} -($\underline{C}H_2$) $_4$), 27,7, 27,6, 27,5 ($\underline{C}Boc$) et 14,5, 14,4 (CH_3).

SMHR calculé pour $C_{29}H_{35}N_3O_8$ [$M+Na^+$] m/z 576,2316, trouvé 576,2316.

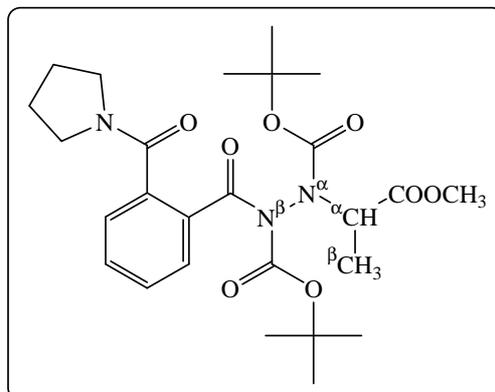
βPCB,Z,αZ-hAla-OMe 16A:

Formule brute: C₃₂H₃₃N₃O₈; **M** = 588 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1850, 1730, 1700 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): δ (ppm) 7,76-6,98 (m, 14H, arom), 5,34-4,62 (m, 5H, 2CH₂ Z et α CH), 3,71-3,10 (m, 7H, O-CH₃ et pyrro), 2,02-1,63 (m, 4H, pyrro), 1,49 (d, J = 7 Hz, 1,1H, β CH₃) et 1,44 (d, J = 7 Hz, 1,9H, β CH₃).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 171,5, 171,4 (COOCH₃), 169,8, 169,5, 169,2 (OC-pyrro), 168,2, 168,1, 168,0 (N-COC₆H₄), 154,8, 154,7, 154,6, 153,4, 153,3, 153,2 (COOCH₂Ph), 137,2, 137,1, 136,9, 136,8, 135,8 (C arom), 129,2, 129,0, 128,9, 128,7, 128,6, 128,5 (CH arom), 70,0, 69,9, 69,8, 69,7 (CH₂ Z), 58,7, 58,6 (α CH), 57,6, 57,3 (O-CH₃), 49,3, 46,2, 26,5, 24,8 (N-(CH₂)₄) et 14,5 (β CH₃).

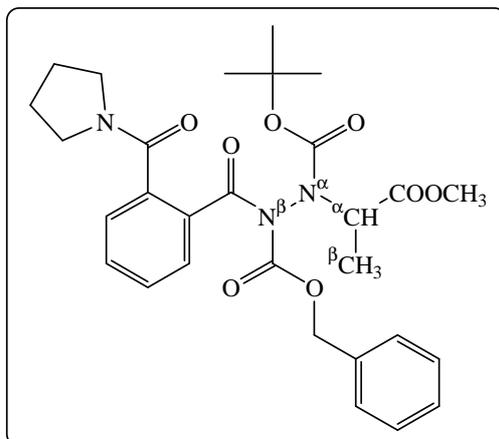
β PCB,Boc, α Boc-hAla-OMe 17A:

Formule brute: $C_{26}H_{37}N_3O_8$; $M = 520 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1751, 1717, 1700 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 7,75-7,20 (m, 4H, arom.), 5,92-4,79 (m, 0,65H, αCH), 4,64 (q, $J = 7 \text{ Hz}$, 0,13H, αCH), 4,50 (q, $J = 7 \text{ Hz}$, 0,22H, αCH), 3,77-3,43 (m, 5H, O- CH_3 et pyrro), 3,41-3,12 (m, 2H, pyrro), 2,00-1,72 (m, 4H, pyrro) et 1,60-1,12 (m, 21H, βCH_3 et Boc).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 172,2, 171,8, 171,7, 171,6 (COOCH_3), 170,7, 170,1, 170,0 (OC-pyrro), 169,5, 168,4, 168,3, 168,2 ($\text{N-COC}_6\text{H}_5$), 154,0, 153,4 (COOtBu), 135,4, 135,2, 134,9, 134,8 (C arom), 128,7, 128,3, 128,2, 127,7, 127,1 (CH arom), 84,7, 84,6, 82,7, 82,6 (CBoc), 59,3, 58,7, 56,5, 55,3 (αCH), 52,5, 52,4 (O- CH_3), 49,4, 49,3, 49,2, 46,2, 46,0, 45,9, 26,6, 26,4, 25,0 ($\text{N-(CH}_2)_4$), 28,7, 28,6, 28,5, 28,4 ($\text{CH}_3 \text{ Boc}$) et 15,1, 15,0, 14,8, 14,6 (βCH_3).

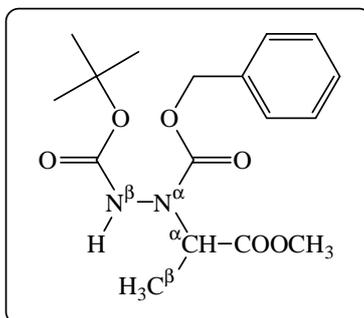
βPCB,Z,αBoc-hAla-OMe 18A :

Formule brute: C₂₉H₃₅N₃O₈; **M** = 554 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1734, 1717, 1700 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): δ (ppm) 7,75 -7,07 (m, 9H, arom), 5,24-4,41 (m, 3H, CH₂ Z et α CH), 3,67-3,45 (m, 5H, O-CH₃ et pyrro), 3,41-3,12 (m, 2H, pyrro) 2,02-1,73 (m, 4H, pyrro) et 1,54-1,22 (m, 12H, β CH₃ et Boc).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 172,0, 171,7, 171,6, 171,4 (COOCH₃), 170,1, 169,6, 169,0 (OC-pyrro), 168,3, 168,2, 168,1 (N-COC₆H₅), 153,8, 153,7, 153,6 (COOCH₂Ph), 153,5, 153,4, 153,3 (COOtBu), 137,7, 137,3, 136,9, 134,9, 134,8, 134,7, 134,5, 134,4, 134,0, 133,7 (C arom.), 131,2, 131,1, 128,3, 128,1, 127,0 (CH arom.), 83,5, 83,4, 83,1, 83,0 (CBoc), 69,7, 69,6 (CH₂ Z), 56,5, 56,1 (α CH), 52,6, 52,4 (O-CH₃), 49,5, 49,4, 49,3, 46,4, 46,2, 26,7, 26,6, 26,5, 25,0 (N-(CH₂)₄), 28,6, 28,5, 28,4, 28,3, 28,2 (CH₃ Boc) et 15,0, 14,9 (β CH₃).

β Boc, α Z-hAla-OMe 9A:

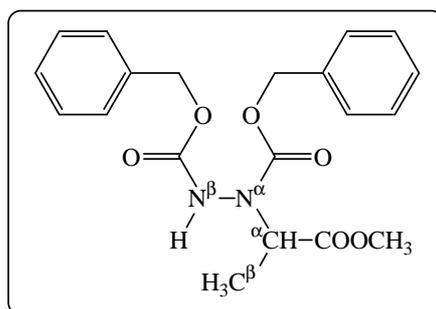
Formule brute: $C_{17}H_{24}N_2O_6$; $M = 352 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3320 (NH), 1743, 1717 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 7,58-7,17 (m, 5H, arom.), 6,88-6,35 (m, 1H, βNH), 5,47-4,66 (m, 3H, CH_2 Z et αCH), 3,96-3,56 (m, 3H, O- CH_3) et 1,60-1,32 (m, 12H, Boc et βCH_3).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 173,1 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 156,5 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$), 155,7 ($\underline{\text{C}}\text{OOtBu}$), 136,2 (C arom.), 128,9, 128,6, 128,4, 128,3 (CH arom.), 81,6 ($\underline{\text{C}}\text{Boc}$), 68,7 (CH_2 Z), 57,6, 56,4 (αCH), 52,8 (O- CH_3), 28,5 (CH_3 Boc) et 14,7 (βCH_3).

SMHR calculé pour $C_{17}H_{24}N_2O_6$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] m/z 375,1527, trouvé 375,1528.

 β Z, α Z-hAla-OMe 21A:

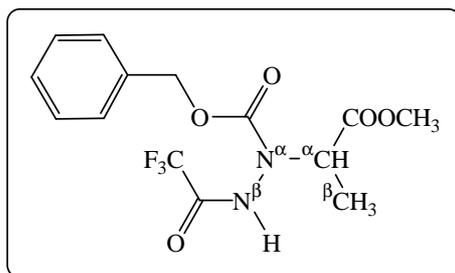
Formule brute: $C_{20}H_{22}N_2O_6$; $M = 386 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3308 (NH), 1740, 1730 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 7,50-7,21 (m, 10H, arom.), 7,00-7,10 (m, 1H, βNH), 5,43-4,77 (m, 5H, 2 CH_2 Z et αCH), 3,64 (s, 3H, O- CH_3), 1,67-1,37 (m, 3H, βCH_3).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 173,0, 172,7 (C=O), 157,2, 157,1, 157,0, 156,8, 156,3 (C=O), 136,1, 136,0 (C arom.), 130,7, 130,3, 130,2, 130,0, 129,9, 128,9, 128,5, 127,7, 127,3, 127,0, 126,9 (CH arom.), 69,7, 69,0, 68,7, 68,1 (CH_2 Z), 57,5, 56,4 (αCH), 52,9 (O-CH_3) et 15,0, 14,6 (βCH_3).

$\beta\text{Tfa}, \alpha\text{Z-hAla-OMe}$ 22A:

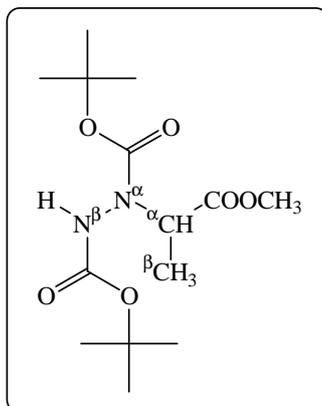


Formule brute: $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$; $\text{M} = 348 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3266 (NH), 1733, 1731 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 8,68-8,42 (m, 1H, βNH), 7,44-7,21 (m, 5H, arom), 5,34-4,82 (m, 3H, CH_2 Z et αCH), 3,75 (s, 3H, O-CH_3) et 1,49 (d, $J = 8 \text{ Hz}$, 3H, βCH_3).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 173,4, 173,3 (C=O), 158,4 (OC-CF_3), 155,2 (C=O), 135,7 (C arom.), 129,2, 129,1, 128,9, 128,4 (CH arom.), 115,8 (q, $^1J_{\text{CF}} = 288 \text{ Hz}$, CF_3), 69,7 (CH_2 Z), 56,4 (αCH), 53,3 (O-CH_3) et 14,9 (βCH_3).

β Boc, α Boc-hAla-OMe 12A:

Formule brute: $C_{14}H_{26}N_2O_6$; $M = 318 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3336 (NH), 1700, 1653 (C=O).

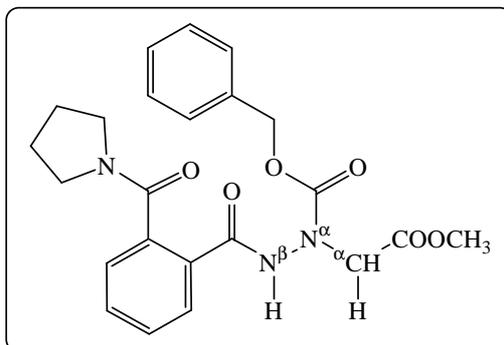
RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 6,56-6,10 (m, 1H, βNH), 5,09-4,59 (m, 1H, αCH), 3,83-3,63 (m, 3H, O- CH_3) et 1,57-1,35 (m, 21H, Boc et βCH_3).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 173,6 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 155,7 ($\underline{\text{C}}\text{OOtBu}$), 82,1, 81,6, 81,4, 81,3, 81,2 ($\underline{\text{C}}\text{Boc}$), 55,8 (αCH), 52,9 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 28,8, 28,7 (CH_3 Boc), 15,0 (βCH_3).

III.2. Généralisation de la méthode de transprotection.

Étape 1 : Dans un monocol de 100 mL, muni d'un barreau aimanté, 3 mmol des composés **3** sont mises en solution dans 20 mL de THF anhydre. On additionne en une fois 3 éq. de pyrrolidine (9 mmol). La disparition totale du produit de départ, suivie par ccm, est observée après 4 heures. Le solvant et l'excès de pyrrolidine sont évaporés sous pression réduite. Soit le produit est utilisé en l'état, soit il est purifié sur colonne de silice avec un éluant AcOEt / éther de pétrole.

βPCB,αZ-hGly-OMe 13G:



Formule brute: C₂₃H₂₅N₃O₆; **M** = 439 g.mol⁻¹; Huile.

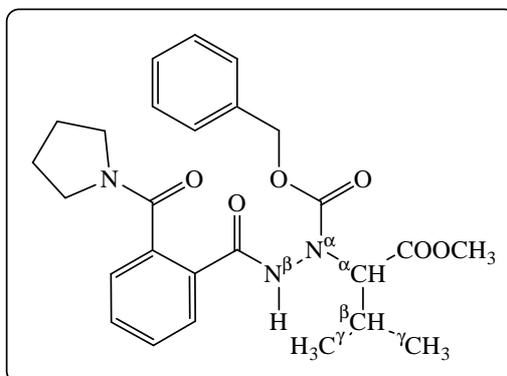
IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3277 (NH), 1795, 1771, 1746 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 9,03-8,93 (m, 1H, βNH), 7,95-7,70 (m, 1H, arom.), 7,61-7,20 (m, 8H, arom.), 5,30-5,14 (m, 2H, CH₂ Z), 4,44-4,31 (m, 2H, αCH₂), 3,83-3,46 (m, 5H, O-CH₃ et pyrro), 3,19-3,07 (m, 2H, pyrro), 2,04-1,82 (m, 4H, pyrro).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 170,3, 170,1 (C=O), 167,3 (OC-pyrro), 166,8 (N-COC₆H₄), 156,4, 155,6 (COOCH₂Ph), 137,7, 137,5, 136,8, 136,3 (C arom), 135,5 (CH arom.), 132,4, 132,3 (C arom.), 130,8, 130,5, 130,3, 129,9, 129,2, 129,0, 128,8, 128,2, 127,3, 124,7 (CH arom.), 69,6, 69,2, 69,0 (CH₂ Z), 53,1 (O-CH₃), 54,1, 53,1 (αCH₂), 49,7, 46,7, 46,4, 45,8, 26,5, 25,1 (CH₂ pyrro).

SMHR calculé pour C₂₃H₂₅N₃O₆ [M+Na⁺] m/z 462,1636, trouvé 462,1635.

βPCB,αZ-hVal-OMe 13V:



Formule brute: C₂₆H₃₁N₃O₆; **M** = 482 g.mol⁻¹; Huile.

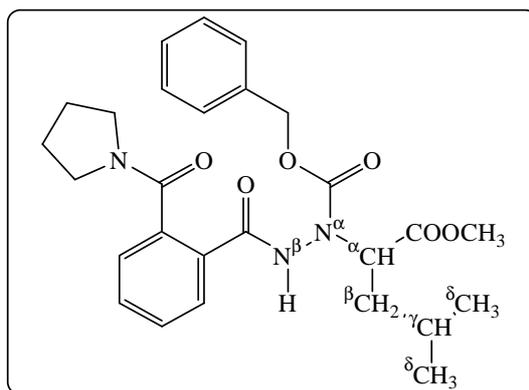
IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3275 (NH), 1741, 1734, 1717 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 9,20-8,90 (m, 1H, βNH), 7,89-7,70 (m, 1H, arom), 7,62-7,26 (m, 8H, arom.), 5,30-5,10 (m, 2H, CH_2 Z), 4,93-4,36 (m, 1H, αCH), 3,86-3,51 (m, 5H, O- CH_3 et pyrro), 3,35-2,93 (m, 2H, pyrro), 2,47-2,14 (m, 1H, βCH), 2,04-1,60 (m, 4H, pyrro) et 1,11-0,89 (m, 6H, γCH_3).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 171,4 ($\text{C}=\text{OOCCH}_3$), 170,1 (OC-pyrro), 167,2 (N- COC_6H_4), 160,0, 155,7 ($\text{C}=\text{OOCCH}_2\text{Ph}$), 137,5 (C arom.), 136,8, 136,3 (C arom.), 130,9, 130,6, 129,8, 129,0, 128,7, 128,2, 126,9 (CH arom.), 69,0 (CH_2 Z), 65,6 (αCH), 52,8 (O- CH_3), 49,7, 46,5 (CH_2 pyrro), 28,6 (βCH), 26,3, 25,0 (2CH_2 pyrro) et 20,1, 19,7 (γCH_3).

SMHR calculé pour $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] m/z 504,2105, trouvé 504,2109.

$\beta\text{PCB}, \alpha\text{Z-hLeu-OMe } \mathbf{13L}$:



Formule brute: $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$; $\text{M} = 496 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Huile.

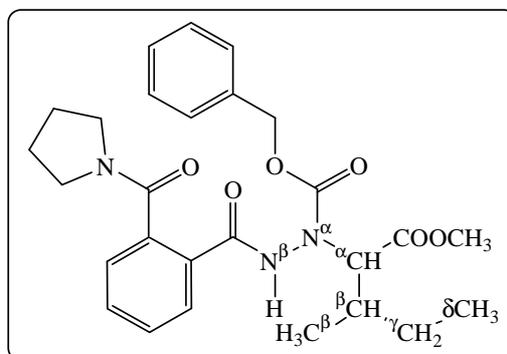
IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3171 (NH), 1772, 1743, 1718 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 8,68 (s, 1H, βNH), 7,76-7,48 (m, 1H, arom.), 7,44-7,07 (m, 8H, arom.), 5,25-4,82 (m, 3H, CH_2 Z et αCH), 3,65 (s, 3H, O- CH_3), 3,54-3,46 (m, 2H, pyrro), 3,05-2,90 (m, 2H, pyrro), 1,98-1,49 (m, 7H, pyrro, βCH_2 et γCH) et 0,91-0,75 (m, 6H, δCH_3).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 172,3 ($\text{C}=\text{OOCCH}_3$), 169,5 (OC-pyrro), 167,2 (N- COC_6H_4), 156,3 ($\text{C}=\text{OOCCH}_2\text{Ph}$), 136,8, 136,5 (C arom.), 132,1 (CH arom.), 130,9 (C arom.) 130,0, 129,7, 129,5, 128,8, 128,4, 127,8, 126,6 (CH arom.), 68,7 (CH_2 Z), 60,0, 59,0 (αCH), 52,9 (O- CH_3), 49,3, 46,1 (2CH_2 pyrro), 38,1, 37,8 (CH_2), 26,1, 24,8 (2CH_2 pyrro), 24,7 (γCH) et 23,6, 21,7 (δCH_3).

SMHR calculé pour C₂₇H₃₃N₃O₆ [M+Na⁺] m/z 518,2262, trouvé 518,2265.

βPCB,αZ-Ile-OMe 13I:



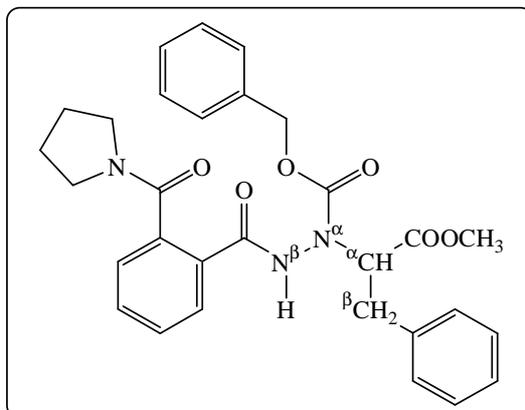
Formule brute: C₂₇H₃₃N₃O₆; **M** = 496 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3245 (NH), 1772, 1741, 1717, 1696 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 9,22-8,91 (m, 1H, βNH), 7,97-7,65 (m, 1H, arom.), 7,56-7,22 (m, 8H, arom.), 5,30-5,05 (m, 2H, CH₂ Z), 4,98-4,48 (m, 1H, αCH), 3,88-3,41 (m, 5H, O-CH₃ et pyrro), 3,29-2,89 (m, 2H, pyrro), 2,05-1,70 (m, 4H, pyrro), 1,60-1,40 (m, 1H, βCH), 1,33-1,16 (m, 2H, γCH₂) et 1,05-0,72 (m, 2H, δCH₃).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 171,0 (COOCH₃), 169,7 (OC-pyrro), 166,9 (N-COC₆H₄), 156,2 (COOCH₂Ph), 136,5 (C arom), 131,7 (CH arom), 130,5, 130,2 (C arom), 129,3, 128,7, 128,3, 127,8 et 126,6 (CH arom), 68,6 (CH₂ Z), 63,8 (αCH), 60,5 (γCH₂), 52,4 (O-CH₃), 49,3, 46,1 (2CH₂ pyrro), 34,7 (βCH), 26,1, 24,8 (2CH₂ pyrro), 15,7 (βCH₃) et 11,6 (δCH₃).

SMHR calculé pour C₂₇H₃₃N₃O₆ [M+Na⁺] m/z 518,2262, trouvé 518,2263.

β PCB, α Z-hPhe-OMe 13F :

Formule brute: $C_{30}H_{31}N_3O_6$; $M = 530 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

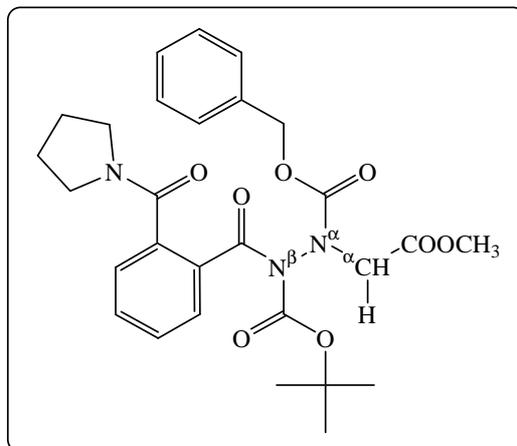
IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3289 (NH), 1792, 1743, 1718 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): δ (ppm) 8,83-8,92 (m, 1H, βNH), 8,00-7,08 (m, 14H, arom.), 5,37-4,90 (m, 3H, CH_2 Zet αCH), 3,83-3,47 (m, 5H, O- CH_3 et pyrro), 3,40-2,93 (m, 4H, pyrro et βCH_2), 2,04-1,63 (m, 4H, pyrro).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : δ (ppm) 171,7 (COOCH_3), 170,1 (OC-pyrro), 167,9 (N- COC_6H_4), 156,6 (COOCH_2Ph), 137,8 (C arom.), 137,0, 136,4 (C arom.), 135,3, 134,4, 132,7, 132,6, 132,2, 131,2 (CH arom.), 131,0, 130,4, 128,7, 128,2, 126,8, 124,5, 124,1, 122,2 (CH arom.), 69,0 (CH_2 Z), 53,1 (O- CH_3), 49,7, 46,6 (2CH_2 pyrro), 35,5 (βCH_2) et 26,1, 24,8 (2CH_2 pyrro).

SMHR calculé pour $C_{30}H_{31}N_3O_6$ [$M+\text{Na}^+$] m/z 552,2105, trouvé 552,2103.

Etape 2 : Les composés $\beta\text{PCB},\alpha\text{Z-hXaa-OMe}$ 13 (3 mmol) sont repris dans 20 mL de THF. 1,5 éq. de Boc_2O sont ajoutés en présence de DMAP en quantité catalytique. La disparition totale du produit de départ, suivi par ccm, est observée après 3h pour hGly et 6 heures pour hLeu, hIle, hVal et hPhe. Le THF est chassé sous pression réduite. Soit le produit est utilisé en l'état, soit il est purifié sur colonne de silice avec un éluant AcOEt / éther de pétrole.

βPCB,Boc,αZ-hGly-OMe 15G:

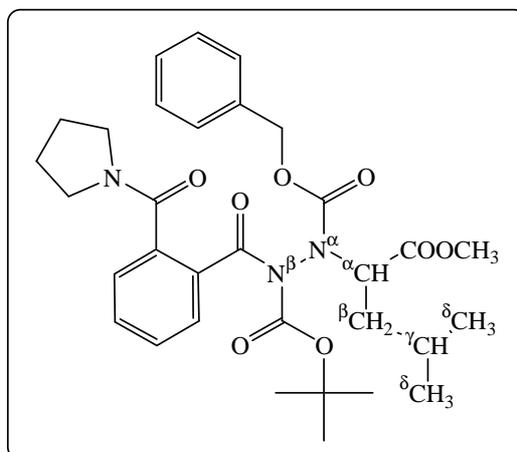
Formule brute: $C_{28}H_{33}N_3O_6$; $M = 540 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1825, 1733, 1684 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 7,23-7,09 (m, 9H, arom), 5,28-5,15 (m, 2H, CH_2 Z), 4,27-4,01 (m, 2H, αCH_2), 3,80-3,33 (m, 7H, O- CH_3 et pyrro), 1,88-1,75 (m, 4H, pyrro) et 1,31-1,85 (m, 9H, Boc).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 169,9, 169,5 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 169,0, 168,6 ($\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}$ -pyrro), 168,4 ($\underline{\text{N}}$ - $\underline{\text{C}}\text{OC}_6\text{H}_4$), 155,8, 155,5 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$), 151,0 ($\underline{\text{C}}\text{OOtBu}$), 136,7 (C arom Z), 136,3, 135,8 (C arom C_4H_6), 129,4, 129,2, 128,9, 128,6, 128,1, 127,8, 127,2, 127,0 (CH arom), 85,5 ($\underline{\text{C}}\text{Boc}$), 69,4 (CH_2 Z) 54,1, 53,1 (αCH_2), 52,6, 52,5 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 49,7, 46,5 ($\underline{2}\text{CH}_2$ pyrro), 28,2, 28,1 (CH_3 Boc) et 26,7, 25,1 ($\underline{2}\text{CH}_2$ pyrro).

SMHR calculé pour $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] m/z 562,2160, trouvé 562,2163.

βPCB,Boc,αZ-hLeu-OMe 15L:

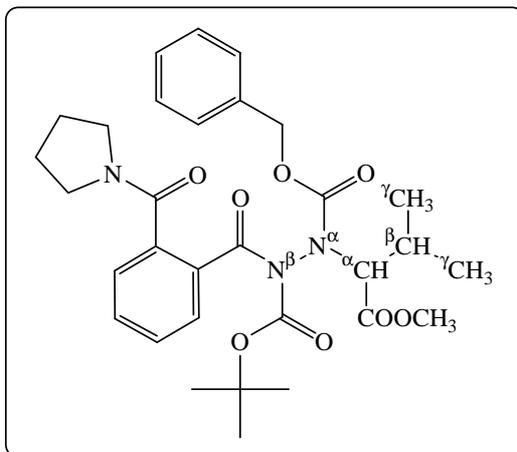
Formule brute: $C_{32}H_{41}N_3O_8$; $M = 596 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1792, 1756, 1733, 1718, 1669 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): δ (ppm) 7,72-7,13 (m, 9H, arom), 5,33-4,68 (m, 3H, CH_2 Z, αCH), 3,63-2,99 (m, 7H, O- CH_3 et pyrro), 1,84-1,32 (m, 7H, pyrro, γCH et βCH_2) et 1,22-0,81 (m, 15H, δCH_3 et Boc).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : δ (ppm) 171,1, 171,0 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 170,1, 169,8 ($\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}$ -pyrro), 168,4, 168,2 ($\underline{\text{N}}\underline{\text{C}}\text{OC}_6\text{H}_4$), 155,4, 155,3, 154,8 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$), 151,8, 151,5 ($\underline{\text{C}}\text{OOtBu}$), 138,2, 138,1, 137,9, 137,8 (C arom Z), 136,2, 136,1, 134,4, 134,3 (C arom C_6H_4), 131,3, 131,1, 128,9, 128,7, 128,6, 128,5, 128,4, 127,7, 127,5, 127,2 (CH arom), 85,3 ($\underline{\text{C}}\text{Boc}$), 69,2, 69,1 (CH_2 Z), 60,6, 60,1, 59,3, 58,4 (αCH), 52,7, 52,6, 52,5 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 49,1, 46,2, 46,0, 45,9 (CH_2 pyrro), 38,9, 38,6, 38,5, 38,4 (βCH_2), 27,9, 27,7 (CH_3 Boc), 26,4 (CH_2 pyrro), 25,3, 25,2 (γCH), 25,0 (CH_2 pyrro) et 23,5, 23,4, 22,7, 22,6, 22,4 (δCH_3).

SMHR calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_8$ m/z 596,2972, trouvé 596,2979.

βPCB,Boc,αZ-hVal-OMe 15V:

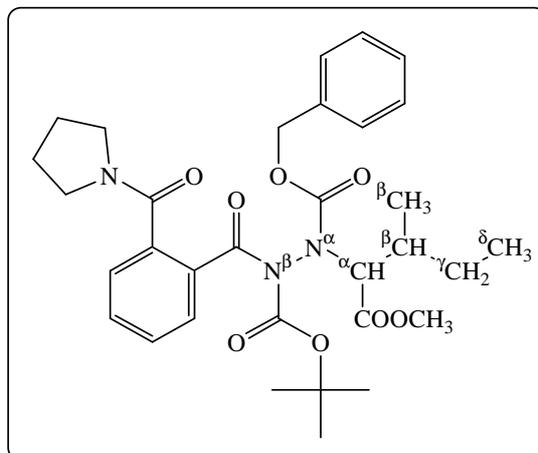
Formule brute: $C_{32}H_{40}N_3O_8$; $M = 581 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1786, 1740, 1723 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 8,03-7,18 (m, 9H, arom), 5,41-4,87 (m, 2,5H, 2 CH_2 Z et 0,5H αCH), 4,84-4,37 (m, 0,5H, αCH), 3,92-3,55 (m, 5H, O- CH_3 et pyrro), 3,26-2,97 (m, 2H, pyrro), 2,04-1,58 (m, 4H, pyrro) et 1,48-0,83 (m, 16H, γCH_3 , βCH et Boc).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 170,1, 170,0, 169,9 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 169,6, 169,5, 169,4 (OC-pyrro), 168,2, 168,1, 168,0 (N- $\underline{\text{C}}\text{OC}_6\text{H}_4$), 155,7, 155,6, 155,0, 154,9 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$), 151,9, 151,8, 151,5, 151,4 ($\underline{\text{C}}\text{OOtBu}$), 138,3, 138,0, 137,7 (C arom Z), 136,0, 135,9, 135,8, 134,0, 133,8, 133,7 (C arom C_6H_4), 131,4, 131,0, 128,9, 128,8, 128,7, 128,6, 128,5, 128,4, 128,3, 128,2, 128,1, 128,0, 127,4, 127,2, 126,9 (CH arom), 85,2, 85,1 ($\underline{\text{C}}\text{Boc}$), 69,1, 69,0, 68,8 (CH_2 Z), 66,8 (αCH), 52,2, 52,1 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 49,8, 46,0, 45,7 (CH_2 pyrro), 29,1, 29,0 (βCH), 27,7, 27,6, 27,5, 27,4 (CH_3 Boc), 26,1, 24,8, 24,7 (CH_2 pyrro), et 20,0, 19,4, 19,3, 19,2 (γCH_3).

SMHR calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_8$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] m/z 604,2629 trouvé 604,2630.

βPCB,Boc,αZ-hIle-OMe 15I:

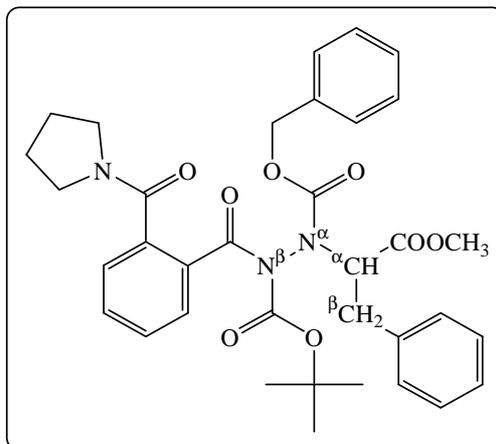
Formule brute: C₃₂H₄₁N₃O₈; **M** = 596 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1749 1732, 1717, 1684, 1670 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃) : δ (ppm) 7,99-7,15 (m, 9H, arom), 5,36-5,08 (m, 2H, CH₂ Z), 4,89-4,68 (m, 0,77H, α CH), 4,63-4,45 (m, 0,23H, α CH), 3,79-3,05 (m, 7H, O-CH₃ et pyrro), 2,04-1,57 (m, 4H, pyrro) et 1,45-0,71 (m, 18H, β CH, γ CH₂, γ CH₃, Boc).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 170,7, 170,5, 170,3 (CCOOCH₃), 169,8 (OC-pyrro), 168,6 (N-COC₆H₄), 156,0 (COOCH₂Ph), 151,7 (COOtBu), 138,6, 138,4 (C arom Z), 136,3, 136,2, 134,4, 134,3 (C arom C₆H₄), 131,7, 131,3, 129,4, 129,2, 129,1, 129,0, 128,9, 128,7, 128,6, 128,5, 128,4, 127,7, 127,2 (CH arom), 85,5, 85,4 (CBoc), 69,4, 69,2 (CH₂ Z), 66,3 (α CH), 61,1 (γ CH₂), 52,6, 52,5 (O-CH₃), 49,2, 49,1, 46,1, 46,0 (CH₂ pyrro), 35,6, 35,4 (β CH), 28,1, 27,9, 27,8 (CH₃ Boc), 26,2, 26,1 (CH₂ pyrro) et 16,1, 11,5 (β , δ CH₃).

SMHR calculé pour C₃₂H₄₁N₃O₈ [M+Na⁺] *m/z* 618,2786, trouvé 618,2285.

βPCB,Boc,αZ-hPhe-OMe 15F:

Formule brute: C₃₅H₃₉N₃O₈; **M** = 629 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1806, 1754, 1727 (C=O), 1638 (C₆H₄).

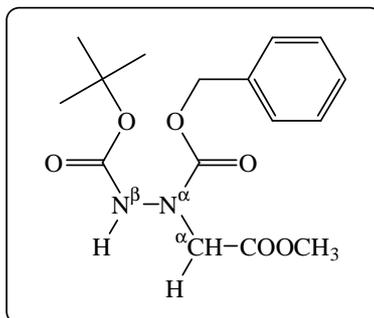
RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): δ (ppm) 7,81-7,07 (m, 14H, arom), 5,35-4,82 (m, 3H, CH₂ Zet αCH), 3,62-2,98 (m, 9H, O-CH₃, βCH₂ et pyrro), 1,97-1,66 (m, 4H, pyrro) et 1,31-0,95 (m, 9H, Boc).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 170,3, 170,1, 170,0 (C=O), 169,8, 169,7 (OC-pyrro), 168,4, 168,3 (N-COC₆H₄), 155,1, 154,6 (COOCH₂Ph), 151,8, 151,7, 151,5, 151,3 (COOtBu), 138,1, 138,0, 137,3, 137,1, 137,0, 136,8, 136,1, 136,0, 134,6, 134,5 (C arom), 131,3, 131,2, 131,1, 130,1, 130,0, 129,9, 129,1, 129,0, 128,9, 128,8, 128,7, 128,5, 128,4, 128,2, 127,5, 127,3 (CH arom), 85,6, 85,5, 85,3 (CBoc), 69,8, 69,4, 69,3 (CH₂ Z), 63,9, 63,7, 63,5, 62,5, 61,8 (αCH), 52,6, 52,4 (O-CH₃), 49,3, 49,2, 46,3, 46,1, 46,0 (CH₂ pyrro), 36,2, 36,1 (βCH₂), 28,3, 27,9, 27,7 (CH₃ Boc) et 26,5, 26,4, 25,0 (CH₂ pyrro).

SMHR calculé pour C₃₅H₃₉N₃O₈ [M+Na⁺] m/z 652,2629, trouvé 652,2632.

Etape 3 : Les composés βPCB,Boc,αZ-hAaa-OMe 15 (3 mmol) sont dissous dans 30 mL de THF sec. On additionne en une fois 1,5 éq. de méthylamine 2N dans le MeOH. La disparition totale du produit de départ, suivie par ccm, est observée après 3 heures pour hGly et 6 heures pour hLeu, hVal, hIle, hPhe. Le solvant et l'excès de méthylamine sont évaporés sous pression réduite et le produit est purifié sur colonne de silice avec comme éluant un mélange AcOEt / éther de pétrole.

βBoc,αZ-hGly-OMe 9G:



Formule brute: C₁₆H₂₂N₂O₆; **M** = 338 g.mol⁻¹; Solide blanc.

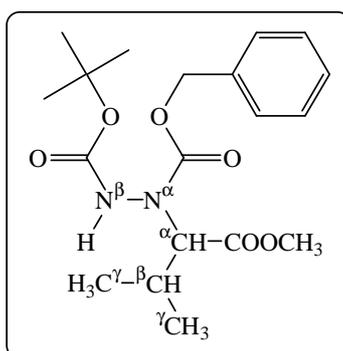
IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3325 (NH), 1733, 1717 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): δ (ppm) 7,50-7,18 (m, 5H, arom), 6,88-6,37 (m, 1H, βNH), 5,25-5,06 (m, 2H, CH₂ Z), 4,46-4,24 (m, 2H, αCH₂), 3,82-3,61 (m, 3H, O-CH₃) et 1,61-1,31 (m, 9H, Boc).

RMN ¹³C (solvant: CDCl₃): δ (ppm) 170,6 (COOCH₃), 156,6 (COOCH₂Ph), 155,6 (COOtBu), 136,3 (C arom), 129,1, 129,0, 128,8, 128,7, 128,4 (CH arom), 82,5 (CBoc), 69,2, 69,0 (CH₂ Z), 52,9 (O-CH₃), 51,9 (αCH₂) et 28,7 (CH₃ Boc).

SMHR calculé pour C₁₆H₂₂N₂O₆ [M+Na⁺] m/z 361,1370, trouvé 361,1372.

βBoc,αZ-hVal-OMe 9V :



Formule brute: C₁₉H₂₈N₂O₆; **M** = 380 g.mol⁻¹; Huile.

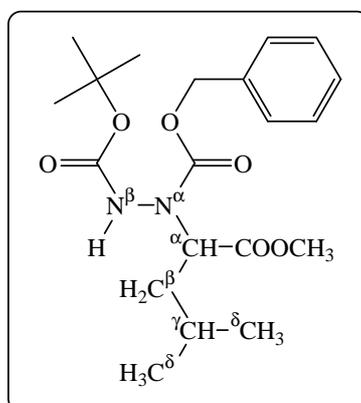
IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3332 (NH), 1747, 1717 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 7,51-7,20 (m, 5H, arom), 6,80-6,34 (m, 1H, βNH), 5,29-5,05 (m, 2H, CH₂ Z), 4,82-4,38 (m, 1H, αCH), 3,81-3,56 (m, 3H, O-CH₃), 2,34-2,01 (m, 1H, βCH), 1,53-1,30 (m, 9H, et Boc) et 1,16-0,80 (m, 6H, γCH₃).

RMN ¹³C (solvant: CDCl₃): δ(ppm) 171,8 (COOCH₃), 157,2 (COOCH₂Ph), 155,2 (COOtBu), 136,3 (C arom), 129,1, 128,8, 128,5 (CH arom), 81,9 (CBoc), 69,1 (CH₂ Z), 65,9 (αCH), 52,7 (O-CH₃), 29,1 (βCH), 28,7 (CH₃ Boc) et 20,3, 19,6 (2CH₃).

SMHR calculé pour C₁₉H₂₈N₂O₆ [M+Na⁺] m/z 403,1840, trouvé 403,1838.

βBoc,αZ-hLeu-OMe 9L :



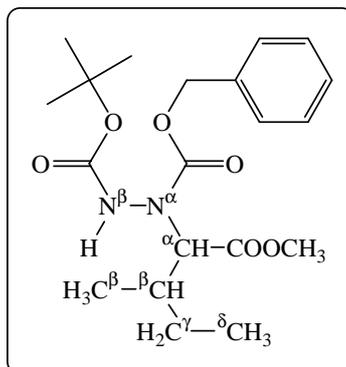
Formule brute: C₂₀H₃₀N₂O₆; **M** = 394 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) v_{max}/cm⁻¹: 3334 (NH), 1740, 1684 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): δ(ppm) 7,49-7,17 (m, 5H, arom), 6,70-6,23 (m, 1H, βNH), 5,35-4,67 (m, 3H, CH₂ Z et αCH), 3,84-3,54 (m, 3H, O-CH₃), 1,88-1,24 (m, 12H, βCH₂, γCH et Boc) et 1,05-0,79 (m, 6H, δCH₃).

RMN ¹³C (solvant: CDCl₃): δ(ppm) 173,5 (COOCH₃), 157,3 (COOCH₂Ph), 155,4 (COOtBu), 136,3 (C arom), 129,1, 128,8, 128,5 (CH arom), 81,8 (CBoc), 69,1 (CH₂ Z), 60,4, 59,4 (αCH), 53,0 (O-CH₃), 38,2 (βCH₂), 29,1 (γCH), 28,7 (CH₃ Boc), et 23,1, 21,9 (δCH₃).

SMHR calculé pour C₂₀H₃₀N₂O₆ [M+Na⁺] m/z 417,1996, trouvé 417,1993.

βBoc,αZ-hIle-OMe 9I:

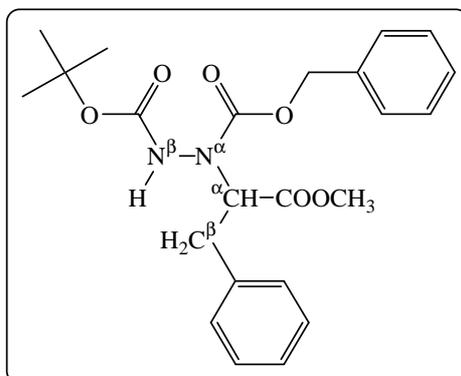
Formule brute: C₂₀H₃₀N₂O₆; **M** = 394 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3333 (NH), 1747, 1716 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): $\delta(\text{ppm})$ 7,43-7,12 (m, 5H, arom), 6,83-6,32 (m, 1H, βNH), 5,27-4,50 (m, 3H, CH₂ Zet αCH), 3,86-3,56 (m, 3H, O-CH₃), 1,70-1,15 (m, 12H, Boc, βCH et γCH₂) et 1,13-0,76 (m, 6H, δCH₃).

RMN ¹³C (solvant: CDCl₃): $\delta(\text{ppm})$ (COOCH₃), 157,6 (COOCH₂Ph), 136,3 (C arom), 129,1, 128,8, 128,5 (CH arom), 81,8 (CBoc), 69,2 (CH₂ Z), 64,4 (αCH), 52,7 (O-CH₃), 35,9 (βCH), 28,7 (CH₃ Boc), 26,5 (γCH₂) et 16,3, 12,3 (β,δCH₃).

SMHR calculé pour C₂₀H₃₀N₂O₆ [M+Na⁺] m/z 417,1996, trouvé 417,1993.

βBoc,αZ-hPhe-OMe 9F:

Formule brute: C₂₃H₂₈N₂O₆; **M** = 428 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3313 (NH), 1794, 1744, 1717 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): δ(ppm) 7,38-7,09 (m, 10H, arom), 6,86-6,35 (m, 1H, βNH), 5,35-4,77 (m, 3H, CH₂ Zet αCH), 3,75-3,41 (m, 3H, O-CH₃), 3,26-3,03 (m, 2H, βCH₂) et 1,49-1,27 (m, 9H, Boc).

RMN ¹³C (solvant: CDCl₃): δ(ppm) 171,5 (COOCH₃), 156,4 (COOCH₂Ph), 155,4 (COOtBu), 137,2, 136,1 (C arom), 129,6, 128,9, 128,6, 128,4, 127,9, 127,8, 127,3, 127,1 (CH arom), 81,9 (CBoc), 68,8 (CH₂ Z), 62,2 (αCH), 52,8 (O-CH₃), 35,5 (βCH₂) et 28,5 (CH₃ Boc).

SMHR calculé pour C₂₃H₂₈N₂O₆ [M+Na⁺] m/z 451,1840, trouvé 451,1840.

III.3. Préparation des βFmoc,αZ-hXaa-OMe.

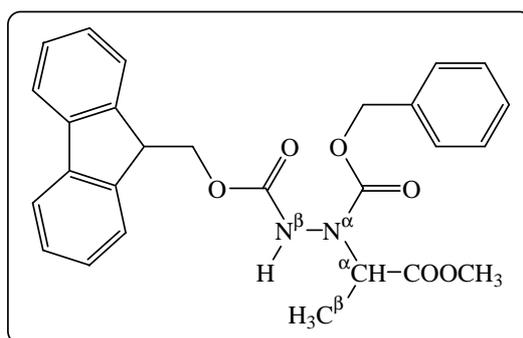
Procédure générale pour la synthèse des βFmoc,αZ-hXaa-OMe à partir des βBoc,αZ-hXaa-OMe

Dans une solution saturée de HCl (3N) dans l'acétate d'éthyle (10 mL), préparée par barbotage de HCl gazeux dans l'acétate d'éthyle, on dissout 1 mmol de βBoc,αZ-hXaa-OMe. La disparition totale du produit de départ, suivie par ccm est observée après 1 heure. Le mélange réactionnel est neutralisé précautionneusement (pH = 7) dans un bain de glace avec une solution saturée de NaHCO₃ puis extrait trois fois à l'AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et le solvant est évaporé sous pression réduite.

Le résidu obtenu est dissous dans 10 mL de dioxane auxquels est ajoutée une solution aqueuse de Na₂CO₃, 10% (1,5 éq, 2,66 mL, 1,5 mmol). A 10°C, on additionne 1,5 éq. de Fmoc-Cl (0,39 g, 1,5 mmol) par petites portions. Le mélange réactionnel est agité pendant 24 h à température ambiante. Les esters βFmoc,αZ-hAaa-OMe sont précipités par addition d'eau (60 mL) et sont récupérés par extraction à l'éther. Après séchage sur MgSO₄ et évaporation du solvant, le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (pour hGly, hAla) avec un mélange AcOEt/ éther de pétrole ou utilisé sans purification dans l'étape suivante (hIle, hVal, hLeu, hPhe).

Procédure générale pour la synthèse des βFmoc, αZ-hXaa-OMe avec un réactif supporté

La résine PS-HOBt(HL) (0,9 mmol/g, 225 mg, 0,2 mmol) est placée dans un réacteur pour phase solide. Une solution de Fmoc-Cl (127 mg, 0,49 mmol) dilués dans 1,1 mL de CH₂Cl₂ est additionnée à la résine. 65 mg de pyridine (0,82 mmol) dans 1,2 mL CH₂Cl₂ sont ajoutés. La solution est agitée pendant 1 heure à 25°C. La phase liquide est filtrée et la résine est lavée successivement par 5 mL de DCM (3x), 5 mL de DMF (3x), 5 mL de DCM (3x) et 5 mL d'Et₂O (3x). Une solution d'hydrazinoester (0,13 mmol) dans 3,2 mL CH₂Cl₂ est additionnée au milieu réactionnel. Le mélange est agité et maintenu à 25°C pendant 20 heures. La phase liquide est récupérée et la résine est lavée avec 5 mL de DCM (3x). Les solvants sont évaporés pour donner l'hydrazinoester βFmoc, αZ-hXaa-OMe pur.

βFmoc, αZ-hAla-OMe 19A:

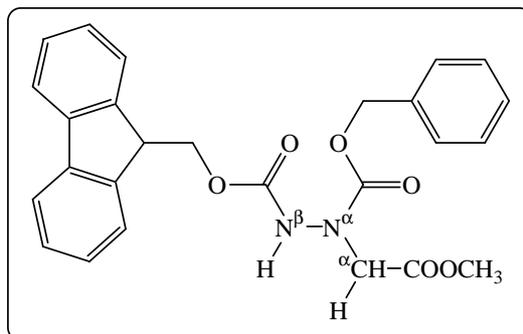
Formule brute: C₂₇H₂₆N₂O₆; **M** = 474 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3311, (NH), 1741, 1717; (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): δ (ppm) 8,03-7,09 (m, 14H, arom), 7,02-6,24 (m, 1H, βNH), 5,52-4,65 (m, 3H, CH₂ Z et αCH), 4,73-4,09 (m, 3H, CH Fmoc et CH₂ Fmoc), 3,85-3,56 (m, 3H, O-CH₃) et 1,70-1,32 (m, 3H, βCH₃).

RMN ¹³C (solvant: CDCl₃) : δ (ppm) 172,7, 171,1 (C=O), 157,2, 157,0 (C=O), 156,9, 156,7, 156,1 (C=O), 144,0, 143,7, 141,6, 136,0 (C arom), 128,6, 128,4, 128,3, 128,0, 127,3, 125,3, 120,2 (CH arom), 68,5, 68,1, 67,9 (CH₂ Z), 61,9, 61,5 (CH₂ Fmoc), 56,3 (αCH), 52,5, 52,3 (O-CH₃), 47,3 (CH Fmoc) et 14,3 (βCH₃).

SMHR calculé pour C₂₇H₂₆N₂O₆ [M+Na⁺] m/z 497,1683, trouvé 497,1682.

β Fmoc, α Z-hGly-OMe 19G:

Formule brute: $C_{26}H_{24}N_2O_6$; $M = 460 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3320 (NH), 1743, 1717 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 8,01-6,72 (m, 14H, arom et βNH), 5,37-4,95 (m, 2H, CH_2 Z), 4,58-4,02 (m, 5H, αCH_2 , CH_2 Fmoc et CH Fmoc), 3,80-3,63 (m, 3H, O- CH_3).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 170,5 ($\text{C}=\text{O}$), 156,4 ($\text{C}=\text{O}$), 155,8 ($\text{C}=\text{O}$), 144,0, 141,9, 136,1 (C arom), 129,4, 129,1, 128,9, 128,6, 128,4, 127,9, 127,7 (CH arom), 69,4 (CH_2 Z), 68,4 (CH_2 Fmoc), 53,0 (O- CH_3), 52,8 (αCH_2), 47,58 (CH Fmoc).

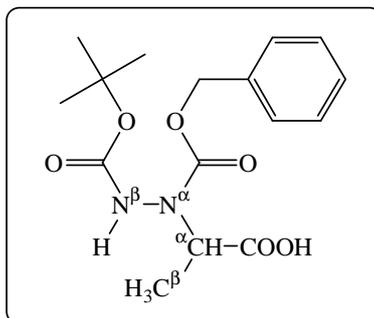
SMHR calculé pour $C_{26}H_{24}N_2O_6$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] m/z 483,1527, trouvé 483,1530.

IV. Déprotection de la fonction acide.

IV.1 Cas des β Boc (ou Z ou Tfa)-hydrazinoesters.

L'hydrazinoester $\beta\text{X},\alpha\text{P-hXaa-OMe}$ (1 mmol) est dissous dans 10 mL de THF. On additionne en une fois 10 ml d'une solution de LiOH dans l'eau (2,5 M). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure puis jeté sur glace. La phase aqueuse est extraite au chloroforme (3x20 mL), puis acidifiée jusqu'à pH = 2. La phase organique est ensuite extraite à l'acétate d'éthyle (8x20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et évaporées pour donner l'hydrazinoacide pur.

β Boc, α Z-hAla-OH 20A:



Formule brute : $C_{16}H_{22}N_2O_6$; $M = 338 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

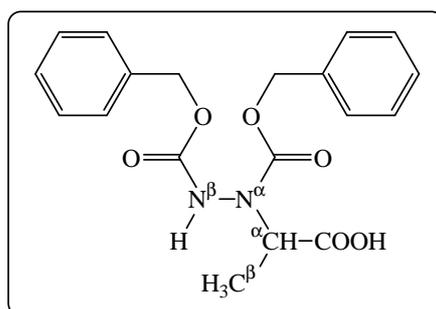
IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3500-3000 (NH et OH), 1743, 1717 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 9,34-9,12(m, 1H, COOH), 7,68-6,98 (m, 6H, arom et β NH), 5,20-4,66 (m, 3H, CH_2 Zet α CH) et 1,45-1,28 (m, 12H, Boc et β CH $_3$).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 175,4, 175,0 ($\underline{\text{C}}\text{OOH}$), 157,4 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$), 156,4 ($\underline{\text{C}}\text{OOtBu}$), 136,0 (C arom), 128,9, 128,8, 128,7, 128,5, 128,3, 127,9, 127,5 (CH arom), 82,9, 82,5 ($\underline{\text{C}}\text{Boc}$), 69,2, 69,0, 68,6 (CH_2 Z), 58,6 (α CH), 28,6, 28,5, 28,0 (CH_3 Boc) et 15,0, 14,6 (β CH $_3$).

SMHR calculé pour $C_{16}H_{22}N_2O_6$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] m/z 361,1370, trouvé 361,1372.

β Z, α Z-hAla-OH 21A :



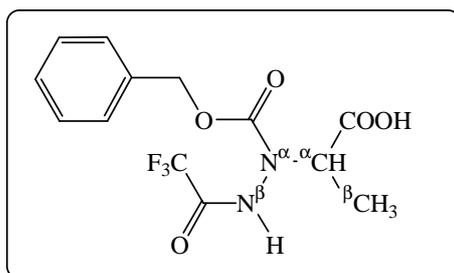
Formule brute: $C_{19}H_{20}N_2O_6$; $M = 372 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3450-3150 (OH et NH), 1718, 1750 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 9,92-9,38 (m, 1H, COOH), 7,60-7,27 (m, 11H, β NH et 10arom), 5,18-4,81 (m, 5H, 2CH_2 Zet α CH) et 1,48-1,39 (m, 3H, β CH $_3$).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 176,8, 176,6, 176,5, 176,4 ($\underline{\text{COOH}}$), 158,3, 157,4, 156,6 ($\underline{\text{COOCH}_2\text{Ph}}$), 136,2, 135,9, 135,8 (C arom), 129,5, 129,4, 129,3, 129,2, 129,0, 128,9, 128,6, 128,6, 128,0, 127,7 (CH arom), 69,6, 69,0, 68,7 (CH_2 Z), 58,4, 57,0 (αCH) et 15,0, 14,6 (βCH_3).

$\beta\text{Tfa}, \alpha\text{Z}$ -hAla-OH 22A:

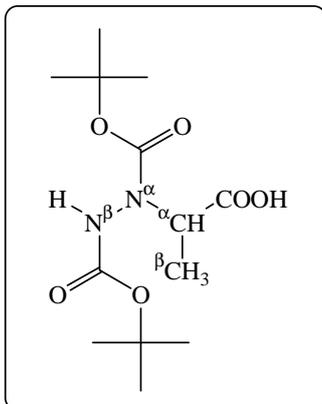


Formule brute: $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$; $\text{M} = 334 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3450-3150 (OH et NH), 1733, 1750 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 9,00-8,26 (m, 2H, βNH et COOH), 7,25-7,18 (m, 5H, arom), 5,21-4,72 (m, 3H, CH_2 Z et αCH), et 1,37 (d, $J = 7 \text{ Hz}$, 3H, βCH_3).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 176,8, 176,7, 176,6, 176,5 ($\underline{\text{COOH}}$), 157,9, 157,8 ($\underline{\text{OC-CF}_3}$), 155,6, 155,5, 155,4 ($\underline{\text{COOCH}_2\text{Ph}}$), 135,3 (C arom), 129,6, 129,4, 129,2, 129,0, 128,8, 128,7, 128,6, 128,5, 128,4, 128,3 (CH arom), 115,9 (q, $^1J_{\text{CF}} = 286 \text{ Hz}$, $\underline{\text{CF}_3}$), 69,9, 69,0 (CH_2 Z), 56,5 (αCH), 14,8 (βCH_3).

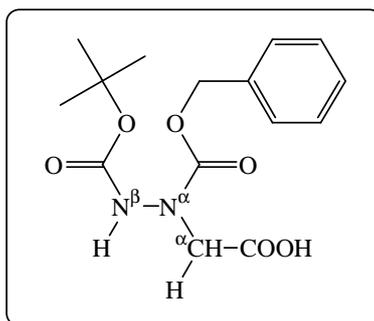
β Boc, α Boc-hAla-OH 23A:

Formule brute: $C_{13}H_{24}N_2O_6$; $M = 304 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3500-3150 (NH et OH), 1700, 1653 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 8,88-7,75 (m, 1H, COOH), 7,00-6,63 (m, 1H, β NH), 5,09-4,21 (m, 1H, α CH), et 1,70-1,00 (m, 21H, Boc et β CH₃).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 174,4, 174,3, 174,2 ($\underline{\text{C}}\text{OOH}$), 154,7, 155,5 ($\underline{\text{C}}\text{OOtBu}$), 84,4, 82,7, 82,5 ($\underline{\text{C}}\text{Boc}$), 60,3 (α CH), 52,9 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 29,4, 29,0, 28,7 (CH₃ Boc), 14,9, 14,7, 14,6 (β CH₃).

 β Boc, α Z-hGly-OH 20G:

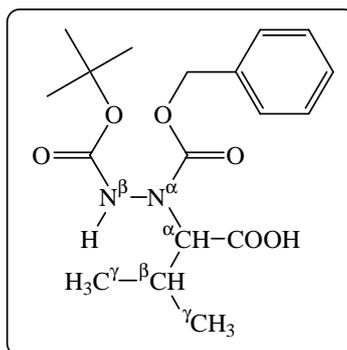
Formule brute: $C_{15}H_{20}N_2O_6$; $M = 324 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3466-3126 (NH, COOH), 1734, 1718 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: DMSO): $\delta(\text{ppm})$ 9,83-8,91 (m, 1H, COOH), 7,39-7,27 (m, 5H, arom), 5,76-5,73 (m, 1H, β NH), 5,24-4,48 (m, 2H, CH₂ Z), 4,33-3,72 (m, 2H, α CH₂) et 1,61-1,10 (m, 9H, Boc).

RMN ^{13}C (solvant: DMSO) : δ (ppm) 156,6 ($\underline{\text{COOCH}_2\text{Ph}}$), 155,6 ($\underline{\text{COOtBu}}$), 136,3 (C arom), 129,1, 129,0, 128,8, 128,7, 128,4 (CH arom), 82,5 ($\underline{\text{CBoc}}$), 69,2, 69,0 (CH_2 Z), 51,9 (αCH_2) et 28,7 (CH_3 Boc).

$\beta\text{Boc}, \alpha\text{Z-hVal-OH}$ 20V:



Formule brute: $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$; $\text{M} = 366 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Huile.

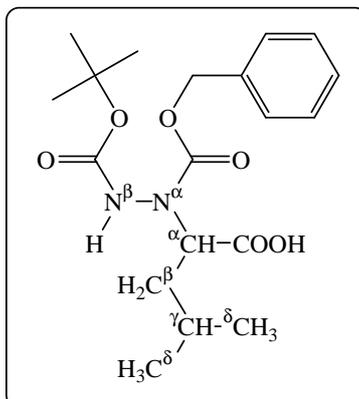
IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3490-3170 (NH, COOH), 1736, 1715 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): δ (ppm) 10,92-9,67 (m, 1H, COOH), 7,70-6,59 (m, 6H, 5 arom. et βNH), 5,35-4,93 (m, 2H, CH_2 Z), 4,81-3,88 (m, 1H, αCH), 2,56-2,16 (m, 1H, βCH), 1,58-0,90 (m, 15H, Boc et γCH_3).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3): δ (ppm) 177,6, 176,9 ($\underline{\text{COOH}}$), 156,8 ($\underline{\text{COOCH}_2\text{Ph}}$), 136,0 (C arom), 129,1, 128,9, 128,6 (CH arom), 83,4 (C Boc), 69,3, 69,1 (CH_2 Z), 67,1 (αCH), 30,3 (βCH), 28,7 (CH_3 Boc) et 20,9, 17,9 (γCH_3).

SMHR calculé pour $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] m/z 389,1683, trouvé 389,1682.

β Boc, α Z-hLeu-OH 20L:



Formule brute: $C_{19}H_{28}N_2O_6$; $M = 380 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

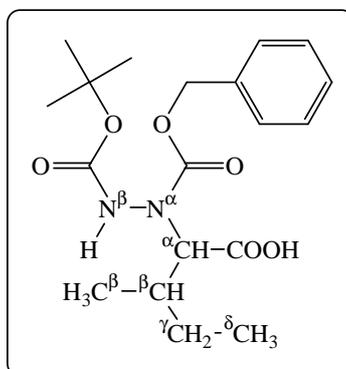
IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3400-3186 (NH, COOH), 1718 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 10,47-8,94 (m, 1H, COOH), 7,61-7,06 (m, 6H, 5arom et βNH), 5,47-4,34 (m, 3H, CH_2 Z et αCH), 1,94-1,05 (m, 12H, γCH , βCH_2 et Boc) et 1,02-0,55 (m, 6H, δCH_3).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 156,7 ($\text{C}=\text{O}$), 136,3 (C arom), 129,2, 128,9, 128,6 (CH arom), 85,8 (C_{Boc}), 69,8, 69,3 (CH_2 Z), 60,5 (αCH), 38,5, 38,1 (βCH_2), 29,1 (γCH), 28,6 (CH_3 Boc), et 23,8, 21,9 (δCH_3).

SMHR calculé pour $C_{19}H_{28}N_2O_6$ [$M+\text{Na}^+$] m/z 403,1840, trouvé 403,1839.

β Boc, α Z-hIle-OH 20I:



Formule brute: $C_{19}H_{28}N_2O_6$; $M = 380 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

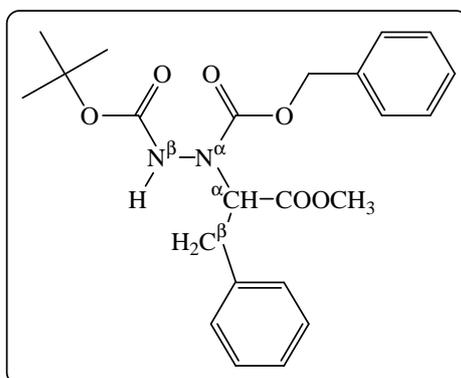
IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3500-3124 (NH, COOH), 1733, 1716 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 10,13-9,31 (m, 1H, COOH), 7,49-6,55 (m, 6H, 5 arom et βNH), 5,56-4,05 (m, 3H, CH_2 Z et αCH), 2,23-1,16 (m, 12H, Boc, γCH_2 et βCH) et 1,09-0,72 (m, 6H, βCH_3 , δCH_3).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 177,7, 177,2 (COOH), 157,1 (COOCH_2Ph), 136,0 (C arom), 129,1, 128,9, 128,5 (CH arom), 82,3 (C Boc), 69,3, 69,0 (CH_2 Z), 68,1 (αCH), 37,1 (βCH), 28,8, 28,6 (CH_3 Boc), 26,8, 26,6, 26,3 (γCH_2) et 16,6, 16,1, 12,4, 12,2 ($\beta, \delta \text{CH}_3$).

SMHR calculé pour $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] m/z 403,1840, trouvé 403,1837.

$\beta\text{Boc}, \alpha\text{Z}$ -hPhe-OH 20F:



Formule brute: $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$; $\text{M} = 414 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3601-3225 (COOH, NH), 1734, 1717 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$ 9,98-6,72 (m, 13H, arom, βNH et COOH), 5,49-4,60 (m, 3H, CH_2 Z et αCH), 3,07-2,68 (m, 1H, βCH_2), 2,67-2,53 (m, 1H, βCH_2) 1,68-1,22 (m, 9H, Boc).

RMN ^{13}C (DMSO) $\delta(\text{ppm})$ 157,1, 156,8 (COOCH_2Ph), 155,6 (COOtBu), 142,5, 140,8, 137,2, 136,2 (C arom) 129,0, 128,3, 128,1, 127,9, 127,8, 127,3, 127,0 (CH arom), 81,9 (CBoc), 66,5 (CH_2 Z), 64,2, 62,8 (αCH_2) et 28,0 (CH_3 Boc).

SMHR calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] m/z 437,1683 trouvé 437,1685.

IV.2. Cas des β Fmoc-hydrazinoesters.

IV.2.1. Hydrolyse enzymatique

Procédure générale pour l'hydrolyse par voie enzymatique

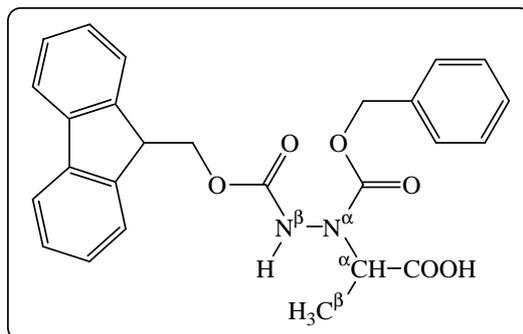
Les synthèses ont été effectuées avec une station Syncore Reactor. Le volume réactionnel est fixé à 5 mL (complété en cas évaporation), à une température de 50°C et sous 400 mbar.

L'hydrazinoester (0,1 mmol) est dissous dans 20 % de solvant (voir tableau 8) et 80 % de tampon phosphate. Le milieu réactionnel est chauffé à 50°C, pendant 15 minutes. L'enzyme est ajoutée (100 mg pour une enzyme immobilisée et 10 mg pour une enzyme libre) et la réaction se poursuit sous agitation. Le filtrat est récupéré, extrait plusieurs fois avec AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées sous pression réduite. Le rendement de l'hydrazinoacide obtenu est déterminé par RMN.

IV.2.2. Saponification.

L'hydrazinoester β Fmoc, α Z-hXaa-OMe (1 mmol) est dissous dans 2,27 mL d'une solution à 0,8 M de CaCl₂ dans un mélange iPrOH / H₂O (7/3). On additionne en une fois 1,2 équivalent de NaOH. La solution est agitée pendant 7 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est jeté sur glace et la solution obtenue est acidifiée jusqu'à pH = 1-2 par addition d'une solution d'HCl à 10%. La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (8x20 mL), les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées. On obtient l'hydrazinoacide pur.

βFmoc,αZ-hAla-OH 24A:



Formule brute : C₂₆H₂₄N₂O₆; **M** = 460 g.mol⁻¹; Huile.

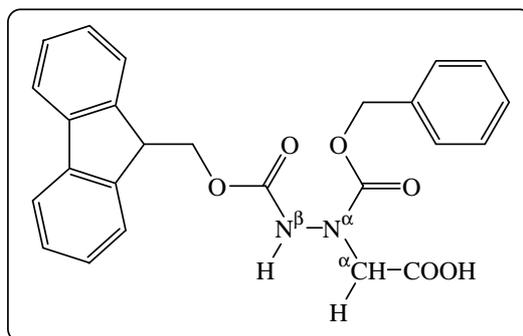
IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3447-3133 (NH, COOH), 1743, 1718 (C=O).

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃) : δ (ppm) 10,74-9,67 (m, 1H, COOH), 8,11-6,73 (m, 14H, arom et βNH), 5,29-4,63 (m, 3H, CH₂ Z et αCH), 4,57-3,96 (m, 3H, CH Fmoc et CH₂ Fmoc) et 1,77-1,35 (m, 3H, βCH₃).

RMN ¹³C (solvant: CDCl₃) : δ (ppm) 177,9 (C=O), 156,4 (C=O), 144,2, 143,8, 141,9, 136,0 (C arom), 129,1, 128,9, 128,5, 127,8, 125,6, 120,7 (CH arom), 69,3, 68,6 (CH₂ Z), 61,1 (CH₂ Fmoc), 56,9 (αCH), 47,6 (CH Fmoc), 14,8 (βCH₃).

SMHR calculé pour C₂₆H₂₄N₂O₆ [M+Na⁺] m/z 483,1527, trouvé 483,1527.

βFmoc,αZ-hGly-OH 24G:



Formule brute : C₂₅H₂₂N₂O₆; **M** = 446 g.mol⁻¹; Huile.

IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3682-3085 (NH, COOH), 1734, 1717, 1653 (C=O).

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3) : δ (ppm) 10,38-9,70 (m, 1H, COOH), 8,29-6,93 (m, 14H, arom et βNH), 5,44-4,67 (m, 2H, CH_2Z), 4,60-4,12 (m, 5H, αCH_2 , CH_2Fmoc et CH Fmoc).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3) : δ (ppm) 157,1 (COOCH_2Ph), 143,5, 140,8, 136,3 (C arom), 128,9, 128,4, 128,3, 127,9, 127,8, 127,7, 127,4, 125,3, 121,4, 120,1 (CH arom), 67,4, 67,2 (CH_2Z), 66,7, 66,6 (CH_2Fmoc), 59,8 (αCH_2), 51,9 (CH Fmoc).

SMHR calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] m/z 469,1370, trouvé 469,1370.

V. Synthèse des monomères sur support solide.

Les synthèses ont été effectuées sur un appareil Heidolph Synthesis 1. La résine PS-WANG est gonflée pendant 15 minutes dans du THF. Toutes les réactions ont été réalisées à température ambiante. Les équivalents sont calculés par rapport au taux de substitution de la résine.

IV.1. Synthèse supportée d' α -hydrazinoacides par la voie 1.

Etape 1 : La résine est mise en suspension dans 5 mL de THF. 3 éq. d'anhydride trimellitique, et 3 éq. de PPh_3 sont introduits. 3 éq. de DIAD sont ensuite ajoutés en une fois. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant quatre heures. La résine est filtrée et lavée successivement par 2 fois 5 mL de DCM et par 2 fois 5 mL de THF (1 min par lavage) puis mise en suspension dans 5 mL de THF.

Etape 2 : 3 éq. de carbazate (ZNHNH_2 ou BocNHNH_2) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant quatre heures. La résine est filtrée et lavée successivement par 2 fois 5 mL de DCM et par 2 fois 5 mL de THF (1 min par lavage) puis mise en suspension dans 5 mL de THF.

Etape 3 : On introduit 3 éq. de DCC et 3 éq. de HOBt. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant trois heures. La résine est filtrée et lavée successivement par 2 fois 5 mL de DCM et par 2 fois 5 mL de THF (1 min par lavage) puis mise en suspension dans 5 mL de THF.

Etape 4 : A la résine en suspension dans le THF sont ajoutés 3 éq. de PPh_3 , 3 éq. de $\text{RCH(OH)COOR}'$ et 3 éq. de DIAD. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant quatre heures. La résine est filtrée et lavée successivement par 2 fois 5 mL de DCM et par 2 fois 5 mL de THF (1 min par lavage).

Etape 5 : libération de l'hydrazinoester

- *Méthode A* : On additionne 4 éq. d'une solution de méthylamine (2N) dans le MeOH. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant trois heures. La résine est filtrée et lavée successivement par 2 fois 5 mL de DCM et par 2 fois 5 mL de THF (1 min par lavage). Elle est mise en suspension dans 5 mL de THF et 4 éq. de Boc_2O ainsi qu'une quantité catalytique de DMAP sont ajoutés. Après deux heures, le filtrat est récupéré. Le solvant est chassé et le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice.

- *Méthode B* : On additionne 4 éq. de pyrrolidine. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant trois heures. La résine est filtrée et lavée successivement par 2 fois 5 mL de DCM et par 2 fois 5 mL de THF (1 min par lavage). La résine est mise en suspension dans 5 mL de THF et 4 éq. de Boc_2O ainsi qu'une quantité catalytique de DMAP sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant trois heures. La résine est filtrée et lavée successivement par 2 fois 5 mL de DCM et par 2 fois 5 mL de THF (1 min par lavage). 4 éq. d'une solution de méthylamine (2N) dans le MeOH sont introduits. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant deux heures. Le filtrat est récupéré et évaporé pour donner l' α -hydrazinoester pur.

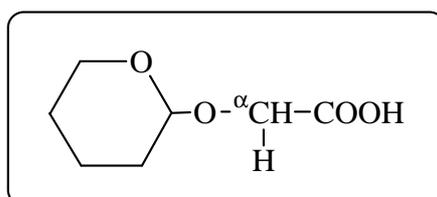
V.2. Synthèse supportée d' α -hydrazinoacides par la voie 2.

Procédure générale pour la préparation des acides O-tétrahydropyranyl à partir des hydroxyacides correspondants.

A une solution d' α -hydroxyacide (20 mmol) et de *p*-TsOH (76 mg, 0,4 mmol) dans 40 mL de CHCl_3 à 4 °C (bain de glace fondante), on additionne goutte à goutte 2,55 mL (28 mmol) de dihydropyrane. Après 5 min, le bain de glace est enlevé et la réaction est laissée à température ambiante. Le mélange réactionnel est extrait avec 2 x 50 mL de KOH (0,2 M). La phase aqueuse est acidifiée (pH 3-4), saturée par NaCl et extraite trois fois avec un mélange

$\text{CHCl}_3/i\text{-PrOH}$ (3:1). Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de l'eau, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite pour donner l'acide *O*-tétrahydropyranyl correspondant.

Acide (tétrahydro-pyran-2-yloxy)-acétique 29G:

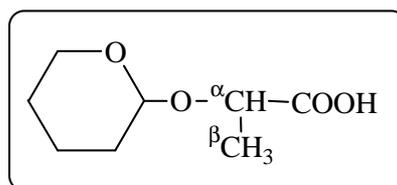


Formule brute: $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_4$; **M** = $160 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Huile.

RMN ^1H (300 MHz) (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 4,87-4,57 (m, 1H, CH THP), 4,42-4,08 (m, 2H, αCH_2), 4,02-3,36 (m, 2H, CH_2 THP) et 2,15-1,36 (m, 6H, 3CH_2 THP).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 176,3, 174,1, 170,8 ($\underline{\text{C}}\text{OOH}$), 99,6, 97,3, 95,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ THP), 64,7, 62,7 (CH_2 THP), 60,7 (αCH_2), 31,1, 30,6 (CH_2 THP), 25,8, 25,7 (CH_2 THP) et 19,6, 19,4 (CH_2 THP).

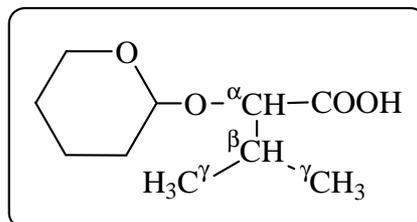
Acide 2-(tétrahydro-pyran-2-yloxy)-propionique 29A:



Formule brute: $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_4$; **M** = $174 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Huile⁶⁶.

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 5,51-3,26 (m, 3H, αCH , CH THP et CH_2 THP) et 2,14-1,01 (m, 9H, CH_2 THP et βCH_3).

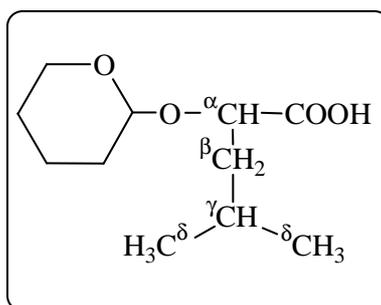
Acide 3-Méthyl-2-(tétrahydro-pyran-2-yloxy)-butyrique 29V:



Formule brute: C₁₀H₁₈O₄; **M** = 202 g.mol⁻¹; Huile⁶⁶.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): δ(ppm) 9,60-7,45 (m, 1H, COOH), 4,81-4,61 (m, 1H, αCH), 4,21-3,72 (m, 2H, CH THP et ½ CH₂ THP), 4,64-3,19 (m, 1H, ½ CH₂ THP), 2,33-1,38 (m, 7H, βCH et CH₂ THP) et 1,30-0,68 (m, 6H, γCH₃).

Acide 4-Méthyl-2-(tétrahydro-pyran-2-yloxy)-pentanoïque 29L:

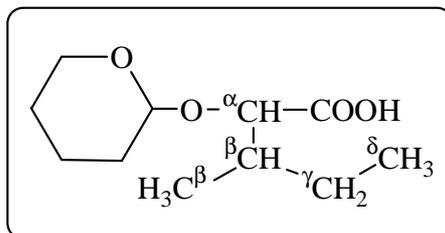


Formule brute: C₁₁H₂₀O₄; **M** = 216 g.mol⁻¹; Huile

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): δ(ppm) 10,74-9,49 (m, 1H, COOH), 4,86-4,55 (m, 1H, αCH), 4,52-3,17 (m, 3H, CH₂ THP et CH THP) 2,46-1,35 (m, 9H, γCH, βCH₂, 3CH₂ THP) et 1,31-0,49 (m, 6H, δCH₃).

RMN ¹³C (solvant: CDCl₃): δ(ppm) 179,7, 178,7, 177,7 (COOH), 101,4, 97,7 (CH THP), 72,8, 69,3 (αCH), 63,9, 62,7 (CH₂ THP), 42,2 (βCH₂), 31,0, 30,7 (CH₂ THP), 24,9, 24,8 (CH₂ THP), 25,0, 24,9 (γCH), 23,7, 23,5 (δCH₃), 22,3, 22,0 (δCH₃) et 19,8, 19,4 (CH₂ THP).

Acide 3-Méthyl-2-(tétrahydro-pyran-2-yloxy)-pentanoïque 29I:

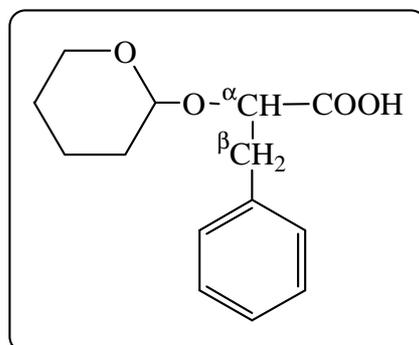


Formule brute: C₁₁H₂₀O₄; **M** = 216 g.mol⁻¹; Huile

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃): δ(ppm) 5,18-3,54 (m, 4H, αCH, CH₂ THP et CH THP), 2,04-1,13 (m, 9H, βCH, γCH₂, CH₂ THP) et 1,07-0,58 (m, 6H, βCH₃, δCH₃).

RMN ¹³C (solvant: CDCl₃): δ(ppm) 179,6 (C=O), 103,4, 98,1 (CH THP), 83,9 (αCH), 65,5, 63,1 (CH₂ THP), 39,2 (βCH), 31,3, 31,0 (CH₂ THP), 25,9, 25,8 (CH₂ THP), 24,3 (γCH₂), 21,1, 19,6 (CH₂ THP), 16,1 (βCH₃) et 13,7 (δCH₃).

Acide 3-Phényl-2-(tétrahydro-pyran-2-yloxy)-propionique 29F:



Formule brute : C₁₄H₁₈O₄; **M** = 250 g.mol⁻¹; Huile.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 7,52-7,01 (m, 5H, arom), 4,73-4,65 (m, 1H, αCH), 4,45-4,22 (m, 1H, CH THP), 3,95-3,26 (m, 2H, CH₂ THP), 3,21-2,68 (m, 2H, βCH₂) et 1,91-1,26 (m, 6H, CH₂ THP).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 175,2, 172,9, 172,8 (C=O), 138,3, 137,5, 137,2 (C arom), 129,5, 129,3, 128,0, 127,9, 126,3, 126,0 (CH arom), 98,4 (CH THP), 77,5 (αCH) 60,0 (CH₂ THP), 40,3, 40,0 (βCH₂), 30,8, 30,3 (CH₂ THP), 25,4, 25,1 (CH₂ THP) et 19,3, 19,2 (CH₂ THP).

Procédure générale pour la préparation des α -hydrazinoacides par la voie 2

Etape 1 : 3 éq de THPO-CH(R)-COOH, 3 éq de DIC et une quantité catalytique de DMAP sont introduits sur la résine dans 5 mL de THF. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant deux heures.

La résine est filtrée, lavée par 3 fois 5 mL de DCM (1 min par lavage) et l'étape 1 est recommencée. La résine est lavée successivement par 3 fois 5 mL de DCM, par 3 fois 5 mL d'acétone et par 3 fois 5 mL de THF (1 min par lavage).

Etape 2 : On introduit 5 mL d'une solution de TsOH (5mg/mL) dans un mélange CH₂Cl₂/ MeOH (97/3). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant une heure.

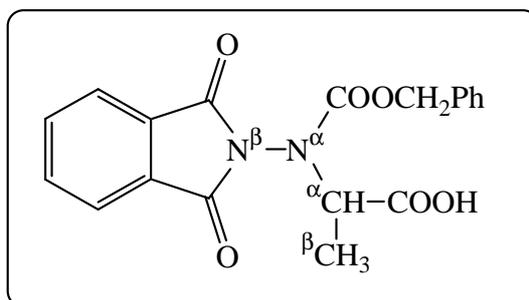
La résine est filtrée, lavée par 3 fois 5 mL de DCM (1 min par lavage) et l'étape 2 est recommencée. La résine est lavée successivement par 3 fois 5 mL de DCM, par 3 fois 5 mL d'acétone et par 3 fois 5 mL de THF (1 min par lavage).

Etape 3 : On introduit 3 éq. de PhtN-NHZ et 3 éq. de PPh₃ dans 5 mL de THF. 3 éq. de DIAD sont ensuite ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant deux heures.

La résine est filtrée, lavée par 3 fois 5 mL de THF (1 min par lavage) et l'étape 3 est recommencée. La résine est lavée successivement par 3 fois 5 mL de DCM, par 3 fois 5 mL d'acétone et par 3 fois 5 mL de THF (1 min par lavage).

Etape 4 : L'hydrazinoacide est décroché de la résine par un mélange de 2 mL de DCM et de 2 mL de TFA pendant 30 minutes. Le filtrat est récupéré puis évaporé pour donner l'hydrazinoacide présentant une pureté satisfaisante par RMN ¹H.

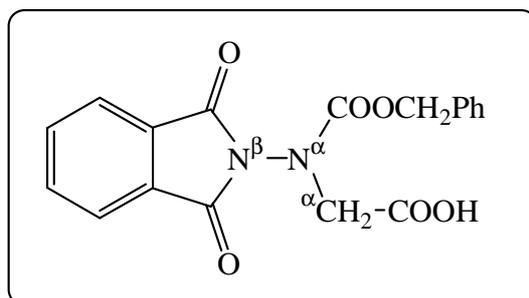
***N*-benzyloxycarbonyl-*N*-phthalimidoalanine 30A:**



Formule brute : C₁₉H₁₆N₂O₆; **M** = 368 g.mol⁻¹ ; Huile.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 10,74-9,82 (m, 1H, COOH), 8,31-6,92 (m, 9H, arom), 5,75-4,47 (m, 3H, CH₂ Zet αCH) et 1,82-1,36 (m, 3H, βCH₃).

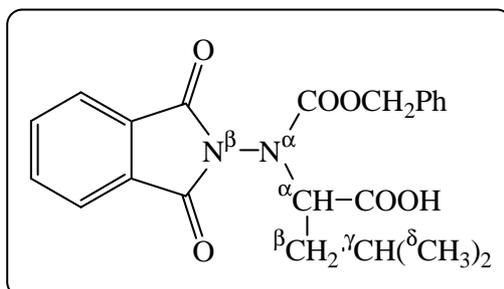
***N*-benzyloxycarbonyl-*N*-phthalimidoglycine 30G:**



Formule brute: C₁₈H₁₄N₂O₆; **M** = 354 g.mol⁻¹ ; Huile.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 8,16-6,43 (m, 9H, arom), 5,50-5,06 (m, 2H, CH₂ Z) et 4,98-4,03 (m, 2H, αCH₂).

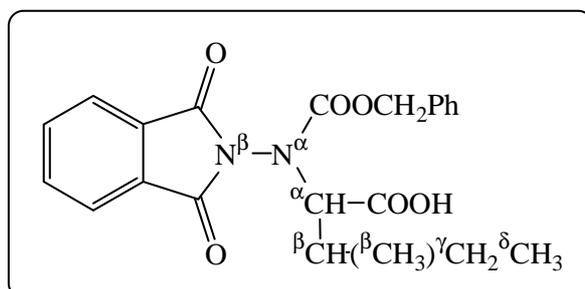
***N*-benzyloxycarbonyl-*N*-phthalimidoleucine 30L:**



Formule brute : C₂₂H₂₂N₂O₆; **M** = 410 g.mol⁻¹; Huile.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃) : δ(ppm) 8,16-7,64 (m, 4H, arom Ph), 7,53-6,98 (m, 5H, arom Z), 5,37-4,90 (m, 3H, αCH et CH₂ Z), 1,98-1,59 (m, 3H, γCH et βCH₂), 1,04-0,88 (m, 6H, δCH₃).

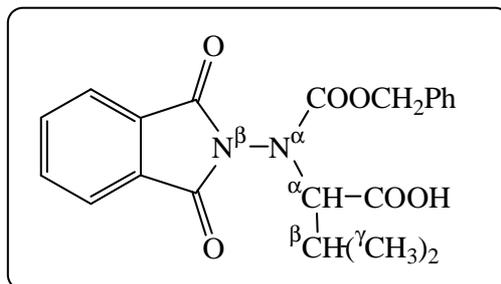
***N*-benzyloxycarbonyl-*N*-phthalimidoisoleucine 30I:**



Formule brute : C₂₂H₂₂N₂O₆; **M** = 410 g.mol⁻¹; Huile.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃) : δ(ppm) 8,38-6,99 (m, 9H, arom), 5,37-4,79 (m, 3H, αCH et CH₂ Z), 2,35-1,72 (m, 2H, γCH₂), 1,75-1,10 (m, 3H, βCH et βCH₃) et 1,10-0,72 (m, 3H, δCH₃).

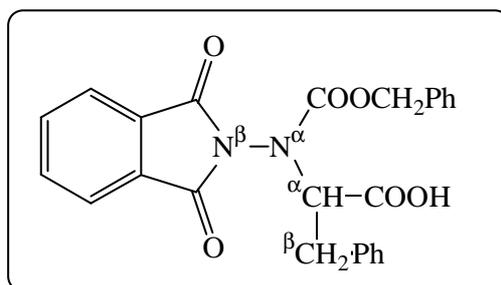
N-benzyloxycarbonyl-N-phthalimidovaline 30V:



Formule brute : C₂₁H₂₀N₂O₆; **M** = 396 g.mol⁻¹; Huile.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃) : δ(ppm) 9,41-8,59 (m, 2H, arom Pht), 8,44-7,59 (m, 2H, arom Pht), 7,56-6,98 (m, 5H, arom Z), 5,55-4,39 (m, 3H, CH₂ Z et αCH), 2,35-1,85 (m, 1H, βCH), 1,37-1,06 (m, 3H, γCH₃), 1,06-0,85 (m, 3H, γCH₃).

N-benzyloxycarbonyl-N-phthalimidophénylalanine 30F:



Formule brute : C₂₅H₂₀N₂O₆; **M** = 444 g.mol⁻¹; Huile.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 8,53-6,36 (m, 14H, arom.), 5,64-4,48 (m, 3H, αCH et CH₂ Z), 3,51-2,63 (m, 2H, βCH₂).

CHAPITRE II :
ETUDE DE LA REACTIVITE DES α -HYDRAZINOACIDES EN
SOLUTION ET SUR PHASE SOLIDE.
APPLICATION A LA SYNTHESE D' α -HYDRAZINOPEPTIDES

III. Etude de la réactivité des α -hydrazinoacides en solution.

Les différentes méthodes de couplage décrites dans ce paragraphe sont des protocoles standards utilisés en synthèse peptidique. Par souci de simplifications, elles sont présentées sous forme générale pour la préparation d'hydrazinodipeptide.

III.1. Méthode de couplage aux chloroformiates (anhydrides mixtes).

A une solution refroidie à -10°C de 5 mmol de l'acide carboxylique et de 5 mmol de NMP dans 5 mL de THF anhydre, sont ajoutées 5 mmol d'ICF. Après 5 minutes, on additionne une solution refroidie de 5 mmol du partenaire hydraziné dans 5 mL de THF. Après $\frac{1}{2}$ h à -10°C et 2 h à l'ambiante, on filtre et l'on évapore le solvant ; le brut réactionnel est chromatographié avec l'éluant adéquat.

III.2. Méthode de couplage par DCC / HOBt

A une solution refroidie à 0°C de 5 mmol du partenaire hydraziné, de 5 mmol de l'acide carboxylique, de 5,5 mmol de HOBt dans 25 mL de THF anhydre, sont additionnées en une seule fraction 5 mmol de DCC. Après 1h à 0°C et 4h à température ambiante, la DCHU formée est filtrée, le solvant évaporé, le brut réactionnel est repris par le minimum d'acétate d'éthyle et laissé 2h à -20°C , puis filtré. La purification finale est réalisée par chromatographie avec l'éluant adéquat.

III.3. Méthode de couplage au chlorure d'acide

1. Préparation du chlorure d'acide

A une solution refroidie à 0°C de 3 mmol de l'acide carboxylique dans 17 mL de CH_2Cl_2 anhydre sont additionnées 30 mmol de SOCl_2 (distillé au préalable sur quinoléine). Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 2h sous azote. L'excès de SOCl_2 et les solvants sont ensuite évaporés sous pression réduite. On obtient un solide jaunâtre qui est dissous dans

3,4 mL de CH_2Cl_2 et 34 mL d'hexane. Le solide blanc obtenu est filtré et le chlorure d'acide est utilisé en l'état.

2. Couplage

A une solution refroidie à -10°C de 6,66 mmol du partenaire hydraziné et de 15 mmol de NaHCO_3 dans 25 mL de CH_2Cl_2 , sont ajoutées goutte à goutte 10 mmol du chlorure d'acide dilué dans 10 mL de CH_2Cl_2 de telle façon à maintenir la température strictement égale à -10°C . L'addition terminée le mélange réactionnel est maintenue à 0°C pendant 1h, puis 10h à l'ambiante. On filtre le NaCl formé, et le solvant est chassé. Le brut réactionnel est chromatographié avec l'éluant adéquat.

III.4. Méthode de couplage par TBTU / HOBt / DIEA

A une solution refroidie à 0°C de 1,35 mmol du composé à extrémité carboxylique dans 3 mL de THF anhydre, sont ajoutées 1,35 mmol d'HOBt et 1,35 mmol TBTU, puis on additionne une solution refroidie de 0,45 mmol du partenaire hydraziné dans 5 mL de THF et 4,5 mmol de DIEA. Après 15mn à 0°C et 10 h à l'ambiante, le solvant est évaporé. Le brut réactionnel est chromatographié avec l'éluant adéquat.

III.5. Méthode de couplage par HATU / HOBt / DIEA

A une solution refroidie à 0°C de 0,7 mmol du partenaire hydraziné, 0,7 mmol du composé à extrémité carboxylique et de 0,77 mmol de HOBt dans 3 mL de THF anhydre, sont ajoutées 0,7 mmol d'HATU en une seule fois et 2,1 mmol DIEA. Après 15 mn à 0°C et 10 h à l'ambiante, le solvant est évaporé. Le brut réactionnel est chromatographié avec l'éluant adéquat.

III.6. Méthode de couplage HATU/ NMM

A une solution refroidie à 0°C de 0,7 mmol du partenaire hydraziné dans 0,35 mL de CH_2Cl_2 , est ajouté 0,3 mL de NMP. Une solution de 0,77 mmol du partenaire à extrémité

carboxylique dans 0,18 mL de CH_2Cl_2 et 0,7 mmol de HAUT est ensuite ajoutée. Le mélange est laissé 12 heures à l'ambiante. La solution est diluée avec de l'acétate d'éthyle, puis lavé avec une solution à 5% KHSO_4 , à 5% NaHCO_3 et une solution saturée de NaCl . La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le brut réactionnel est chromatographié avec l'éluant adéquate.

III.7. Méthode de couplage aux fluorures d'acides

1. Préparation du fluorure d'acide

Stratégie Fmoc : A 2 mmol du partenaire à extrémité carboxylique dans 10 mL CH_2Cl_2 anhydre, sont ajoutées, sous azote et à -20°C , 4 mmol de fluorure de cyanuryle (0,54 g, 0,33 mL, $d = 1,6$) et 2 mmol de pyridine (0,17 g, 0,2 mL, $d = 0,861$). L'addition terminée le mélange réactionnel est amené à l'ambiante puis laissé 3h sous agitation. On ajoute de la glace pilée et 10 mL de CH_2Cl_2 . La phase organique est séparée et la phase aqueuse est extraite une fois avec 5 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec 10 mL d'eau glacée et séchée sur MgSO_4 . Les solvants sont évaporés sous pression réduite à température ambiante.

Stratégie Boc : A une solution de 2 mmol du partenaire à extrémité carboxylique et de 2 mmol de pyridine (0,17 g, 0,2 mL, $d = 0,861$) dans 5 mL CH_2Cl_2 anhydre, sont ajoutées sous azote et de -20°C à -10°C 4 mmol de fluorure de cyanuryle (0,54 g, 0,33 mL, $d = 1,6$). L'addition terminée le mélange réactionnel est maintenu à -10°C pendant 1h. On ajoute de la glace pilée avec 10 mL de CH_2Cl_2 . La phase organique est séparée et la phase aqueuse est extraite une fois avec 5 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec 10 mL d'eau glacée et séchée sur MgSO_4 . Les solvants sont évaporés sous pression réduite à température ambiante.

2. Couplage

A une solution de 6,66 mmol du partenaire hydraziné et de 15 mmol de NaHCO_3 dans 25 mL de CH_2Cl_2 , sont ajoutées goutte à goutte une solution refroidie à -10°C de 10 mmol du fluorure d'acide dilués dans 10 mL de CH_2Cl_2 . L'addition terminée le mélange réactionnel est maintenue à l'ambiante pendant 3 heures. On filtre le sel formé et le solvant est chassé. Le brut réactionnel est chromatographié avec l'éluant adéquat.

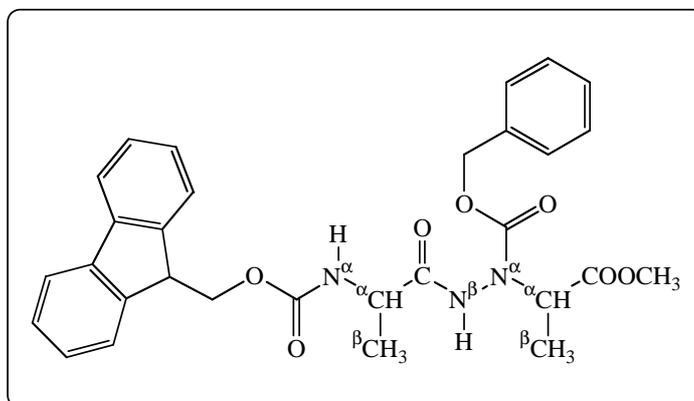
III.8. Méthode de couplage aux esters activés (OPfp, ONp, OSu)

A une solution de 5,5 mmol de l'ester activé et 5,5 mmol de HOBt dans 20 mL de THF, sont ajoutées 5 mmol du partenaire hydraziné dilué dans 10 mL de THF. Après 12h à l'ambiante, le solvant est évaporé. Le brut de réaction est repris par 50 mL de CH_2Cl_2 et la phase organique est lavée 3 fois par 10 mL de NaHCO_3 à 5%, 2 fois par 10 mL d'une solution de NaCl saturée, et séchée sur MgSO_4 . Le brut réactionnel est chromatographié avec l'éluant adéquate.

III.9. Méthode de couplage aux Uréthane N-carboxyanhydrides (ou UNCA).

A une solution de 5,5 mmol du UNCA dans 10 mL de THF, sont ajoutées 5 mmol du partenaire hydraziné dilué dans 10mL de THF. Après 12h à l'ambiante, le solvant est évaporé. Le brut réactionnel est chromatographié avec l'éluant adéquate.

Fmoc-Ala-h(Z)Ala-OMe:



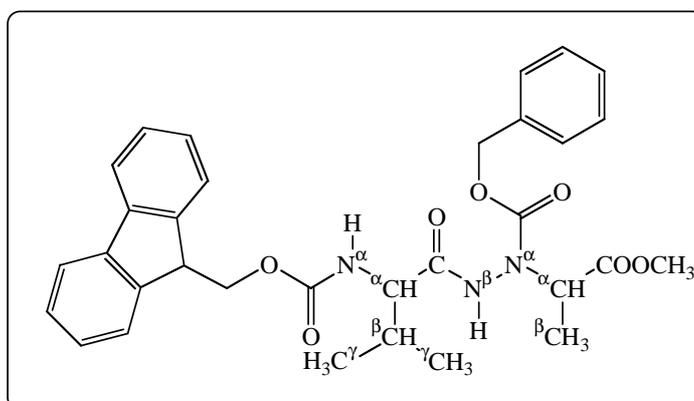
Formule brute : $C_{30}H_{31}N_3O_7$; $M = 545 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 8,34-7,14 (m, 14H, arom et βNH), 5,59-4,72 (m, 4H, CH_2 Z, αCH hAla, et αNH), 4,54-4,05 (m, 4H, CH Fmoc, CH_2 Fmoc et αCH Ala), 3,89-3,48 (m, 3H, O- CH_3) et 1,70-1,32 (m, 6H, βCH_3).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3) : $\delta(\text{ppm})$ 173,4 (COOCH_3), 144,5, 144,4, 142,0, 136,3 (C arom), 129,1, 128,9, 128,4, 127,9, 125,7, 120,7 (CH arom), 69,1, (CH_2 Z), 68,0 (CH_2 Fmoc), 56,5 (αCH hAla), 53,1 (O- CH_3), 50,0 (αCH Ala), 47,8 (CH Fmoc), 18,6 et 15,1 (βCH_3).

SMHR calculé pour $C_{30}H_{31}N_3O_7$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] m/z 568,2054, trouvé 568,2052.

Fmoc-Val-h(Z)Ala-OMe:

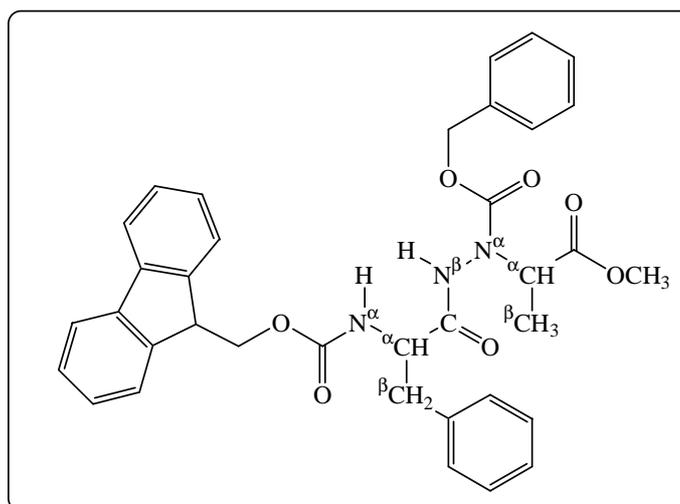


Formule brute : $C_{26}H_{23}N_3O_7$; $M = 489 \text{ g.mol}^{-1}$; Mousse.

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3) : δ (ppm) 8,47-7,97 (m, 1H, βNH), 7,94-6,99 (m, 13H, arom), 5,77-5,28 (m, 1H, αNH), 5,18-4,91 (m, 2H, CH_2 Z), 4,85-4,28 (m, 2H, CH Fmoc et αCH hAla), 4,28-3,99 (m, 3H, CH_2 Fmoc et αCH Val) 3,77-3,46 (m, 3H, O- CH_3) 2,46-1,94 (m, 1H, βCH Val) 1,60-1,32 (m, 3H, CH_3 hAla) 1,11-0,63 (γCH_3 Val).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3) : δ (ppm) 175,3, 175,4 (CONH), 171,9 (COOCH_3), 157,1 (COOCH_2Ph), 155,9 (COOFmoc), 144,5, 144,3 (C arom Fmoc), 136,2 (C arom Z), 129,1, 128,9, 128,6, 128,4, 127,8, 125,8, 120,6 (CH arom), 68,7, 67,9, 67,7 (CH_2 Z), 61,1 (CH_2 Fmoc), 59,8 (αCH Val), 56,7 (αCH hAla), 53,1 (O- CH_3), 47,9, 47,8 (CH Fmoc), 31,9, 31,2 (βCH Val), 21,7, 19,9, 19,7, 18,3 (γCH_3 Val) et 15,3, 14,9 (βCH_3 hAla).

Fmoc-Phe-h(Z)Ala-OMe :



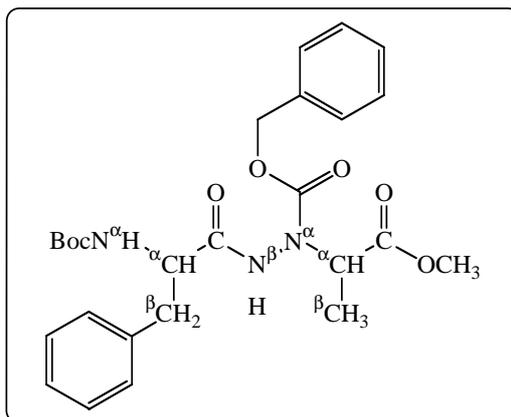
Formule brute : $\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_7$; **M** = $621 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Mousse.

RMN ^1H (300 MHz) (solvant: CDCl_3) : δ (ppm) 7,95 (s, 1H, βNH), 7,80-7,68 (m, 2H, arom), 7,60-7,08 (m, 16H, arom), 5,55-4,71 (m, 4H, CH_2 Z, αNH et αCH hAla), 4,65-3,99 (m, 4H, CH Fmoc, CH_2 Fmoc et αCH Phe), 3,87-3,36 (m, 3H, O- CH_3), 3,28-2,77 (m, 2H, βCH_2 Phe) et 1,40-0,97 (m, 3H, CH_3 hAla).

RMN ^{13}C (solvant: CDCl_3) : δ (ppm) 174,3, 173,0 (COOCH_3), 156,7, 156,3, 155,8 (COOCH_2Ph et COOFmoc), 144,4, 144,3, (C arom Fmoc), 136,7, 136,2 (C arom Z), 130,0, 129,9, 129,3, 129,2, 129,0, 128,9, 128,3, 127,6, 120,5 (CH arom), 69,0, 68,7, 67,9, 67,5 (CH_2

Z), 60,9 (CH₂ Fmoc), 56,7 (α CH hAla), 55,2 (α CH Phe), 53,0 (O-CH₃), 47,7, 47,6 (CH Fmoc), 38,5 (β CH₂ Phe) et 14,7 (β CH₃ hAla).

Boc-Phe-h(Z)Ala-OMe :



Formule brute: C₂₆H₃₃N₃O₇; **M** = 499 g.mol⁻¹; Huile.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃) : δ (ppm) 8,25-7,82 (m, 1H, β NH), 7,60-6,97 (m, 10H, H arom), 5,37-4,82 (m, 4H, CH₂ Z, α CH Ala et NH), 4,75-4,24 (m, 1H, α CH Phe), 3,94-3,43 (m, 3H, O-CH₃) 3,39-2,71 (m, 2H, β CH₂ Phe) et 1,55-1,09 (m, 12H, Boc et β CH₃).

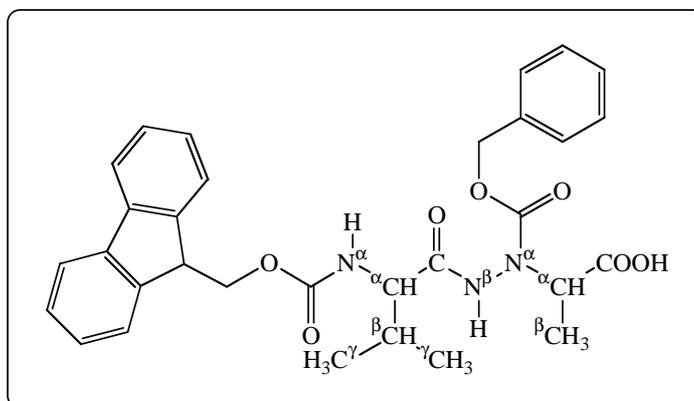
RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 175,6, 173,2 (COOCH₃), 155,9 (COOtBu), 136,8, 136,3 (C arom), 129,9, 129,3, 129,2, 129,1, 128,9, 128,7, 128,5, 127,7, 127,6, 127,2 (\underline{C} H arom), 82,0 (CH₃ Boc), 69,1 (CH₂ Z), 56,5, 56,2 (α CH hAla), 55,3, 54,9 (α CH Phe), 53,1, 53,0 (O- \underline{C} H₃), 38,6, 38,2 (β CH₂ Phe), 28,8 (CH₃ Boc) et 14,9 (β CH₃).

IV. Synthèse d'hydrazinopeptides sur phase solide.

IV.1. Préparation des synthons

Tous les hydrazinoacides ont été préparés selon les protocoles du chapitre I. Le pseudodipeptide est saponifié selon le protocole du chapitre I par NaOH dans 0,8M CaCl₂ dans un mélange iPrOH/H₂O.

Fmoc-Val-h(Z)-Ala-OH :



Formule brute : $C_{25}H_{21}N_3O_7$; $M = 475 \text{ g.mol}^{-1}$; Mousse.

RMN 1H (300 MHz) (solvant: $CDCl_3$) : δ (ppm) 9,18-8,48 (m, 1H, β NH), 8,01-6,93 (m, 13H, arom), 5,88-5,27 (m, 1H, α NH), 5,27-4,91 (m, 2H, CH_2 Z), 4,53-4,33 (m, 2H, CH Fmoc et α CH Ala), 4,30-3,94 (m, 3H, CH_2 Fmoc et α CH Val), 2,59-1,75 (m, 1H, β CH Val) 1,71-1,32 (m, 3H, CH_3 Ala) 1,11-0,42 (γ CH_3 Val).

RMN ^{13}C (solvant: $CDCl_3$) : δ (ppm) 176,1 (\underline{COOH}), 175,8, 175,3 (\underline{CONH}), , 156,7 ($\underline{COOCH_2Ph}$), 156,1, ($\underline{COOFmoc}$), 144,2, 144,0, (C arom Fmoc), 136,4 (C arom Z), 128,8, 128,7, 128,5, 128,4, 125,8, 120,7 (CH arom), 69,2, (CH_2 Z), 62,1 (CH_2 Fmoc), 59,8 (α CH Val), 56,7 (α CH Ala), 47,9, 47,8 (CH Fmoc), 31,9, 31,2 (β CH Val), 21,7, 19,9 19,7, 18,3 (γ CH_3 Val)et 15,3, 14,9 (β CH_3 Ala).

IV.2. Synthèse sur phase solide.

Les synthèses ont été effectuées soit sur des réacteurs indépendants soit sur un synthétiseur multi-canaux semi-automatique PSP 4000¹⁰⁰. La Résine est expansée pendant 15 minutes dans le DCM. Plusieurs protocoles ont été mis en œuvres suivant la stratégie et la résine utilisées.

Déprotection :

Stratégie Boc

Protocole 1a : « classique »

Le premier acide aminé fixé sur la résine est déprotégé. Le groupement Boc est éliminé par deux traitements au TFA pur de 1 et 3 minutes. La résine est lavée successivement par 3 mL de DCM (3 fois 1 min) , par 3 mL de MeOH (3 fois 1 min) et par 3 mL de DMF (3 fois 1 min). Les tests au ATNBS ou Kaiser ou au chloranil sont effectués et doivent être positifs.

Protocole 1b : « classique doux »

Le premier acide aminé fixé sur la résine est déprotégé. Le groupement Boc est éliminé par trois traitements avec une solution à 25% de TFA dans le DCM pendant 1, 5 et 20 minutes. La résine est lavée successivement par 3 mL de DCM (3 fois 1 min), par 3 mL de MeOH (3 fois 1 min) et par 3 mL de DMF (3 fois 1 min). Les tests au ATNBS ou Kaiser ou au chloranil sont effectués et doivent être positifs.

Stratégie Fmoc :

Protocole 2a : classique

Le groupement Fmoc est éliminé par 3 traitements avec une solution à 25% en volume de pipéridine dans la DMF pendant 2, 5 et 8 minutes. La résine est lavée successivement par 3 mL de DCM (3 fois 1 min), par 3 mL de MeOH (3 fois 1 min) et par 3mL de DMF (3 fois 1 min). Les tests au ATNBS ou Kaiser ou au chloranil sont effectués et doivent être positifs.

Protocole 2b : mélange magique avec triton 2b'ou sans triton 2b

Le groupement Fmoc est éliminé par plusieurs traitements avec une solution à 25% de pipéridine, 25 % de DMF, 25% de NMP et 25% toluène (**2b**) (et éventuellement 1% triton X100 (**2b'**)) pendant 3 heures. La résine est lavée successivement par 3 mL de DCM (3 fois 1 min), par 3 mL de MeOH (3 fois 1 min) et par 3mL de DMF (3 fois 1 min). Les tests au ATNBS ou Kaiser ou au chloranil sont effectués et doivent être positifs.

Test TNBSA : A quelques billes de résine sont successivement introduits 0,5 mL de MeOH, 2 gouttes de DIEA et 2 gouttes d'une solution commerciale de 1% de TNBSA dans la DMF. Une coloration rouge orange apparaît sur les billes de résine comportant des fonctions amine libres.

Test de Kaiser : A quelques billes de résine sont successivement introduites 2 gouttes d'une solution de 5 g de ninhydrine dans 100 mL d'EtOH, 2 gouttes d'une solution de 80 g de phénol dans 20 mL d' EtOH et 2 gouttes d'un mélange d'une solution aqueuse de cyanure de potassium (KCN) 1 mM et de 98 mL de pyridine. Une coloration bleue à violette apparaît sur les billes de résine comportant des fonctions amine libres.

Test au chloranil : A quelques billes de résine sont successivement introduites 2 gouttes d'une solution saturée de chloranil dans le toluène et 2 gouttes d'acétone. Une coloration bleu-vert apparaît sur les billes de résine comportant des fonctions amine libres.

Couplage :

Protocole 3a : classique

3 éq d'acide aminé *N*-protégé, 3 éq. de TBTU et 3 éq. de HOBt sont dissous dans 5 mL de DMF et introduit sur la résine, puis 9 éq. de DIEA sont ajoutés. La réaction se poursuit sous agitation pendant 2h. La résine est lavée successivement par 3 mL de DCM (3 fois 1 min), par 3 mL de MeOH (3 fois 1 min) et par 3 mL de DMF (3 fois 1 min). La même solution que précédemment est préparée et 9 éq de DIEA sont de nouveau introduits sur la résine. La réaction se poursuit pendant 2 heures. La résine est lavée successivement par 3 mL de DCM (3 fois 1 min), par 3 mL de MeOH (3 fois 1 min) et par 3 mL de DMF (3 fois 1 min). Les tests sont effectués. Si le couplage n'est pas total une nouvelle procédure est mise en œuvre.

Le couplage avec le N ^{β} de l'hydrazino ce fait avec le fluorure d'acide de l'acide aminé suivant dans le DCM. Cette réaction est réalisée 3 fois pendant 2h.

*Protocole 3b : mélange magique avec **3b'** ou sans triton **3b***

3 éq. acide aminé *N*-protégé, 3 éq. de TBTU et 3 éq. de HOBt sont dissous dans une solution contenant 33% de DMF, 33% de NMP, 33% de DCM (**3b**) et éventuellement 1% triton X100

(**3b'**). Le mélange est introduit sur la résine et 9 éq. de DIEA sont ajoutés. La réaction se poursuit agitation pendant 2h. La résine est lavée successivement pendant 1 minute par 3 fois 3 mL de DCM, par 3 fois 3 mL de MeOH et par 3 fois 3mL de DMF. L'opération est répétée, voire triplée. La résine est lavée successivement par 3 mL de DCM (3 fois 1 min), 3 mL de MeOH (3 fois 1 min) puis par 3 mL de DMF (3 fois 1 min). Les tests sont effectués. Si le couplage n'est pas total une nouvelle procédure est mise en œuvre.

Le couplage avec le N ^{β} de l'hydrazino ce fait avec le fluorure d'acide de l'acide aminé suivant dans 33% de DMF, 33% de NMP, 33% de DCM (**3b**) (et éventuellement 1% triton X100 (**3b'**)). Cette réaction est réalisée pendant 2 fois 2h et une nuit.

La synthèse du pseudopeptide se poursuit par une alternance de procédures de déprotection et de couplage. La synthèse terminée, si le peptide possède un groupement Boc ou Fmoc *N*-terminal, celui est éliminé suivant les protocoles citées précédemment. La résine est lavée plusieurs fois au DCM pour être ensuite séchée sous vide pendant une nuit.

Décrochage du peptide :

Protocole A : PAM et Merrifield résine

Le pseudopeptide est décroché de la résine pendant 2h par 5% TFMSA dans du TFA. Ce mélange est initialement refroidi à 0°C mais le clivage se déroule à température ambiante. On ajoute d'Et₂O glacé et la résine est filtrée :

- Soit le pseudopeptide précipite : le filtrat est éliminé et le résidu est lavé plusieurs fois à l'Et₂O puis dissous dans du TFA ; la solution obtenue est versée dans de l'éther diéthylique glacé, la solution est ensuite concentrée et lyophilisée.
- Soit le pseudopeptide ne précipite pas : il est alors lavé plusieurs fois à l'acide acétique puis concentré et lyophilisé.

Protocole B : Wang résine

Le pseudopeptide est décroché de la résine pendant 1h30 par 5% d'eau dans du TFA. Ce mélange est initialement refroidi à 0°C mais le clivage se déroule à température ambiante. On ajoute d'Et₂O glacé et la résine est filtrée :

- Soit le pseudopeptide précipite : le filtrat est éliminé et le résidu est lavé plusieurs fois à l'Et₂O puis dissous dans du TFA ; la solution obtenue est versée dans de l'éther diéthylique glacé, la solution est ensuite concentrée et lyophilisée.
- Soit le pseudopeptide ne précipite pas : il est alors lavé plusieurs fois à l'acide acétique puis concentré et lyophilisé.

Protocole C : H-Leu-2-Chlorotriyl résine :

Le pseudopeptide est décroché de la résine pendant 2h par 5% TFA dans du DCM. Ce mélange est initialement refroidi à 0°C mais le clivage se déroule à température ambiante. On ajoute d'Et₂O glacé et la résine est filtrée :

- Soit le pseudopeptide précipite : le filtrat est éliminé et le résidu est lavé plusieurs fois à l'Et₂O puis dissous dans du TFA ; la solution obtenue est versée dans de l'éther diéthylique glacé, la solution est ensuite concentrée et lyophilisée.
- Soit le pseudopeptide ne précipite pas : il est alors lavé plusieurs fois à l'acide acétique puis concentré et lyophilisé.

Les peptides sont purifiés par chromatographie liquide haute performance (CLHP). La colonne préparative utilisée est une DELTA PAK C18 (15 μ m, 300 Å, 19 x 300 nm). L'éluant est composé d'une solution A 0,1 % en volume de TFA dans l'eau et une solution B de 0,1 % de TFA et de 20 % d'eau dans l'acétonitrile.

L'attribution univoque des signaux et le séquençage des pseudopeptides sont établis grâce aux techniques particulières de la RMN à deux dimensions TOCSY et COSY.

IV.2.1. Pseudotriptide

PhLA

	N ^{β} H	N ^{α} H	α	β	γ	δ
Pro			4,33	2,17	1,77	3,16
h(Z)Leu	8,67	8,03	4,75	1,63	1,67	0,90 ; 0,87
Ala		7,91	4,51	1,42		

Tableau des déplacements chimiques, en RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆), exprimés en ppm

PhGA

	N ^{β} H	N ^{α} H	α	β	γ	δ
Pro			4,22	2,01	1,60	3,27
h(Z)Gly	8,56	8,11	4,28			
Ala		8,00	4,64	1,32		

Tableau des déplacements chimiques, en RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆), exprimés en ppm

IV.2.2. Pseudopentapeptide

PFVh(Z)AL

	N ^{β} H	N ^{α} H	α	β	γ	δ
Pro			4,00	2,17	1,77	3,06
Phe		8,65	4,67	3,04		
Val		8,30	4,27	1,97	0,94 ; 0,80	
h(Z)Ala	8,67	CH ₂ (Z) 5,06 Ph(Z) 7,33	4,29, 4,46, 4,70	1,23		
Leu		8,30	4,17	1,57	1,50 ; 1,49	0,84 ; 0,76

Tableau des déplacements chimiques, en RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆), exprimés en ppm
m/z [ES] théorique 694,81, expérimental 695,6 pour [M+H]

PFVhAL

	N ^{β} H	N ^{α} H	α	β	γ	δ
Pro			3,97	2,19	1,72	3,61
Phe		8,61	4,69	3,05, 2,80		
Val		8,18	4,02	1,82	0,81	
hAla	9,47	5,16	3,35	1,11		
Leu		8,15	4,21	1,65	1,56	0,85

Tableau des déplacements chimiques, en RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆), exprimés en ppm

PFh(Z)AVL

	N ^{β} H	N ^{α} H	α	β	γ	δ
Pro			4,00	2,17	1,77	3,06
Phe			4,67	3,04		
h(Z)Ala		CH ₂ (Z) 5,06 Ph(Z) 7,33	4,29, 4,46, 4,70	1,23		
Val		8,10	4,10	1,97	0,94 ; 0,80	
Leu		8,10	4,17	1,57	1,50 ; 1,49	0,84 ; 0,76

Tableau des déplacements chimiques, en RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆), exprimés en ppm

CHAPITRE III :
ETUDE PROSPECTIVE SUR LA SYNTHÈSE ET
L'ETUDE STRUCTURALE
D'UN α /HYDRAZINO-PEPTIDE

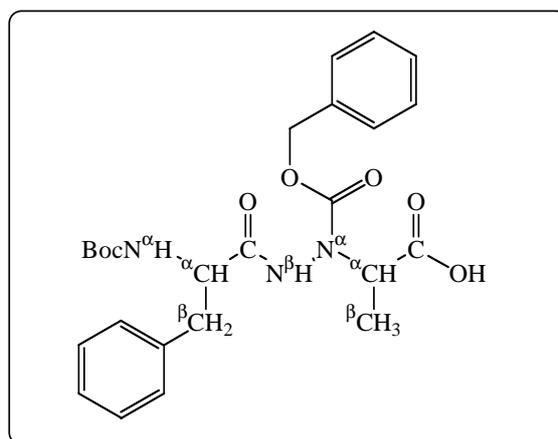
I. Déprotection du groupement Boc et de la fonction acide

Les réactions de déprotection du groupement Boc et de la fonction acide sont réalisées selon les protocoles décrits dans le chapitre I page 154 et 156.

II. Couplage HOBt / DCC / DIEA

Les différents couplages sont réalisés suivant le protocole décrit dans le paragraphe précédent page 174.

Boc-Phe-h(Z)Ala-OH :

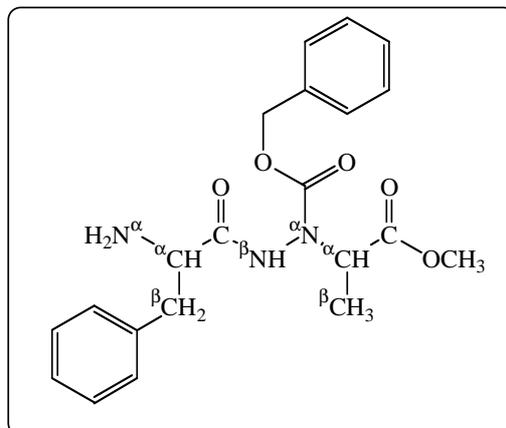


Formule brute: C₂₅H₃₁N₃O₇; **M** = 485 g.mol⁻¹; Huile.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 9,61-8,15 (m, 2H, βNH et COOH), 7,73-6,96 (m, 10H, H arom), 5,40-4,29 (m, 4H, CH₂ Z, αCH hAla et αNH), 4,00-3,61 (m, 1H, αCH Phe), 3,49-2,67 (βCH₂ Phe) et 1,53-1,04 (m, 12H, Boc et βCH₃).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ(ppm) 176,4 (COOH), 156,7 (COOCH₂Ph), 155,7 (COOtBu), 137,5, 136,9 (C arom), 129,9, 129,2, 129,1, 128,3, 127,8, 127,5, 127,4 (CH arom), 81,7 (C Boc), 69,1 (CH₂ Z), 55,4 (αCH hAla), 54,1 (αCH Phe), 37,9 (βCH₂ Phe), 28,8 (CH₃ Boc) et 14,8 (βCH₃).

H-Phe-h(Z)Ala-OMe

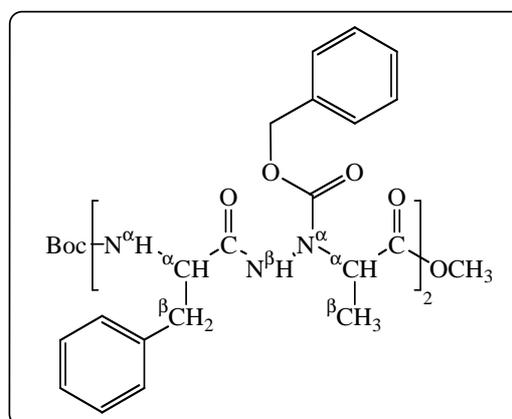


Formule brute: $C_{21}H_{25}N_3O_5$; $M = 399 \text{ g.mol}^{-1}$; Huile.

RMN 1H (300 MHz) (solvant: $CDCl_3$) : δ (ppm) 9,21-8,17 (m, 1H, β NH), 7,70-6,90 (m, 10H, H arom), 5,40-4,74 (m, 3H, CH_2 Z, α CH hAla), 3,95-3,46 (m, 4H, O- CH_3 et α CH Phe), 3,40-2,30 (β CH_2 Phe), 2,28-1,71 (m, 2H, NH_2) et 1,61-1,10 (m, 3H, β CH_3).

RMN ^{13}C (solvant: $CDCl_3$) : δ (ppm) 173,8 ($\underline{C}OOCH_3$), 156,7 ($\underline{C}OOCH_2Ph$), 155,2 ($\underline{C}OOtBu$), 137,3, 136,5 (C arom), 129,9, 129,2, 129,1, 128,6, 127,9, 127,8, 127,5, 127,4 (CH arom), 69,2 (CH_2 Z), 57,9 (α CH hAla), 56,6 (α CH Phe), 53,5 (O- $\underline{C}H_3$), 37,7, 36,9 (β CH_2 Phe) et 14,9 (β CH_3).

Boc-(Phe-h(Z)Ala) $_2$ -OMe



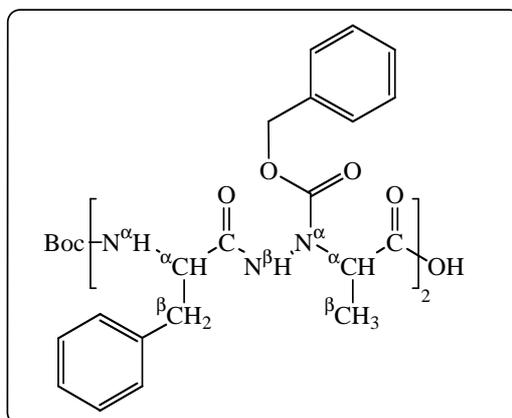
Formule brute: $C_{46}H_{54}N_6O_{11}$; $M = 867 \text{ g.mol}^{-1}$, Huile.

RMN ^1H (300 MHz) (solvant : CDCl_3) : δ (ppm) 8,78-8,21 (m, 2H, BNH), 7,52-7,02 (m, 20H, H arom), 5,26-4,32 (m, 10H, 2CH_2 Z, $2\alpha\text{CH}$ hAla, 2NH et $2\alpha\text{CH}$ Phe), 3,79-3,53 (m, 3H, O- CH_3) 3,47-2,65 (m, 4H, $2\beta\text{CH}_2$ Phe) et 1,55-1,09 (m, 15H, Boc et $2\beta\text{CH}_3$).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : δ (ppm) 171,8 (COOCH_3), 156,5 (COOCH_2Ph), 155,1 (COOtBu), 137,3, 136,5 (C arom), 129,9, 129,2, 129,1, 128,6, 127,9, 127,8, 127,5, 127,4 (CH arom), 82,1 (C Boc), 69,4 (CH_2 Z), 57,6, 56,6 (αCH hAla), 55,3, 54,2 (αCH Phe), 53,2 (O- CH_3), 37,7, 36,9 (βCH_2 Phe), 28,8 (CH_3 Boc) et 14,9 (βCH_3).

SMHR: calculé pour $\text{C}_{46}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_{11}$ [$\text{M} + \text{Na}^+$] m/z 889,9, trouvée 889,7.

Boc-(Phe-h(Z)Ala) $_2$ -OH :

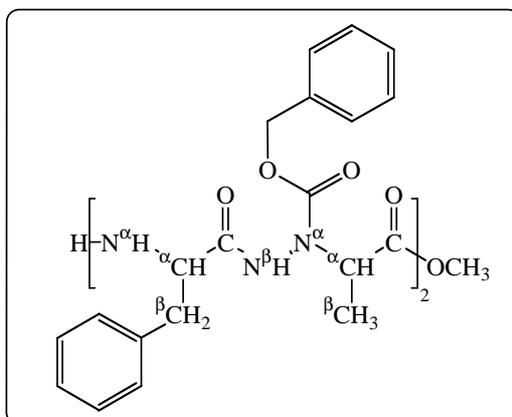


Formule brute: $\text{C}_{45}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}_{11}$; $\text{M} = 853 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Huile.

RMN ^1H (300 MHz) (solvant : CDCl_3) : δ (ppm) 11,14-10,04 (m, 1H, COOH), 8,78-8,75 (m, 1H, BNH), 8,07-6,92 (m, 20H, H arom), 5,63-4,19 (m, 10H, 2CH_2 Z, $2\alpha\text{CH}$ hydrazino, 2NH et $2\alpha\text{CH}$ Phe), 3,48-2,56 (m, 4H, $2\beta\text{CH}_2$ Phe), 2,28-1,66 (m, 2H, NH_2) et 1,40-1,17 (m, 15H, Boc et $2\beta\text{CH}_3$).

RMN ^{13}C (solvant : CDCl_3) : δ (ppm) 176,5, 175,5 (COOH), 158,2, 156,7, 157,1, 155,6 (COOCH_2Ph), 137,5, 136,9, 136,8, 136,7, 136,3 (C arom), 129,9, 129,5, 129,3, 129,1, 128,3, 127,5 (CH arom), 81,8 (C Boc), 69,1 (CH_2 Z), 57,0, 56,9 (αCH hydrazino), 55,5, 55,3 (αCH Phe), 38,9, 37,9 (βCH_2 Phe), 28,8 (CH_3 Boc) et 14,8, 14,4 (βCH_3).

H-(Phe-h(Z)Ala)₂-OCH₃ :

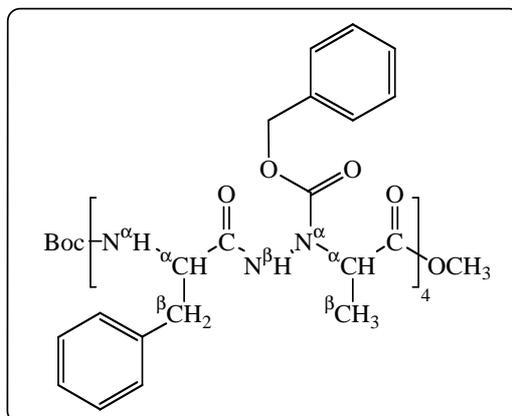


Formule brute: C₄₅H₅₂N₆O₁₁; **M** = 767 g.mol⁻¹, Huile.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 9,69-8,15 (m, 2H, 2 β NH), 7,54-6,90 (m, 20H, H arom), 5,41-4,25 (m, 8H, 2CH₂ Z, 2 α CH hAla, 2NH), 4,20-3,44 (m, 5H, O-CH₃, 2 α CH Phe), 3,42-2,38 (m, 4H, 2 β CH₂ Phe), 2,26-1,84 (m, 2H, NH₂) et 1,39-1,20 (m, 9H, 2 β CH₃).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 175,5, 174,4, 173,0, 172,9, 172,6, 171,8 (CONH) 171,3 (COOCH₃), 156,2, 155,9 (COOCH₂Ph) 137,6, 137,5, 136,2, 136,0 (C arom), 129,9, 129,4, 129,1, 129,0, 128,8, 128,5, 128,2, 127,6, 127,2 (CH arom), 69,2, 69,0, 68,8 (CH₂ Z), 58,4, 57,5, 57,0, 56,7 (α CH hAla), 56,1, 55,6, 55,4, 54,8 (α CH Phe), 52,9 (O-CH₃), 37,8, 37,3, 37,2, 36,7 (β CH₂ Phe)et 14,9 (β CH₃).

Boc-(Phe-h(Z)Ala)₄-OCH₃:



Formule brute: C₈₆H₉₆N₁₂O₁₉; **M** = 767 g.mol⁻¹, Huile.

RMN ¹H (300 MHz) (solvant: CDCl₃) : δ (ppm) 10,33-8,11 (m, 1H, 8NH), 7,54-6,79 (m, 40H, H arom), 5,51-3,96 (m, 16H, 4CH₂ Z, 4 α CH hAla et 4 α CH Phe), 3,85-2,46 (m, 11H, O-CH₃ et 4 β CH₂ Phe) et 1,41-1,13 (m, 30H, Boc et 4 β CH₃).

RMN ¹³C (solvant : CDCl₃) : δ (ppm) 174,0, 173,0, 172,8, 172,7, 172,6, 172,0, 171,8, 171,7 (COOCH₃ et CONH), 156,5, 156,0, 155,7 (COOCH₂Ph), 137,2, 136,2 (C arom), 129,8, 129,6, 129,1, 128,3, 128,0, 127,4, 127,0 (CH arom), 81,7 (C Boc), 69,0 (CH₂ Z), 57,7, 57,6, 55,9, 55,6, 55,5, 55,3, 55,2 (α CH hAla et α CH Phe), 53,1 (O-CH₃), 38,1, 37,8, 37,6, 37,4, 37,2 (β CH₂ Phe), 28,8 (CH₃ Boc) et 14,8, 14,7 (β CH₃).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Fauchère, J. L.; Thurieau, C. *Adv. Drug Res.* **1992**, *23*, 128-159.
- (2) Fauchère, J. L. *Adv. Drug Res.* **1986**, *15*, 29-69.
- (3) Dutta, A. S. *Adv. Drug Res.* **1991**, *21*, 145-286.
- (4) Hruby, V. J.; Al-Obeidi, F.; Kazamierski, W. *Biochem. J.* **1990**, *268*, 249-262.
- (5) Gante, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1994**, *33*, 1699-1720.
- (6) Kolsterman, H. J.; Lamoureux, G. L.; Parsons, J. L. *Biochemistry* **1967**, *6*, 170-177.
- (7) Parsons, J. L.; Klosterman, H. J.; Ninnemann, J. L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1967**, 415-421.
- (8) Kondo, S.; Shibakara, S.; Takahashi, S.; Maeda, K.; Umezawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *97*, 6305-6306.
- (9) Hamada, M.; Takeuchi, T.; Kondo, S.; Ikeda, Y.; Naganawa, H.; Maeda, K.; Okami, Y.; Umezawa, H. *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 170.
- (10) Oehme, P.; Niedrich, H.; Jung, F.; Rudel, M. *Acta Biol. Med. Germ.* **1969**, *22*, 345-358.
- (11) Oehme, P.; Glaesmer, R.; Kalasu, W.; Heine, U. *Acta Biol. Med. Germ.* **1970**, *24*, 141-153.
- (12) Oehme, P.; Rex, H.; Wergin, A.; Jung, F. *Acta Biol. Med. Germ.* **1968**, *21*, 635-647.
- (13) Oehme, P.; Schwartz, C.; Jung, F. *Acta Biol. Med. Germ.* **1969**, *22*, 359-367.
- (14) Oehme, P.; Hartmann, R.; Friedrich, U.; Schwartz, C. *Acta Biol. Med. Germ.* **1969**, *23*, 189-201.
- (15) Oehme, P.; Friedrich, U.; Göresse, E. *Acta Biol. Med. Germ.* **1970**, *25*, 307-313.

- (16) Oehme, P.; Bergmann, J.; Niedrich, H.; Jung, F.; Menzel, G. *Acta Biol. Med. Germ.* **1970**, *25*, 613-625.
- (17) Oehme, P.; Bergmann, J.; Falk, M.; Reich, J. G.; Vogt, W. E.; Niedrich, H.; Pirrwitz, J.; Bersek, C.; Jung, F. *Acta Biol. Med. Germ.* **1972**, *28*, 109-120.
- (18) Grupe, R.; Niedrich, H. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 3283-3288.
- (19) Grupe, R.; Baeck, B.; Niedrich, H. *J. Prakt. Chem.* **1970**, *314*, 751-758.
- (20) Niedrich, H.; Köller, G. *J. Prakt. Chem.* **1974**, *316*, 729-740.
- (21) Traube, W.; Longinescu, G. G. *Chem. Ber.* **1896**, *29*, 670-675.
- (22) Darapsky, A. *J. Prakt. Chem.* **1936**, *296*, 268-306.
- (23) Sletzinger, M.; Firestone, R. A.; Reinhold, D. F.; Rooney, C. S.; Nicholson, W. H. *J. Med. Chem.* **1968**, *11*, 261-263.
- (24) Carmi, A.; Pollak, G.; Yellin, H. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 44-46.
- (25) Hoffman, R. V.; Kim, H.-O. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2953-2956.
- (26) Weber, I.; Potier, P.; Thierry, J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7083-7086.
- (27) Burk, M. J.; Martinez, J. P.; Feaster, J. E.; Cosford, N. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4399-4428.
- (28) Gennari, C.; Colombo, L.; Bertolini, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6394-6395.
- (29) Evans, D. A.; Britton, T. C.; Dorow, R. L.; Dellaria, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6395-6397.
- (30) Trimble, L. A.; Vederas, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6397-6399.
- (31) Oppolzer, W.; Moretti, R. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 5541-5552.
- (32) Evans, D. A.; Britton, T. C.; Dorow, R. L.; Dellaria Jr., J. F. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 5525-5540.
- (33) Shestakov, P. *J. Soc. Phys. Chim. Russia* **1903**, *35*, 850-858.

- (34) Gustafsson, H.; Ragnarsson, U. *Acta Pharma. Suecica* **1974**, *11*, 493-494.
- (35) Gustafsson, H. *Acta Pharma. Suecica* **1979**, *11*, 493-494.
- (36) Karady, S.; Ly, M. G.; Pines, S. H.; Sletzing, M. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 1949-1951.
- (37) Viret, J.; Gabard, J.; Collet, A. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 891-894.
- (38) Klosterman, H. J.; Lamoureux, G. L.; Parsons, J. L. *Biochemistry* **1976**, *6*, 170-177.
- (39) Achiwa, K.; Yamada, S.-I. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 2701-2704.
- (40) Schmitz, E.; Andreae, S.; Schramm, S.; Albert, F. M.; Lohamm, D. *German (East) Patent DD 230865*, (1985) *Chem. Abstr.* **1985**, *105*, 227301j.
- (41) Schimtz, E.; Andreae, S.; Schramm, S.; Albert, F. M.; Lohamm, D. *German (East) Patent DD 240818*, (1986); *Chem. Abstr.Ger.* **1987**, 198926a.
- (42) Andreae, S.; Schmitz, E. *Synthesis* **1991**, 327-341.
- (43) Hannachi, J.-C.; Vidal, J.; Mulatier, J.-C.; Collet, A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2367-2373.
- (44) Di Grandi, M. J.; Tilley, J. W. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4327-4330.
- (45) Pinto, M.-F., Université Henri Poincaré-Nancy 1, 2002.
- (46) Blaskovich, M. A.; Lajoie, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5021-5030.
- (47) Brüchner, H.; Westhauser, T.; Godel, H. J. *Chromatogr. A* **1995**, *711*, 201-215.
- (48) Brosse, N.; Pinto, M.-F.; Bodiguel, J.; Jamart-Grégoire, B. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2869-2873.
- (49) Kolasa, T.; Miller, M. J. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4978-4984.
- (50) Seffler, A. M.; Kozlowski, M. C.; Guo, T.; Bartlett, P. A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 93-102.
- (51) Brosse, N.; Grandeury, A.; Jamart-Gregoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2009-2011.
- (52) Stafford, Jeffrey A.; Brackeen, M. F.; Karanewsky, D. S.; Valvano, N. L. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7873-7876.

- (53) Ye, B.; Akamatsu, M.; Shoelson, S. E.; Wolf, G.; Giorgetti-Peraldi, S.; Yan, X.; Roller, P. P.; Burke Jr., T. R. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4270-4275.
- (54) Wu, Y.; Xu, J.-C. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8107-8113.
- (55) Bodansky, M.; Bodansky, A. *The practice of peptide synthesis*; Heidelberg: Berlin, **1984**.
- (56) Palomo, J. M.; Mateo, C.; Fernandez-Lorente, G.; Solares, L. F.; Diaz, M.; Sanchez, V. M.; Bayod, M.; Gotor, V.; Guisan, J. M.; R, F.-L. *Tetrahedron asymmetry* **2003**, *14*, 429-438.
- (57) Palomo, J. M.; Mateo, C.; Fernandez-Lorente, G.; Solares, L. F.; Diaz, M.; Sanchez, V. M.; Bayed, M.; Gotor, V.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Tetrahedron* **2003**.
- (58) Pousset, C.; Callens, R.; Haddad, M.; Larchevêque, M. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, *15*, 3407-3412.
- (59) Salazar, L.; Sih, C. J. *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 2917-2920.
- (60) Schlosser, M.; Michel, D. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8257-8262.
- (61) Adamson, J. G.; Blaskovich, M. A.; Groenevelt, H.; Lajoie, G. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3447-3449.
- (62) Zvilichovsky, G.; Gurvich, V. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4457-4468.
- (63) Pascal, R.; Sola, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5031-5034.
- (64) Aronov, A. M.; Gelb, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4947-4950.
- (65) Bauer, J.; Rademann, J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5019-5023.
- (66) Kuisle, O.; Quinoa, E.; Riguera, R. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8063-8075.
- (67) Bouillon, I.; Brosse, N.; Vanderesse, R.; Jamart-Gregoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3569-3572.
- (68) Curtius, T. *Chem. Ber.* **1902**, *35*, 3226.
- (69) Vaughan, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 3547.

- (70) Stavropoulos, G.; Karagiannis, K.; Anagnostides, S.; Ministrouski, I.; Selinger, Z.; Chorev, M. *Int. J. Protein Res.* **1995**, *45*, 508-513.
- (71) Zaoral, M. *Coll. Czech. Chem. Comm.* **1959**, 1314.
- (72) Oya, M.; Takahashi, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, *54*, 439-441.
- (73) Oya, M.; Neigishi, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, 439-441.
- (74) Denkewalter, R. G.; Schwam, H.; Strachan, R. G.; Beesley, T. E.; Veber, D. F.; Schoenewaldt, E. F.; Barkemeyer, H.; Paleveda, W. J.; Jacob, T. A.; Hirschmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3163-3164.
- (75) Fehrentz, J. A.; Pothion, C.; Califano, J. C.; Loffet, A.; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9031-9034.
- (76) Fehrentz, J. A.; Genu-Dellac, C.; Amblard, M.; Winternitz, F.; Loffet, A.; Martinez, J. *J. of Peptide Science* **1995**, *1*, 124-131.
- (77) Paris, M.; Fehrentz, J. A.; Heitz, A.; Loffet, A.; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8489-8492.
- (78) Fuller, W. D.; Cohen, M. P.; Shabankareh, M.; Blair, R. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 7415.
- (79) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- (80) Kimura, T.; Takai, M.; Masui, Y.; Morikawa, T.; Sakakibara, S. *Biopolymers* **1981**, *20*, 1823-1832.
- (81) DeTar, D. F.; Silverstein, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1013-1019.
- (82) DeTar, D. F.; Silverstein, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1020-1023.
- (83) Sheehan, J. C.; Goodman, M.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 1367-1369.
- (84) König, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- (85) Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3039.

- (86) Bodansky, M.; Du Vigneaud, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 6072-6075.
- (87) Kovacs, J.; Kisfaludy, L.; Ceprini, M. Q.; Johnson, R. H. *Tetrahedron* **1969**, *25*, 2555-2573.
- (88) Castro, B.; Dormoy, J.-R. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1973**, *12*, 3359-3361.
- (89) Castro, B.; Dormoy, J.-R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *14*, 1219-1222.
- (90) Castro, B.; Dormoy, J.-R.; Evin, G.; Selve, C. *J. Chem. Res. (S)* **1977**, 182.
- (91) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- (92) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- (93) Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- (94) Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Sadat-Aalae, D.; Tien, J. H.; Langridge, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3732-3734.
- (95) Beyermann, M.; Bienert, M.; Niedrich, H.; Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 721-728.
- (96) Bertho, J. N.; Loffet, A.; Pinel, C.; Reuther, F.; Sennyey, G. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1303-1306.
- (97) Carpino, L. A.; Mansour, E.-S. M. E.; Sadat-Aalsee, D. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2611-2614.
- (98) Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Chao, H. G.; DeSelms, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9651-9652.
- (99) Carpino, L. A.; El-Faham, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5401-5402.
- (100) Merrieffield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- (101) Yajima, H.; Fujii, N.; Ogawa, H.; Kawatani, H. *J. C. S. Chem. Com.* **1974**, 107-108.

- (102) Yajima, H.; Fujii, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5867-5871.
- (103) Tam, J. P.; Heath, W. F.; Merrieffield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5242-5251.
- (104) Noyori, R.; Murata, S.; Suzuki, M. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 3899-3910.
- (105) Ono, S.; Kiyama, S.; Futaki, S.; Nakamura, T.; Taike, T.; Akita, T.; Sumi, S.; Inoue, K.; Fujimura, M.; Tobe, T.; Yajima, H. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *33*, 29-38.
- (106) Pennington, M. W. *Methods in Molecular Biology* **1994**, *35*, 41-62.
- (107) Kaiser, E.; Colecott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Analytical Biochemistry* **1970**, *34*, 595-598.
- (108) Hancock, W. S.; Battersby, J. E. *Analytical Biochemistry* **1976**, *71*, 260-264.
- (109) Christensen, T. *Peptides Structure and Biological Function*; Pierce Chemical Co: Rockford, 1979.
- (110) Lippens, G.; Bourdonneau, M.; Dhalluin, C.; Warras, R.; Richert, T.; Seetharaman, C.; Boutillon, C.; Piotto, M. *Current Organic Chemistry*, **1999**, *3*, 147-169.
- (111) Rousselot-Pailley, P., Université de Lille 2, 2002.
- (112) Dubar, C., Université de Lyon I, 1992.
- (113) Viret, J., Paris 6, 1988.
- (114) Lecoq, A.; Marraud, M. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *24*, 2765-2768.
- (115) Lecoq, A., Institut National Polytechnique de Lorraine, 1991.
- (116) Niedrich, H. *Chem. Ber.* **1965**, *98*, 3451.
- (117) Grupe, R.; Niedrich, H. *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 3914.
- (118) Niedrich, H.; Knobloch, W. *J. Prakt. Chem.* **1962**, *17*.
- (119) Knobloch, W.; Niedrich, H. *J. Prakt. Chem.* **1962**, *17*, 273.
- (120) Niedrich, H. *Chem. Ber.* **1963**, *96*, 2774.

- (121) Niedrich, H. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 3273-3282.
- (122) Niedrich, H. *Chem. Ber.* **1969**, *102*, 1557-1569.
- (123) Guy, L.; Vidal, J.; Collet, A. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4833-4843.
- (124) Lelais, G.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta.* **2003**, *86*, 4152-4168.
- (125) Meiboom, S.; Gill, D. *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, *29*, 688-691.
- (126) Carr, H. Y.; Purcell, E. M. *Phys. Rev.* **1954**, *94*, 630-654.
- (127) Aubry, A.; Bayeul, D.; Mangeot, J.-P.; Vidal, J.; Stérin, S.; Collet, A.; Lecoq, A.; Marraud, M. *Biopolymers* **1991**, *31*, 793-801.
- (128) Zhang, L.; Goldammer, C.; Henkel, B.; Zühl, F.; Panhaus, G.; Jungs, G.; Bayer, E. In *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis*; Epton, R., Ed. Mayflower: Birmingham, 1994, p 711-716.
- (129) Mcnamara, J. F.; Lombardo, H.; Pillai, S. K.; Jensen, I.; Albericio, F.; Kates, S. A. *J. of Peptide Science* **2000**, *6*, 512-518.
- (130) Boussard, G.; Marraud, M.; Aubry, A. *Biopolymers* **1979**, *18*, 1297-1331.
- (131) Boussard, G.; Cung, M. T.; Marraud, M.; Néel, J. *J. Chem. Phys.* **1974**, *71*, 1159-1166.
- (132) Milner-White, E. J. *J. Mol. Biol.* **1990**, *115*, 385-397.
- (133) Némethy, G.; Scheraga, H. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 320-327.
- (134) Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 2207-2216.
- (135) Prince, R. B.; Brunsveld, L.; Meyer, E. W.; Moore, J. S. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **2000**, *39*, 228-230.
- (136) Prince, R. B.; Barnes, S. A.; Moore, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2758-2762.
- (137) Schmitt, M. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6848-6849.
- (138) Tanatani, A.; Mio, M. J.; Moore, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1792-1793.

- (139) Tanatani, A.; Hugues, T. S.; Moore, J. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 325-328.
- (140) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071-13072.
- (141) Stigers, K. D.; Sothn, M. J.; Nowick, J. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 714-723.
- (142) Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893-4011.
- (143) Cubberley, M. S.; Iverson, B. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 650-653.
- (144) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. F.; Powell, D. R.; Huang, X.; Barchi, J. J.; Gellman, S. H. *Nature* **1997**, *387*, 381-384.
- (145) Krauthäuser, S.; Christianson, L. A.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11719-11720.
- (146) Chung, Y. J.; Christianson, L. A.; Stanger, H. E.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10555-10556.
- (147) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6206-6212.
- (148) Appella, D. H.; Barchi, J. J.; Durell, S.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2309-2310.
- (149) Seebach, D.; Kimmerlin, T.; Sebesta, R.; Campo, M. A.; Beck, A. K. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7455-7506.
- (150) Viret, J.; Collet, A.; Pichon-Pesme, V.; Aubry, A. *New J. Chem.* **1988**, *12*, 253-256.
- (151) Günther, R.; Hofmann, H.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 247-255.
- (152) Salaün, A.; Potel, M.; Roisnel, T.; Gall, P.; Le Grel, P. *J. Org. Chem. Note* **2005**, *70*, 6499-6502.
- (153) Schmitt, M. A.; Choi, S. H.; Guzei, L. A.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13130-13131.

- (154) Hayen, A.; Schmitt, M. A.; Ngassa, F. N.; Thomasson, K. A.; Gellman, S. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 505-510.
- (155) Bax, A.; Freeman, R. *J. Magn. Reson.* **1981**, *44*, 542-561.
- (156) Bax, A.; Freeman, R.; Morris, G. *J. Magn. Reson.* **1981**, *42*, 164-168.
- (157) Günther, R. *La spectroscopie de RMN*; Masson: Paris, 1994.
- (158) Bothner-By, A. A.; Stephens, R. L.; Lee, J.; Warren, C. O.; Jeanloz, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *109*, 607-609.
- (159) Kessler, H.; Bermel, A.; Mueller, A.; Pock, K. H. In *The peptides*; Udenfriend, S., & Meienhofer, J., Eds.; . Orlando, USA, 1985; Vol. 7, p 437-473.
- (160) Seebach, D.; Overhand, M.; Kühnle, F. N. M.; Martinoni, B.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 3219.
- (161) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. F.; Richards, M. R.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7574-7581.
- (162) Rosini, G.; Ballini, R. *Synthesis* **1989**, *11*, 832-835.

SYNTHESE D' α -HYDRAZINOPEPTIDES

Résumé : Ce travail concerne l'élaboration de nouvelles voies de synthèse d' α -hydrazinopeptides en solution et sur phase solide. Dans un premier temps nous avons mis au point une nouvelle voie d'accès à une série d' α -hydrazinoacides chiraux orthogonalement protégés impliquant un protocole original mis au point tout d'abord en solution et adapté par la suite sur support solide. Nous avons montré que la réactivité du N ^{β} des α -hydrazinoacides étudiés était nettement moindre de celle d'un N ^{α} d'un acide aminé classique. Nous avons alors défini en solution les meilleures conditions de couplage de nos α -hydrazinoacides, ce qui nous a permis d'obtenir une série de pseudodipeptides. La mise au point de la synthèse d'hydrazinopeptides sur phase solide a été possible grâce à une étude qualitative préalable réalisée par RMN HRMAS et trois stratégies de synthèse ont été proposées. Enfin, dans une étude prospective nous avons montré que les pseudodipeptides, préparés en solution, pouvaient s'oligomériser pour conduire à un nouveau type d'oligomères mixtes : les α /hydrazino-peptides.

SYNTHESIS OF α -HYDRAZINOPEPTIDES

Abstract: We have synthesized α -hydrazinopeptides on liquid and solid phase. We have developed original synthetic protocols for the preparation of chiral α -hydrazinoacids *via* liquid and solid phase synthesis. A systematic study was performed in liquid phase in order to define coupling conditions to incorporate the hydrazinoacids in a peptide chain. We have shown that the reactivity of the N ^{β} seems to be clearly less reactive than that of a classical amino acid and specific conditions had to be defined to form the hydrazide link. By using HRMAS NMR techniques as qualitative monitoring, we were able to develop three strategies for the incorporation of hydrazinoacids on solid phase. Finally, we demonstrated that pseudodipeptides obtained by liquid phase protocol can be oligomerized to give a new kind of oligomers: the α /hydrazino-peptides.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Joëlle PARIS, Professeur, LCT, Faculté de Pharmacie, Lyon

Monsieur Gilles GUICHARD, Chargé de Recherche, ICT, IBMC, Strasbourg

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame BOUILLON Isabelle

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Synthèse d' α -hydrazinopeptides"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Génie des procédés et des produits** »

Fait à Vandoeuvre, le 03 octobre 2006

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX