



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>

Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques
Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire UMR CNRS-INPL 7568
Ecole Doctorale Science et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement

Thèse

présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'INPL

Génie des Procédés et des Produits

par

Emelyne VOSS

Synthèse d'Analogues Bis-azotés de la Proline et Applications

Soutenue publiquement le 12 octobre 2011 devant la commission d'examen :

Membres du jury

Pr. G. KIRSCH (LIMBP, UPV Metz)

Pr. G. GUILLAUMET (ICOA, Université d'Orléans)

Dr. F. CAVELIER (DR-CNRS, IBMM, Universités de Montpellier 1 et 2)

Pr. Dr. Dr. h.c. M. VEITH (INM, Université de Saarbrücken)

Pr. B. JAMART-GREGOIRE (LCPM, INPL Nancy)

Dr. A. ARRAULT (MCF, LCPM, INPL Nancy)

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse

Co-directrice de thèse

A ma famille et Thibaut

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.

Je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Brigitte JAMART-GREGOIRE pour avoir dirigé ma thèse et de m'avoir fait confiance en m'accueillant au sein de son équipe. J'ai grandement apprécié de travailler à ses côtés et je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour tous les conseils qu'elle m'a donnés lors de ces quatre années de thèse.

Je ne saurais assez remercier le Docteur Axelle ARRAULT pour avoir co-dirigé cette thèse : en plus du soutien et de toute l'aide qu'elle m'a apportés, une véritable amitié est née. Je garderai de très bons souvenirs des moments professionnels et extra-professionnels passés ensemble.

Je suis très sensible à l'honneur que m'ont fait le Professeur Gérard GUILLAUMET et le Docteur Florine CAVELIER d'avoir accepté de juger mon travail en la qualité de rapporteurs. Je remercie également le Professeur Gilbert KIRSCH et le Professeur Dr. Dr. h.c. Michael VEITH pour leur participation au jury de cette thèse.

Je remercie tout le personnel du LCPM de l'ENSIC que j'ai pu côtoyer durant quatre ans, et plus particulièrement Mathilde ACHARD, pour sa gentillesse et sa grande disponibilité, Olivier FABRE, pour la spectroscopie RMN, et le Docteur Jacques BODIGUEL, pour sa bonne humeur et ses conseils. Une forte pensée à tous les étudiants et post-doc ayant égayé mon passage au laboratoire : Sébastien, Marc, Cécile (merci pour les SGP), Florent, Ralph (je n'oublierai jamais ton rire !), Maxime (ou Maxetta ?), Zhou Zhou, Pasquale, Baptiste (mille mercis pour ton aide avec la dynamique moléculaire sous

contraintes RMN), et Lucie, qui poursuit ce travail... Je leur souhaite à tous une très bonne continuation !!!

Je ne pourrais terminer ces remerciements sans citer ma famille qui m'a énormément soutenue durant mes études, et plus particulièrement pendant ces quatre ans, et qui a toujours cru en moi. Je n'aurais jamais pu arriver là où j'en suis sans eux. Mes parents, mes grands parents, mon frère, ma petite sœur et Thibaut, mon compagnon : vous êtes mon port et mon ancre. Merci à tous.

Emelyne

29 août 2011 à Nancy

Table des Matières

Liste des Abréviations	4
Introduction générale	8
Chapitre I : Synthèse de la (S)- δ -azaproline.....	17
I Introduction	18
I.1 Régiosélectivité du couplage peptidique sur les hydrazinoesters.....	18
I.2 Régiosélectivité de la réaction de N-protection.....	19
I.3 Cas des hydrazines cycliques	20
II Synthèses de la δ -azaproline préalablement décrites	22
II.1 Synthèses de la δ -azaproline en mélange racémique.....	22
II.2 Synthèses de la δ -azaproline énantiomériquement pure	23
II.2.1 A partir de l'acide malique	23
II.2.2 Par cycloaddition [3+2]	24
II.2.3 Conclusion	25
III Synthèse de la (S)- δ -azaproline à partir de la (R)- α -hydroxy- γ -butyrolactone	25
III.1 Introduction.....	25
III.1.1 La réaction de Mitsunobu appliquée à la synthèse d' α -hydrazinoesters	25
III.1.2 Les méthodes de transprotection du groupement phtalimide	26
III.2 Application des réactions de Mitsunobu et de transprotection à la synthèse de la (S)- δ -azaproline	28
III.2.1 Synthèse de l'hydrazinolactone 4	28
III.2.2 Transprotection en composés mono/bis protégés 5	29
III.2.3 Ouverture de la lactone et estérification	30
III.2.3.1 Ouverture de la lactone 5.....	31
III.2.3.2 Synthèse de l'ester benzylique 3b	31
III.2.3.3 Synthèse de l'ester isopropylique 3d	33
III.2.3.4 Réaction de Mitsunobu intramoléculaire	35
III.3 Conclusion.....	36
Chapitre II : Etude de la réactivité de la δ -aza-proline et synthèse de pseudotripeptides	38
I Introduction	39
II Réactivité de la δ -azaproline	39
II.1 Synthèse de dipeptides de type Phe- δ -azaPro	40
II.1.1 Déprotections sélectives des groupements Boc et Z de la δ -azaproline.....	40
II.1.2 Synthèse des dipeptides Phe- δ -azaPro 10 et 11	40
II.2 Synthèse du dipeptide (S,S)- δ -azaPro-Phe.....	41
II.2.1 Synthèse du dipeptide (S,S)- δ -azaPro-Phe à partir du mélange racémique de la δ -azaproline	41
II.2.2 Synthèse du dipeptide (S,S)-13 à partir de la (S)- δ -azaproline.....	42
II.2.3 Synthèse du dipeptide (S,S)-13 par ouverture de la lactone (S)-5b.....	43
II.2.3.1 Ouverture de la lactone 5b par la phénylalanine.....	43
II.2.3.2 Réaction de Mitsunobu intramoléculaire	44
II.2.3.3 Conclusion	45
II.3 Conclusion.....	45
III Synthèse des pseudotripeptides P ₁ -AA ₁ - δ -azaPro-AA ₃ -P ₃	45
III.1 Introduction : choix des pseudotripeptides à synthétiser.....	45
III.2 Synthèse des pseudotripeptides.....	47

III.2.1	Déprotection de l'extrémité N ^δ _{term} des dipeptides Z-δ-azaPro-AA ₃ -OMe	47
III.2.2	Couplage peptidique entre les dipeptides déprotégés 17/18 et Z-AA ₁ -OH.....	48
III.2.3	Réaction parasite	51
III.2.4	Synthèse des pseudotriptides Z-AA ₁ -δ-azaPro-AA ₃ -NH ₂	52
III.2.4.1	Formation de la liaison amide en extrémité C _{term} des pseudotriptides	52
III.2.4.2	Déprotection de l'extrémité N ^δ des pseudotriptides.....	53
III.3	Conclusion.....	54
Chapitre III : Synthèse de l'acide pyrazolique, étude de sa réactivité et incorporation dans des pseudopeptides		56
I Introduction		57
I.1	Propriétés biologiques et physicochimiques	57
I.2	Introduction du motif pyrazole dans la structure de pseudopeptides	59
II Etude de la réactivité de l'acide pyrazolique.....		61
II.1	Réactivité de la fonction acide carboxylique.....	61
II.2	Réactivité de la fonction NH du cycle pyrazolique	63
II.2.1	Réactivité de la fonction NH de l'acide pyrazolique 26	63
II.2.2	Protection et déprotection du motif NH à partir des esters 27	64
II.2.3	Conclusion	65
III Synthèse de pseudotriptides P-AA-Pyr-Gly-X		66
III.1	A partir des esters 27.....	66
III.1.1	A partir de l'ester éthylique 27b	66
III.1.2	A partir de l'ester benzylique 27c	68
III.2	A partir de l'acide pyrazolique 26	70
IV Conclusion.....		72
Chapitre IV : Etude structurale des pseudo-tripeptides synthétisés		74
I Introduction		75
II Aspects conformationnels en série peptidique et pseudopeptidique		75
II.1	Liaisons hydrogène intramoléculaires dans les peptides	75
II.1.1	Conventions d'écriture	75
II.1.2	Les coudes ou turns	77
II.1.2.1	Les coudes γ ou C ₇	77
II.1.2.2	Les coudes β ou C ₁₀	78
II.2	Aspects conformationnels en série pseudopeptidique.....	80
II.2.1	Pseudopeptides bis-azotés	80
II.2.1.1	Les hydrazinopeptides.....	80
II.2.1.2	Les N-aminopeptides	82
II.2.1.3	Les azapeptides	84
II.2.2	Pseudopeptides incorporant des analogues de proline	86
II.2.2.1	Les alkyl-prolines	86
II.2.2.2	Analogues de proline dont le cycle intègre un hétéroatome supplémentaire.....	89
II.2.2.3	Conclusion	93
III Méthodes et techniques d'études conformationnelles		93
III.1	Spectroscopie d'absorption Infrarouge (IR).....	93
III.2	Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	94
III.2.1	La RMN à deux dimensions.....	95
III.2.2	Les expériences de RMN à une dimension.....	95
III.3	Dichroïsme circulaire	97
III.4	Diffraction des rayons X.....	97
III.5	Modélisation moléculaire.....	98
III.6	Conclusion.....	98

IV	Etude structurale des pseudotriptides AA₁-δ-azaPro-AA₃	99
<i>IV.1</i>	<i>Matériels et méthodes.....</i>	<i>99</i>
<i>IV.2</i>	<i>Etude conformationnelle de Boc-Phe-Pyr-Gly-OMe (32a)</i>	<i>100</i>
<i>IV.3</i>	<i>Etude conformationnelle des pseudotriptides Z-Ala-(D+L)-δ-azaPro(Boc)-Phe-OMe (19) et Z-Gly-(D+L)-δ-azaPro(Boc)-Gly-OMe (20).....</i>	<i>101</i>
IV.3.1	Par RMN à une dimension	101
IV.3.2	Par spectroscopie IR	103
IV.3.3	Par RMN deux dimensions et modélisation par dynamique moléculaire sous contraintes RMN	107
<i>IV.4</i>	<i>Etude conformationnelle du pseudotriptide Z-Gly-(D+L)-δ-aza-Pro(Boc)-Gly-NH₂ (23).</i>	<i>109</i>
<i>IV.5</i>	<i>Etude conformationnelle du pseudotriptide Z-Gly-(D+L)-δ-aza-Pro-Gly-NH₂ (24) ...</i>	<i>115</i>
<i>IV.6</i>	<i>Conclusion.....</i>	<i>119</i>
	Conclusion générale et perspectives	120
	Experimental Part	123
	Références bibliographiques	169

Liste des Abréviations

[α]_D	pouvoir rotatoire
δ-azaPro	δ -azaproline
1D	une dimension
2D	deux dimensions
3D	trois dimensions
Å	angström
AA	acide aminé
Ala	résidu alanine
Alloc	allyloxycarbonyl
aq.	aqueux
Asp	résidu acide aspartique
Bn	benzyle
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
Boc₂O	dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle
BOP	hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium
Bu	butyle
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDI	carbonyl diimidazole
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
cm	centimètres
COSY	CORrelated SpectroscopY
DBAD	di- <i>tert</i> -butylazodicarboxylate
DBzAD	dibenzylazodicarboxylate
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
DEAD	diéthylazodicarboxylate
deg	degrés
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropyléthylamine
dm	décimètres
DMAP	4,4-diméthylaminopyridine

DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
EDC	1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide
eq.	équivalents
ESI	eElectroSpray Ionization
Et	éthyle
EtOAc	acétate d'éthyle
FKBP	FK506-binding proteins
Fmoc	9-fluorénylméthyloxycarbonyl
FmocCl	chloroformiate de fluorénylméthyloxycarbonyl
fs	femtosecondes
g	grammes
HATU	fluorophosphate de <i>O</i> -(1H-azatriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetra-méthyluronium
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMPT	hexaméthylphosphorotriamide
HNp	<i>para</i> -nitrophénol
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
HOPfp	pentafluorophénol
HOSu	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
iPr	<i>isopropyle</i>
IR	infrarouge
K	Kelvin
kcal	kilocalories
Leu	résidu leucine
Me	méthyle
MHz	mégaHertz
MIP	Macrophage Infectivity Potentiator
mL	millilitres
mM	millimolaires
mp	melting point

ms	millisecondes
MW	micro-waves
v	nombre d'onde
NaEH	2-éthylhexanoate de sodium
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PE	éther de pétrole
pH	potentiel hydrogène
Ph	phényle
Phe	résidu phénylalanine
Pht	phtalimide
Piv	pivaloyle
PPIases	Peptidyl Proline Isomérases
ppm	parties par million
Pro	résidu proline
ps	picosecondes
PyBOP	hexafluorophosphate de benzotriazolyl-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium
Pyr	pyrazole
Rf	rapport frontal
RMN ou NMR	Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
s	secondes
Ser	sérine
Suc	succinyle
TA	température ambiante
TBTU	tetrafluoroborate de <i>O</i> -(1H-benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N'</i> -tetraméthyluronium
<i>t</i>Bu	<i>tert</i> -butyle
Tf₂O	anhydride trifluorométhanesulfonique
TFA	acide trifluoroacétique
TFFH	hexafluorophosphate de <i>N,N,N'',N''</i> -tétraméthyl-formamidinium
THF	tétrahydrofurane
Thr	thréonine
TMS	tétraméthylsilane

TOCSY	TOTally Correlated SpectroscopY
Ts	tosyle
UV	ultraviolet
Val	résidu valine
Z	benzyloxycarbonyl
Z₂O	dicarbonate de dibenzyle
ZCl	chloroformiate de benzyloxycarbonyl

N. B. Les molécules décrites dans la littérature sont annotées de lettres et les molécules synthétisées au cours de ces travaux sont annotées de chiffres.

Introduction générale

La proline est un acide aminé un peu particulier : son atome d'azote impliqué dans un cycle engendre des répercussions sur la structure du peptide qui l'héberge. En effet, dans les peptides naturels la liaison peptidique est d'ordinaire plane, de part son caractère partiel de double liaison. Celle-ci peut alors adopter une conformation *cis* ou une conformation *trans*, la position des deux carbones α , par rapport au lien amide unissant les deux aminoacides, détermine la nature *cis* ou *trans* de la liaison. La conformation *trans* est toutefois majoritaire, pour tous les acides aminés naturels, par rapport à la conformation *cis*, dans laquelle une gêne stérique entre les chaînes latérales des deux aminoacides est observée (Schéma 1).

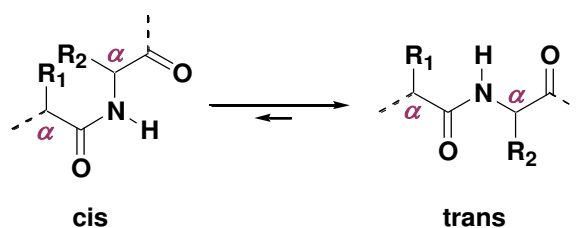


Schéma 1 : Isomérisation *cis/trans* du lien AA₁-AA₂

La situation est un peu différente en avant de la proline (AA-Pro). La barrière thermodynamique qui s'oppose à la rotation de la liaison amide est plus faible et la tendance de la liaison à rester plane est un peu moins grande. Lorsque la liaison amide est de conformation *cis*, il en résulte un coude prononcé dans la chaîne principale à son niveau (Schéma 2).¹

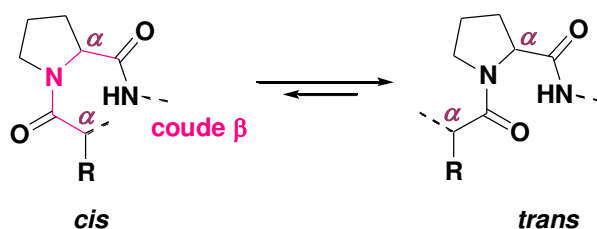


Schéma 2 : Isomérisation *cis/trans* du lien AA-Pro

Une chaîne polypeptidique en cours d'assemblage a alors une probabilité élevée de placer en conformation *cis* des liaisons AA-Pro qui sont retrouvées en *trans* dans la structure définitive de la protéine. L'isomérisation *cis* vers *trans* de certaines liaisons AA-Pro apparaît donc comme une opération nécessaire au cours du repliement de la chaîne. Ce phénomène freine la mise en plis définitive de la protéine, car l'isomérisation spontanée est relativement lente. La nature a donc sélectionné des enzymes, les peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérases (PPIases), pour catalyser la conversion du lien peptidique précédent une proline d'une conformation *cis* à une conformation *trans*.

¹ Pelmont, J. *Enzymes : Catalyseurs du monde vivant*; Edition Presses universitaires de Grenoble ed., 1995.

Les PPIases

La première activité peptidyl-prolyl isomérase fut mise en évidence en 1984 par l'équipe de Fisher.² A ce jour, deux principales familles de PPIases ont été répertoriées : les cyclophilines et les FK506-binding proteins (FKBP).

Les cyclophilines tirent leur nom de l'affinité que possède la cyclophiline A (enzymes modèles de cette famille) pour la cyclosporine A (Figure 1), un polypeptide cyclique immunosuppresseur, isolé à partir du champignon *Talyplocadium inflatum gams*.³ Elle a été trouvée dans le périplasma de plusieurs cellules procaryotes et eucaryotes. Quand elle est liée à la cyclosporine A, le complexe formé permet d'inhiber la calcineurine, une phosphatase impliquée dans la transduction du signal qui mène à la production d'interleukine-2, stimulatrice de la prolifération des lymphocytes T. L'action immunosuppressive du complexe cyclophiline-cyclosporine a pu être utilisée dans la prévention du rejet de greffes. Malheureusement, le traitement par la cyclosporine A est associé à un risque non négligeable de complications et d'interactions médicamenteuses. Les effets indésirables les plus documentés de la cyclosporine A concernent la néphrotoxicité et les maladies opportunistes qui résultent de l'immunosuppression (infections et plus rarement cancers).

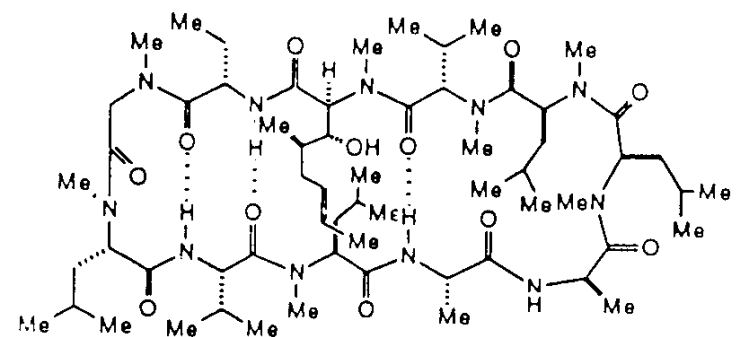


Figure 1 : La cyclosporine A

Les PPIases possédant une affinité pour le FK506 (Figure 2), un autre immunosuppresseur, font partie de la deuxième famille, les *FK506-binding proteins* (FKBP). Les différents membres de cette famille sont reconnaissables à leur localisation subcellulaire chez les procaryotes et les eucaryotes. Ainsi, les FKBP-12 se situent essentiellement dans le cytoplasme, les FKBP-13, dans la lumière du réticulum endoplasmique et le FKBP-25, dans le noyau cellulaire. Les FKBP liés au FK506 inhibent également la calcineurine, protéine phosphatase

² Fischer, G.; Bang, H.; Mech, C. *Biomed. Biochim. Acta* **1984**, 43, 1101-1112.

³ Handschumacher, R. E.; Harding, M. W.; Rice, J.; Drugge, R. J.; Speicher, D. W. *Science* **1984**, 226, 544-546.

stimulant la croissance et la différenciation des lymphocytes T.⁴ Cette action permet leur utilisation dans le traitement des rejets de greffes et des désordres auto-immuns. La toxicité du FK506 est toutefois similaire à celle de la cyclosporine.

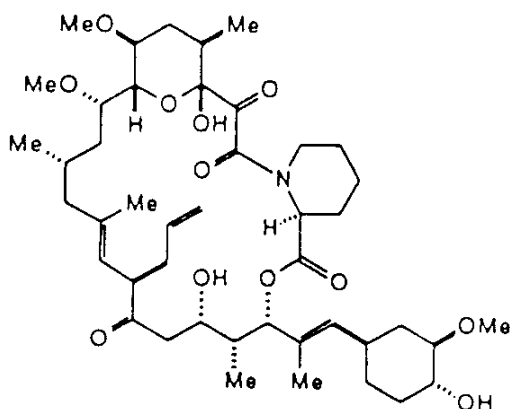


Figure 2 : Le FK506

Des PPIases présentant des similitudes avec les FKBP-25, appelées *FKBP-25-like proteins* ou MIP-proteins (Macrophage Infectivity Potentiator), ont été retrouvées dans plusieurs microorganismes. Elles interviennent dans le facteur de virulence des bactéries à Gram négatif, telles la *Legionella pneumophila*, cause de sévères pneumonies (maladie du Légionnaire), lorsqu'elles se multiplient dans les macrophages alvéolaires.⁵ Des Mips similaires ou des gènes codants ont également été identifiés chez *Chlamydia trachomatis* et chez *Trypanosoma cruzi*, un parasite, agent pathogène de la maladie de Chaga.⁶ Cette maladie touche environ 18 millions de personnes en Amériques du Sud et Centrale. Bien que les PPIases de la famille des FKBP soient inhibées par le FK506 ou la rapamycine (Figure 3), ces immunosuppresseurs ne sont que partiellement efficaces et cette maladie reste donc, à ce jour, incurable.

⁴ Crabtree, G. R. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 2313-2316.

⁵ Rahfel, J.-U.; Rücknagel, K. P.; Stollert, G.; Hornes, S. M.; Schierhorn, A.; Young, K. D.; Fischer, G. *J. Bio. Chem.* **1996**, 271, 22130-22138.

⁶ Pereira, P. J. B.; Vega, M. C.; Gonzales-Rey, E.; Fernandez-Carazo, R.; Macedo-Ribeiro, S.; Gomis-Rüth, F. X.; Gonzales, A.; Coll, M. *Eur. Mol. Bio. Org.* **2002**, 3, 88-94.

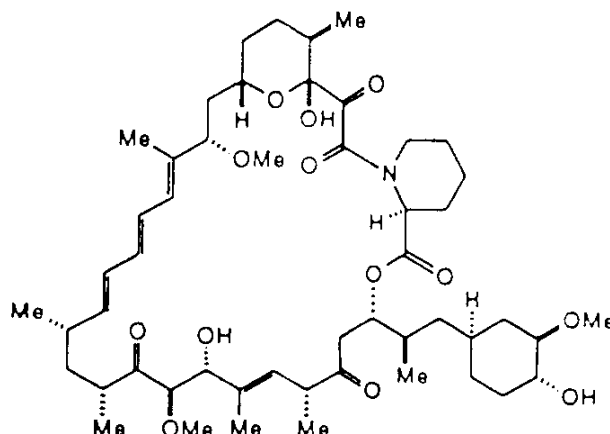


Figure 3 : La rapamycine

Mesure de l'activité des PPIases :

La synthèse de nouveaux inhibiteurs des PPIases semble primordiale au vu de la toxicité relativement élevée des immunosupresseurs utilisés dans le traitement des maladies dans lesquelles sont impliquées les PPIases. Pour ce faire, il est crucial de pouvoir comprendre clairement le mécanisme catalytique de ces enzymes, *via* la mesure de leur activité.

L'activité enzymatique des PPIases est généralement mesurée en employant la méthode mise au point par l'équipe de Fischer, qui exploite la forte sélectivité conformationnelle de la chymotrypsine pour des substrats artificiels de type Succinyl-Y-X-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (Substrat **A**).⁷ Ces substrats présentent une meilleure affinité pour les cyclophilines lorsque Y = X = Ala, ou pour les FKBP lorsque Y = Ala et X = Leu.⁸

La mesure de l'activité enzymatique des PPIases se déroule en trois étapes :

- la chymotrypsine hydrolyse tout d'abord rapidement la liaison Phe-*p*-nitroanilide lorsque la liaison X-Pro, en aval de la phénylalanine, est en conformation *trans*, alors que la conformation *cis* résiste. La nature des acides aminés situés en amont influence la vitesse de l'hydrolyse et permet de mesurer la spécificité de la protéase ;
- les PPIases, ajoutées ensuite au milieu réactionnel, isomérisent tous les conformères *cis* du substrat **A** en conformères *trans* (la spécificité et l'efficacité des PPIases sont représentées par la constante spécifique $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ qui peut atteindre des valeurs supérieures à $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^{5,8a,9};
- toutes les molécules de substrat **A** sont ainsi rendues accessibles à la chymotrypsine.

⁷ Fischer, G.; Bang, H.; Berger, E.; Schellenberger, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 791, 87-97.

⁸ **a)** Harrison, R.K.; Stein, R. L. *Biochem.*, **1990**, 29, 3813-3816. **b)** Albers, M.W.; Walsh, C.T.; Schreiber, S.L. *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 4984-4986.

La concentration en nitroanilines détachées du groupe terminal est dosée par spectrophotométrie tout au long de la mesure (Schéma 3).

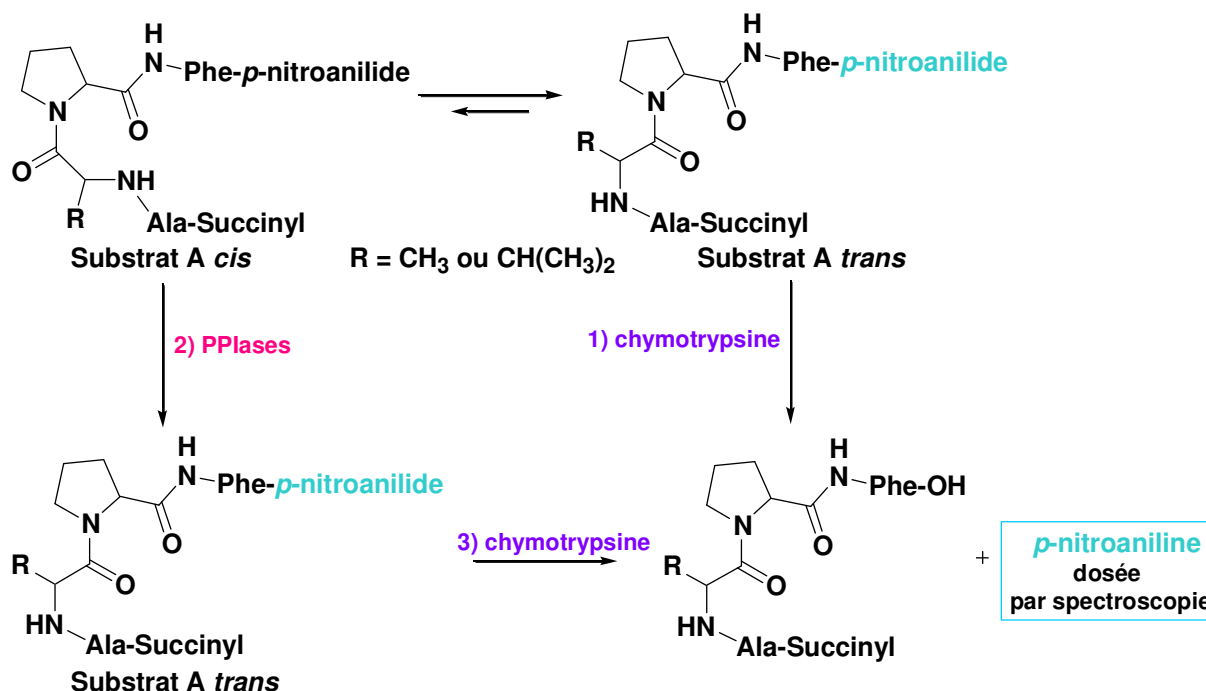


Schéma 3 : Principe de la mesure de l'activité des PPIases

Malheureusement, l'efficacité de cette mesure est limitée par le fait que seuls 10 % des liaisons X-Pro des substrats sont en conformation *cis* : les PPIases ne pourront alors isomériser qu'une faible concentration de substrat A. De plus, la faible solubilité de la *p*-nitroaniline en phase aqueuse ne permet pas de concentrer plus le milieu en substrat. L'équipe de Kofron a été la seule à proposer une solution permettant d'augmenter la proportion des conformères *cis* du substrat A. Elle consiste en la réalisation des mesures d'activité dans des milieux de type trifluoroéthanol/LiCl ou tétrahydrofurane/LiCl, dans lesquels la concentration en LiCl varie de 235 mM à 470 mM, permettant une bonne solubilité du substrat A dans ces solvants organiques et d'augmenter la proportion de forme *cis* de 10 % à 50 %, alors que d'autres solvants comme l'éthanol, le DMSO ou le DMF n'ont pas ou que très peu d'effet sur cet équilibre *cis-trans*. Mais ces conditions restent toutefois très sensibles à l'ajout d'eau qui entraîne une diminution de la solubilité de la *p*-nitroaniline libérée et de la proportion de conformère *cis*.⁹

⁹ Kofron, J.L.; Kuzmic, P.; Kishore, V.; Colon-Bonilla, E.; Rich, D.H. *Biochem.*, **1991**, 30, 6127-6134.

Intérêt de l'incorporation de pseudoprolines dans le substrat A pour la mesure de l'activité des PPIases :

Afin de pouvoir comprendre précisément et efficacement le mécanisme d'action des PPIases, il est nécessaire de trouver des méthodes permettant d'obtenir le conformère *cis* du substrat **A** de façon largement majoritaire. A ce titre, certaines équipes se concentrent sur la recherche de nouveaux résidus à intégrer dans le substrat **A**, en lieu et place de la proline, et qui permettraient d'imposer à une liaison amide X-résidu d'adopter une conformation *cis*.* Par exemple, l'équipe de Mutter a synthétisé des pseudoprolines, qui ont par la suite été intégrées dans des pseudotripeptides de formule Succinyl-Val- Ψ Pro-Phe-*p*-nitroanilide,¹⁰ où Ψ Pro est une pseudo-proline dont l'atome de carbone, en position γ de l'hétérocycle, a été remplacé par un hétéroatome (Figure 4).

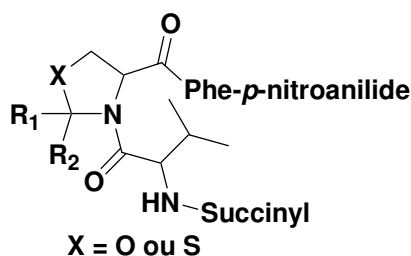


Figure 4 : Structure du substrat Succinyl-Val- Ψ Pro-Phe-*p*-nitroanilide

Ces substrats présentent des proportions plus élevées de conformère *cis* comprises entre 37 et 97 % reconnus par la chymotrypsine, mais leur affinité avec les PPIases n'a pas été testée. Toutefois, ce résultat laisse penser que le substrat **A**, incorporant une pseudoproline à la place de la proline, serait reconnu par la chymotrypsine et pourrait être utilisé dans la mesure de l'activité des PPIases.

Le groupe Synthèse Organique et Biostructures, du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM, UMR INPL/CNRS 7568) s'est spécialisé, depuis quelques années, dans la mise au point de nouvelles méthodes de synthèse, en phase liquide et sur support solide, et l'étude conformationnelle de pseudopeptides bisazotés¹¹, comme les hydrazinopeptides¹², les *N*-

* voir chapitre 4, pages 82-89.

10 Keller, M.; Sager, C.; Dumy, P.; Sebutkowski, M.; Fischer, G.S.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 2714-2720.

11 a) Aubry, A.; Boussard, G.; Cung, M. T.; Marraud, M.; Vitoux, B. *J. Chim. Phys. Phys. Chim. Biol.* **1988**, *85*, 345-359. **b)** Lecoq, A. *Thèse d'université : N-amino et hydrazinopeptides. Aspects chimiques et structuraux* **1991**, INPL Nancy. **c)** Grand, V.; Aubry, A.; Dupont, V.; Vicherat, A.; Marraud, M. *J. Pept. Sci.* **1996**, *2*, 381-391. **d)** Andre, F.; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M. *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 372-381. **e)** Vanderesse, R.; David, L.; Grand, V.; Marraud, M.; Mangeot, J. P.; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*,

aminopeptides¹³ et les azapeptides (Figure 5). C'est pourquoi le groupe peut apporter ce savoir faire au profit de la mesure de l'activité des PPIases, en synthétisant de nouveaux analogues de la proline permettant d'obtenir des mimes du substrat A.¹⁴

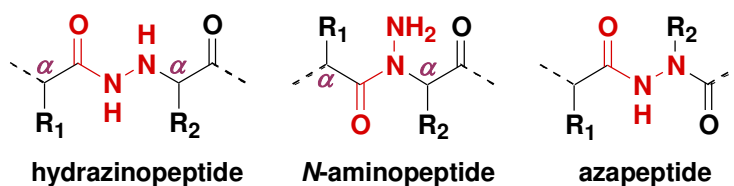


Figure 5 : Structure des hydrazinopeptides, *N*-aminopeptides et azapeptides

En effet, il est possible d'envisager la synthèse d'une pseudoproline bis-azotée, la δ -azaproline, possédant un motif NH supplémentaire remplaçant le groupement méthylène en position δ du cycle de la proline (Figure 6).

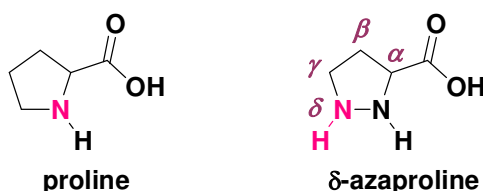


Figure 6 : Structures de la proline et de la δ -azaproline

Il est envisageable que la présence de cet atome d'azote supplémentaire pourrait privilégier la conformation *cis* d'une liaison X- δ -azaPro par établissement d'une liaison hydrogène entre le proton du motif N δ H et le groupement carbonyle de la liaison AA- δ -azaPro, favorisant ainsi la formation de coudes β (Figure 7).

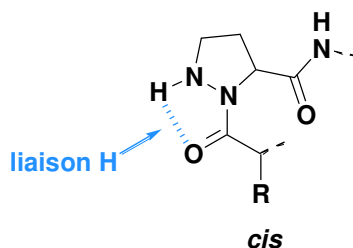


Figure 7 : Liaison hydrogène dans les pseudopeptides contenant la δ -azaproline

2669-2672. **f)** Vanderesse, R.; Grand, V.; Limal, D.; Vicherat, A.; Marraud, M.; Didierjean, C.; Aubry, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9444-9451.

12 a) Bouillon, I.; Brosse, N.; Vanderesse, R.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3569-3572. **b)** Bouillon, I.; Brosse, N.; Vanderesse, R.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *63*, 2223-2234. **c)** Bouillon, I.; Vanderesse, R.; Brosse, N.; Fabre, O.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9635-9641.

13 Felten, A.-S.; Dautrey, S.; Bodiguel, J.; Vanderesse, R.; Didierjean, C.; Arrault, A.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10741-10753.

14 a) Abbas C.; Pickaert G.; Didierjean C.; Jamart-Grégoire B.; Vanderesse R. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4158-4160. **b)** Abbas C.; Jamart-Grégoire B.; Vanderesse R.; Didierjean C. *Acta Cryst.* **2009**, *E65*, o3079.

Il serait alors possible de tirer profit de ces modifications structurales puisque l'incorporation de la δ -azaproline dans le substrat **A** pourrait permettre d'augmenter sensiblement la proportion de son conformère *cis*. Le substrat **A**, s'il s'avère reconnu par la chymotrypsine et les PPIases, serait ainsi très efficace pour mesurer l'activité enzymatique de ces dernières et résoudre leur mécanisme d'action *in vivo*.

Objectifs

L'objectif de ce travail de thèse consistait donc à mettre au point une nouvelle méthode de synthèse énantiosélective de l'analogue de la (*S*)-proline, la (*S*)- δ -azaproline, orthogonalement protégée. Deux autres points ont également été résolus :

- l'étude de la réactivité de la (*S*)- δ -azaproline, ainsi que son incorporation dans des petits pseudotriptides de formule $P_1-AA_1-\delta\text{-azaPro-AA}_3-X$, précurseurs du substrat **A** utilisable pour la mesure de l'activité enzymatique des PPIases ;
- les études structurales par spectroscopies RMN, infrarouge, dichroïsme circulaire et modélisation par dynamique moléculaire sous contraintes RMN, qui ont été conduites sur ces pseudo-peptides, afin de mettre en évidence une éventuelle auto-structuration de ces composés.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse ont également permis l'étude de la réactivité d'un autre analogue bis-azoté de la proline, l'acide pyrazolique (forme oxydée de la δ -azaproline), qui devrait également conduire à des pseudo-peptides possédant une structuration intéressante (Figure 8) ;

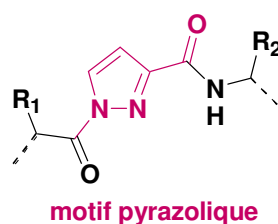


Figure 8 : Structure d'un pseudo-peptide incorporant un motif pyrazolique

Le manuscrit s'articulera en quatre chapitres : après avoir présenté la synthèse de la (*S*)- δ -azaproline, l'étude de la réactivité de la δ -azaproline et la synthèse de pseudotriptides seront ensuite abordés. Puis la synthèse de l'acide pyrazolique, l'étude de sa réactivité et l'incorporation dans des pseudo-peptides seront décrites. Enfin, les résultats obtenus lors des études conformationnelles des pseudo-peptides synthétisés seront exposés.

Chapitre I : Synthèse de la (*S*)- δ -azaproline

I Introduction

Le premier objectif de ce travail était la préparation de la (S)- δ -azaproline, une pyrazolidine analogue de la (S)-proline, utilisable en synthèse peptidique en solution, afin de former des pseudotriptides de formule P-AA₁- δ -azaPro-AA₃-X et d'étudier l'impact conformationnel de cette pseudoproline. Pour ce faire, il était nécessaire de :

- mettre au point une méthode de synthèse rapide et efficace de la δ -azaproline énantiomériquement pure ;
- trouver et introduire les groupements protecteurs orthogonaux nécessaires à la construction de la chaîne peptidique par l'atome d'azote N ^{ϵ} , de façon sélective (Figure 9).

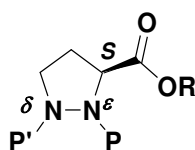


Figure 9 : La (S)- δ -azaproline

En effet, la présence des deux atomes d'azote non protégés de ce composé peut poser un problème de régiosélectivité lors de couplages peptidiques. Une certaine analogie pouvant être retrouvée entre la réactivité de la (S)- δ -azaproline et celle d'hydrazinoesters, une étude bibliographique sur la réactivité des hydrazinoesters, linéaires et cycliques, a donc été réalisée afin de connaître les possibilités de régiosélectivité des deux atomes d'azote.

I.1 Régiosélectivité du couplage peptidique sur les hydrazinoesters

Du fait de la présence des deux atomes d'azote N ^{α} et N ^{β} , l'acylation d'un hydrazinoester, par couplage peptidique avec un acide aminé protégé sur son extrémité N_{term}, peut conduire à trois types de composés, α - ou β -monoacylés (α -hydrazinopeptide ou N-aminopeptide), et α,β -diacylés (peptide branché) (Schéma 4). Quelques études ont déjà été menées sur la compétitivité N ^{α} /N ^{β} lors de réactions d'acylation d' α -hydrazinoesters.^{11b-15} Il ressort que dans des conditions classiques de synthèse peptidique, le couplage d'un α -hydrazinoester avec un acide aminé N-protégé conduit majoritairement à la formation d'hydrazinopeptides.

15 a) Niedrich, H. *Chem. Ber.* **1965**, 98, 3451-3461. b) Grupe, R.; Baeck, B.; Niedrich, H. *J. Prakt. Chem.* **1972**, 314, 751-758. c) Dupond, V.; Lecoq, A.; Mangeot, J. P.; Aubry, A.; Boussard, G.; Marraud, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8898-8906. d) Lecoq, A.; Marraud, M.; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 2765-2768. e) Aubry, A.; Bayeul, D.; Mangeot, J. P.; Sterin, S.; Collet, A.; Lecoq, A.; Marraud, M. *Biopolymers* **1991**, 31, 793-801.

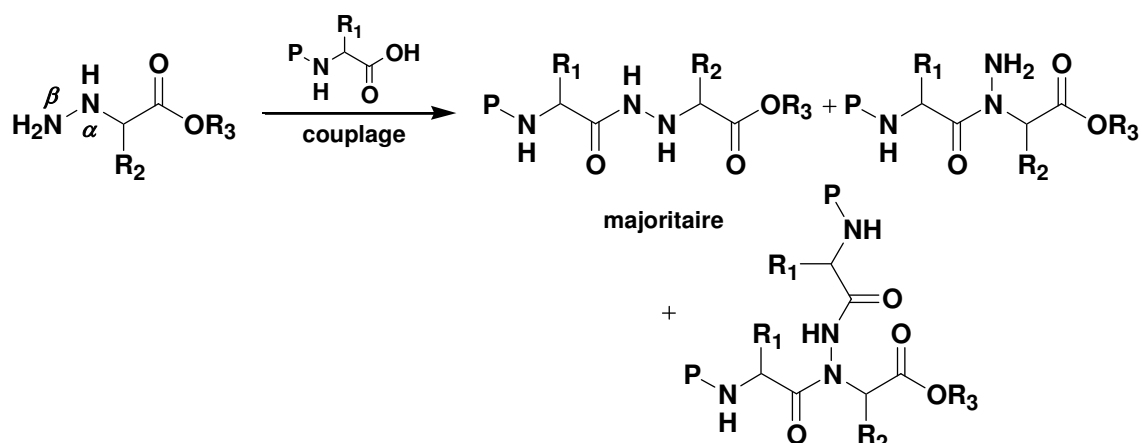


Schéma 4 : Régiosélectivité du couplage peptidique sur un hydrazinoester

De plus, la régiosélectivité de cette réaction est favorisée par l'augmentation de l'encombrement stérique des acides aminés mis en jeu. A titre d'exemple, Lecoq a étudié, au cours de sa thèse, le couplage d'une proline *N*-protégée avec l'ester éthylique de l'hydrazinoglycine en présence de différents agents de couplage peptidiques (Schéma 5).^{11b} Les résultats obtenus montrent que l'acylation a lieu uniquement sur l'atome d'azote β , et ce, quel que soit l'agent de couplage employé. Ceci montre que la protection de l'atome d'azote N^β est conseillée pour former des *N*-aminodipeptides dans de bonnes conditions.

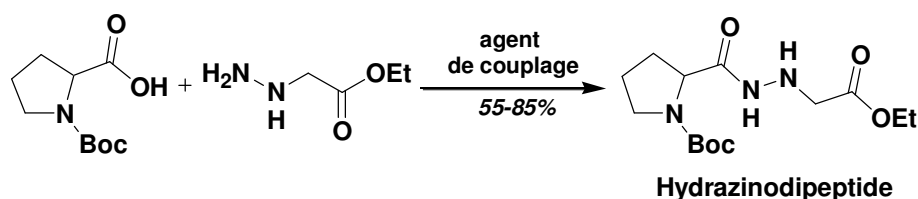


Schéma 5 : Couplage de l'hydrazinoglycine avec la proline

I.2 Régiosélectivité de la réaction de N-protection

Des premiers travaux réalisés par l'équipe de Niedrich^{15a} ont déjà montré que lors de l'introduction des groupements protecteurs Z et Boc, la régiosélectivité dépendait des réactifs employés. Plus récemment, Lecoq^{11b} a mené une étude très complète sur la régiosélectivité de la réaction de protection des atomes d'azote N^α et N^β de l'hydrazinoglycine, également par des groupements Z et Boc (Schéma 6). Les proportions relatives des isomères de position **I**, **II** et **III**, varient considérablement suivant les réactifs et les conditions réactionnelles utilisées :

- l'utilisation des anhydrides symétriques P_2O et de PCl ($P=Z$ ou Boc) conduit majoritairement à la formation des isomères **II**, mais la formation des isomères bisprotégés **III** est également observée ;

- l'emploi des carbonates ZNp, ZOPfp et ZOSu et la cristallisation sélective dans l'acétate d'éthyle permettent la formation sélective des isomères **I** ; aucune formation des isomères bisprotégés **III** n'est détectée ;
- la nature chimique de l'agent acylant n'est pas influente ; l'isomère **II** N ^{α} -Boc est toujours isolé majoritairement.

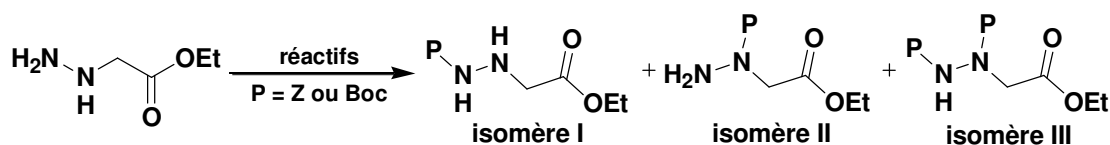


Schéma 6 : N-protection de l'hydrazinoglycine

Les différents résultats ont été regroupés dans le Tableau 1 à des fins de comparaison.

Réactif	Isomère I (%)	Isomère II (%)	Isomère III (%)
Z ₂ O	10	80	5
ZCl	25	60	10
ZCl/DMAP	10	65	15
ZONp	80	10	/
ZOPfp	74	10	/
ZOSu	83	10	/
Boc ₂ O	10	80	5
BocONp	35	45	/
BocOPfp	30	43	/
BocOSu	40	50	/

Tableau 1 : Rendements et régiosélectivité de la N-protection de l'hydrazinoglycine

I.3 Cas des hydrazines cycliques

Dans la littérature, aucune étude de la réactivité des hydrazines cycliques de type δ -azaproline n'a été reportée à ce jour. Seuls des travaux décrivant la réactivité de la 3-(cyanométhyl)pyrazolidine et de dérivés de l'acide pipérazique, dont les structures sont relativement proches de la δ -azaproline, sont répertoriés.

Les pyrazolidines **R** sont des hydrazines cycliques à cinq atomes, dont la structure diffère de celle de la δ -azaproline par la présence d'un atome de carbone supplémentaire et le remplacement de la fonction ester par une fonction cyanométhyle. L'équipe de Weigert a montré que la réactivité de ces pyrazolidines **R** était semblable à celle de dialkylhydrazines.¹⁶ Lorsqu'elles réagissent avec des électrophiles, deux types de composés peuvent être générés et la régiosélectivité ne peut pas être contrôlée : en fonction des réactifs utilisés, la formation d'adduits de type 1:1 ou 2:1 est observée. Dans le cas des adduits 1:1, inséparables par chromatographie, le site d'addition du nucléophile ne peut pas être déterminé (Schéma 7).

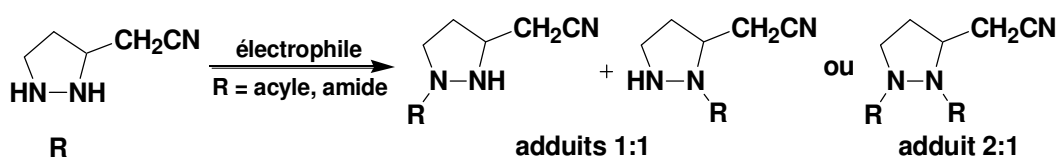


Schéma 7 : Addition électrophile sur les atomes d'azote de la pyrazolidine **P**

La réactivité de la δ -azaproline peut également être comparée à celle de l'acide pipérazique puisque leurs structures ne diffèrent que par la présence d'un atome de carbone supplémentaire dans le cycle. Plusieurs équipes ont utilisé l'acide pipérazique dans la synthèse de pseudopeptides possédant différentes activités biologiques.¹⁷ Pour ce faire, un des deux atomes d'azote de cet analogue d'acide aminé doit être protégé, afin d'allonger la chaîne peptidique de façon régiosélective. Tous les travaux décrits montrent que seule la protection de l'atome d'azote N^{β} s'effectue, et ce quels que soient le groupement protecteur et le réactif utilisés (Schéma 8).

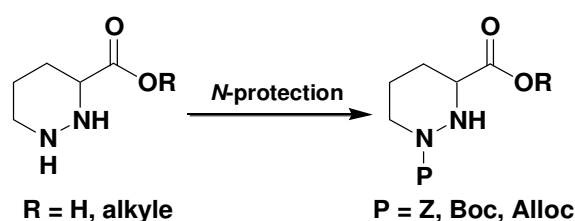


Schéma 8 : N-protection de l'acide pipérazique

Les différents résultats tirés de ces études montrent qu'il est difficile de contrôler la régiosélectivité des réactions de couplage peptidique ou de N-protection avec des hydrazinoesters. Une réactivité plus forte de l'atome d'azote N^{β} est observée dans les couplages peptidiques et il s'avère alors impossible de former des pseudopeptides natifs sans protéger au préalable cet atome

¹⁶ Weigert, F. J. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 622-626.

¹⁷ a) Adams, C. E.; Aguilar, D.; Hertel, S.; Knight, W. H.; Paterson, J. *Synth. Commun.* **1988**, *18*, 2225-2231. b) Coats, R. A.; Lee, S.-L.; Davis, K. A.; Patel, K. M.; Rhoads, E. K.; Howard, M. H. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1734-1737. c) Kennedy, J. P.; Brogan, J. T.; Lindsley, C. W. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4116-4118.

d'azote. Il est donc nécessaire de protéger les deux atomes d'azote de la (S)- δ -azaproline de façon orthogonale au cours de sa synthèse afin de pouvoir les faire réagir sélectivement par la suite.

II Synthèses de la δ -azaproline préalablement décrites

L'examen de la littérature montre la difficulté de générer la δ -azaproline de manière énantiomériquement pure et orthogonalement protégée. Seuls des travaux effectués en 1997 par les équipes de Kim et de Carreira décrivent la formation de la δ -azaproline énantiomériquement pure. Les travaux concernant ces premières synthèses de la δ -azaproline sont décrits ci-dessous.

II.1 Synthèses de la δ -azaproline en mélange racémique

En 1968, l'équipe de Kornet a proposé une méthode de synthèse permettant de former un nouvel hétérocycle : une pyrazolidine dont les atomes de carbone C^β et C^γ ne sont pas substitués. Ces pyrazolidines sont générées par réduction spécifique au borane de la fonction amide de pyrazolidinones avec un rendement moyen, la fonction ester n'étant pas touchée (Schéma 9).¹⁸

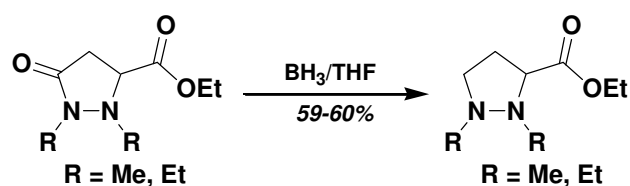


Schéma 9 : Synthèse de la pyrazolidine (équipe de Kornet)

L'équipe de Tsuge (1989) a été la première à décrire la synthèse d'une δ -azaproline orthogonalement protégée.¹⁹ L'intermédiaire réactionnel azométhine, issu d'une réaction de type Mannich entre une hydrazine et le formaldéhyde en présence de triéthylamine, réagit par cycloaddition *in situ* avec un alcène pour générer un mélange de pyrazolidines avec un rendement de 96% (Schéma 10).

¹⁸ Kornet, M. J.; Thio, P. A.; Tan, S. I. *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 3637-3639.

¹⁹ Kanemasa, S.; Tomoshige, N.; Wada, E.; Tsuge, O. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, 62, 3944-3949.

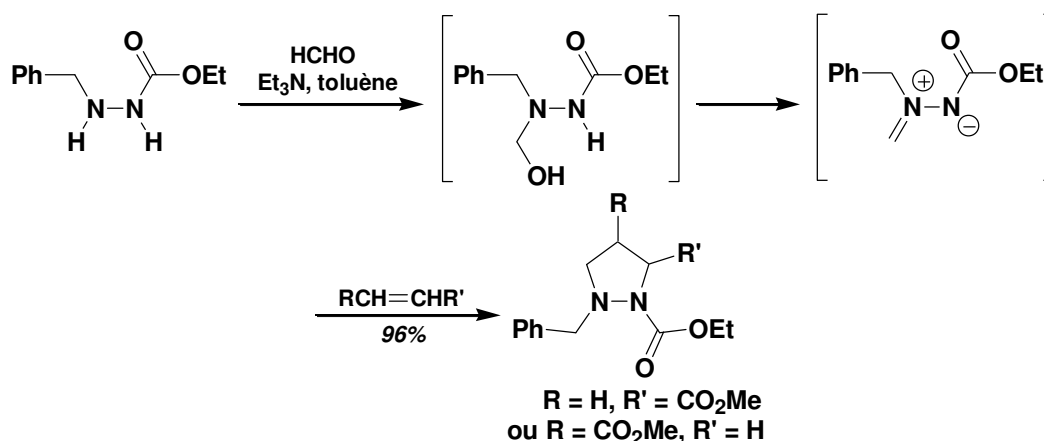


Schéma 10 : Synthèse de pyrazolidines (équipe de Tsuge)

Cette réaction toutefois non régiosélective conduit à un mélange d'isomères de pyrazolidines, impossible à séparer.

II.2 Synthèses de la δ -azaproline énantiomériquement pure

II.2.1 A partir de l'acide malique

La première méthode de synthèse de la δ -azaproline énantiomériquement pure, développée par l'équipe de Kim en 1997, utilise l'acide (*R*)-malique en tant que réactif de départ (Schéma 11).²⁰ La δ -azaproline **F** synthétisée a ensuite servi d'intermédiaire réactionnel pour former les structures plus complexes **G**, mimes de β -turns. Après protection de la fonction acide carboxylique de l'acide malique et de la fonction alcool en α en acétal **B**, la seconde fonction acide carboxylique est réduite en alcool, puis en dérivé bromé **C**. L'ester méthylique **D** est ensuite généré par déprotection de l'acétal par utilisation de d'acide paratoluènesulfonique. Enfin, la (*S*)- δ -azaproline **F** est obtenue après cyclisation entre une hydrazine protégée par un groupement Boc et un dérivé de l'ester méthylique **D**.

Cette synthèse nécessite cinq étapes et le rendement global est faible puisque de 14%, l'étape limitante étant la cyclisation par substitution nucléophile.

²⁰ Kim, H.-O.; Lum, C.; Lee, M. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4935-4938.

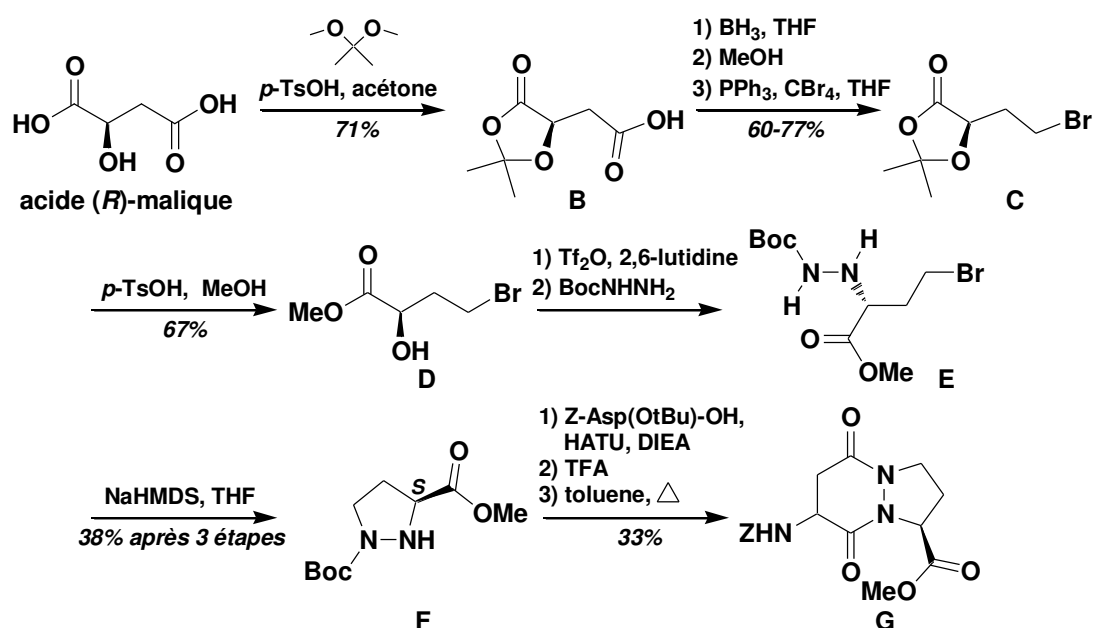


Schéma 11 : Synthèse de la (S)-δ-azaproline à partir de l'acide malique

II.2.2 Par cycloaddition [3+2]

La deuxième voie de synthèse de la (S)-δ-azaproline a été décrite par l'équipe de Carreira.²¹ Le composé **H**, obtenu après réaction du (*R*)-camphor sultame avec le chlorure d'acryloyle conduit, par cycloaddition dipolaire asymétrique [3+2] avec un diazométhane silylé, à la pyrazoline **I**. Le site de formation de la double liaison N=C est surprenant, puisque dans ce cas elle n'est pas très stable, et ce phénomène n'a pas pu être expliqué par l'équipe. La pyrazoline a ensuite été réduite et protégée en pyrazolidine **J**. Enfin, la (S)-δ-azaproline **K** est obtenue après transfonctionnalisation du dérivé **J** (Schéma 12).

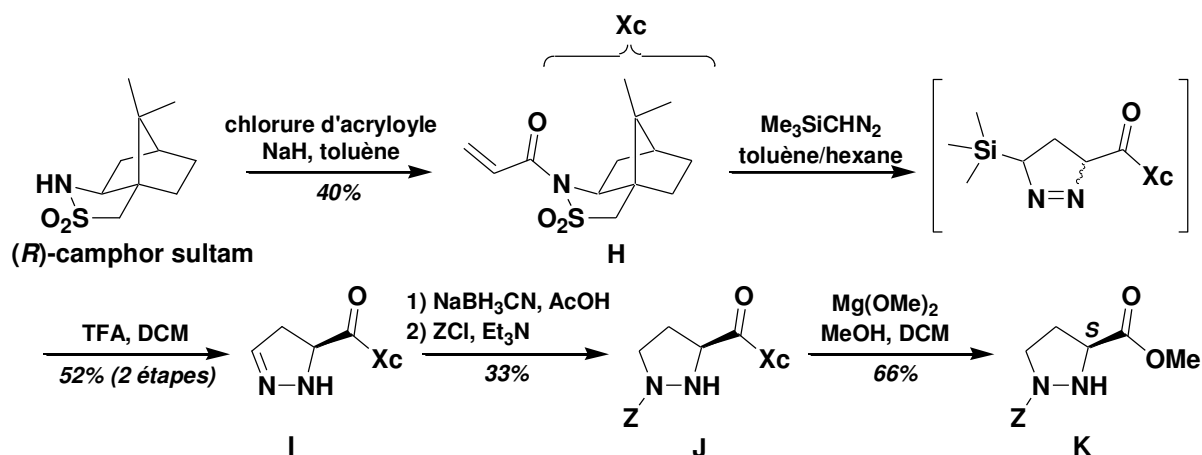


Schéma 12 : Synthèse de la (S)-δ-azaproline par cycloaddition [3+2]

²¹ Mish, M.R.; Guerra, F.M.; Carreira, E.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 8379-8380.

Cette synthèse présente deux inconvénients majeurs :

- le rendement global n'est que de 4,5% ;
- la nécessité de séparer les deux diastéréoisomères **I** obtenus pour générer la δ -azaproline **K** énantiomériquement pure.

II.2.3 Conclusion

Ces deux méthodes de synthèse de la (S)- δ -azaproline, présentant un nombre important d'étapes et de faibles rendements globaux, n'étaient pas appropriées pour utiliser, par la suite, cet analogue de la proline en synthèse peptidique. Il était donc nécessaire de trouver une nouvelle voie de synthèse de la (S)- δ -azaproline orthogonalement protégée réalisable avec un bon rendement global, grâce à un nombre d'étapes limitées.

III Synthèse de la (S)- δ -azaproline à partir de la (R)- α -hydroxy- γ -butyrolactone

III.1 Introduction

La nouvelle stratégie envisagée pour la synthèse de la (S)- δ -azaproline s'est inspirée de la méthode développée par l'équipe de Kim, afin d'obtenir plus rapidement et plus efficacement un analogue de l'hydrazinoester **E** (Schéma 11, page 22). Pour ce faire, la méthode de synthèse d' α -hydrazinoesters énantiomériquement purs, développée depuis quelques temps au laboratoire, a été utilisée. Cette stratégie est basée sur deux réactions clés :

- une réaction de Mitsunobu, permettant de remplacer une fonction hydroxyle par un motif hydrazino ;
- une réaction de transprotection, permettant, dans ce cas, d'obtenir les hydrazinoacides orthogonalement protégés.

III.1.1 La réaction de Mitsunobu appliquée à la synthèse d' α -hydrazinoesters

La réaction de Mitsunobu est une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2, mettant en jeu un partenaire acide et, en général, un alcool primaire ou secondaire, qui a été utilisée au laboratoire pour mettre au point l'alkylation d'hydrazines triacylées.²² Pour ce faire, des tri-*tert*-butoxycarbonylhydrazines et des *N*-acyl ($P=COCH_3$) ou *N*-alcoxycarbonyl-aminophthalimides

22 a) Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1, 1-28. **b)** Brosse, N.; Pinto, M.-F.; Jamart-Grégoire, B. *J.Org. Chem* **2000**, 65, 4370-4374.

(P=Boc, Z) peuvent être utilisés en tant que partenaires acides, grâce à la présence d'un proton acide ($pK_a \sim 11$) sur l'atome d'azote proche de trois groupements électroattracteurs (Figure 10).

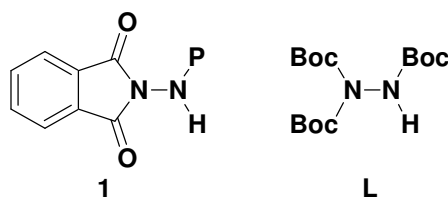


Figure 10 : *N*-alcoxycarbonylaminophthalimide **1** et tri-*tert*-butoxycarbonylhydrazine **L**

Il a été montré que seuls les dérivés du *N*-aminophthalimide **1** permettent d'obtenir de très bons rendements dans la réaction de Mitsunobu. Cette différence de réactivité, qui ne peut être attribuée à une acidité plus faible du NH des partenaires **L** (les valeurs de pK_a sont environ de 11), est expliquée par une diminution de l'accessibilité à ce site dû à l'encombrement stérique. En effet, par comparaison, les *N*-aminophthalimides **1** ont la particularité d'être plans et, de ce fait, présenter un encombrement stérique limité, qualité nécessaire pour permettre la réaction de type SN_2 dans de bonnes conditions.

La réaction de Mitsunobu est également connue pour être stéréospécifique et s'effectue avec une inversion totale de la configuration absolue du carbone asymétrique porteur de la fonction hydroxyle. Ainsi, cette réaction a pu être utilisée dans la synthèse d' α -hydrazinoesters optiquement purs **N**. En effet, ils ont pu être obtenus par condensation des *N*-acyl (P=COCH₃) ou *N*-alcoxycarbonylaminophthalimides (P=Boc, Z) sur des α -hydroxyesters chiraux, puis par déprotection (P'=H) ou par transprotection (P=Boc, P'=Boc/Z ou P=Z, P'=Boc) du motif phthalimide des composés **M** (Schéma 13).²³

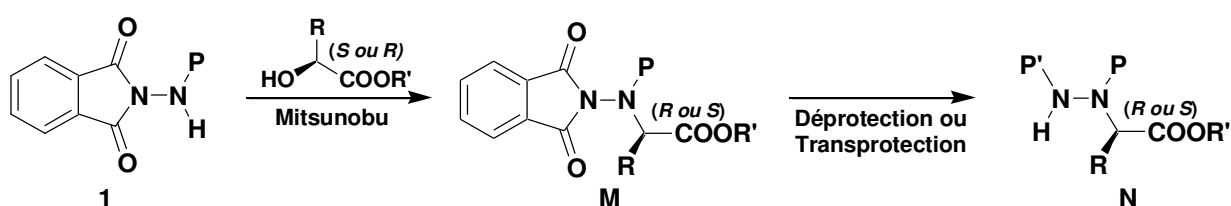


Schéma 13 : Synthèse d' α -hydrazinoesters énantiomériquement purs par réaction de Mitsunobu

III.1.2 Les méthodes de transprotection du groupement phthalimide

En plus d'être de très bons partenaires acides pour la réaction de Mitsunobu, les *N*-alcoxycarbonylaminophthalimides ont l'avantage d'être très facilement transprotégeables dans des conditions qui ont été mises au point au laboratoire. La première méthode de transprotection

23 a) Brosse, N.; Pinto, M.-F.; Bodiguel, J.; Jamart-Grégoire, B. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2869-2873. **b)** Brosse, N.; Pinto, M.-F.; Jamart-Grégoire, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 24, 4757-4764.

permet de remplacer le groupement phthalimide par deux groupements Boc ou un groupement Z (Schéma 14).²⁴ Le motif phthalimide est tout d'abord ouvert par une amine primaire, la méthylamine. L'introduction d'un groupement Boc ou Z sur l'azote β permet ensuite la rupture de la liaison carbone-azote par réaction de substitution intramoléculaire et conduit à la formation d'un composé monoprotégé **O** (un groupement Z) ou bisprotégé **P** (groupements Boc). Dans ce dernier cas, l'utilisation du perchlorate de magnésium permet de transformer le motif imidocarbonate du composé **P** en motif carbamate (composé **Q**). Il est à noter que seule la transprotection du *N*-benzyloxycarbonylaminophthalimide (P=Z) par un groupement Boc permet d'obtenir l'hydrazine orthogonalement protégée **Q**.

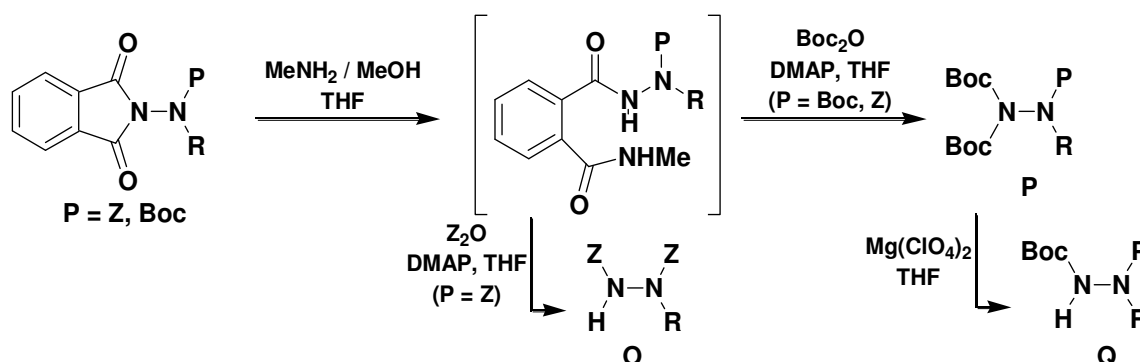


Schéma 14 : Méthode de transprotection utilisant la méthylamine

La seconde méthode de transprotection menant à l'hydrazine orthogonalement protégée **Q** a été mise au point plus récemment. Elle permet de remplacer directement le motif phthalimide par un seul groupement Boc.^{24b-25} Dans ce cas, le groupement phthalimide est ouvert par une amine secondaire, la pyrrolidine, qui ne peut pas éliminer le motif aromatique. L'attaque nucléophile de la méthylamine, dans un second temps, libère le produit monoprotégé. (Schéma 15).

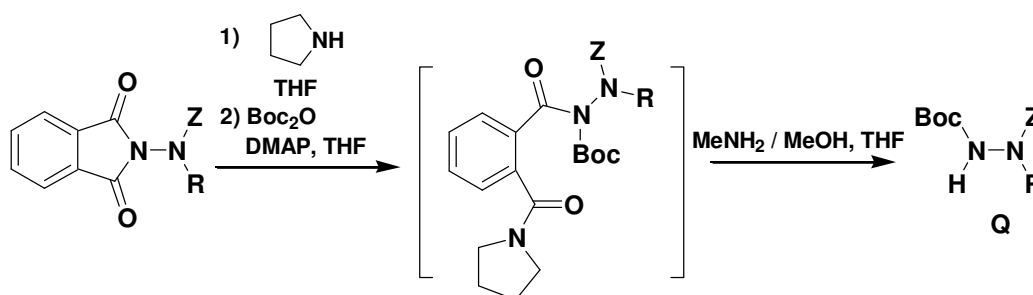


Schéma 15 : Méthode de transprotection utilisant la pyrrolidine

24 a) Brosse, N. ; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 249-251. **b)** Bouillon, I. *Thèse d'université : Synthèse d'α-hydrazinopeptides* **2006**, INPL, Nancy.

25 Bouillon, I.; Vanderesse, R.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 3569-3572.

III.2 Application des réactions de Mitsunobu et de transprotection à la synthèse de la (S)- δ -azaproline

Compte-tenu des différents avantages présentés par les réactions de Mitsunobu et de transprotection du groupement phthalimide, il a semblé judicieux d'appliquer ces conditions de formations d' α -hydrazinoesters à la synthèse de la δ -azaproline.

La stratégie retenue permettant de mettre en application ces réactions est la suivante :

- comme seule la transprotection du groupement phthalimide en groupement(s) Boc du *N*-benzyloxycarbonylaminophthalimide **1** permet d'obtenir un composé orthogonalement protégé, celui-ci a tout d'abord été utilisé en tant que partenaire acide et a été condensé sur la (*R*)- α -hydroxy- γ -butyrolactone **2**. Ce dérivé, peu encombré, permet de réaliser la réaction de Mitsunobu dans de bonnes conditions et possède le même nombre d'atomes de carbone que l'ester **E** (Schéma 11, page 22) ;
- le composé formé lors de cette réaction permettrait de conduire à la (S)- δ -azaproline, après une série de transprotection du groupement phthalimide en groupement Boc, estérification et réaction de Mitsunobu intramoléculaire (Schéma 16).

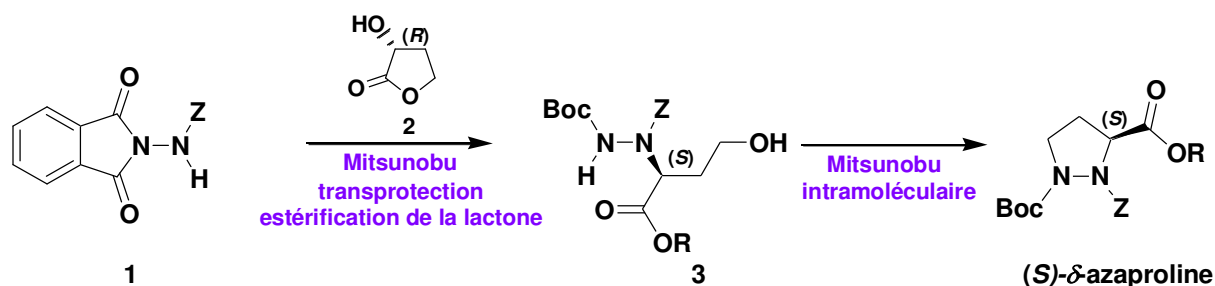


Schéma 16 : Stratégie de synthèse de la (S)- δ -azaproline

L' α -hydroxy- γ -butyrolactone est commercialement accessible sous ses formes énantiomériquement pures. Néanmoins, la mise au point de cette synthèse a été effectuée sur le composé racémique, et ce pour des raisons économiques.

III.2.1 Synthèse de l'hydrazinolactone **4**

La synthèse du Z-aminophthalimide a tout d'abord été réalisée à partir de l'anhydride phthalique par réaction avec le benzylcarbazate dans le toluène à reflux avec un très bon rendement de 91%.^{23b-26} L'hydrazinolactone **4** a ensuite été générée par une réaction de Mitsunobu entre l' α -hydroxy- γ -butyrolactone **2** et le partenaire acide **1**. L'influence de la nature

²⁶ Krause, J. G.; Kwon, S.; George, B. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2040-2042.

du dialkylazodicarboxylate activant (DXAD) a été étudiée afin de trouver les conditions optimales de formation de l'hydrazinolactone **4** (Schéma 17).

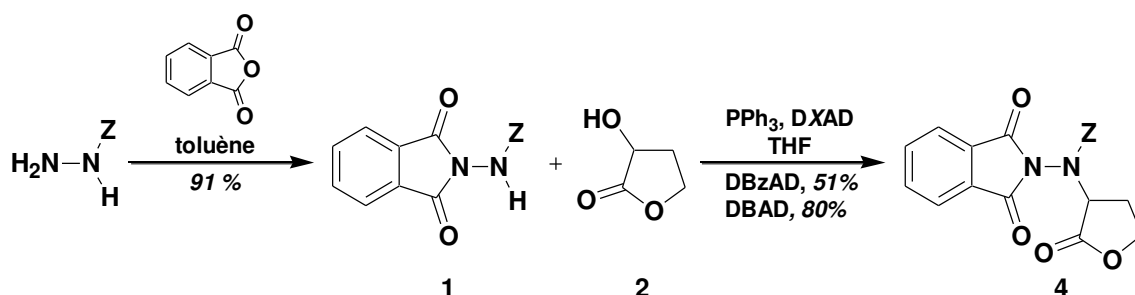


Schéma 17 : Formation du Z-aminophthalimide **1** et synthèse de l'hydrazinolactone **4**

L'utilisation du DEAD n'a pas permis d'obtenir la lactone **4** pure, inséparable par chromatographie du diéthyléthyle hydrazodicarboxylate, produit de la réduction du DEAD. Ces problèmes de séparation ont pu être résolus en utilisant le DBzAD ou le DBAD. L'hydrazinolactone **4** a alors été générée avec un très bon rendement de 80% avec le DBAD après 4 heures de réaction dans le THF.

III.2.2 Transprotection en composés mono/bis protégés **5**

Si la présence du motif phthalimide est essentielle pour la réussite de la réaction de Mitsunobu précédemment décrite, il n'en reste pas moins que sa fragilité en milieu basique constitue un handicap pour la suite des opérations. C'est pourquoi il a été nécessaire de transprotéger le motif phthalimide de l'hydrazinolactone **4** en composé monoprotégé **5b** (Figure 11).

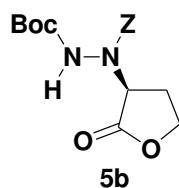
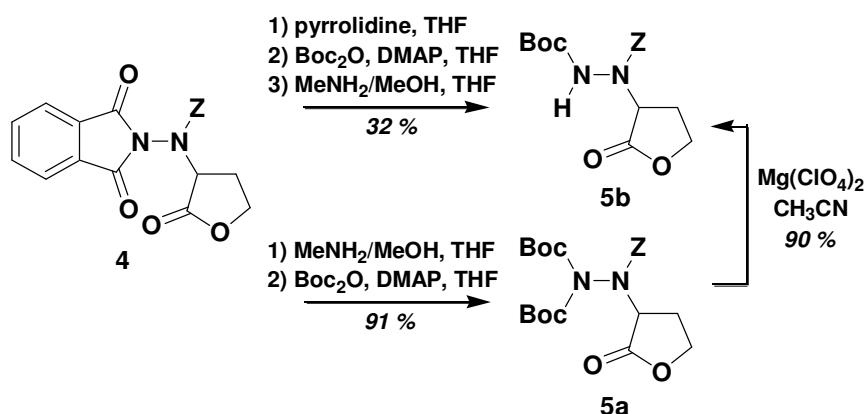


Figure 11 : Hydrazinolactone monoprotégée **5b**

Les deux méthodes de transprotection du groupement phthalimide développées au laboratoire ont été testées :

- la méthode la plus directe a permis de conduire à la lactone monoprotégée **5b**. Le motif phthalimide du composé **4** a tout d'abord été ouvert par une amine secondaire, la pyrrolidine. L'intermédiaire ouvert obtenu a été mis en présence de Boc_2O et d'une quantité catalytique de DMAP, puis de méthylamine afin de libérer le produit monoprotégé **5b** avec un rendement faible de 32% ;^{24b-25}

- la méthode développée en premier au laboratoire a permis de remplacer le motif phthalimide par deux groupements Boc (composé **5a**), puis de cliver un seul groupement Boc pour générer la lactone **5b**. Pour ce faire, l'ouverture du groupement phthalimide a été effectuée à l'aide de la méthylamine, suffisamment nucléophile pour éliminer le motif aromatique.^{24a} Le produit ainsi formé, mis en présence de Boc_2O et d'une quantité catalytique de DMAP, a généré le composé bis protégé **5a** avec un rendement de 91%. Il est intéressant de noter que la lactone reste stable dans les deux conditions de transprotection testées. La monodéprotection du composé **5a**, par l'utilisation d'une quantité catalytique de perchlorate de magnésium, a permis de produire le composé **5b** et cette fois avec un excellent rendement de 90% (Schéma 18).²⁷

Schéma 18 : Transprotection en hydrazinolactone **5b**

III.2.3 Ouverture de la lactone et estérification

La suite de la synthèse de la (S)- δ -azaproline consistait en la formation de l'ester **3** afin de pouvoir l'engager dans une dernière réaction de Mitsunobu intramoléculaire (Schéma 16, page 27). Comme les lactones **5** ont été générées sous forme bis ou mono protégées, deux stratégies pour former l'ester **3** se sont alors présentées :

- l'ouverture de la lactone **5a**, l'estérification du composé généré et la monodéprotection de l'ester correspondant ;
- l'ouverture de la lactone **5b** et l'estérification du produit formé pour conduire directement à l'ester **3** (Schéma 19).

²⁷ Stafford, J. A.; Brackeen, M. F.; Karanewsky, D. S.; Valvano, N. L. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7873-7876.

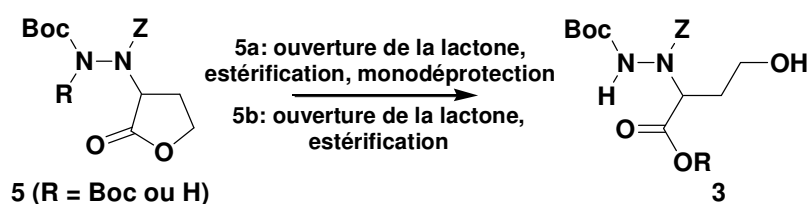


Schéma 19 : Stratégies de synthèse de l'ester 3

III.2.3.1 Ouverture de la lactone 5

Le groupement Boc étant sensible aux conditions acides, l'ouverture de la lactone a tout d'abord été réalisée à partir des composés **5a** et **5b**, en milieu basique, par utilisation d'hydroxyde de sodium dans un mélange THF / eau. Les carboxylates **6a** et **6b** correspondants ont été obtenus quantitativement (Schéma 20).

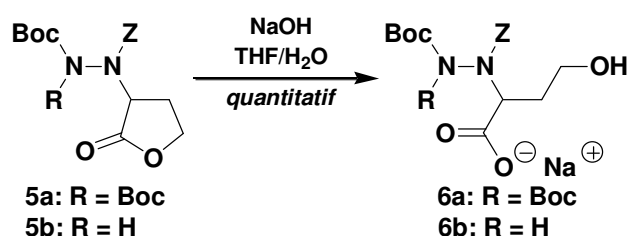


Schéma 20 : Synthèse des carboxylates de sodium 6

La fonction carboxylate doit être ensuite transformée en ester afin d'éviter une cyclisation intramoléculaire en lactone. En effet, si les carboxylates de sodium **6** sont placés en milieu acide, les acides carboxyliques formés correspondants pourraient réagir avec leur fonction hydroxyle et, ainsi, régénérer les lactones **5**, ou pourraient conduire à des réactions parasites lors de la réaction de Mitsunobu suivante.

L'estérification, qui ne peut être effectuée en milieu acide, a donc été réalisée sur les composés **6a** et **6b**. Comme les carboxylates de sodium sont de bons nucléophiles, il a été décidé d'utiliser des dérivés halogénés comme partenaires électrophiles de l'estérification.

III.2.3.2 Synthèse de l'ester benzylique 3b

Dans la littérature, il est montré que la formation d'un ester méthylique n'empêche pas la cyclisation en lactone,²⁸ le choix s'est porté en premier sur la synthèse de l'ester benzylique.

La formation de l'ester benzylique **3a** a tout d'abord été tentée dans des conditions classiques d'estérification avec des dérivés halogénés : le carboxylate **6a** est mis en présence de

²⁸ Hayashi, Y.; Yamaguchi, J.; Shoji, M. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 9839-9846.

bromure de benzyle dans le DMF.²⁹ Aucune réaction n'a été observée après 48 heures de réaction à reflux de la DMF. La mauvaise solubilité du carboxylate constatée dans ce solvant peut, sans doute, expliquer cet échec.

Par contre, l'utilisation du bromure de benzyle, en présence d'une quantité catalytique d'un agent de transfert de phase, le bromure de tétrabutylammonium, à reflux de l'acétone,³⁰ a permis d'obtenir l'ester **3a** après 24h de réaction avec un rendement de 80% (Schéma 21).

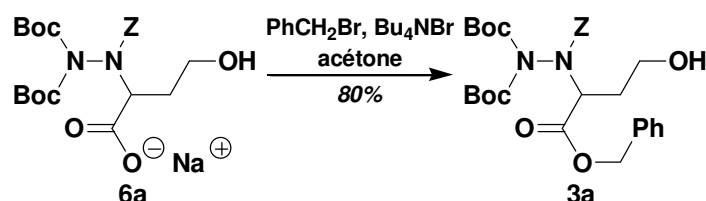


Schéma 21 : Synthèse de l'ester benzylique **3a**

Deux essais de monodéprotection ont été envisagés afin d'obtenir l'ester benzylique **3b** :

- le premier, dans les mêmes conditions de monodéprotection utilisées pour la formation de la lactone **5b**, c'est à dire en présence d'une quantité catalytique de perchlorate de magnésium dans l'acétonitrile ;²⁷
- le second, par utilisation de carbonate de potassium à reflux de méthanol.³¹

Dans le cas de la première tentative de monodéprotection, aucune réaction n'a été observée, même lorsqu'une quantité stœchiométrique de perchlorate de potassium a été employée. L'utilisation du carbonate de potassium a conduit à l'apparition d'hydrazinolactone **5b** et d'alcool benzylique (Schéma 22).

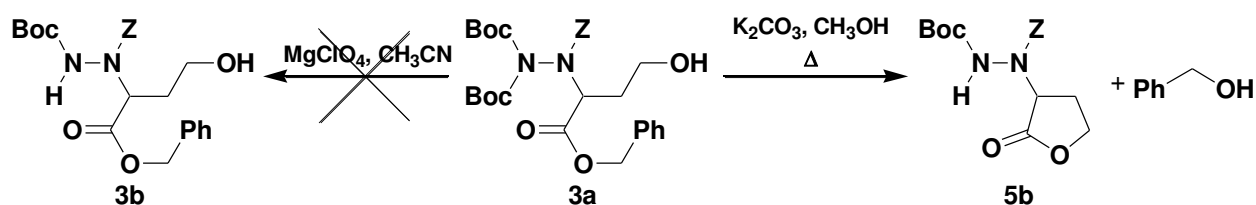


Schéma 22 : Monodéprotection de l'ester benzylique **3a**

Ce résultat a également été observé lors d'un troisième essai de synthèse de l'ester **3b**, qui consistait à faire réagir le carboxylate de sodium **6b** dans des conditions d'estérification identiques à celles utilisées pour le carboxylate **6a**. Même le remplacement du carboxylate de

²⁹ Civitello, E.R.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 3775-3782.

³⁰ Weber, A.E.; Halgren, T.A.; Doyle, J.J.; Lynch, R.J.; Siegl, P.K.S.; Parsons, W.H.; Grennlee, W.J.; Patchett, A.A. *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 2692-2701.

³¹ a) Darnbrough, S.; Mervic, M.; Condon, S. M.; Burns, C. *J. Synth. Commun.* **2001**, *31*, 3273-3280.

b) Schlosser, M.; Heiss, C.; Marzi, E.; Scopelliti, R. *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, *19*, 4398-4404.

sodium **6b** par ses carboxylates de lithium, de potassium ou de césium correspondants n'a pas empêché la formation de la lactone **5b**. Ceci peut s'expliquer par la participation du proton acide, lié à l'atome d'azote portant le groupement Boc. La formation d'une liaison hydrogène entre le groupement carbonyle et ce proton augmenterait l'électrophilie de cet ester, et favoriserait, de ce fait, l'attaque intramoléculaire de la fonction alcool (Schéma 23).

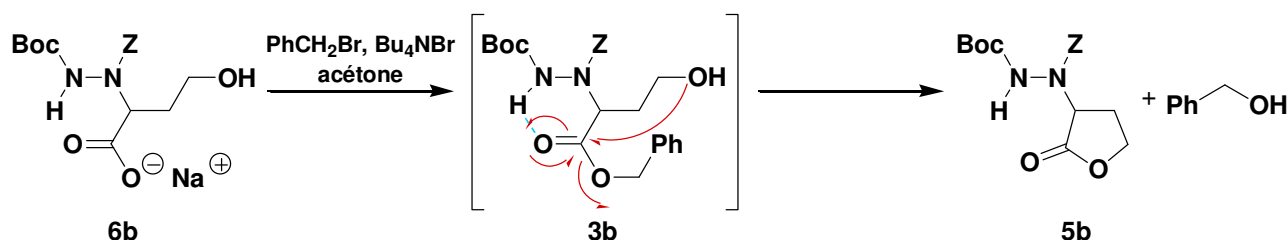


Schéma 23 : Mécanisme réactionnel possible de la cyclisation intramoléculaire de l'ester **3b**

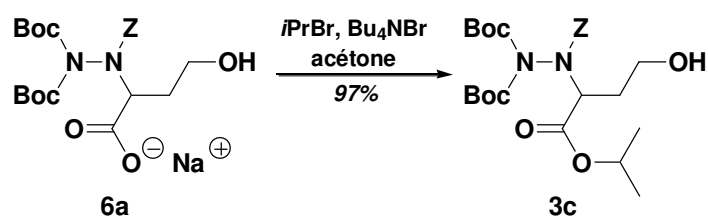
III.2.3.3 Synthèse de l'ester *isopropylique* **3d**

Afin d'éviter la réaction de cyclisation intramoléculaire observée avec les esters de benzyle **3a** et **3b**, la synthèse d'un autre ester comportant un groupement plus encombré a été envisagée. Cet encombrement permettrait de rendre moins accessible le groupement carbonyle à l'attaque du groupement hydroxyle (Schéma 23). L'insertion du groupement *tert*butylique n'a pas été retenue, malgré les méthodes d'estérifications dans des conditions douces à partir d'halogénures de *tert*butyle récemment décrites.³² En effet, même si les esters *tert*butyliques peuvent être sélectivement hydrolysés en présence d'un groupement Boc,³³ il n'y a aucune certitude à ce que ces conditions puissent être appliquées à la δ -azaproline. Le groupement *isopropyle* a donc été sélectionné.

La mise au point de l'estérification avec du bromure d'*isopropyle* a tout d'abord été effectuée à partir du carboxylate **6a**. Celui-ci a été mis en présence de bromure d'*isopropyle* (1,2 éq) et d'une quantité catalytique de bromure de tétrabutylammonium à reflux d'acétone pour former l'ester *isopropylique* **3c** avec un rendement de 11%. La quantité de bromure d'*isopropyle* a été augmentée à 3 puis 6 équivalents, permettant d'atteindre 97% de rendement (Schéma 24).

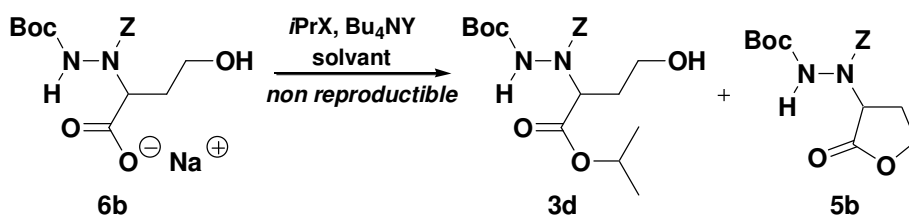
32 a) Chevallet, P.; Garrouste, P.; Malawska, B.; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7409-7412. **b)** McNulty, J.; Cheekoori, S.; Nair, J. J.; Larichev, V.; Capretta, A.; Robertson, A. J. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3641-3644.

33 a) Wu, Y.-q.; Limburg, D. C.; Wilkinson, D. E.; Vaal, M. J.; Hamilton, G. S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2847-2849. **b)** Kaul, R.; Brouillette, Y.; Sajjadi, Z.; Hansford, K. A.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6131-6133. **c)** Yadav, J. S.; E. Balanarsaiah, E.; S. Raghavendra, S.; Satyanarayana, M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4921-4924.

Schéma 24 : Synthèse de l'ester *isopropylique* 3c

Comme dans le cas de l'ester **3b**, la monodéprotection de l'ester **3c** a été tentée en présence d'une quantité catalytique de perchlorate de magnésium dans l'acétonitrile (conditions utilisées pour former la lactone **5b**) et en milieu basique à reflux du méthanol. Ces deux essais se sont soldés par des échecs : le produit de départ **3c** ne réagit pas dans ces conditions.

Les conditions d'estérification ayant permis la formation de l'ester **3c** ont, cette fois, été utilisées pour générer l'ester **3d**. La réaction conduit dans certains cas à l'ester **3d** mais celle-ci n'est cependant pas reproductible et peut générer également de façon majoritaire la lactone **5b**. L'utilisation d'iodure d'*isopropyle* et du fluorure de tétrabutylammonium dans le THF à 50°C a conduit aux mêmes résultats (Schéma 25).³⁴

Schéma 25 : Synthèse de l'ester *isopropylique* 3d

Une étude systématique a été réalisée afin de définir les conditions optimales de formation du composé **3d**. Les réactions d'estérification ont d'abord été réalisées à plusieurs températures, en présence de bromure d'*isopropyle* dans l'acétone, avec ou sans eau ou DMSO, puis en présence d'iodure d'*isopropyle* dans le THF. L'eau et le DMSO permettent de rompre des liaisons hydrogène intramoléculaires, comme celles supposées s'établir au sein de l'ester **3d**, qui favorise la formation de la lactone **5b**. La présence de ces solvants permettrait d'éviter cette cyclisation intramoléculaire (Schéma 17). Les résultats de cette étude sont reportés dans le tableau 2.

³⁴ Wu, C.Y.; Brik, A.; Wang, S.K.; Chen, Y.H.; Wong, C.H. *ChemBioChem* **2005**, 6, 2176-2180.

<i>i</i> PrX (ég)	Bu ₄ NY (ég)	Solvant	T (°C)	t (j)	Rdt 5b (%)	Rdt 3d (%)
Br (6)	Br (0,05)	acétone	60	2	67	/
			40	3	50	/
			30	3	/	49
		acétone + 1% H ₂ O	40	3	50	/
			30	3	/	43
		acétone + 5% DMSO	40	3	15	16
			30	3	/	/
I (1,2)	F (1,2)	THF	55	1	64	36
			30	3	/	100
			20	4	/	71

Tableau 2 : Conditions et rendements de la réaction d'estérification de 6b

Il découle de cette étude que toutes les réactions réalisées à plus de 40°C conduisent majoritairement à la formation de la lactone **5b**. Les résultats obtenus montrent également que la présence d'eau ou de DMSO ne semble pas favoriser la formation de **3d**, alors que l'emploi de bromure d'*isopropyle* dans l'acétone à 30°C, sans ajout d'autre solvant, a permis d'obtenir l'ester **3d** seul avec un rendement de 49%.

En conclusion, les meilleures conditions pour réaliser cette étape d'estérification nécessitent l'utilisation de l'iodure d'*isopropyle* dans le THF anhydre à 30°C et en présence de fluorure de tétrabutylammonium. Ce protocole permet d'obtenir l'ester **3d** seul avec un rendement quantitatif.

III.2.3.4 Réaction de Mitsunobu intramoléculaire

La dernière étape envisagée pour l'obtention de la δ -azaproline orthogonalement protégée consiste en une cyclisation *via* une réaction de Mitsunobu intramoléculaire entre la fonction hydroxyle et le groupement NH de l'ester **3d**.

Comme démontré précédemment, l'introduction d'une fonction hydrazine sur une molécule, *via* une réaction de Mitsunobu intermoléculaire, nécessite l'utilisation d'hydrazine portant trois groupements électroattracteurs contribuant à augmenter le pKa du proton du groupement NH autour de 11.^{22b} C'est pourquoi, cette réaction s'effectue avec de très bons rendements quand les *N*-alkoxy- ou benzyloxy-carbonylaminophthalimides sont utilisés en tant que partenaire acide. Au contraire, aucune réaction n'a lieu lorsque seulement deux groupements

électroattracteurs sont présents sur le partenaire hydrazine acide. Toutefois, les réactions intramoléculaires se font généralement plus facilement que les réactions intermoléculaires, la réaction de Mitsunobu réalisée dans ces conditions peut permettre la cyclisation de l'ester **3d**, comme cela l'a déjà été décrit dans la littérature.³⁵ En tenant compte de ce résultat, il a semblé que seule la présence des deux groupements électroattracteurs, Z et Boc, était suffisante pour que la réaction de Mitsunobu intramoléculaire sur l'ester *isopropylique* **3d** ait lieu.

La synthèse de la δ -azaproline a été réalisée dans les conditions de Mitsunobu, c'est à dire en présence de triphénylphosphine et de dialkylazodicarboxylate comme activant dans le THF. La nature de l'agent activant, ainsi que le nombre d'équivalents utilisés ont été modifiés afin d'optimiser les conditions de synthèse (Schéma 26).

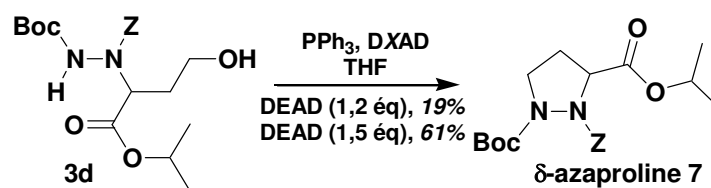


Schéma 26 : Synthèse de la δ -azaproline *via* réaction de Mitsunobu intramoléculaire

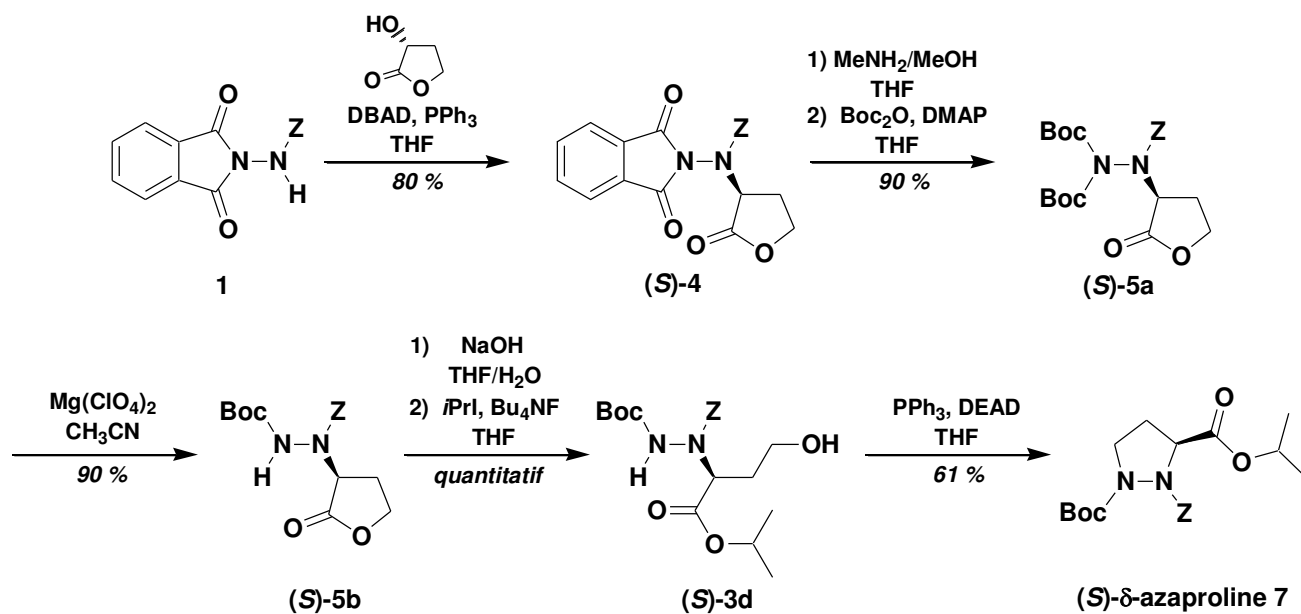
L'utilisation du DBAD n'a pas permis d'obtenir la δ -azaproline **7** pure, inséparable par chromatographie liquide du *di-tert*butyle hydrazodicarboxylate, produit de la réduction du DBAD. Le meilleur rendement de 61% a été obtenu en augmentant la quantité de PPh_3 et de DEAD de 1,2 à 1,5 équivalents, en milieu plus concentré que les conditions de dilution employées pour des réactions intramoléculaires. Il est intéressant de noter que cette réaction peut s'effectuer sur un mélange d'ester **3d** et de lactone **5b**.

III.3 Conclusion

Après avoir mis au point la synthèse de la δ -azaproline en mélange racémique, les différentes étapes ont été effectuées à partir de la (R)- α -hydroxy- γ -butyrolactone. Ainsi, la synthèse de la (S)- δ -azaproline a pu être réalisée avec succès après 6 étapes et avec un bon rendement global de 41% et elle a fait l'objet d'une publication.³⁶ Celle-ci a l'avantage d'être énantiosélective : la configuration absolue des carbones asymétriques est conservée tout au long des étapes de cette synthèse (Schéma 27).

³⁵ Iwagami, H.; Yasuda, N. *Heterocycles* **1990**, *31*, 529-536.

³⁶ Voss, E.; Arrault, A.; Bodiguel, J.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron : Asymmetry*, **2009**, *20*, 1809-1812.

Schéma 27 : Synthèse de la (S)- δ -azaproline

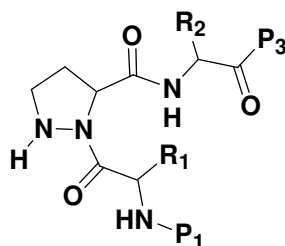
La présence de groupements protecteurs orthogonaux permet d'introduire cet analogue de la proline dans des chaînes peptidiques, que ce soit par l'atome d'azote N^δ ou par l'atome d'azote N^ε, et peut donc conduire à différents types de pseudopeptides.

Plus particulièrement, la (S)- δ -azaproline va être intégrée dans des pseudotripeptides afin de vérifier la stéréochimie de la liaison amide située en amont et de confirmer l'hypothèse établie en introduction.

Chapitre II : Etude de la réactivité de la δ -azaproline et synthèse de pseudotripeptides

I Introduction

La suite des travaux consistait en la synthèse de pseudotriptides de formule P_1 -AA₁- δ -azaPro-AA₃-P₃ afin de réaliser par la suite des études conformationnelles permettant de déterminer la conformation de la liaison AA₁- δ -azaPro (Figure 12).



R = alkyle ou H, P₃ = OR ou NH₂
P₁ = groupement protecteur ou H

Figure 12 : Pseudotriptides de type P-AA₁- δ -azaPro-AA₂-X

Comme la δ -azaproline n'a jamais été incorporée dans des pseudopeptides, il était important de commencer par étudier sa réactivité avant de réaliser la synthèse des pseudotriptides P_1 -AA₁- δ -azaPro-AA₃-P₃, c'est à dire :

- vérifier que les protections Boc, Z et ester *isopropylique* choisies de la δ -azaproline (Schéma 27) peuvent être clivées sélectivement. En effet, la présence des atomes d'azote N^δ et N^ε, s'ils sont déprotégés, peut engendrer des problèmes de régiosélectivité lors d'un couplage peptidique ;
- vérifier que les extrémités C_{term} et N_{term} peuvent être engagées dans des réactions de couplage peptidique.

II Réactivité de la δ -azaproline

Afin de pouvoir étudier la réactivité de la δ -azaproline, chacune de ses extrémités terminales a été libérée de son groupement protecteur puis engagée dans un couplage peptidique avec un dérivé de la phénylalanine. En effet, le choix de cet acide aminé a deux avantages :

- le suivi des réactions par chromatographie sur couche mince et les purifications par CLHP sont facilités grâce à son cycle aromatique détectable sous UV ;
- les signaux des protons observés en RMN se trouvent dans des zones distinctes des protons de la δ -azaproline.

Comme pour la mise au point de la synthèse de la δ -azaproline, cette étude a été réalisée, dans un premier temps, à partir de son mélange racémique avant d'appliquer, dans un second temps, certaines de ces conditions à la (*S*)- δ -azaproline.

II.1 Synthèse de dipeptides de type Phe- δ -azaPro

II.1.1 Déprotections sélectives des groupements Boc et Z de la δ -azaproline

La synthèse des dipeptides de type Phe- δ -azaPro nécessitait au préalable de déprotéger les extrémités N ^{δ} _{term} ou N ^{ϵ} _{term}. Il a fallu tout d'abord s'assurer que les groupements protecteurs employés étaient clivables de façon sélective afin de s'affranchir de tout problème de régiosélectivité lors des couplages peptidiques qui allaient suivre (cf. Introduction Chapitre I, page 17).

Les déprotections des extrémités N ^{δ} et N ^{ϵ} ont été réalisées en utilisant des conditions classiques. Le groupement Boc est clivé en milieu acide avec de l'acide trifluoroacétique en proportion volumique 40/60 dans le dichlorométhane. Le groupement Z, quant à lui, a été réduit par hydrogénolyse en présence d'une quantité catalytique de palladium sur charbon.³⁷ Cette réaction a également été réalisée avec l'assistance de micro-ondes, afin de s'affranchir de l'utilisation d'hydrogène : la réduction se fait à l'aide de 1,4-cyclohexadiène en présence de palladium sur charbon.³⁸ Le gain de temps est alors considérable puisque ces conditions permettent d'effectuer la déprotection en seulement cinq minutes. Pour chaque déprotection, le rendement de réaction est quantitatif et le groupement protecteur non visé s'est avéré stable aux conditions utilisées (Schéma 28).

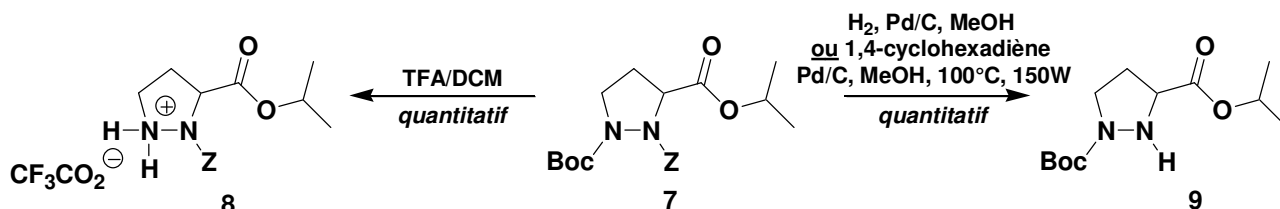


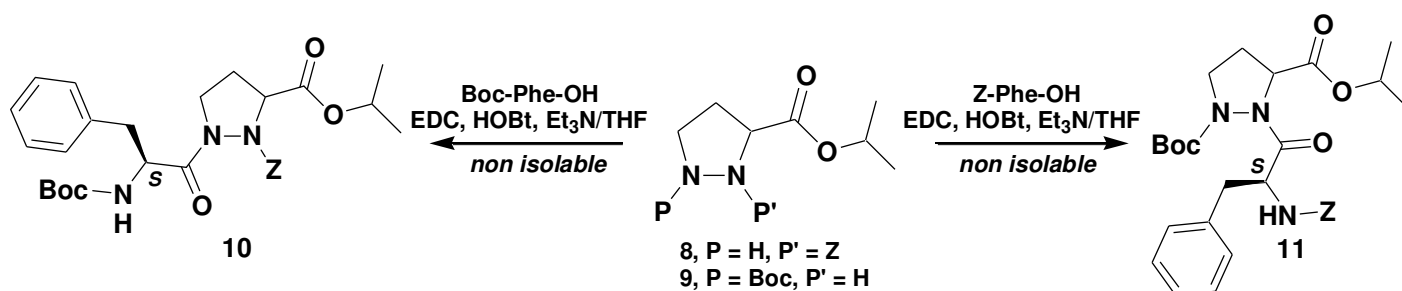
Schéma 28 : Déprotections des groupements Boc et Z de la δ -azaproline

II.1.2 Synthèse des dipeptides Phe- δ -azaPro 10 et 11

Les dipeptides de type Phe- δ -azaPro **10** et **11** ont été obtenus séparément, à partir, respectivement, des δ -azaprolines N-déprotégées **8** (analogue d'un acide β -aminé) et **9** (analogue d'un acide α -aminé), par couplage peptidique classique, en utilisant l'EDC comme agent de couplage. L'urée produite après réaction est soluble en milieux aqueux, ce qui permet de l'éliminer facilement par extraction (Schéma 29).

37 a) Rosenmund, K. W.; Zetsche, F.; Heise, F. *Ber. dtsch. Chem. Ges.* **1921**, *54*, 2038-2042. **b)** Bergmann, M.; Zervas, L. *Ber. dtsch. Chem. Ges.* **1932**, *65*, 1192-1201.

38 Quinn, J. F.; Razzano, D. A.; Golden, K. C.; Gregg, B. T. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6137-6140.

Schéma 29 : Synthèse des dipeptides Phe- δ -azaPro 10 et 11

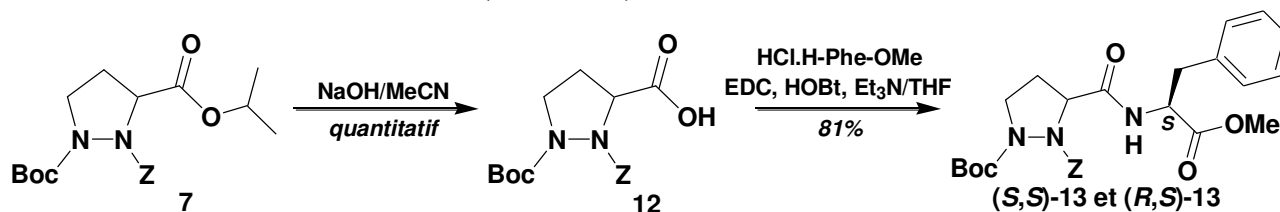
Malheureusement, les pseudodipeptides **10** et **11** se sont avérés difficiles à purifier après lavages et par chromatographie sur colonne ou par CLHP. Leur présence dans le brut réactionnel a néanmoins été validée par RMN, grâce aux corrélations COSY et HSQC observées, et par spectrométrie de masse haute résolution. La formation possible de ces deux pseudopeptides montre cependant que la δ -azaproline pourrait s'intégrer dans une chaîne peptidique en tant qu'analogue d'un acide α -aminé ou β -aminé, et ce, de façon régiosélective.

II.2 Synthèse du dipeptide (*S,S*)- δ -azaPro-Phe

II.2.1 Synthèse du dipeptide (*S,S*)- δ -azaPro-Phe à partir du mélange racémique de la δ -azaproline

Le couplage avec l'ester de la phénylalanine a tout d'abord été réalisé à partir de la δ -azaproline sous sa forme racémique car il peut conduire à la formation de deux diastéréoisomères. Leur séparation permettrait alors d'obtenir le dipeptide (*S,S*)- δ -azaPro-Phe de façon plus économique que le couplage réalisé sur l'énantiomère pur (*S*)- δ -azaproline.

Afin de ne pas cliver le groupement Boc, l'acide **12** a pu être obtenu de façon quantitative après saponification de l'ester isopropylique en présence d'hydroxyde de sodium dans l'acétonitrile. Celui-ci est alors engagé dans un couplage peptidique avec l'ester de la phénylalanine, à l'aide d'EDC, et conduit à un mélange de diastéréoisomères (*S,S*)-**13** et (*R,S*)-**13**, avec un rendement de 81% (Schéma 30).

Schéma 30 : Synthèse des dipeptides (*S,S*)-**13** et (*R,S*)-**13**

La séparation des diastéréoisomères **13** a pu être effectuée après plusieurs chromatographies sur colonne successives. La configuration absolue du C $^{\alpha}$ de la δ -azaproline pour chaque diastéréoisomère n'a pas pu être attribuée par RMN : seules des études par radiocristallographie pourraient permettre cette attribution. Malheureusement, les composés **13** se trouvant sous forme d'huile, leur cristallisation a été impossible à réaliser, malgré plusieurs tentatives. C'est pourquoi la synthèse du dipeptide (*S,S*)-**13** a été tentée dans les mêmes conditions, à partir de l'énantiomère pur (*S*)- δ -azaproline.

II.2.2 Synthèse du dipeptide (*S,S*)-**13** à partir de la (*S*)- δ -azaproline

Les mêmes conditions de synthèse des dipeptides **13** appliquées à la (*S*)- δ -azaproline (Schéma 30) ont conduit à la formation du mélange de diastéréoisomères du dipeptide **13**. Ce phénomène s'explique par la racémisation du C $^{\alpha}$ de la δ -azaproline lors de la saponification de l'ester *isopropylique*, vérifiée par comparaison de l' $[\alpha]_D$ du composé **12** mesuré après réaction et l' $[\alpha]_D$ de la (*S*)- δ -azaproline ($[\alpha]_D^{22} = -12.94$, cf. Partie Expérimentale). Cette racémisation peut être due au proton CH $^{\alpha}$ de la δ -azaproline, plus acide que celui d'un acide aminé classique, en raison de l'effet péri des deux atomes d'azote N $^{\delta}$ et N $^{\epsilon}$ et de la proximité des deux groupements électroattracteurs Z et Boc.

D'autres conditions de saponification en milieu basique ont été utilisées, les résultats sont regroupés dans le Tableau 3. Après réaction, les $[\alpha]_D$ de l'acide **12** isolé sont mesurés puis l'acide est engagé dans le couplage peptidique afin de confirmer ou d'infirmer la racémisation du C $^{\alpha}$ de la δ -azaproline.

Réactifs	Solvant	Rendement après saponification (%)	$[\alpha]_D^{22}$ après saponification	Racémisation du C $^{\alpha}$
NaOH 1M (2 éq.)	MeCN	100	+0,66	oui
NaOH 1M (1 éq.)	MeCN	54	+0,05	oui
LiOH anhydre (2 éq.)	THF / MeOH	/	/	/
LiBr (10 éq.)/Et $_3$ N (3 éq.)	MeCN / H $_2$ O	63	non mesuré	oui

Tableau 3 : Saponification de l'ester *isopropylique* de la (*S*)- δ -azaproline

Dans les conditions précédentes, deux équivalents d'hydroxyde de sodium étaient utilisés. Cette quantité a été abaissée à un équivalent : le rendement de la réaction s'est trouvé diminué de moitié et la racémisation du C $^{\alpha}$ de la δ -azaproline a également été observée. L'hydroxyde de

sodium a ensuite été remplacé par de l'hydroxyde de lithium, base plus douce, mais dans ce cas, aucune trace de l'acide **12** n'a été détectée en RMN : il semblerait que ces conditions dégradent la δ -azaproline. Enfin, des conditions d'hydrolyse plus douces à l'aide de sel de lithium ont été testées,³⁹ mais encore une fois, le dipeptide **13** est obtenu sous forme de mélange de deux diastéréoisomères après couplage peptidique. Il s'avère donc que les milieux basiques favorisent la racémisation du C $^{\alpha}$ de la δ -azaproline et il est nécessaire de trouver une autre voie de synthèse pour conduire directement au dipeptide (*S,S*)-**13**.

II.2.3 Synthèse du dipeptide (*S,S*)-**13** par ouverture de la lactone (*S*)-**5b**

Il a été montré précédemment que les méthodes de synthèse utilisées pour former l'ester *isopropylique* **3d**, par ouverture de la lactone (*S*)-**5b**, et la δ -azaproline, par réaction de Mitsunobu intramoléculaire, ne conduisaient pas à la racémisation du C $^{\alpha}$ (voir Schéma 27, page 38). Ces conditions pourraient être appliquées à la synthèse du dipeptide (*S,S*)-**13**. En effet, si l'ouverture de la lactone **5b** est possible par l'ion hydroxyde, celle-ci peut également l'être par d'autres nucléophiles comme les amines. Il serait alors aisé de former le dipeptide **13** souhaité après ouverture de la lactone par la phénylalanine et après réaction de Mitsunobu intramoléculaire du pseudodipeptide formé (Schéma 31).

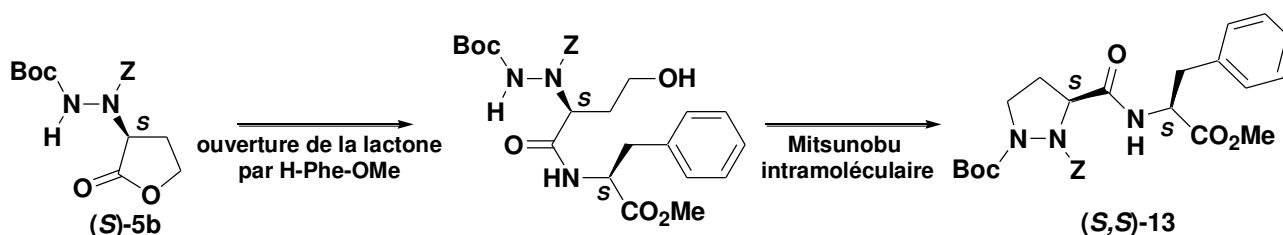


Schéma 31 : Synthèse du dipeptide (*S,S*)-**13** par ouverture de la lactone (*S*)-**5b** par la phénylalanine

II.2.3.1 Ouverture de la lactone **5b** par la phénylalanine

Plusieurs conditions d'ouverture ont été utilisées sur le mélange racémique de la lactone **5b**. La première méthode envisagée consistait à réaliser un couplage peptidique entre le carboxylate de sodium **6b** (voir Schéma 20, page 30) et l'ester de la phénylalanine à l'aide d'EDC. Mais l'activation de l'extrémité C_{term} augmente la réactivité de cette position et favorise la réaction de cyclisation intramoléculaire observée sur l'ester **3b**, conduisant à la formation quantitative de la lactone **5b** (Schéma 23, page 32).

³⁹ Ganellin, C. R.; Bishop, P. B.; Bambal, R. B.; Chan, S. M. T.; Leblond, B.; Moore, A. N. J.; Zhao, L.; Bourgeat, P.; Rose, C.; Vargas, F.; Schwartz, J.-C. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7333-7342.

Les autres méthodes testées ont donc consisté à utiliser la phénylalanine en tant que nucléophile pour attaquer l'atome de carbone de la fonction carbonyle de la lactone **5b**, permettant ainsi l'ouverture irréversible du cycle.

L'aminolyse de lactones, qui pourrait sembler de premier abord assez aisée, nécessite généralement de hautes températures ou l'emploi de métaux alcalins en tant que catalyseur.⁴⁰ Grâce aux résultats obtenus par l'équipe de Xu, cette réaction peut désormais se faire dans des conditions plus douces, en utilisant le 2-éthylhexanoate de sodium (NaEH), base soluble dans les solvants organiques et jouant également le rôle de catalyseur.⁴¹ Ces conditions ont été appliquées à l'ouverture de la lactone **5b** (Schéma 32).

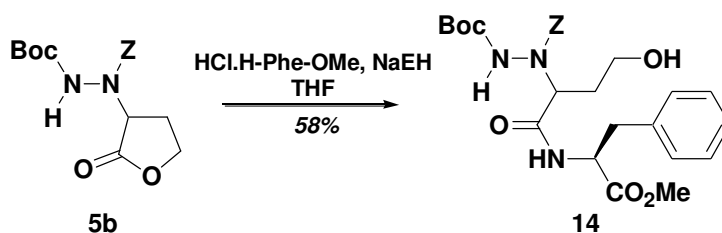


Schéma 32 : Ouverture de la lactone **5b** par la phénylalanine

L'emploi de cette base à température ambiante n'a pas permis l'ouverture de la lactone **5b**. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la phénylalanine est moins nucléophile que l'amine primaire qu'emploie l'équipe de Xu. Il a été nécessaire de chauffer le milieu réactionnel à reflux afin d'observer la formation du pseudodipeptide **14**, avec un rendement satisfaisant de 58%. Ce résultat est à comparer avec celui décrit par l'équipe de Hénichart pour l'ouverture de la valérolactone et de la 2-phthalimidobutyrolactone par la phénylalanine.⁴² Ces conditions ont été utilisées pour former directement l'ester *isopropylique* **3d** à partir de la lactone **5b** et l'*isopropanol* mais cet essai s'est soldé par un échec.

II.2.3.2 Réaction de Mitsunobu intramoléculaire

La synthèse du dipeptide **13** a été réalisée dans les mêmes conditions que celles de la réaction de Mitsunobu conduisant à la δ -azaproline, à savoir en présence de 1,5 équivalents de triphénylphosphine et de dialkylazodicarboxylate comme activant dans le THF (Schéma 33).

40 a) Fellingner L. L.; Audrieth, L. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 579-581. **b)** Robins, M. J.; Sarker, S.; Xie, M.; Zhang, W.; Peterson, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3921-3924. **c)** Yong, K. W.; Cannon, J. G.; Rose, J. G. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 1791-1794.

41 Liu, W.; Xu, D. D.; Repic, O.; Blacklock, T. J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2439-2441.

42 Gilleron, P.; Millet, R.; Domarkas, J.; Farce, A.; Houssin, R.; Hénichart, J.-P. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 140-146.

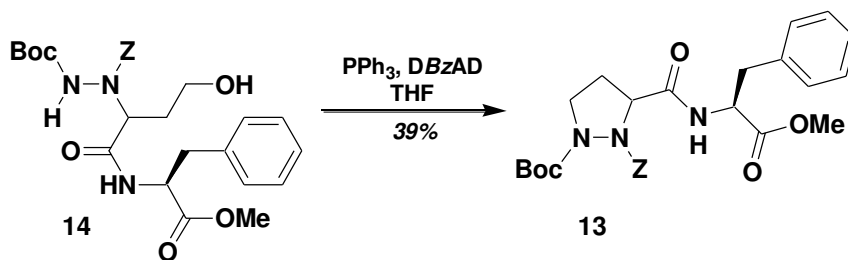


Schéma 33 : Synthèse du dipeptide 13 par réaction de Mitsunobu intramoléculaire

L'utilisation de diéthylazodicarboxylate et de di-*tert*-butylazodicarboxylate n'ont pas permis de former le dipeptide 13. Seul l'emploi du dibenzylazodicarboxylate (DBzAD) a conduit au dipeptide 13, mais avec un rendement faible de 39%.

II.2.3.3 Conclusion

Ce résultat a permis d'identifier le composé (*S,S*)-13 lors de la synthèse effectuée à partir du mélange racémique de la δ -azaproline 12, et la phénylalanine (voie de synthèse présentant un meilleur rendement global), après purification par chromatographie sur colonnes successives.

II.3 Conclusion

L'étude de la réactivité de la δ -azaproline a permis de montrer que les protections des extrémités C_{term} , N^{δ} et N^{ϵ} peuvent être clivées de façon sélective. La δ -azaproline a pu être intégrée dans une chaîne peptidique soit par son extrémité N^{ϵ} , soit par son extrémité N^{δ} , formant ainsi des analogues d' α - ou de β -peptides.

Malheureusement, l'utilisation de la δ -azaproline sous sa forme énantiomériquement pure n'est pas pertinente en raison de la racémisation du C^{α} en milieu basique. Les pseudopeptides formés lors du couplage entre l'acide 12 généré et un acide aminé chiral se trouvent alors en mélange de diastéréoisomères et doivent être séparés au cours de la synthèse peptidique. L'utilisation de la δ -azaproline sous sa forme racémique sera privilégiée pour la suite des travaux.

III Synthèse des pseudotriptides P_1 -AA₁- δ -azaPro-AA₃-P₃

III.1 Introduction : choix des pseudotriptides à synthétiser

A partir des résultats obtenus lors de l'étude de la réactivité de la δ -azaproline, la synthèse des pseudotriptides P_1 -AA₁- δ -azaPro-AA₃-P₃ a été envisagée. La stratégie retenue consiste à déprotéger l'extrémité C_{term} de la δ -azaproline, puis à coupler l'acide 12 formé avec l'acide aminé

AA₃, pour obtenir le dipeptide dont l'extrémité C_{term} est sous forme ester méthylique. L'extrémité N_{term} du dipeptide généré est déprotégée et l'amine est ensuite couplée avec l'acide aminé AA₁ dont l'extrémité N_{term} est protégée par un groupement Z. Les pseudotriptides formés restent alors orthogonalement protégés (Schéma 34).

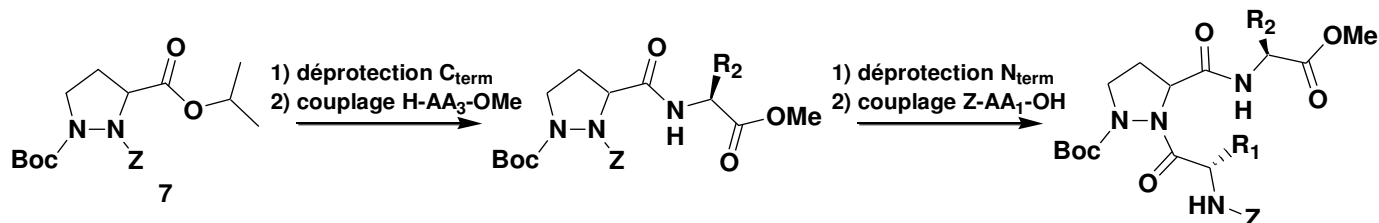


Schéma 34 : Stratégie de synthèse des pseudotriptides P₁-AA₁- δ -azaPro-AA₃-P₃

Dès lors, la question du choix des acides aminés à utiliser pour réaliser les couplages s'est posée. Comme la δ -azaproline est utilisée sous forme racémique, le choix d'un acide α -aminé AA₃ chiral, permettant de former des diastéréoisomères potentiellement isolables, a été privilégié dans un premier temps. D'abord, le choix s'est porté naturellement sur la phénylalanine, puisque les pseudodipeptides formés permettraient de synthétiser le substrat **A** (cf. Introduction Générale), puis sur l'alanine, afin de déterminer si les diastéréoisomères formés sont plus facilement séparables que les pseudodipeptides **13**. Dans un second temps, l'utilisation de la glycine (seul acide aminé achiral) a été envisagée, puisque le dipeptide serait cette fois obtenu en mélange racémique, ce qui permet de s'affranchir de la résolution diastéréoisomérique des dipeptides et de faciliter la cristallisation des pseudotriptides synthétisés. La méthode de couplage utilisée entre l'acide **12** et ces acides α aminés a été celle mettant en jeu l'EDC (Schéma 35).

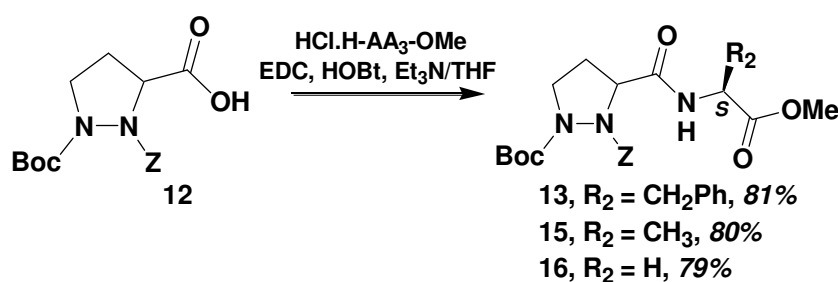


Schéma 35 : Synthèse des dipeptides δ -azaPro-AA₃

Les composés **13**, **15** et **16** ont été obtenus avec de bons rendements du même ordre de grandeur selon l'acide aminé employé. La synthèse des pseudotriptides a toutefois été réalisée à partir des dipeptides **13** et **16** car les diastéréoisomères δ -azaPro-Ala n'ont pas pu être séparés, même après plusieurs colonnes chromatographiques successives. Le choix des acides aminés AA₁ a été plus aisé : dans le cas du dipeptide δ -azaPro-Phe, l'acide aminé AA₁ choisi a été l'alanine, puisque le pseudotriptide formé est un précurseur dans la synthèse du substrat **A** ; dans le cas

du dipeptide δ -azaPro-Gly, l'acide aminé AA₁ choisi a été de nouveau la glycine, afin de former un mélange racémique de pseudotriptides (Figure 13).

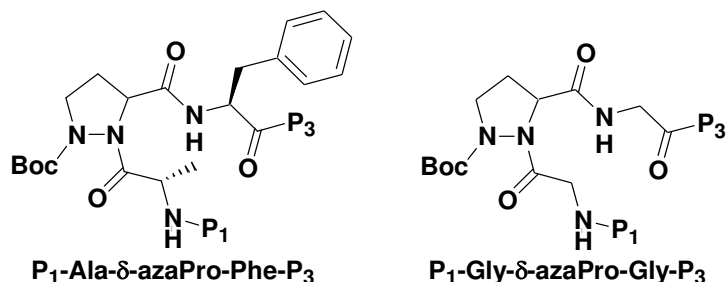


Figure 13 : Formule des pseudotriptides à synthétiser

III.2 Synthèse des pseudotriptides

La synthèse des pseudotriptides désirés peut être réalisée après déprotection de l'extrémité N ^{δ} _{term} des dipeptides **13** et **16** obtenus et couplage peptidique avec l'acide aminé AA₁.

III.2.1 Déprotection de l'extrémité N ^{δ} _{term} des dipeptides Z- δ -azaPro-AA₃-OMe

La protection Z de l'atome d'azote N ^{δ} a tout d'abord été clivée. Deux méthodes présentant des rendements quantitatifs ont été utilisées :

- l'hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon ;
- la déprotection assistée par micro-ondes en présence de 1,4-cyclohexadiène et catalysée par du palladium sur charbon (Schéma 36).³⁸

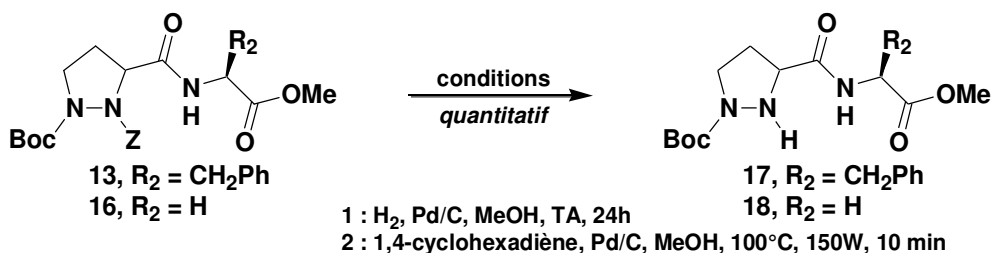


Schéma 36 : Déprotection du groupement Z des dipeptides **13** et **16**

La méthode de déprotection retenue a été celle assistée aux micro-ondes puisque les dipeptides **17** et **18** peuvent être quantitativement générés en 10 minutes, contrairement à 24 heures lors d'une hydrogénation catalytique classique.

III.2.2 Couplage peptidique entre les dipeptides déprotégés 17/18 et Z-AA₁-OH

La formation des triptides par couplage peptidique à partir des dipeptides **10** et **11** semble plus délicate que cette même réaction réalisée avec un dipeptide de type Pro-AA. En effet, l'atome d'azote N⁶ de ce dérivé d'hydrazine cyclique est moins réactif que l'atome d'azote N⁶ de la proline naturelle, du fait de la présence du groupement électroattracteur Boc sur l'atome d'azote N⁵, rendant le site de réaction plus encombré : l'insertion d'un acide aminé s'avère donc plus difficile. En effet, la δ -azaproline est ici engagée en tant que dérivé d'un carbazate et plusieurs équipes de recherche ont montré que la réaction de couplage entre un carbazate et un acide aminé N-protégé nécessitait des activations relativement fortes.⁴³

C'est pourquoi, une étude systématique du couplage peptidique entre les dipeptides **17** et **18** et les acides aminés Z-AA₁-OH a dû être conduite, afin de trouver l'agent de couplage permettant l'obtention des pseudotriptides avec le meilleur rendement possible.

Les agents utilisés sont décrits ci-dessous :

- l'EDC (1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide),⁴⁴ permet de s'affranchir de l'utilisation de la dicyclohexylcarbodiimide (DCC),⁴⁵ car présente l'avantage de se transformer en urée soluble dans l'eau et facilement éliminée par lavages aqueux ;

- le PyBOP (hexafluorophosphate de benzotriazolyl-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium),⁴⁶ est une alternative du réactif de Castro, l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium (BOP),⁴⁷ car son utilisation pour un usage thérapeutique est totalement proscrite : de l'hexaméthylphosphorotriamide (HMPT) cancérigène est libéré au cours du couplage. Le PyBOP, dont la réactivité est comparable, génère lui un sous-produit beaucoup moins toxique, la 1,1',1''-phosphorylpyrrolidine ;

- le chlorure de cyanuryle,⁴⁸

- le TBTU (tetrafluoroborate de O-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium)⁴⁹ et l'HATU (fluorophosphate de O-(1H-azatriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetra-methyluronium),⁵⁰ utilisé

43 a) Kim, H.-O.; Gardner, B.; Kahn, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6013-6016. **b)** Ciufolini, M. A.; Xi, N. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2320-2321. **c)** Boger, D. L.; Schüle, G. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6421-6424. **d)** Liu, F.; Stephen, A. G.; Adamson, C. S.; Gousset, K.; Aman, M. J.; Freed, E. O.; Fisher, R. J.; Burke, T. R. Jr. *Organic Lett.* **2006**, 8, 5165-5168. **e)** Li, W.; Gan, J.; Ma, D. *Organic Lett.* **2009**, 11, 5694-5697.

44 Kimura, T.; Takai, M.; Masui, Y.; Morikawa, T.; Sakakibara, S. *Biopolymers* **1981**, 20, 1823-1832.

45 Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067-1068.

46 a) Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205-208. **b)** Wang, W.; McMurray, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2501-2504.

47 Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, 1219-1222.

48 Giacomelli, G.; Porcheddu, A.; Salaris, M. *Organic Lett.* **2003**, 5, 2715-2717.

49 Pettit, G. R.; Taylor, S. R. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2322-2325.

dans le cas des couplages stériquement encombrés. Ces méthodes ont l'avantage d'être très faciles à mettre en œuvre, sans nécessiter de précautions particulières et génèrent des produits bruts avec de bons rendements, facilement purifiables par lavages aqueux.

- l'ester *N*-hydroxysuccinimique de la glycine (méthode aux esters activés) ;⁵¹
- les fluorures des acides aminés AA₁, préparés en utilisant le fluorure de cyanuryle⁵² ou l'hexafluorophosphate de *N,N,N'',N''*-tétraméthyl-formamidinium (TFFH),⁵³ ont pu être engagés dans la réaction de couplage. Il est à noter que les chlorures des acides aminés AA₁ n'ont pas pu être utilisés puisque leur formation nécessite l'emploi de chlorure de thionyle, incompatible avec la protection Z de leur extrémité N_{term}.⁵⁴ En effet, les chlorures d'acide correspondants ne sont pas stables et se transforment en leurs anhydrides de Leuch.^{52b-54c}

Les résultats de cette étude sont reportés dans le tableau 4 (Schéma 37).

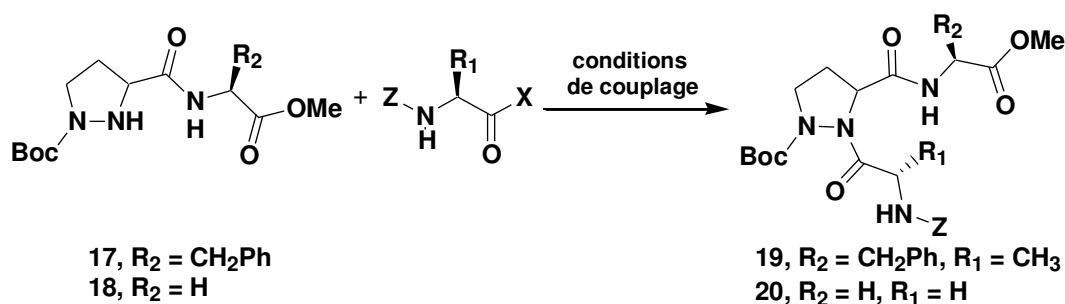


Schéma 37 : Couplage peptidique à partir des dipeptides 17 et 18

50 a) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398. **b)** Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.

51 Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3039-3039.

52 a) Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Chao, H. G.; DeSelms, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9651-9652. **b)** Carpino, L. A.; Mansour, E.-S. M. E.; Sadat-Aalae, D. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2611-2614.

53 Carpino, L. A.; El-Faham, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5401-5402.

54 a) Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Sadat-Aalae, S. Y.; Tien, J. H.; Langridge, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3732-3734. **b)** Beyermann, M.; Bienert, M.; Niedrich, H.; Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, S. Y. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 721-728. **c)** Carpino, L. A.; Ionescu, D.; El-Faham, A.; Henklein, P.; Wenschuh, H.; Bienert, M.; Beyermann, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 241-244.

R ₂	R ₁	X	Conditions de couplage	T (°C)	P (W)	t	Rdt(%)
CH ₂ Ph	CH ₃	OH	EDC/HOBt/Et ₃ N/THF	TA	/	24h	/ ^a
				75	50	3 x 10 min	
			TBTU/HOBt/Et ₃ N/THF	TA	/	24h	
			PyBOP/Et ₃ N/THF				
			C ₃ N ₃ Cl ₃ /NMM/DMAP/THF				
		F	NaHCO ₃ /DCM/H ₂ O			27 ^{b,c}	
H	H	OSu	Et ₃ N/DCM	TA	/	24h	/ ^a
		OH	HATU/Et ₃ N/DMF	TA	/	4h	36 ^b
				75	50	3 x 5 min	40 ^b
		F	NaHCO ₃ /DCM/H ₂ O	TA	/	24h	48 ^b

(a) aucune formation des tripeptides n'a été observée en CCM

(b) rendements calculés à partir des dipeptides de départ

(c) formation de deux mélanges de deux diastéréoisomères

Tableau 4 : Conditions et rendements du couplage peptidique entre 17/18 et Z-AA₁-OH

Lors de cette étude, les méthodes fréquemment utilisées dans la littérature pour la synthèse de peptides se sont révélées infructueuses, que ce soit l'utilisation des esters activés (OSu), des carbodiimides (EDC à TA ou assisté par micro-ondes), des sels de phosphonium et d'uronium (PyBOP, TBTU). De même, la réaction en présence de chlorure de cyanuryle n'a pas permis d'aboutir aux pseudotripeptides attendus.

Il apparaît au travers de cette étude que le rendement de la réaction varie sensiblement en fonction de la nature de l'agent de couplage utilisé. L'essai avec le fluorure d'acide Z-Ala-F conduit à la formation d'un mélange de quatre diastéréoisomères **19** difficilement séparables. Ce résultat peut être expliqué par la racémisation du fluorure d'acide qui peut avoir lieu lors du couplage, générant ainsi un mélange Z-(R)-Ala-(S+R)- δ -azaPro-Phe-OMe (6% de rendement) et un mélange Z-Ala-(S+R)- δ -azaPro-Phe-OMe (21% de rendement). Cette hypothèse peut être confirmée par le fait qu'aucune racémisation de la phénylalanine n'a été observée lors du premier couplage peptidique de la synthèse.

Au vu du mauvais résultat concernant la formation des tripeptides Z-Ala-(S+R)- δ -azaPro-Phe-OMe **19**, la suite de l'étude s'est concentrée sur la synthèse des pseudotripeptides Z-Gly-(S+R)- δ -azaPro-Gly-OMe **20**. L'utilisation du fluorure d'acide Z-Gly-F permet d'obtenir de façon

non reproductible les pseudotriptides **20** avec, dans le meilleur des cas, un rendement de 48%. La solution envisagée a été de réaliser le couplage peptidique en présence du sel d'uronium HATU à température ambiante en 4 heures ou assistée par micro-ondes. Cette méthode, reproductible, conduit à la formation du tripeptide **20** avec des rendements satisfaisants de 36% et 40% respectivement.

III.2.3 Réaction parasite

Au cours des deux étapes de synthèse des pseudotriptides **19** et **20**, la formation de pyrazolines **21** et **22** non désirées a été observée. Ces composés seraient issus de l'oxydation spontanée des dipeptides **17** et **18** qui débute après quelques heures à température ambiante et qui est totale en 48 heures. Aucun doute ne peut être établi quant à la position de la double liaison au sein du cycle puisque ses deux groupements CH_2 ainsi que la disparition totale du CH^α sont observés en RMN ^1H et ^{13}C (Schéma 38).

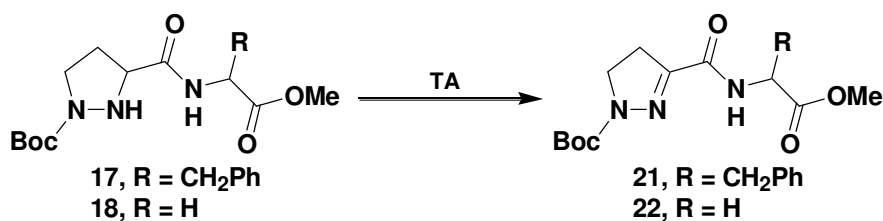


Schéma 38 : Oxydation spontanée des δ -azaprolines en pyrazolines **21** et **22**

Cette oxydation spontanée a rarement été notée : seule deux équipes ont déjà décrit ce phénomène. La première, l'équipe de Tiecco, observe la formation de trois composés, chacun isolable, lorsque des *N*-allylhydrazines sont mises en présence de sulfate de phénylsélényle.⁵⁵ Deux d'entre-eux s'avèrent être une pyrazolidine et une pyrazoline. La deuxième équipe, celle de Paulmier, a repris ces travaux et constate la formation exclusive de pyrazoline (Schéma 39).⁵⁶

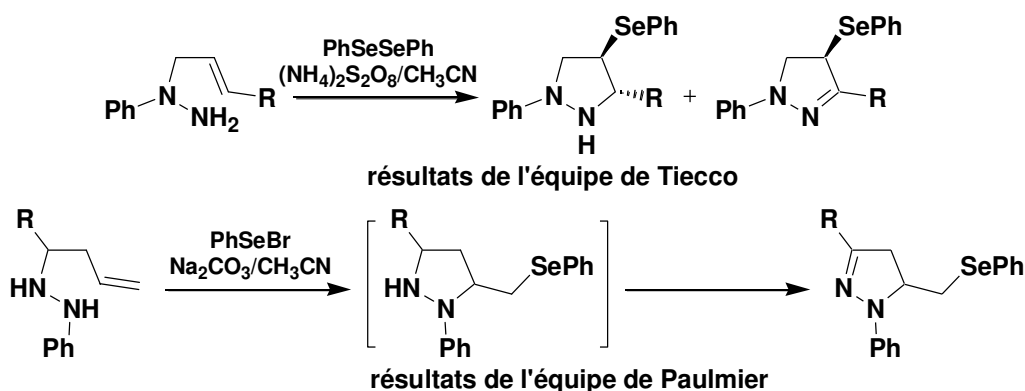
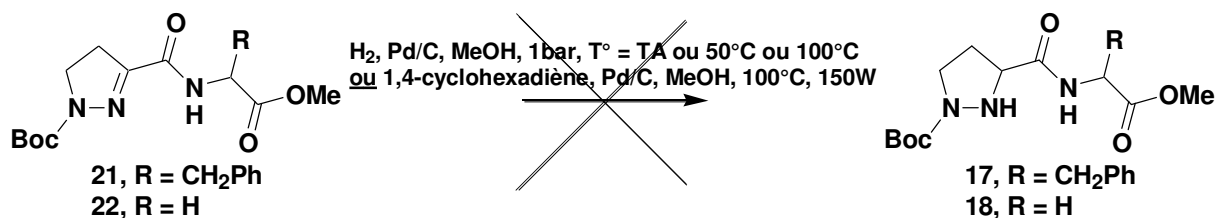


Schéma 39 : Formation de pyrazolines à partir de pyrazolidines

⁵⁵ Tiecco, M.; Testaferri, L.; Marine, F. *Tetrahedron*, **1997**, 53, 4441-4446.

⁵⁶ Ternon, M.; Outurquin, F.; Paulmier, C. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 10259-10270.

Dans le cas des pyrazolines **21** et **22**, les tentatives de réduction de leur double liaison N=C montrent que ces composés sont très stables, puisque cette liaison n'est pas réduite en présence de dihydrogène dans les conditions normales ou à des températures supérieures (obtenues à l'aide d'un générateur à dihydrogène), ou dans les conditions de déprotection de groupements Z assistées par micro-ondes (Schéma 40).

Schéma 40 : Essais de réduction des pyrazolines **21** et **22**

Afin de minimiser cette réaction d'oxydation secondaire, les réactions de couplage sur les dipeptides **17** et **18** ont eu directement lieu après la déprotection du groupement Z des dipeptides **13** et **16**, et sous courant d'azote. Ces précautions ne se sont pas avérées suffisantes puisque les pyrazolines **21** et **22** ont été formées, limitant le rendement de synthèse des pseudotriptides **19** et **20**.

III.2.4 Synthèse des pseudotriptides Z-AA₁- δ -azaPro-AA₃-NH₂

Afin de réaliser des études structurales sur les pseudotriptides **19** et **20**, ceux-ci ont été transformés afin de mimer un pseudo-peptide plus long. La fonction ester de l'extrémité C_{term} doit tout d'abord être remplacée par une fonction amide primaire, mimant une liaison peptidique avec un acide aminé AA₄. De plus, afin de vérifier l'établissement éventuel d'une liaison hydrogène entre l'atome d'hydrogène du groupement N ^{δ} -H de la δ -azaproline et l'atome d'oxygène de la liaison AA₁- δ -azaPro (cf. Introduction Générale), la protection Boc de l'extrémité N ^{δ} doit être éliminée.

III.2.4.1 Formation de la liaison amide en extrémité C_{term} des pseudotriptides

Une méthode simple et directe de transformation d'une fonction ester en fonction amide a été utilisée sur le tripeptide **20**. Celui-ci est mis en présence d'hydroxyde d'ammonium aqueux dans le toluène ou le THF et conduit à la formation du tripeptide **23** avec un rendement quantitatif (Schéma 41).⁵⁷

⁵⁷ Li, Y. A.; Chalker, J. M.; Floyd, N.; Bernardes, G. J. L.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 9642–9643.

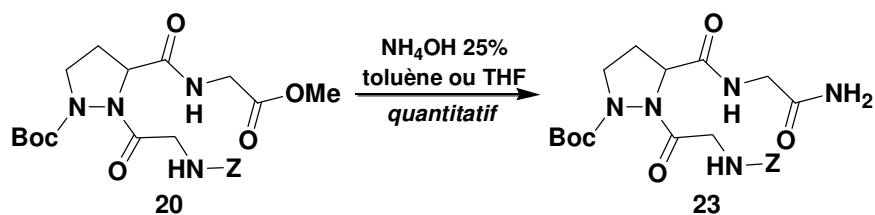


Schéma 41 : Transformation de la fonction ester 20 en fonction amide 23

Ces mêmes conditions, appliquées au tripeptide **19**, n'ont donné lieu à aucune réaction. Le même résultat est obtenu lors de l'emploi d'une solution d'ammoniaque 7N à 40% dans le méthanol,⁵⁸ et peut alors être expliqué par l'inaccessibilité de l'ammoniac à l'extrémité C_{term} du tripeptide **19**. Un dernier essai de transformation, consistant à saponifier l'ester pour obtenir l'extrémité C_{term} du tripeptide **19** sous forme acide, avant de former la fonction amide à l'aide de carbonate d'ammonium en présence de Boc₂O,⁵⁹ s'est également révélé infructueux puisque le tripeptide s'est dégradé lors de l'étape de saponification. Il a donc été impossible d'obtenir l'extrémité C_{term} du tripeptide **19** sous forme amide. La suite de la synthèse a donc été réalisée uniquement à partir du pseudotriptide **23**.

III.2.4.2 Déprotection de l'extrémité N^δ des pseudotriptides

Le clivage de la fonction Boc du pseudotriptide **23** a tout d'abord été tenté dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la δ -azaproline, c'est-à-dire en milieu acide avec une solution de 40% d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. Dans ce cas, la dégradation du tripeptide est observée et aucun des produits formés n'ont pu être identifiés. Plusieurs méthodes ont été testées afin d'éviter cette dégradation et sont reportées dans le tableau 5 (Schéma 42).

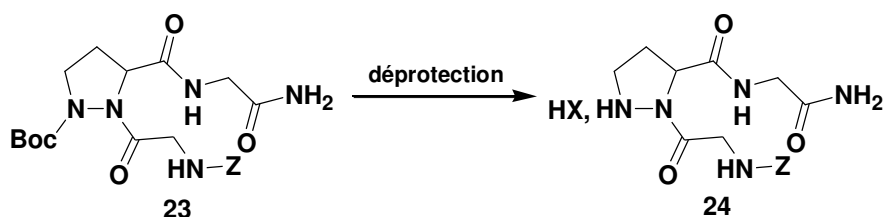


Schéma 42 : Clivage du groupement Boc du tripeptide 23

⁵⁸ Salaün, A. *Thèse d'université : Synthèse et étude conformationnelle des aza- β^3 -peptides et de leurs dérivés macrocycliques* 2005, Université de Rennes 1.

⁵⁹ MacDonald, S. J. F.; Clarke, G. D. E.; Dowle, M. D.; Harrison, L. A.; Hodgson, S. T.; Inglis, G. G. A.; Johnson, M. R.; Shah, P.; Upton, R. J.; Walls, S. B. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5166-5175.

Conditions	Proportions	T (°C)	P (W)	t	HX	Rdt (%)
TFA/DCM	40/60	TA	/	30min	CF ₃ CO ₂ H	/
	15/85	TA	/	2h		100
AcCl/MeOH (25/75)	/	0°C	/	1h	HCl	/
NaHCO ₃ /MeOH	/	70°C	/	4h	/	/
	/	120°C	150	10min		

Tableau 5 : Etude du clivage du groupement Boc du tripeptide 23

La déprotection de l'extrémité N^δ en milieu acide a tout d'abord été tentée à l'aide d'acide trifluoroacétique (40% dans le dichlorométhane) et par l'utilisation du chlorure d'acétyle dans le méthanol. Celui-ci génère *in-situ* de l'acide chlorhydrique permettant d'obtenir le composé N-déprotégé sous forme de chlorure d'ammonium.⁶⁰ Dans le cas du tripeptide 23, une dégradation du produit est observée et les composés générés ont pu être identifiés : la liaison Gly- δ -azaPro a été clivée en libérant la glycine sous forme d'ester méthylique et la pyrazoline 22. Le tripeptide 23 n'est donc pas stable en milieu acide très concentré et il a été nécessaire de trouver des conditions plus douces de déprotection. Parmi les méthodes de déprotection en conditions plus douces décrites dans la littérature,⁶¹ seules celles utilisant l'hydrogénocarbonate de sodium dans le méthanol ont été testées mais sans succès, aussi bien à reflux de méthanol qu'à l'aide de micro-ondes.^{61c} Finalement, l'emploi d'acide trifluoroacétique plus dilué a permis de générer le pseudotriptide N^δ-déprotégé sous forme de trifluoroacétate d'ammonium avec un rendement quantitatif, les proportions volumiques de la solution ayant été réduites de 40 à 15% dans le dichlorométhane. La forme amine du pseudotriptide 24 a pu être obtenue après traitement basique de la forme ammonium.

III.3 Conclusion

La δ -azaproline a pu être intégrée dans des pseudotriptides par synthèse peptidique classique et plusieurs pseudotriptides ont pu être obtenus :

- les pseudotriptides N^δ-protégés Z-Ala-(D+L)- δ -azaPro(Boc)-Phe-OMe 19 et Z-Gly-(D+L)- δ -azaPro(Boc)-Gly-OMe 20,

⁶⁰ Kim, J.; Kim, Y.; Baek, K.; Ko, Y. H.; Kim, D.; Kim, K. *Tetrahedron* **2008**, 64, 8389-8393.

⁶¹ a) Routier, S.; Sauge, L.; Ayerbe, N.; Coudert, G.; Mérour, J.-Y. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 589-591.

b) El Kazzouli, S.; Koubachi, J.; Bertaina-Raboin, S.; Mouaddib, A.; Guillaumet, G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 8575-8577. c) Dandepally, S. R.; Williams, A. L. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 1071-1074.

- le pseudotriptide à extrémité C_{term} amide Z-Gly-(D+L)- δ -azaPro(Boc)-Gly-NH₂ **23**,
- le pseudotriptide N ^{δ} -déprotégé Z-Gly-(D+L)- δ -azaPro-Gly-NH₂ **24**.

Des analyses structurales par RMN, IR et DC vont alors pouvoir être effectuées afin de déterminer la conformation *cis* ou *trans* de la liaison AA₁- δ -azaPro qui s'établit au sein de ces quatre pseudotriptides (Figure 14).

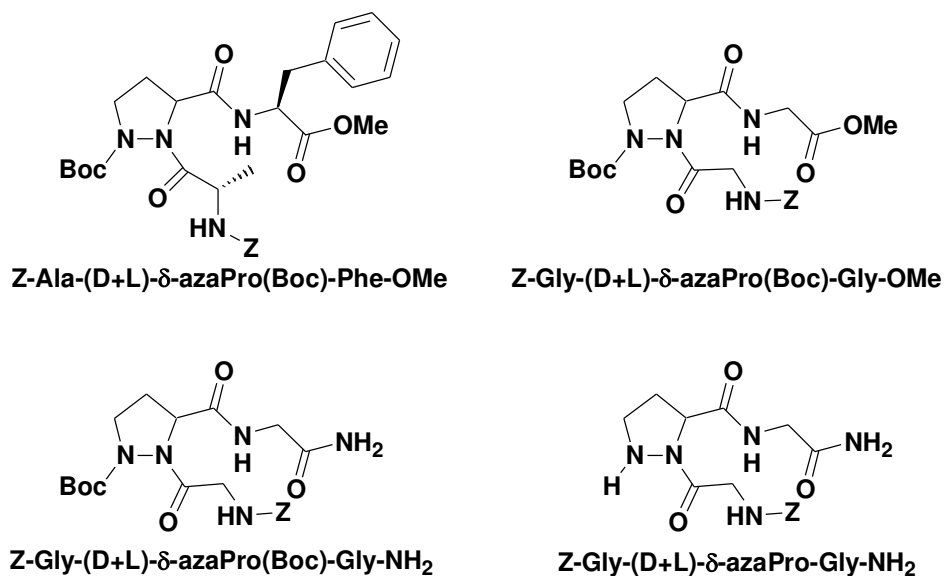


Figure 14 : Structure des quatre pseudotriptides à analyser

Chapitre III : Synthèse de l'acide pyrazolique, étude de sa réactivité et incorporation dans des pseudopeptides

I Introduction

L'obtention de pyrazolines **21** et **22** (Schéma 40, page 50), lors de l'étude de la réactivité de la δ -azaproline, a permis d'orienter la suite des travaux sur la synthèse et l'étude de la réactivité d'un autre analogue bis-azoté de la proline : l'acide pyrazolique, forme totalement oxydée de la δ -azaproline.

Cet hétérocycle aromatique, intégré dans une chaîne peptidique en tant qu'analogue d'acide β -aminé, pourrait permettre d'obtenir des pseudopeptides possédant des propriétés biologiques et/ou physicochimiques et des structurations en solution intéressantes (Figure 15).

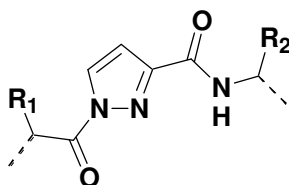


Figure 15 : L'acide pyrazolique intégré dans une chaîne peptidique

I.1 Propriétés biologiques et physicochimiques

En effet, le pyrazole est largement employé depuis de nombreuses années dans la synthèse de nombreux composés aux propriétés variées. Il peut rentrer dans la formulation d'inhibiteurs du virus de l'herpès,⁶² d'analgésiques,⁶³ d'agents anticancéreux⁶⁴ ou anti-HIV,⁶⁵ anti-inflammatoires,⁶⁶ antimicrobiens,⁶⁷ etc. Les dérivés du pyrazole sont également connus pour leur capacité à complexer les métaux de transition : propriété notamment à l'origine de l'activité fongicide et bactéricide de la thiopicolinamide.⁶⁸ De nombreuses recherches ont été effectuées, depuis ces trente dernières années, sur la chimie de coordination des ligands de type pyrazolique. Mukherjee a d'ailleurs publié une revue en 2000, dans laquelle les propriétés physico-chimiques de complexes de coordination sont exposées.⁶⁹ A titre d'exemple d'applications de complexes de pyrazole, les travaux de l'équipe de Bünzli, qui a développé de nouveaux ligands de lanthanides

⁶² Bekhit, A. A.; El-Sayed, O. A.; Aboul-Enein, H. Y.; Siddiqui, Y. M.; Al-Ahdal, M. N. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, 338, 74-77.

⁶³ Erden, B.; Murat, S.; Burcu, C. E.; Sultan, N. B.; Eda, A.; Mustaf, A. *Turk J. Chem.* **2007**, 31, 677-687.

⁶⁴ Leblanc, R.; Dickson, J.; Brown, T.; Stewart, M.; Pati, H. N.; VanDerveer, D.; Arma, H.; Harris, J.; Pennington, W.; Holt, H. L. Jr; Lee, M. *J. Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 6025-6034.

⁶⁵ Liu, X.-Y.; Yan, R.-Z.; Wang, Y.; Zhan, P.; De Clerq, E.; Pannecouque, C.; Witvrouw, M.; Molina, M. T.; Vega, S. *Arch. Pharm.* **2008**, 341, 216-222.

⁶⁶ Trilok, C.; Neha, G.; Suman, L.; Saxena, K. K.; Ashok, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 1772-1776.

⁶⁷ Gouda, M. A.; Berghot, M. A.; Abd El-Ghani, G. E.; Khalil, A. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 1338-1345.

⁶⁸ Morio, K.; Shigeko, N.; Takeo, H. *Takeda Keukyusho Ho* **1973**, 32, 181.

⁶⁹ Mukherjee, R. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 203, 151-218.

composés d'un noyau benzénique et de dérivés acide pyrazolique de formule H_4L (Figure 16), peuvent être cités.⁷⁰

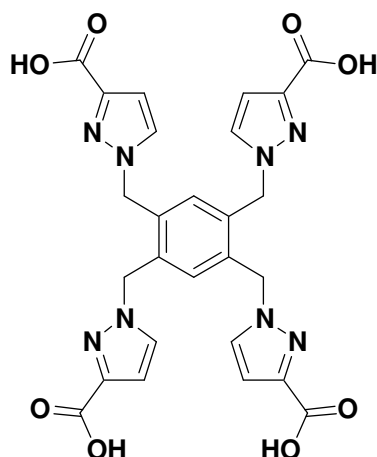


Figure 16 : Formule des ligands H_4L

L'étude de ces complexes de lanthanides a montré que les noyaux pyrazoliques fournissaient une énergie de transfert relativement suffisante vers l'état excité 5D_0 de l'ion europium (+III) et 5D_4 de l'ion terbium (+III). Ces résultats laissent à penser que de telles structures supramoléculaires pourront être utilisées pour la conception, à terme, de nouveaux agents de contraste pour l'IRM et marqueurs luminescents pour l'analyse médicale.

De plus, la présence du doublet non liant de l'atome d'azote hybridé sp^2 lui procure la particularité de pouvoir être donneur de liaison hydrogène. C'est pourquoi les molécules incorporant ce motif peuvent s'associer par liaisons hydrogène intramoléculaires entre l'atome d'azote hybridé sp^2 et le proton du motif NH en dimères linéaires ou cycliques ou en trimères, leur conférant ainsi une grande stabilité (Figure 17).

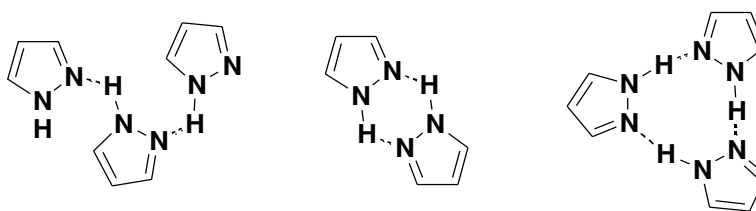


Figure 17 : Associations de pyrazoles en dimère linéaire, dimère cyclique et en trimère

Grâce à cette propriété, un tel motif introduit dans une chaîne peptidique pourrait permettre de former des mimes de coude β . Le doublet non liant de l'atome d'azote hybridé sp^2 en position i pourrait donner une liaison hydrogène au proton du groupement NH de la fonction amide du résidu $i-1$. Cette liaison hydrogène permettrait de former un pseudocycle en C_6 , repliant

⁷⁰ Fatin-Rouge, N.; Toth, E.; Perret, D.; Backer, R. H.; Merbach, A. E.; Bünzli, J.-C. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10810-10820.

ainsi la chaîne peptidique et provoquant l'inversion du sens de propagation de la chaîne, phénomène qui a lieu au niveau d'un coude β dans les protéines naturelles (Figure 18).

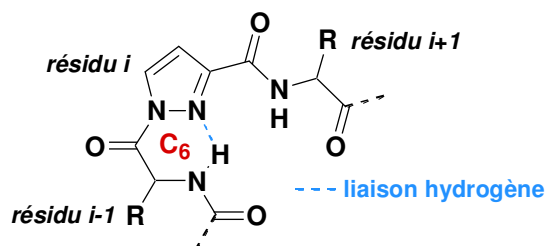


Figure 18 : Liaison hydrogène pouvant s'établir dans un pseudopeptide contenant un noyau pyrazolique

I.2 Introduction du motif pyrazole dans la structure de pseudopeptides

L'insertion du noyau pyrazolique dans la structure de pseudopeptides en tant que mime d'acide β aminé est innovante. En effet, il n'y a que très peu de publications qui font état de l'incorporation de dérivés du pyrazole dans des peptides. Cet hétérocycle aromatique a tout d'abord été trouvé dans la structure d'un acide aminé non naturel appartenant au dipeptide γ -glutamyl- β -pyrazol-1-yl-alanine issu de racines de concombres (Figure 19).⁷¹ La structure de cet acide aminé est très proche de celle de l'histidine, le noyau imidazole étant remplacé par le pyrazole, et se retrouve dans la structure de petits peptides isolés de racines de divers cucurbitacés.⁷²

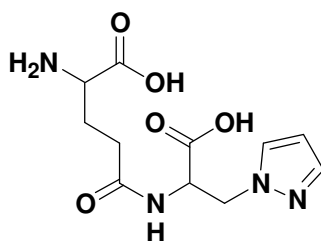


Figure 19 : Structure du dipeptide γ -glutamyl- β -pyrazol-1-yl-alanine

Le pyrazole a également été utilisé par l'équipe de Giacomelli pour synthétiser des acides α aminés bicarboxyliques, qui, intégrés dans une chaîne peptidique, permettent de mimer une liaison peptidique en conformation *cis*.⁷³ Ces acides aminés **S** et **T** peuvent respectivement être considérés comme homologues de l'acide aminosubérique et de l'acide glutamique (Figure 20)

⁷¹ Dunnill, P. M.; Fowden, L. *Biochem. J.* **1963**, *86*, 388-391.

⁷² Noe, F. F.; Fowden, L. *Biochem. J.* **1960**, *77*, 543-546.

⁷³ De Luca, L.; Falorni, M.; Giacomelli, G.; Porcheddu, A. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8701-8704.

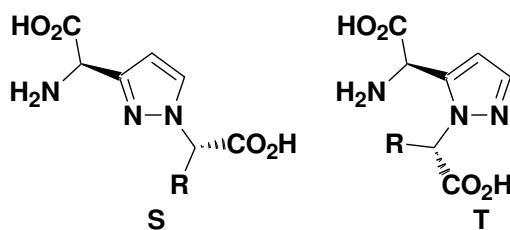


Figure 20 : Acides aminés bicarboxyliques P et Q

Aucune référence à l'introduction de l'acide pyrazolique par sa fonction acide carboxylique (voir figure 15) et par sa fonction NH libre n'est faite dans la littérature. En effet, l'insertion de ce motif par le motif NH du cycle pyrazolique dans une chaîne peptidique peut se présenter problématique. La liaison amide entre cette extrémité et un résidu a déjà été décrite comme étant une liaison très labile. Les équipes de Mitkidou et de Takagi ont montré que la liaison benzylamide-pyrazole est sensible à l'attaque de nucléophiles et se clive en présence d'ions hydroxydes ou de dérivés amines (Schéma 43).⁷⁴

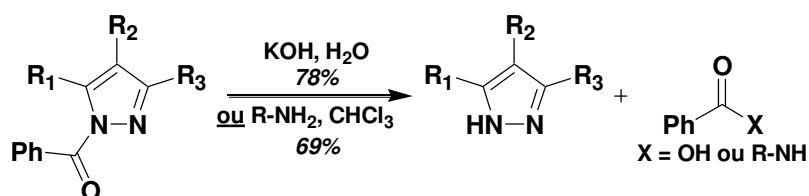


Schéma 43 : Rupture de la liaison benzylamide-pyrazole en présence de nucléophiles

L'équipe de Rzeszotarska a même observé que la fonction acyle, greffée à l'atome d'azote hybridé sp^3 du cycle pyrazolique, du composé U était clivée après quelques temps à l'ambiante, alors que celle protégeant la fonction amine en position 3 de ce cycle restait stable (Schéma 44).⁷⁵

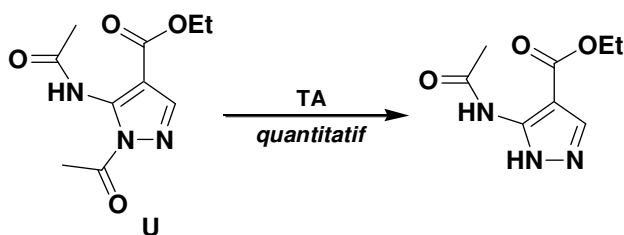


Schéma 44 : Libération du groupement acyle après quelques temps à l'ambiante

La synthèse de pseudopeptides incorporant le motif pyrazolique en tant qu'analogue d'acide β -aminé ne sera donc pas aisée. L'objectif de cette troisième partie a donc été de

74 a) Takagi, K.; Tanaka, M.; Murakami, Y.; Ogura, K.; Ishii, K.; Morita, H.; Aotsuka, T. *J. Heterocyclic Chem.* **1987**, 24, 1003-1007. **b)** Mitkidou, S.; Stephanidou-Stephanatou, J.; Stephopoulou, H. *J. Heterocyclic Chem.* **1993**, 30, 441-444.

75 Kusakiewics-Dawid, A.; Masiukiewicz, E.; Rzeszotarska, B.; Dybala, I.; Koziol, A. E.; Broda, M. A. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, 55, 747-752.

synthétiser un pseudotripeptide de type P-AA-Pyr-Gly-X (Pyr pour pyrazole). Pour ce faire, il a été important de vérifier que la fonction acide carboxylique et du motif NH du cycle de l'acide pyrazolique puissent être engagés dans des réactions de couplage peptidique, en s'assurant au préalable qu'elles soient sélectivement protégeables. Il a également fallu s'assurer que la liaison AA-Pyr des différents composés synthétisés soit stable, et, dans le cas contraire, de trouver un moyen d'empêcher le clivage de cette liaison.

II Etude de la réactivité de l'acide pyrazolique

Afin d'intégrer le motif pyrazole dans une chaîne peptidique, il a fallu tout d'abord synthétiser l'acide pyrazolique **26**. Celui-ci est obtenu avec un rendement quantitatif après oxydation du 3-méthylpyrazole **25** par le permanganate de potassium en milieu aqueux (Schéma 45).⁶⁸

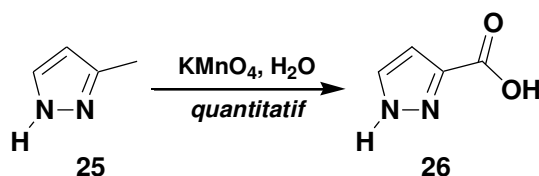


Schéma 45 : Oxydation du 3-méthylpyrazole **25** en acide pyrazolique **26**

La réactivité de la fonction acide carboxylique et du motif NH du cycle pyrazolique du composé **26** a ensuite été étudiée, *via* la formation de différents esters à partir de la fonction acide carboxylique et *via* les réactions de protection et déprotection de l'atome d'azote de la fonction NH libre.

II.1 Réactivité de la fonction acide carboxylique

L'objectif de cette étude est de pouvoir obtenir différents esters, dérivés de l'acide pyrazolique, pouvant être utilisés en synthèse peptidique et compatibles avec les stratégies Boc, Fmoc et Z utilisées. La fonction acide carboxylique du composé **26** a été estérifiée dans différentes conditions (Schéma 46). Les résultats sont reportés dans le tableau 6.

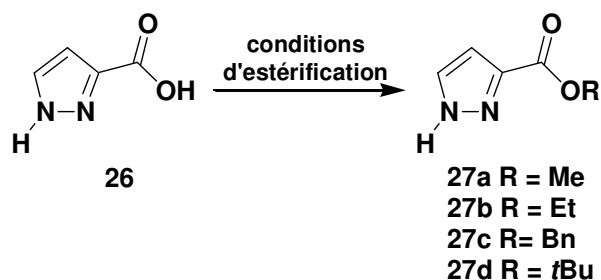


Schéma 46 : Estérifications de l'acide pyrazolique 26

R	Conditions	T	T (h)	Rdt (%)
Me	MeOH, H ₂ SO ₄	reflux	5	50
	MeOH, SOCl ₂		2	70
Et	EtOH, H ₂ SO ₄		5	50
	EtOH, SOCl ₂		2	100
Bn	BnOH, SOCl ₂	TA	5	/
	BnOH, DCC, DMAP, DCM, TA		24	85
	1) KOH, EtOH 2) BnBr, DMF		24	75
tBu	tBuOH, SOCl ₂	reflux		/

Tableau 6 : Conditions et rendements des réactions d'estérifications de l'acide carboxylique 26

Les premières conditions utilisées ont été reprises des travaux de Bünzli.⁶⁸ L'estérification s'effectue en milieu acide en présence d'alcools primaires, mais comme il s'agit d'une réaction réversible, les rendements ne dépassent pas 50%. Lorsque l'estérification a lieu dans des conditions de réaction irréversible, c'est-à-dire lorsque l'acide carboxylique est transformé en chlorure d'acide à l'aide de chlorure de thionyle avant réaction avec l'alcool primaire, les rendements augmentent jusqu'à atteindre 100% pour la formation de l'ester éthylique **27b**. Par contre, les mêmes conditions appliquées à la synthèse de l'ester benzylique et de l'ester *tert*-butylique^{76a} ne se sont pas avérées concluantes. La méthode de synthèse d'esters *tert*-butylique décrite par Widmer n'a pas été testée.^{76b}

L'emploi de conditions d'estérification moins classiques a permis la formation de l'ester benzylique **27c**. Deux méthodes ont été testées :

- la première consiste en l'ajout d'alcool benzylique sur l'acide pyrazolique **26** en solution dans le dichlorométhane, en présence de DCC et de DMAP. L'ester benzylique est obtenu avec un

76 a) Wanka, L.; Cabrele, C.; Vanejews, M.; Schreiner, P. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 9, 1474-1490.
b) Widmer, U. *Synthesis* **1983**, 2, 135-136.

rendement de 85% mais la présence d'urée insoluble dans le brut réactionnel rend la purification sur colonne chromatographique fastidieuse ;

- la deuxième méthode permet d'obtenir l'ester benzylique en deux étapes : la fonction acide du composé **26** est tout d'abord déprotonnée par l'hydroxyde de potassium, puis le carboxylate généré est mis en présence de bromure de benzyle.⁷⁷ L'ester **27c** est alors formé avec un rendement de 75%, après purification par précipitation dans un mélange dichlorométhane/éther de pétrole.

Deux types d'esters sont donc disponibles pour la suite des travaux : les esters méthylique **27a** et éthylique **27b**, compatibles avec les stratégies Boc et Z, et l'ester benzylique **27c**, compatible avec les stratégies Boc et Fmoc.

II.2 Réactivité de la fonction NH du cycle pyrazolique

Le but de cette partie des travaux est de vérifier si l'atome d'azote de la fonction NH libre du cycle pyrazolique possède la même réactivité qu'une amine secondaire classique. En effet, cet atome d'azote est impliqué dans un cycle aromatique : sa réactivité peut donc s'avérer particulière. Afin de vérifier cette hypothèse, les tentatives de protection de cet atome d'azote ont été réalisées avec des groupements Boc ou Fmoc. Il a fallu également s'assurer que les groupements protecteurs de la fonction acide carboxylique et du motif NH du dérivé de l'acide pyrazolique pouvaient être clivés de façon sélective.

II.2.1 Réactivité de la fonction NH de l'acide pyrazolique **26**

Les essais ont tout d'abord été effectués sur l'acide pyrazolique **26** (Schéma 47). Les conditions de protection sont reportées dans le Tableau 7.

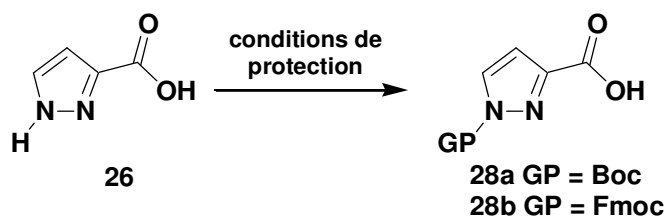


Schéma 47 : Protection de la fonction NH de l'acide pyrazolique **26**

⁷⁷ Fields, W. H.; Chruma, J. J. *Organic Lett.*, **2010**, 12, 316-319 (Supporting Information).

P	Conditions
Boc	Boc ₂ O, DMAP, THF
	Boc ₂ O, Et ₃ N, THF ⁷⁸
	Boc ₂ O, NaHCO ₃ , DCM/H ₂ O
	Boc ₂ O, NaOH, CH ₃ CN/H ₂ O ⁷⁹
Fmoc	FmocCl, NaHCO ₃ , DCM/H ₂ O

Tableau 7 : Conditions de protection de la fonction NH de l'acide pyrazolique 26

Tous les essais de protection de l'atome d'azote avec un groupement Boc ont échoué et ce même si la base associée à la réaction est une base forte. Seul l'essai de protection par un groupement Fmoc, en utilisant le chlorure de fluorenylmethyloxycarbonyl, a permis d'obtenir le composé protégé **28b** en mélange avec l'acide pyrazolique **26** de départ. Ces mauvais résultats peuvent être expliqués par l'insolubilité de l'acide pyrazolique **26** dans les solvants organiques utilisés.

II.2.2 Protection et déprotection du motif NH à partir des esters 27

Comme il était impossible de protéger le motif NH de l'acide pyrazolique, il a fallu changer de stratégie afin d'obtenir les composés protégés **28**.

Des essais de protection des esters **27a** et **27c**, plus solubles dans les solvants organiques employés précédemment, ont tout d'abord été menés. L'emploi de Boc₂O en présence de triéthylamine a permis de former les esters *N*-protégés **29a** et **29c** avec des bons rendements de 89% et 67% respectivement (Schéma 48).

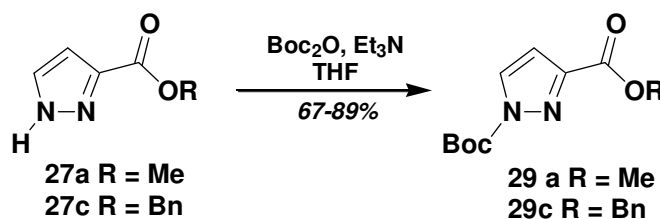


Schéma 48 : Protection de l'atome d'azote des esters 27

La dernière étape pour obtenir l'acide pyrazolique *N*-protégé **28** consistait à saponifier les esters **29**. La saponification de l'ester méthylique **29a** a été réalisée classiquement en milieu basique à l'aide d'hydroxyde de sodium. Les produits formés après trente minutes de réaction ont

⁷⁸ Oslob, J. D.; Yu, C. H. *Pyrazolo pyrimidines usefals as aurora kinase inhibitors*, WO 2007/013964.

⁷⁹ Gilbert, E. J.; Greenlee, W. J.; Li, S. W.; Miller, M. W.; Scott, J. D.; Stamford, A.; Celly, C. S. *Substituted piperazines as CB1 antagonists*, WO 2009/005671.

été l'ester **27a** et l'acide pyrazolique **26** (Schéma 49). Afin de déterminer le mécanisme de formation de l'acide **26**, la réaction a été suivie par RMN du brut réactionnel : aucune trace de l'acide pyrazolique *N*-protégé **28** n'a été détectée, même après cinq minutes de réaction, seul l'ester **27a** était présent dans le milieu réactionnel. La protection Boc de l'atome d'azote impliqué dans le cycle aromatique est donc clivée, dans un premier temps, en milieu basique pour générer l'ester **27a**. Dans un second temps seulement, la fonction ester est saponifiée en acide pyrazolique **26**. Les mêmes résultats ont été obtenus en remplaçant l'hydroxyde de sodium par une base plus douce, l'hydroxyde de lithium.

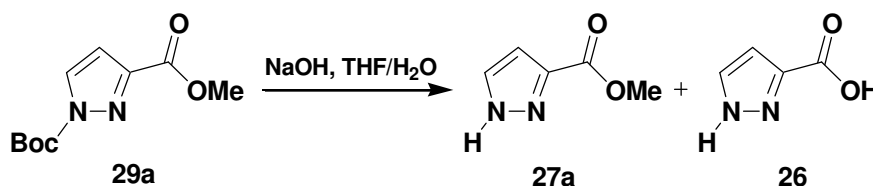


Schéma 49 : Déprotection du groupement Boc de l'ester **29a** en milieu basique

Le clivage de la fonction ester a donc été réalisée en milieu plus neutre. Cette réaction a été effectuée sur l'ester benzylique **29c** sous atmosphère de dihydrogène en présence de palladium sur charbon en quantité catalytique. L'acide pyrazolique *N*-protégé **28** a pu cette fois être obtenu dans ces conditions avec un rendement quantitatif (Schéma 50).

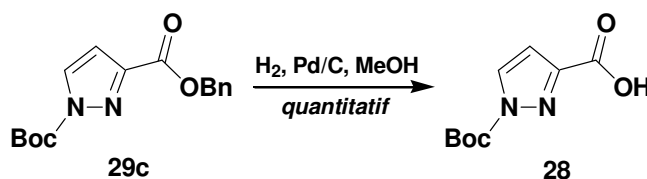


Schéma 50 : Déprotection de l'ester benzylique **29c**

II.2.3 Conclusion

L'étude de la réactivité du motif NH du noyau pyrazolique, *via* sa protection/déprotection, a montré que celle-ci est très particulière puisque le clivage de la fonction Boc est observé dans des conditions dans lesquelles il n'a pas lieu habituellement. Des difficultés pour la suite des travaux pourront donc être rencontrées : la liaison amide AA-Pyr sera également sensible aux conditions basiques qui vont être employées pour la synthèse des pseudotripeptides P-AA-Pyr-Gly-X.⁷⁴⁻⁷⁵

III Synthèse de pseudotriptides P-AA-Pyr-Gly-X

Afin de faciliter sa cristallisation, il a été décidé de synthétiser un pseudotriptide achiral : le choix des acides aminés à greffer sur l'acide pyrazolique s'est donc porté, dans un premier temps, sur la glycine pour former un pseudotriptide de formule P-Gly-Pyr-Gly-X (Figure 21).

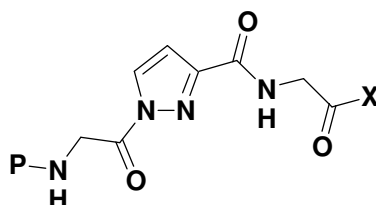


Figure 21 : Formule du pseudotriptide P-Gly-Pyr-Gly-X

III.1A partir des esters 27

L'étude de la réactivité de l'acide pyrazolique a montré que sa fonction NH est difficilement protégeable et qu'elle est plus réactive lorsque la fonction acide carboxylique du dérivé pyrazole est sous forme d'ester. L'élongation de la chaîne peptidique a donc été tentée dans le sens Gly₁ vers Gly₃ : tout d'abord le couplage entre les esters **27** et la glycine *N*-protégée a été réalisé, suivi de la saponification de la fonction ester, et enfin d'un dernier couplage avec l'ester méthylique de la glycine (Schéma 51).

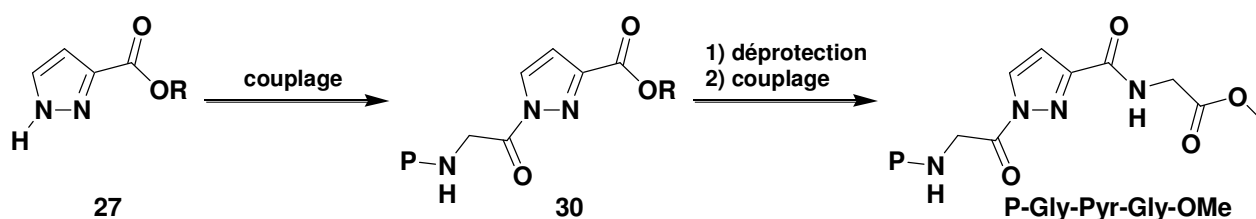


Schéma 51 : Stratégie de synthèse du pseudotriptide P-Gly-Pyr-Gly-X à partir des esters 27

III.1.1 A partir de l'ester éthylique 27b

La première étape de la synthèse du pseudotriptide consistait à coupler l'acide pyrazolique avec la glycine. Plusieurs essais ont été réalisés pour trouver les meilleures conditions de couplage peptidique permettant d'obtenir le dipeptide P-Gly-Pyr-OEt **30** (Schéma 52) à partir de l'ester **27b** et la glycine. Les résultats sont reportés dans le Tableau 8.

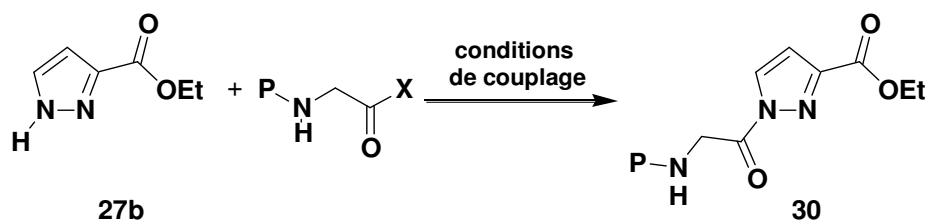


Schéma 52 : Couplage peptidique entre l'ester 27b et la glycine N-protégée

P	X	Conditions de couplage	T (°C)	P (W)	t	Rdt(%)
Fmoc	Cl	NaHCO ₃ /DCM/H ₂ O	TA	/	24h	64 ^b
Z	OH	EDC/HOBt/Et ₃ N/THF	TA	/	24h	/ ^a
		CDI/THF				
		HATU/Et ₃ N/DMF				
			75°C	50	3 x 5 min	88 ^b
	OSu	Et ₃ N/DCM	TA	/	24h	/ ^a
	F	NaHCO ₃ /DCM/H ₂ O	TA	/	24h	/ ^a

(a) aucune formation des dipeptides n'a été observée en CCM

(b) rendements calculés à partir de l'ester 27b

Tableau 8 : Conditions et rendements du couplage peptidique entre l'ester 27b et la glycine

Il découle de cette étude que les agents de couplage tels l'EDC ou le CDI ou l'emploi d'un ester succinique ne permettent pas de former les dipeptides 30.

Lorsque P = Fmoc, l'emploi de chlorure d'acide génère le dipeptide 30 avec un rendement de 64% mais il a présenté un inconvénient : le chlorure d'acide de la glycine dans les conditions basiques de la réaction de couplage peptidique forme une « oxazolone » équivalente et bien que ce composé soit une forme activée de la glycine, celui-ci ne se couple pas à l'ester 27b. Cette oxazolone est alors difficilement séparable du dipeptide formé.^{54b}

Lorsque P = Z, seul l'emploi de l'HATU assisté aux micro-ondes a conduit au dipeptide 30 attendu avec un rendement de 88%.

La saponification de l'ester éthylique du dipeptide 30, dont l'extrémité N_{term} est protégée par un groupement Z, a donc été tentée à l'aide d'hydroxyde de sodium, mais la formation de l'acide correspondant n'a pas été observée. Comme lors de la saponification de l'ester 29a (Schéma 49, page 63), la liaison peptidique a été clivée, libérant ainsi la glycine sous sa forme acide et l'ester 27b (Schéma 53).

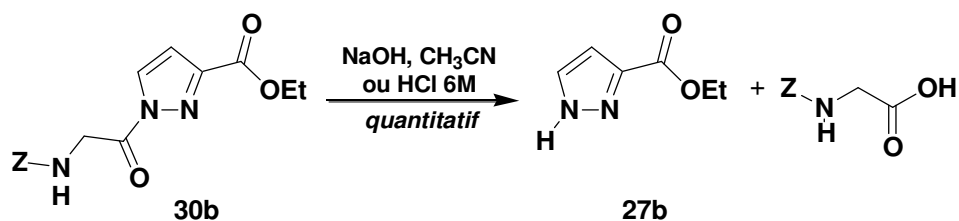


Schéma 53 : Clivage de la liaison peptidique Gly-Pyr

Les conditions de saponification plus douces, employées pour le clivage de l'ester *isopropylique* de la δ -azaproline **7** (Tableau 3, page 40), ont été utilisées pour réaliser la même réaction, mais là encore la rupture de la liaison peptidique Gly-Pyr est observée. Ce clivage avait déjà été observé lors de la saponification de l'ester méthylique du dérivé pyrazolique **29a**, ce qui permet de confirmer que les liaisons amides ou carbamates des dérivés du pyrazole sont sensibles au milieu basique. Elles le sont également en milieu acide puisque la tentative de l'hydrolyse de l'ester éthylique en milieu acide a montré que la liaison peptidique est également clivée (Schéma 53).

Il faut donc trouver des conditions d'hydrolyse de la fonction ester neutres, afin de pouvoir générer le dipeptide **31** C-déprotégé.

III.1.2 A partir de l'ester benzylique **27c**

La synthèse du tripeptide P-Gly-Pyr-Gly-X à partir de l'ester benzylique **27c** semblait judicieuse puisque l'ester benzylique se déprotège en milieu neutre, par action du dihydrogène ou du 1,4-cyclohexadiène assistée par micro-ondes.³⁸ Cette synthèse nécessite trois étapes :

- le couplage peptidique de l'ester **27c** avec la glycine protégée par un groupement Boc, afin que les protections des extrémités soient orthogonales ;
- la déprotection de l'ester benzylique du dipeptide formé ;
- le dernier couplage peptidique avec l'ester méthylique de la glycine pour former le tripeptide Boc-Gly-Pyr-Gly-OMe.

Le dipeptide C-déprotégé **31** a tout d'abord été généré après un premier couplage peptidique entre l'ester **27c** et la glycine, en présence d'HATU, assisté par micro-ondes, puis après l'hydrogénolyse assistée par micro-ondes de l'ester benzylique du dipeptide formé correspondant, en présence de 1,4-cyclohexadiène, de palladium sur charbon (Schéma 54).³⁸ La réaction de couplage a présenté un rendement de 63%, plus faible que dans le cas du couplage avec l'ester **27b** sans doute dû à l'effet électroattracteur du groupement benzyle. La déprotection a été réalisée de façon quantitative sans qu'aucun clivage de la liaison Gly-Pyr ne soit observé.

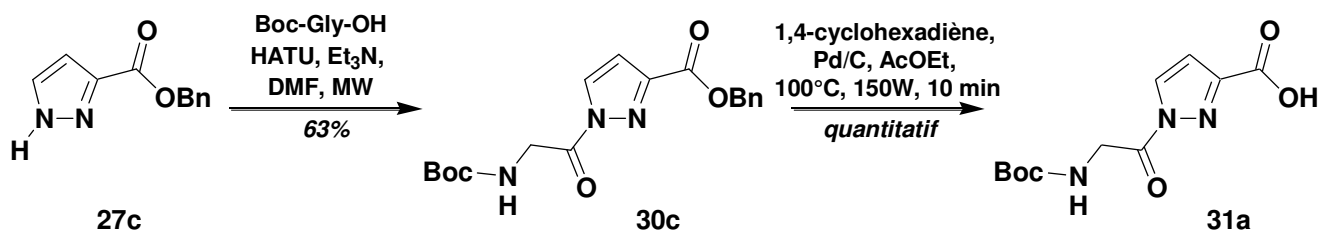
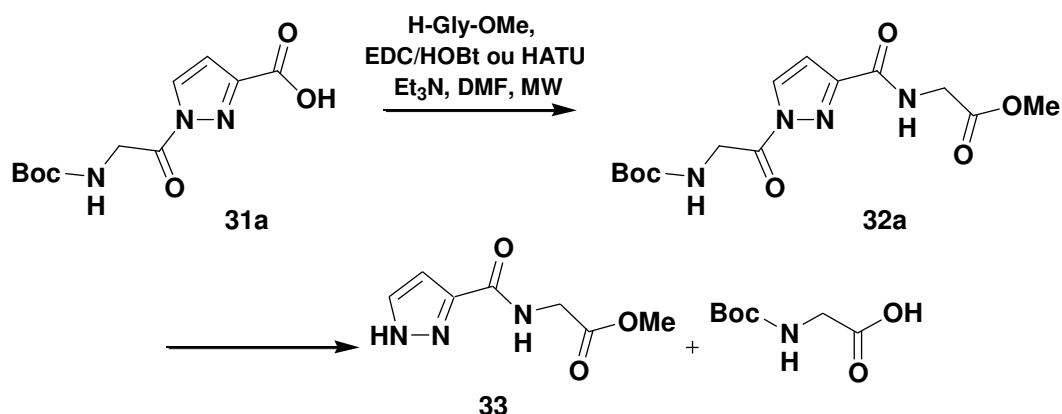


Schéma 54 : Synthèse du dipeptide C-déprotégé 31

La dernière étape de couplage peptidique peut être envisagée sous conditions classiques puisque la fonction acide carboxylique devrait réagir comme celle d'un acide α aminé classique. Le choix de l'agent de couplage s'est porté sur l'EDC et l'HATU avec assistance par micro-ondes afin de diminuer le temps de réaction. Malheureusement, le suivi d'avancement de réaction en CCM et l'analyse par RMN des bruts réactionnels, obtenus après extraction, n'indiquent pas la présence du pseudotripeptide **32**. Seuls le dipeptide **33** et Boc-Gly-OH ont pu être détectés, issus du clivage de la liaison Gly-Pyr du pseudotripeptide **32a** formé après le couplage mais qui s'avère instable. Il est à noter que ce clivage est également observé sur le dipeptide **31** après quelques semaines à température ambiante (Schéma 55).

Schéma 55 : Synthèse du pseudotripeptide Boc-Gly-Pyr-Gly-OMe **32** à partir du dipeptide **31**

Comme présenté en introduction, le clivage de cette liaison pouvait être attendu. En effet, les conditions de couplage peptidique nécessitent de réaliser cette réaction en milieu basique, ce qui est suffisant pour que l'atome de carbone du groupement carbonyle de la liaison Gly-Pyr soit attaqué, libérant la glycine du cycle pyrazolique.

Un encombrement stérique plus important de l'acide aminé devrait rendre plus difficile toute attaque nucléophile sur cet atome de carbone. C'est pourquoi la première glycine a été remplacée par une phénylalanine. Le dipeptide Phe-Pyr **30d** a tout d'abord été généré après couplage entre la phénylalanine et l'ester **27c**. Puis l'ester benzylique de ce composé a ensuite été déprotégé pour que le dipeptide **31b** correspondant puisse être engagé dans un couplage avec

l'ester méthylique de la glycine. Malheureusement, le clivage de la liaison Phe-Pyr est également observé, libérant Boc-Phe-OH et le dipeptide **33** (Schéma 56).

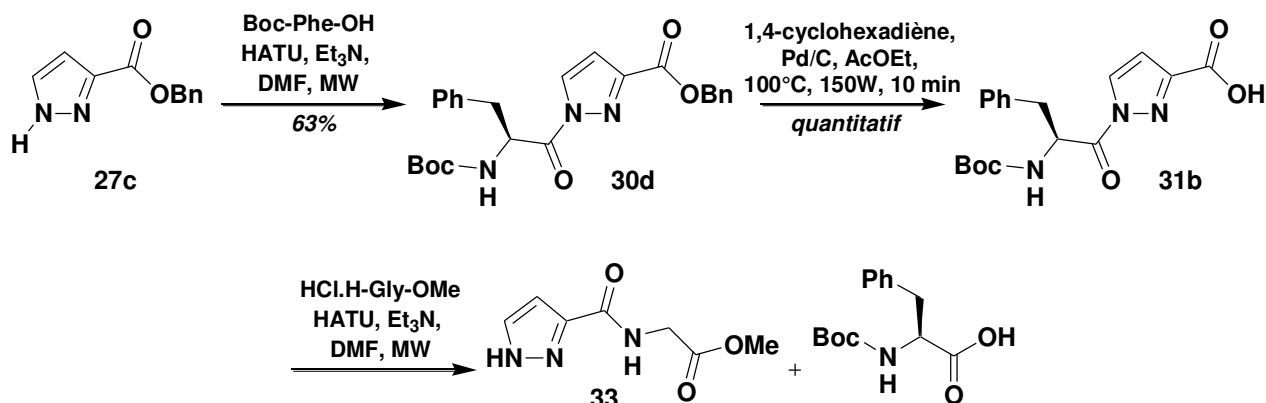


Schéma 56 : Tentative de synthèse du pseudotriptide Boc-Phe-Pyr-Gly-OMe

Toutes les tentatives de formation du pseudotriptide **32** ont échoué. Il a donc fallu exploiter une autre stratégie de synthèse de ce composé, au cours de laquelle la formation de la liaison AA-Pyr doit être réalisée en dernière étape.

III.2 A partir de l'acide pyrazolique **26**

Une seconde voie de synthèse du pseudotriptide **32** a donc été étudiée en parallèle. L'ordre d'insertion des acides aminés peut donc être inversé, sans avoir à protéger au préalable la fonction NH de l'acide pyrazolique, puisque celle-ci n'est que peu réactive. La synthèse du pseudotriptide **32** peut donc être réduite à deux étapes :

- une première réaction de couplage entre l'acide pyrazolique **26** et l'ester méthylique de la glycine ;
- une seconde réaction de couplage entre le dipeptide formé et la glycine protégée par une fonction Boc.

L'acide pyrazolique est très soluble dans l'eau et le DMF et l'est beaucoup moins dans les autres solvants organiques usuellement employés en synthèse peptidique. Plusieurs méthodes de couplage ont donc été testées dans différents mélanges de solvant THF/eau en présence d'EDC, en parallèle d'un couplage à l'aide d'HATU dans le DMF (Schéma 57). Les résultats sont reportés dans le Tableau 9.

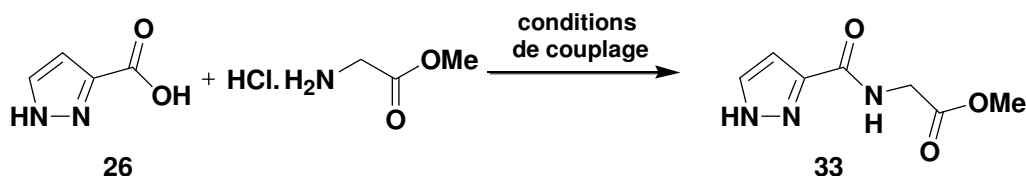


Schéma 57 : Couplage peptidique entre l'acide pyrazolique **26** et l'ester méthylique de la glycine

Conditions de couplage	T (°C)	P (W)	t	Rdt(%)
EDC/NMM/H ₂ O	TA	/	24h	24 ^c
EDC/HOBt/Et ₃ N/THF				/ ^a
EDC/HOBt/Et ₃ N/THF/H ₂ O				/
EDC/Et ₃ N/THF/H ₂ O				37 ^c
HATU/ Et₃N/DMF	75°C	50	5 x 5 min	54^c

(a) aucune formation des dipeptides n'a été observée en CCM

(c) rendements calculés à partir de l'acide pyrazolique **26**

Tableau 9 : Conditions et rendements du couplage peptidique entre l'acide carboxylique **26 et la glycine**

Le premier essai a été réalisé en employant l'EDC en présence de *N*-méthylmorpholine dans l'eau : le rendement du couplage est faible et ne dépasse pas 24%.

L'emploi d'EDC et d'HOBt, dans les mêmes conditions utilisées pour les couplages effectués jusqu'à présent (réaction dans le THF uniquement) ne permet pas d'obtenir le dipeptide **33**. En présence d'eau, la formation de ce dipeptide est observée mais il reste inséparable de l'HOBt présent dans le milieu réactionnel, et ce, malgré les différents traitements par extraction et les purifications sur colonnes chromatographiques. Par contre, en absence d'HOBt, le dipeptide **33** a pu être isolé par simple extraction du milieu réactionnel, avec un rendement de 37% après réaction dans les mêmes conditions.

Parallèlement, l'essai de couplage en présence d'HATU sous l'action de micro-ondes a permis de générer le dipeptide **33** avec un rendement de 54%.

Finalement, l'emploi des conditions de couplage entre l'ester **27b** et la glycine (Schéma 52) ont été appliquées au dipeptide **33**. Dans ce cas, le suivi CCM de la réaction indique la formation d'un nouveau composé par l'apparition d'une nouvelle tache et la disparition des produits de départ. Malheureusement, aucune trace du nouveau composé formé n'a été observée après traitement du brut réactionnel. De même, le spectre RMN ¹H du brut après traitement montre que seuls le dipeptide **33** et la glycine sont présents en solution. Ces résultats semblent montrer que le pseudotripeptide **32a** se forme mais qu'il est très instable et se clive rapidement (Schéma 58).

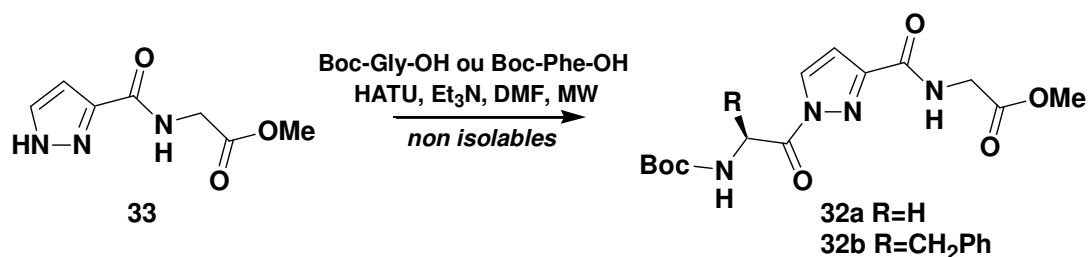


Schéma 58 : Synthèse du pseudotripeptide Boc-Gly-Pyr-Gly-OMe 32a à partir du dipeptide 33

Afin d'essayer de ralentir la dégradation du pseudotripeptide, la glycine a été remplacée par la phénylalanine, qui devrait encombrer le site sensible aux attaques nucléophiles. Les mêmes conditions de couplage ont été employées et cette fois ci, le pseudotripeptide **32b** a pu être synthétisé avec succès (Schéma 58). Ce composé est toutefois instable, et il s'avère impossible de le purifier et de calculer le rendement de sa formation. Mais, comme il se clive de façon plus lente, il a tout de même été possible de le caractériser par RMN 1D et 2D et spectrométrie de masse haute résolution.

IV Conclusion

Les différentes études de la réactivité des fonctions acide carboxylique et NH du noyau pyrazolique ont révélé que celles-ci avaient une réactivité très particulière :

- la fonction acide carboxylique ne réagit pas de la même manière que des acides carboxyliques classiques dans des conditions d'estérification ou de couplage peptidique ;
- la fonction NH libre du noyau pyrazolique n'est pas très nucléophile et nécessite l'emploi d'espèces plus électrophiles pour réaliser des réactions de protections ou de couplages peptidiques que celles utilisées pour des amines classiques.

Le clivage des liaisons Boc-Pyr ou Gly-Pyr dans des conditions inhabituelles ont également permis de montrer que le pyrazole constitue un bon groupe partant lors de réactions de substitutions nucléophiles (Schéma 59).

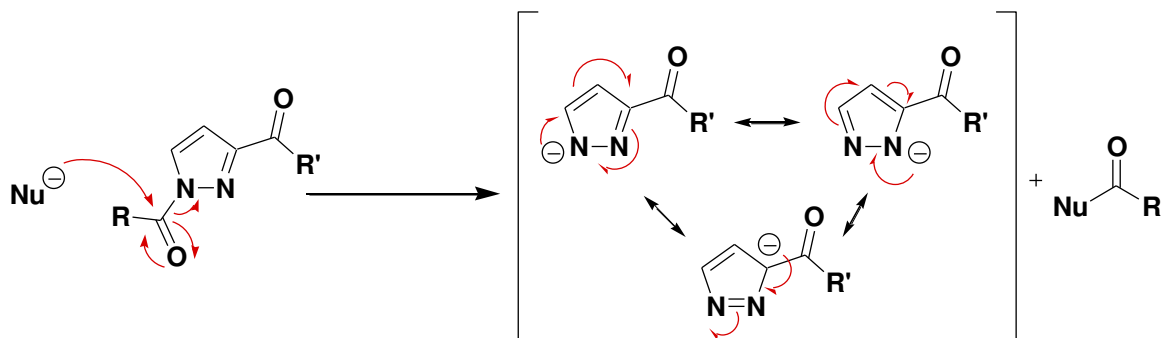


Schéma 59 : Substitutions nucléophiles au cours desquelles le pyrazole joue le rôle de groupe partant

Après attaque d'un nucléophile, comme l'ion hydroxyde dans le cas des réactions de saponification de l'ester **29a** et du dipeptide **30b**, sur l'atome de carbone de la liaison amide AA-Pyr, le noyau pyrazolique est libéré en acceptant un doublet d'électrons non liants et est stabilisé par effet mésomère, augmentant ainsi l'électrophilie de l'atome de carbone.

Cette caractéristique peut donc expliquer le fait que jusqu'à présent, aucuns travaux publiés n'ont décrit la synthèse de pseudopeptides incorporant le noyau pyrazolique comme analogue d'un acide β aminé. Le pseudotripeptide **32b** est donc le premier pseudopeptide de ce type à avoir été synthétisé et caractérisé. Une étude conformationnelle par RMN va être réalisée afin de déterminer si des liaisons hydrogène peuvent s'établir au sein de ce pseudotripeptide.

Chapitre IV : Etude structurale des pseudo-tripeptides synthétisés

I Introduction

L'objectif final de ce travail de thèse est de mettre en évidence une auto-structuration des pseudotripeptides **19**, **20**, **23**, **24** et **32b** (Figure 14, page 53 et Schéma 58, page 70) par établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires. Plus particulièrement, les analyses conformationnelles menées sur ces composés permettront de vérifier si une différence de structuration peut être observée lorsque l'atome d'azote N^δ des composés **19**, **20**, **23** et **24** est protégé, ou non, et, dans ce cas, si la conformation *cis* de la liaison AA₁-δ-azaPro est privilégiée.

Après avoir rappelé les aspects conformationnels en série peptidique et pseudopeptidique, ainsi que les différentes techniques permettant l'analyse structurale de ces composés, les résultats des analyses conformationnelles des pseudotripeptides synthétisés seront décrits.

II Aspects conformationnels en série peptidique et pseudopeptidique

Les propriétés conformationnelles des peptides et pseudopeptides sont le fruit d'un équilibre entre des interactions intramoléculaires à courte et longue distance, et intermoléculaires avec l'environnement. La nature non covalente de ces forces (électrostatiques, par liaisons hydrogène, hydrophobes, ioniques...) conditionnent l'organisation des biomolécules.⁸⁰

De nombreuses études conformationnelles portant sur des peptides et pseudopeptides ont permis de mettre en évidence le rôle clé de certains facteurs de structuration, dont le plus important est la formation de liaisons hydrogène.

II.1 Liaisons hydrogène intramoléculaires dans les peptides

II.1.1 Conventions d'écriture

La disposition dans l'espace des atomes constituant les peptides est décrite, en respectant un certain nombre de conventions, notamment à l'aide de trois angles de torsion autour des liaisons NH-C^α, C^α-CO et CO-NH, respectivement notés Ψ, Φ et ω (Figure 22). Leur signe est positif lorsque l'observateur, situé du côté N_{term}, voit la partie C_{term} tourner dans le sens des aiguilles d'une montre. La valeur nulle correspond à la disposition éclipse des atomes du squelette peptidique.

⁸⁰ Schulz, G. E.; Schirmer, R. H. *Principles of Protein Structure* ; Cantor CR, Series éd., Springer, NY, **1979**.

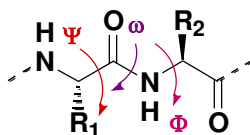


Figure 22 : Représentation des angles dièdres caractérisant la structure du squelette peptidique

La liaison amide, de par son caractère de liaison partiellement double, possède ses six atomes $C_{\alpha 1}$, O, C, N, H et $C_{\alpha 2}$ dans un même plan. La valeur de l'angle ω est donc voisine soit de 0° , soit de 180° selon que la liaison peptidique est respectivement *cis* ou *trans*. Seuls les angles Φ et Ψ sont les variables conformationnelles pour la chaîne principale. Cependant, toutes les valeurs d'angles des couples (Φ , Ψ) ne sont pas permises soit en raison de contraintes stériques, soit en raison de la formation de liaisons hydrogène limitant les degrés de liberté de la chaîne peptidique. Le diagramme de Ramachandran représente les zones énergiquement favorables (Figure 23).⁸¹

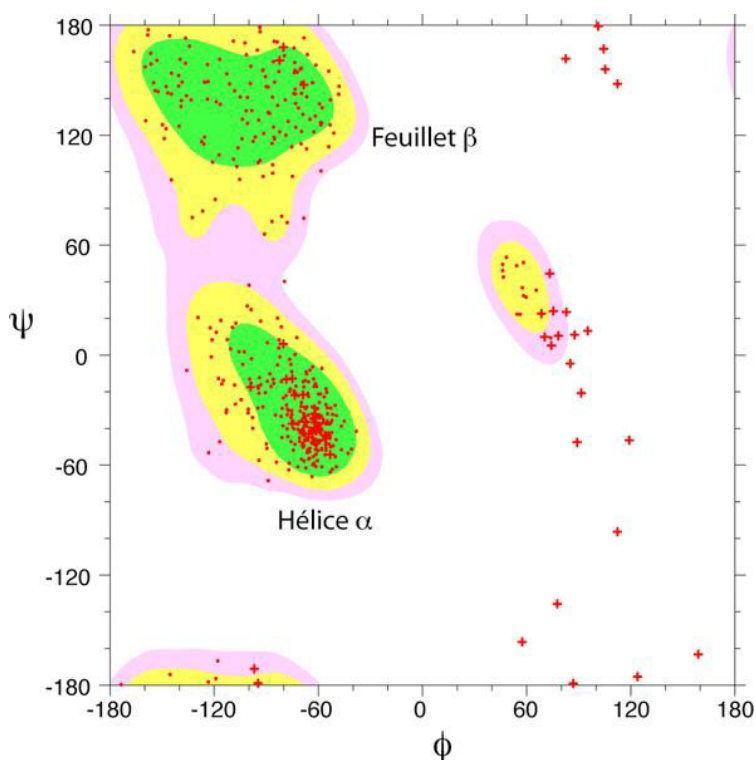


Figure 23 : Diagramme de Ramachandran simplifié indiquant les valeurs des angles (Φ , Ψ) permises dans les protéines

Une liaison hydrogène s'établit, au sein d'un peptide, entre un site donneur de proton NH appartenant au résidu i et un site accepteur de proton CO du résidu $i+x$. La force de cette interaction, notée $i \rightarrow i+x$, dépend principalement de la distance N...O qui sépare le site donneur du site accepteur. Cette distance est optimale lorsqu'elle est comprise entre 2,8 et 3,1 Å,

⁸¹ Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. *J. Mol. Biol.* **1963**, 7, 95-99.

et lorsque les trois atomes N-H...O sont colinéaires, c'est-à-dire que l'angle (N-H...O) a une valeur comprise entre -20° et $+20^\circ$. Cette liaison ferme alors un pseudocycle à n atomes, noté C_n , qui caractérise les différents types de structures secondaires (Figure 24).

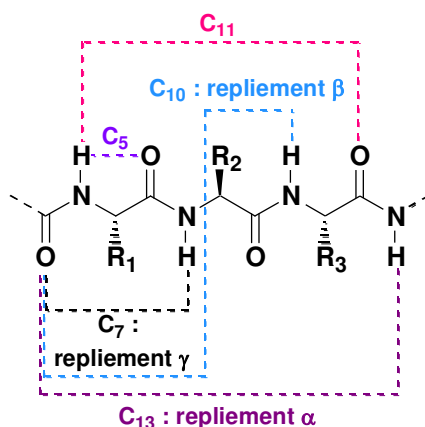


Figure 24 : Les différents pseudocycles rencontrés dans les peptides

Les méthodes d'analyse structurale comme la diffraction des rayons X, la résonance magnétique nucléaire, la spectroscopie infrarouge et le dichroïsme circulaire ont permis de mettre en évidence différentes interactions intramoléculaires au sein des peptides. Quelques exemples d'éléments de structure rencontrés dans les peptides, ainsi que ceux rencontrés en présence d'une proline dans une chaîne peptidique, sont décrits.

II.1.2 Les coudes ou turns

Les coudes sont des éléments de structure secondaire localisés qui permettent un repliement particulier de la chaîne peptidique. Il existe différents types de coudes, caractérisés par le nombre d'atomes impliqués dans le pseudocycle.

II.1.2.1 Les coudes γ ou C_7

Ces coudes sont caractérisés par la formation d'un pseudocycle à sept atomes, stabilisé par une liaison hydrogène de type $i+2 \rightarrow i$. Il a été mis en évidence lors d'études spectroscopiques de dipeptides en solution⁸² et de protéines.⁸³ Il existe deux types de repliement γ :

- le γ -turn inverse, dont la chaîne latérale du résidu $i+1$ est en position équatoriale par rapport au

⁸² a) Boussard, G.; Marraud, M.; Neel, J. *J. Chem. Phys.* **1974**, *71*, 1081. b) André, F.; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M. *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 372-381.

⁸³ Milner-White, E. L. *J. Mol. Biol.* **1990**, *216*, 385-397.

plan moyen du pseudocycle, est le plus fréquemment rencontré dans les protéines,⁸⁴ - le γ -turn classique, dont la chaîne latérale du résidu $i+1$ est en position axiale par rapport au plan moyen du pseudocycle (Figure 25).

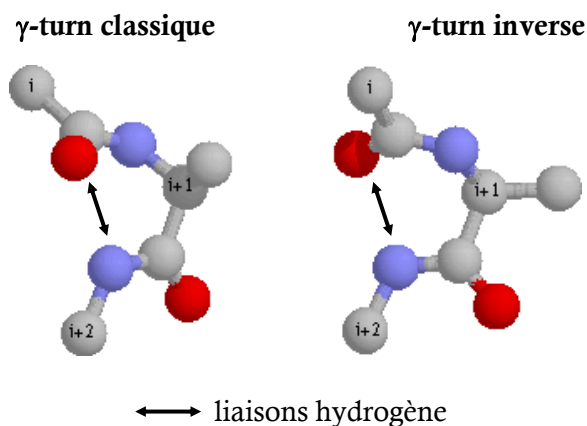


Figure 25 : Représentation des γ -turns

II.1.2.2 Les coudes β ou C_{10}

Une liaison hydrogène de type $i+3 \rightarrow i$, fermant un pseudocycle à dix atomes, C_{10} , ou une forme repliée, stabilisée ou non par liaison hydrogène, dont la distance entre les C_α des résidus i et $i+3$ reste inférieure à 7 Å, donne naissance à un repliement de type β . Il permet d'inverser le sens de propagation d'une chaîne peptidique. Le coude β se révèle être un élément architectural primordial dans les structures tridimensionnelles des protéines globulaires. Les causes de l'existence de structures repliées ont fait l'objet d'un grand nombre d'études expérimentales et théoriques et tendent à montrer qu'il s'agit d'une disposition intrinsèquement stable de la chaîne peptidique. Plusieurs familles ont été identifiées à partir de structures cristallines des protéines.⁸⁵ Les principales caractéristiques des différents sous-types connus les plus fréquents à ce jour sont rassemblées dans le tableau 10.

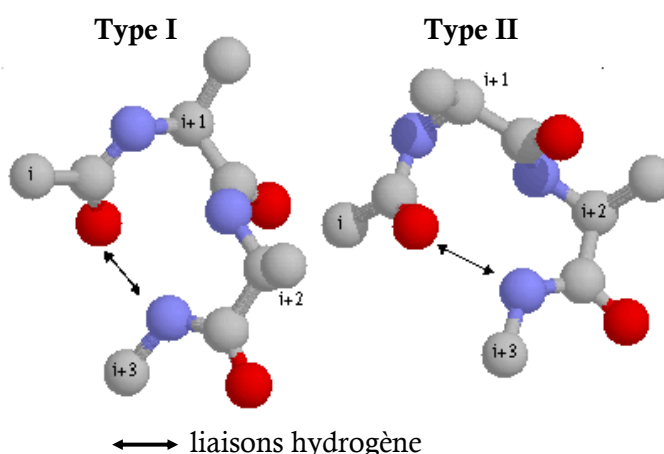
⁸⁴ Milner-White, E. L.; Ross, B. M.; Ismail, R.; Belhadj-Mostefa, K.; Poet, R. *J. Mol. Biol.* **1988**, 204, 777-782.

⁸⁵ Némethy, G.; Scheraga, H. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 95, 320-327.

Type	Résidu i+1		Résidu i+2	
	Φ	Ψ	Φ	Ψ
βI	-60°	-30°	-90°	0°
$\beta\text{I}'$	60°	30°	90°	0°
βII	-60°	120°	80°	0°
$\beta\text{II}'$	60°	-120°	-80°	0°
βVIa	-60°	120°	-90°	0°
βVIb	-135°	135°	-75°	160°
βIV	-	-	-	-

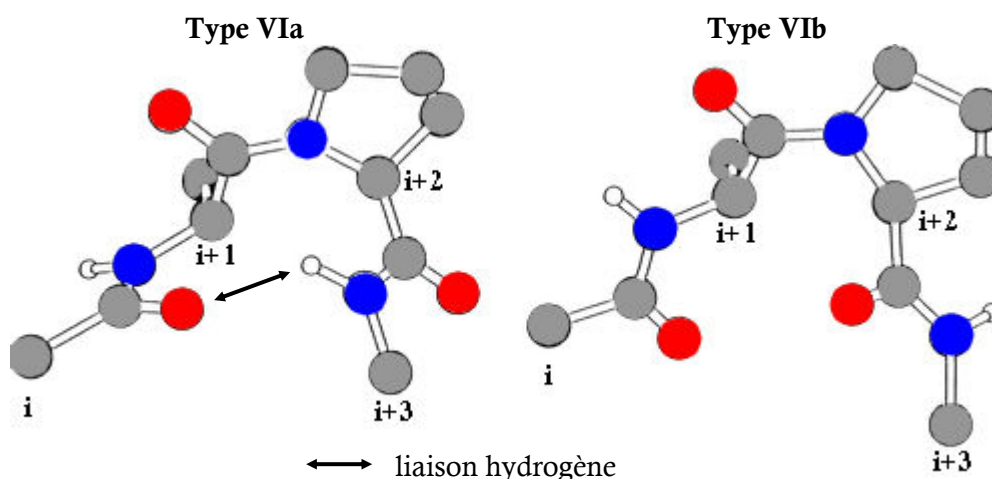
Tableau 10 : Angles dièdres moyens dans les coudes β

Les deux catégories les plus importantes sont les β -turns de type I et II, rencontrés pour la plupart des acides aminés (Figure 26).

Figure 26 : Structure des β -turns de type I et II

Les coudes β de type VI ne sont présents que lorsque le résidu i+2 possède une liaison peptidique en conformation *cis* ($\omega = 0^\circ$), donc essentiellement lorsque ce résidu est une proline. Deux classes de β -turns de type VI ont été définis d'après les valeurs des angles dièdres des résidus centraux i+1 et i+2 de leur squelette peptidique (Figure 27).⁸⁶ Dans le type VIa, l'angle dièdre Ψ de la proline vaut environ 0° et une liaison hydrogène s'établit entre le CO du résidu i et le groupement NH du résidu i+3, alors que dans le type VIb, l'angle dièdre Ψ de la proline vaut environ 160° et aucune liaison hydrogène ne peut se former de façon intramoléculaire.

⁸⁶ Müller, G.; Gurrath, M.; Kurz, M.; Kessler, H. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1993**, *15*, 235-251.

Figure 27 : Structure des β -turns de type VIa et VIb

Il est à noter qu'en pratique, pour caractériser un coude β , une tolérance de $\pm 30^\circ$ sur trois des angles dièdres et une tolérance de $\pm 45^\circ$ sur le quatrième sont accordées.⁸⁷ Quand seule la distance inférieure à 7 Å entre le C^α i et le C^α i+3 est respectée (la valeur des angles dièdres ne permet pas le classement dans un des types de coude β), alors ce repliement sera noté β IV.

II.2 Aspects conformationnels en série pseudopeptidique

L'étroite relation entre les propriétés conformationnelles des peptides bioactifs et leur activité biologique est une des raisons qui ont motivé l'étude d'analogues pseudopeptidiques. C'est en ce sens qu'il est utile de cerner l'influence des modifications chimiques du squelette peptidique sur les propriétés conformationnelles des pseudopeptides résultants. Les modifications pseudopeptidiques étudiées au sein du laboratoire, ainsi que les pseudopeptides incorporant certains analogues de proline sont décrits dans cette partie.

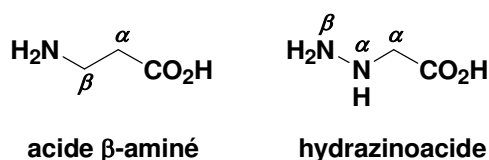
II.2.1 Pseudopeptides bis-azotés

Les exemples suivants concernent les éléments de structure secondaire que peuvent présenter différents pseudopeptides bis-azotés synthétisés au laboratoire.

II.2.1.1 Les hydrazinopeptides

Les hydrazinopeptides sont des analogues azotés de β -peptides, dans lesquels l'atome de carbone de l'unité de base en position β a été remplacé par un groupement NH (Figure 28).

⁸⁷ Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. *Protein Sci.* **1994**, 3, 2207-2216.

Figure 28 : Analogie de structure entre acide β aminé et hydrazinoacide

Les premières études structurales par diffraction des rayons X, réalisées par l'équipe d'Aubry, sur des séquences de deux ou trois résidus, ont montré que le lien hydrazide pouvait apporter de fortes modifications structurales par rapport au lien peptidique.⁸⁸ En effet, la présence du lien hydrazinopeptidique introduit un allongement de la chaîne peptidique, mais ouvre également la voie à l'établissement de nouvelles liaisons hydrogène, conduisant ainsi à la formation de structures originales. Au laboratoire, il a été montré que dans des petits pseudopeptides, de type Piv-Pro-N ^{β} H-N ^{α} Bzl-CH₂-CO-NHiPr et Moc-N ^{β} H-Pro-OH, le résidu α -hydrazinoacyle peut adopter une conformation caractérisée par une interaction bifide intramoléculaire. De ce fait, le site donneur de proton *i*PrNH ou OH interagit à la fois avec le groupement carbonyle de l'hydrazide et avec la paire électronique libre de l'atome d'azote N ^{α} (hybridation sp³). Des pseudocycles à huit et cinq atomes, respectivement, se forment ainsi. Cette structuration particulière a été par la suite baptisée « hydrazinoturn » (Figure 29). D'un point de vue topologique, ce repliement est analogue au repliement γ des peptides puisqu'il est caractérisé par une liaison hydrogène de type $i+2 \rightarrow i$. Cependant, la présence de deux atomes d'azote dans un résidu acide α hydraziné accroît d'un atome la taille du pseudocycle. La comparaison des structures modélisées a mis en évidence que le repliement hydrazino incluant un résidu acide α hydraziné de configuration L est relativement proche du repliement γ équatorial observé dans le cas d'un acide α aminé de configuration D. Par ailleurs, il semblerait que l'hydrazinoturn soit plus stable qu'un coude γ tant à l'état solide qu'en solution.⁸⁹

88 a) Viret, J.; Collet, A.; Pichon-Pesme, V.; Aubry, A. *New J. Chem.* **1988**, 12, 253-256. **b)** Aubry, A.; Bayeul, D.; Mangeot, J.-P.; Vidal, J.; Stérin, S.; Collet, A.; Lecoq, A.; Marraud, M. *Biopolymers* **1991**, 31, 793-801.

89 Aubry, A.; Mangeot, J. P.; Vidal, J.; Collet, A.; Zerkout, A.; Marraud, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, 38, 603-605.

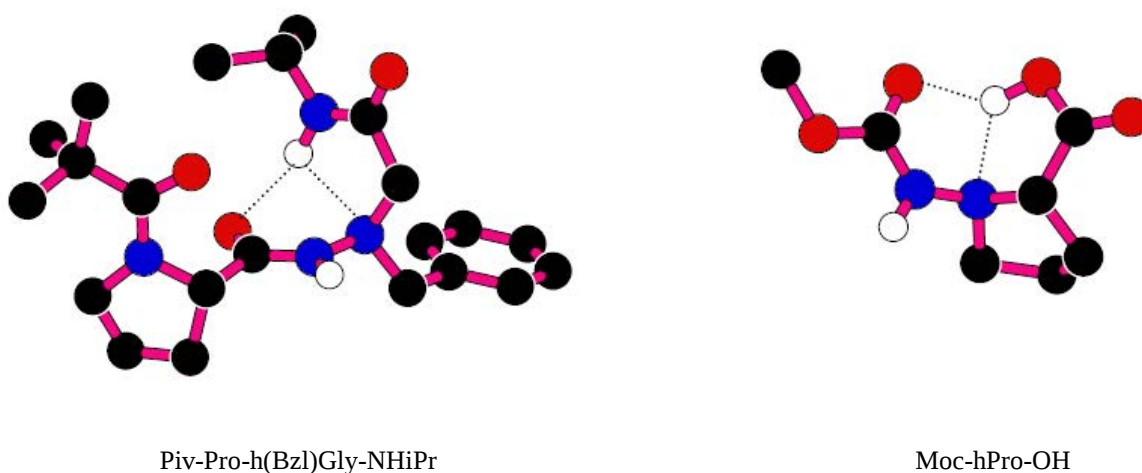


Figure 29 : Conformation à l'état solide de Piv-Pro-h(Bzl)Gly-NHiPr et Moc-hPro-OH

Plus récemment, l'équipe de Le Grel a synthétisé et étudié la structuration d'aza- β^3 -peptides, dérivés de l'acide hydrazinoacétique, dont la chaîne latérale portée par l'atome d'azote N^α entraîne une perte de chiralité de la molécule (Figure 30).⁹⁰

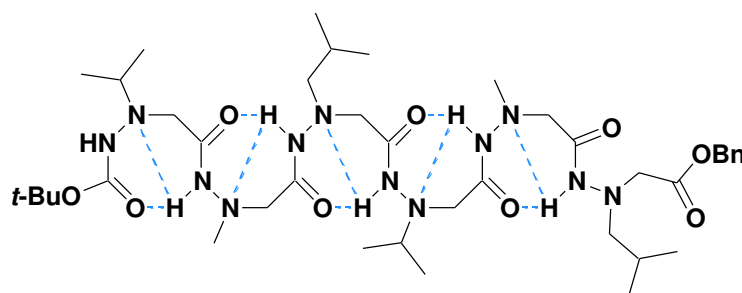


Figure 30 : Représentation de l'organisation conformationnelle d'un aza- β^3 -peptide

Une structuration de ces composés par formation de pseudocycles en C_8 , obtenus par un réseau de liaisons hydrogène bifides, est observé. Leur étude structurale a montré que l'atome d'azote N^α de ces molécules peut adopter deux conformations privilégiées, la première étirée, faisant apparaître une configuration absolue identique des atomes d'azote N^α , la seconde cyclique, faisant apparaître une alternance de configurations R,S des atomes d'azote N^α .

II.2.1.2 Les *N*-aminopeptides

Les *N*-aminopeptides sont les analogues des peptides naturels pour lesquels l'atome d'hydrogène de la fonction NH de la liaison peptidique est remplacé par une fonction amine primaire. Les premières études structurales de ces composés ont été réalisées par l'équipe de

90 a) Cheguillaume, A.; Salaun, A.; Sinbandhit, S.; Potel, M.; Gall, P.; Baudy-Floch, M.; Le Grel, P. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4923-4929. **b)** Salaun, A.; Potel, M.; Roisnel, T.; Gall, P.; Le Grel, P. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6499-6502.

Marraud sur des dérivés à un ou deux résidus.⁹¹ Les données obtenues par diffraction des rayons X et par les travaux en solution ont montré que la liaison *N*-aminoamide adopte une conformation *trans*, permettant la formation d'une liaison hydrogène, refermant un cycle à dix atomes, entre l'atome d'hydrogène du groupement NH_2Pr et l'atome d'oxygène du groupement Piv (Figure 31).^{88b}

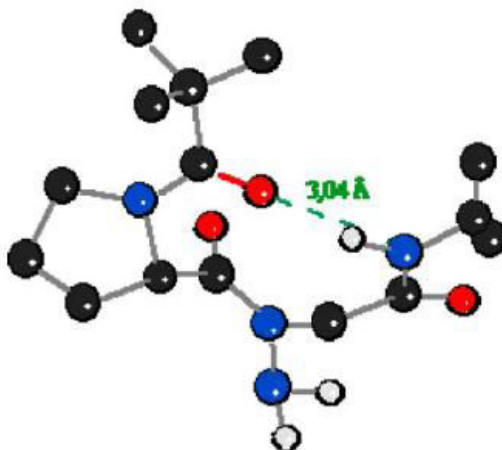


Figure 31 : Structure cristalline de Piv-ProΨ[CON(NH₂)]Gly-NHiPr

Plus récemment, les premiers pseudopeptides mixtes alternant un lien amide et un lien *N*-aminoamide, les 1:1-[α/α -*N*-amino]-peptides, ont été synthétisés sur support solide au laboratoire dans le cadre de la thèse d'Anne-Sophie Felten et ont fait l'objet d'études structurales (Figure 32).⁹²

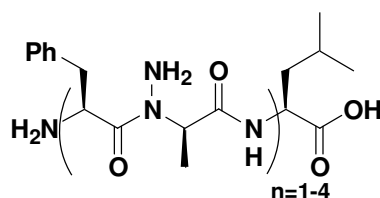


Figure 32 : Formule générale des 1:1-[α/α -*N*-amino]-oligomères

Les pseudopeptides ont été analysés par RMN, IR et modélisation moléculaire mais la très mauvaise résolution des spectres RMN et de la zone des bandes NH en IR n'a pas permis d'attribuer une structuration précise à ces composés. Seule la zone des bandes CO en IR semble indiquer l'existence de liaisons hydrogène. Les calculs effectués en modélisation moléculaire ont, quant à eux, fait ressortir une conformation privilégiée à partir de neuf résidus avec un réseau de liaisons hydrogène refermant des pseudocycles en C₁₀.

⁹¹ Lecoq, A.; Marraud, M.; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 2765-2768.

⁹² Felten, A.-S. *Thèse d'université : Synthèse de N-aminopeptides. Application à la synthèse de nouveaux foldamères*, **2007**, INPL Nancy.

Afin de déterminer la structure tridimensionnelle de ces pseudopeptides, d'autres 1:1-[α/α -N-amino]-peptides ont été synthétisés et étudiés au laboratoire par Sébastien Dautrey. Ces composés ont la particularité d'être protégés sur le groupement amine primaire du lien N-aminoamide par un groupement phthalimide.⁹³ Leur étude conformationnelle a montré que ces pseudopeptides peuvent s'autostructurer en solution *via* la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires en C₈ entre les fonctions carbonyles des groupements phthalimides et les atomes d'hydrogène des groupements NH des liaisons peptidiques (Figure 33).

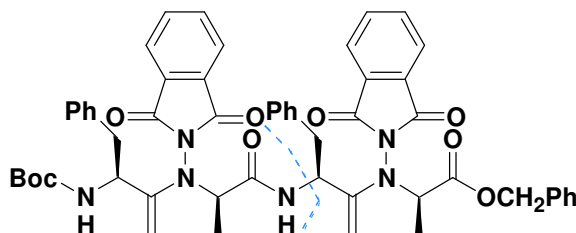


Figure 33 : Exemple de formation d'une liaison hydrogène en C₈ sur un tétramère mixte amide/N-amino

II.2.1.3 Les azapeptides

La structuration de ces pseudopeptides, dont l'atome d'hydrogène du CH $^{\alpha}$ d'un acide α aminé originel a été remplacé par un atome d'azote, ont beaucoup été étudiés par le Laboratoire de Cristallographie et Modélisation des Matériaux Minéraux de Nancy. En effet, l'équipe d'Aubry a résolu les structures cristallines de peptides contenant l'analogue de la proline (azaPro) ou de l'alanine (azaAla).^{11b-94} Ces travaux ont défini les caractéristiques géométriques des acides azaaminés :

- les liens amides CO-N sont allongés et les liaisons N-N $^{\alpha}$ et N $^{\alpha}$ -CO sont raccourcies par rapport à N-C $^{\alpha}$ et C $^{\alpha}$ -CO ;
- l'atome d'azote de substitution N $^{\alpha}$ adopte un caractère pyramidal de type sp³ et possède donc une chiralité.

Dernièrement, des pseudopeptides de type 2:1-[α /aza]-peptides ont été synthétisés au laboratoire dans le cadre de la thèse de Cécile Abbas-Quinternet (Figure 34).⁹⁵

⁹³ Dautrey, S. *Thèse d'université : Synthèse et étude conformationnelle de nouveaux oligomères mixtes : les [α/α -N-amino]mères*, **2009**, INPL Nancy.

⁹⁴ Benatalah, Z. ; Aubry, A.; Boussard, G.; Marraud, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 38, 603-605.

⁹⁵ Abbas, C. *Thèse d'université : Synthèse et études structurales de nouveaux 2:1-[α /aza]-oligomères, vers de nouveaux foldamères*, **2009**, INPL Nancy.

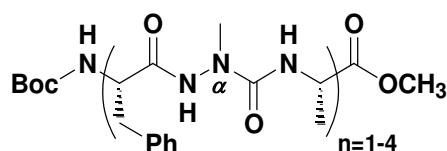


Figure 34 : Formule générale des 2:1-[α/aza]-peptides

Les études RMN et IR en solution, ainsi que la modélisation moléculaire laissent imaginer que la structure des 2:1-[α/aza]-hexamères présente un réseau de liaisons hydrogène qui s'établit entre les protons NH des résidus alanine et le groupement carbonyle du résidu phénylalanine, formant des pseudocycles en C₇ (Figure 35).

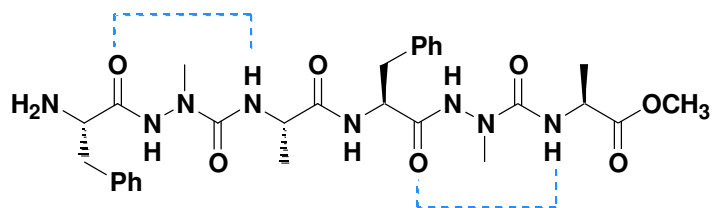


Figure 35 : Liaisons hydrogène s'établissant au sein des 2:1-[α/aza]-hexamères

Le calcul des angles de torsion par diffraction des rayons X des monocristaux de 2:1-[α/aza]-hexamères ont permis de déterminer quels types de repliement prennent place dans le pseudopeptide. La molécule présente deux coudes, le premier proche d'un coude β de type I et le deuxième d'un coude de type II, par formation d'un pseudocycle à 10 atomes de type $i+3 \rightarrow i$ (Figure 36). Ces composés n'ont pas le même comportement en solution qu'à l'état cristallin : la présence d'une molécule d'eau structurante dans les monocristaux peut expliquer cette différence.

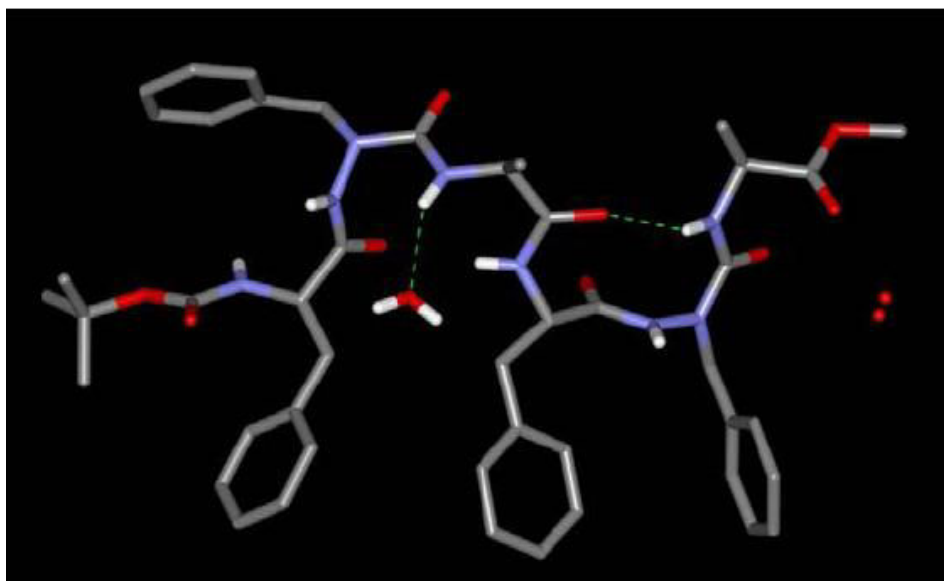


Figure 36 : Structure moléculaire dans le cristal du 2:1-[α/aza]-hexamère

II.2.2 Pseudopeptides incorporant des analogues de proline

Depuis quelques années, plusieurs équipes de recherche développent des voies de synthèses de différents analogues de la proline afin d'analyser l'impact qu'engendre ces composés, intégrés dans une chaîne peptidique, sur la conformation de la liaison AA- Ψ Pro. Les résultats de certaines de ces études sont décrits dans cette partie.

II.2.2.1 Les alkyl-prolines

Les substituants alkyles peuvent influencer la torsion du cycle, l'angle diédre Ψ et l'équilibre entre les conformères *cis/trans* de la liaison AA-Pro du résidu proline.

Par exemple, seul l'isomère *trans* de la *N*-acetyl- α -méthylproline *N'*-méthylamide est observé en RMN dans le CDCl_3 et le D_2O (Figure 37). La liaison hydrogène s'établissant entre l'atome d'hydrogène du motif NH de l'extrémité C_{term} et le groupement carbonyle de l'extrémité N_{term} ferme un pseudocycle en C_7 , correspondant à un γ -turn.⁹⁶

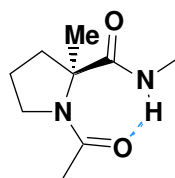


Figure 37 : Isomère *trans* de la *N*-acetyl- α -méthylproline-*N'*-méthylamide

Les prolines β substituées influencent plus particulièrement la valeur de leur angle diédre Ψ . Dans le cas des *N*-acetyl- β -méthylproline-*N'*-méthylamides, le substituant *cis*- β -méthyle cause des interactions stériques empêchant la formation de γ -turns, en imposant une valeur d'environ 80° à l'angle diédre Ψ . Ce phénomène a été observé en spectroscopie IR par l'équipe de Madison.^{94a} Un effet similaire a été observé dans les *N*-acetyl- β,β -diméthylproline-*N'*-méthylamides : la présence de deux groupements méthyles empêche la formation du pseudocycle en C_7 , permettant de diviser par sept l'isomérisation *cis* vers *trans* dans l'eau de la liaison amide en extrémité N_{term} , comme l'ont démontré des expériences de transferts de magnétisation réalisées par l'équipe de Lubell (Figure 38).⁹⁷

96 a) Delaney, N. G.; Madison, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6635-6641. **b)** Overberger, C. G.; Jon, Y. S. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1977**, *15*, 1413-1421.

97 Beausoleil, E.; Sharma, R.; Michnick, S.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6572-6578.

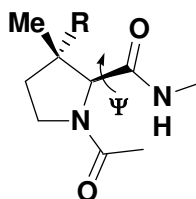


Figure 38 : Isomère *cis* des *N*-acetyl-β-méthylproline-*N'*méthylamides (R = H) et *N*-acetyl-β,β-diméthylproline-*N'*-méthylamides (R = Me)

Des γ-alkyprolines ont également été synthétisées, mais elles ont surtout été utilisées pour former des oligomères de proline grâce à leurs substituants en position γ qui n'agissent que très peu sur la conformation du résidu proline.⁹⁸

Plus récemment, l'équipe de Lubell a étudié l'impact conformationnel 5-*tert*-butylprolines sur les pseudopeptides qui l'hébergent. Les proportions d'isomères *cis* et *trans* des (2*S*,5*R*)-*N*-acetyl-5-*tert*-butylproline-*N'*-methyamide et (2*S*,5*S*)-*N*-acetyl-5-*tert*-butylproline-*N'*-methyamide ont tout d'abord été comparées avec celles de la *N*-acetyl-proline-*N'*-methyamide, grâce aux résultats obtenus en RMN ¹H et ¹³C dans l'eau. La conformation *trans* est majoritaire pour les dérivés de proline et de (2*S*,5*R*)-5-*tert*-butylproline (proportion de conformère *cis* : 27% et 49% respectivement) alors que 66% de dérivés de (2*S*,5*S*)-5-*tert*-butylproline sont en conformation *cis* (Figure 39).⁹⁹

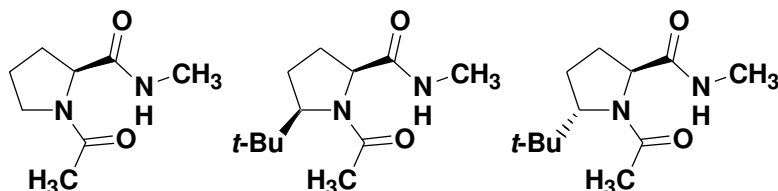
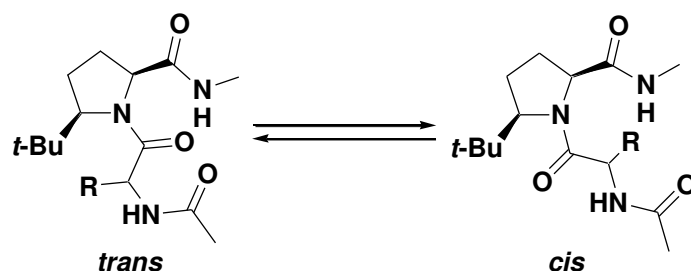


Figure 39 : Isomères *trans* des *N*-acetyl-proline-*N'*-methyamides étudiées par l'équipe de Lubell

L'équipe a ensuite intégré le dérivé (2*S*,5*S*)-5-*tert*-butylproline dans des pseudopeptides de formule Ac-AA-5-*t*-BuPro-NHMe afin d'étudier l'influence de la chaîne latérale du résidu AA et du solvant sur les proportions de conformères *cis* et *trans* (Schéma 40). Les résultats sont reportés dans le Tableau 11.

98 a) Koskinen, A. M. P.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1859-1866. **b)** Tamaki, M.; Han, G.; Hruby, V. J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3593-3596.

99 Beausoleil, E.; Lubell, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12902-12908.

Schéma 40 : Isomérisation cis/trans des pseudodipeptides Ac-AA-5-*t*-BuPro-NHMe

AA	Proportion d'isomère cis (% $\pm$ 3%)		
	D ₂ O	DMSO- <i>d</i> ₆	CDCl ₃
L-Ala	79	79	83
D-Ala	68	91	71
L-Leu	81	67	85
D-Leu	78	93	60
L-Phe	90	79	89
D-Phe	58	73	82

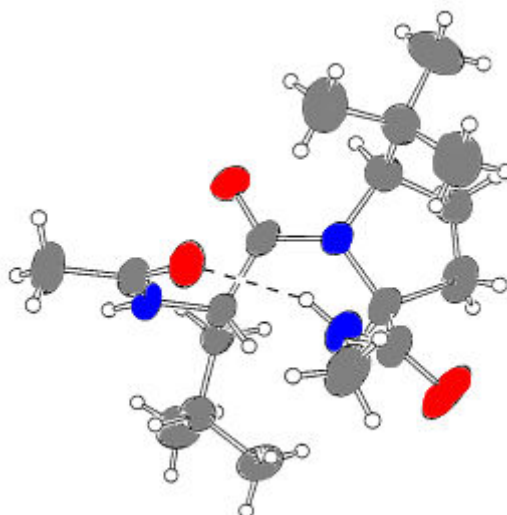
Tableau 11 : Influence du résidu AA et du solvant sur la proportion d'isomère cis des pseudodipeptides Ac-AA-5-*t*-BuPro-NHMe

Il découle de cette étude que plus la chaîne latérale du résidu AA est encombrée, plus la proportion de conformère *cis* augmente. Cette étude montre également que la population d'isomères *cis* est plus faible pour les pseudopeptides intégrant des acides aminés de la série D que ceux de la série L dans le CDCl₃ et l'eau, alors que l'effet inverse est reporté avec le DMSO. Le plus grand nombre d'isomères *cis* est observé dans le DMSO pour le résidu D-leucine (proportion supérieure à 90%).¹⁰⁰

La structure cristalline du pseudodipeptide Ac-Leu-5-*t*-BuPro-NHMe obtenue corrobore les précédents résultats puisqu'une liaison hydrogène s'établit entre l'atome d'hydrogène du motif NHMe et le groupement carbonyle de la protection Ac, fermant un pseudocycle en C₁₀ et correspondant à un coude βVIa (Figure 41).¹⁰¹

¹⁰⁰ Halab, L.; Lubell, W. D. *J. Peptide Sci.* **2001**, 7, 92-104.

¹⁰¹ Halab, L.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 3312–3321.

Figure 41 : Structure RX du pseudodipeptide Ac-Leu-5-*t*-BuPro-NHMe

II.2.2.2 Analogues de proline dont le cycle intègre un hétéroatome supplémentaire

Les analogues de proline de ce type ayant été les plus étudiés sont ceux au sein desquels l'atome de carbone de la position α ou de la position γ a été remplacé, respectivement, par un atome d'azote (azaproline) ou d'oxygène ou de silicium (oxaproline ou silaproline).

a. Azaproline

Cet aza-amino acide est un analogue de la proline dont la fonction CH^α a été remplacée par un atome d'azote et qui a été étudié au laboratoire il y a quelques années du point de vue conformationnel (Figure 42).¹⁰²

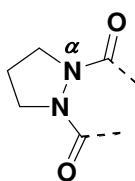


Figure 42 : Structure de l'azaproline

L'examen du Tableau 12 montre que les deux atomes d'azote du cycle de l'azaproline acquièrent une chiralité, variable selon la molécule.

102 a) Marraud, M.; Aubry, A. *Biopolymers* **1996**, 40, 45-83. **b)** Lecoq, A.; Boussard, G.; Marraud, M.; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5209-5212. **c)** Lecoq, A.; Boussard, G.; Marraud, M.; Aubry, A. *Biopolymers* **1993**, 33, 1051-1059.

Composé	Configuration des deux atomes d'azote du cycle pyrazolidine	Conformation
Ac-azaPro-NHMe	RR/SS	/ ^{98a}
Z-azaPro-Ala-NH <i>i</i> Pr	RR	étendue ^{98c}
Boc-Ala-azaPro-NH <i>i</i> Pr	SS	coude βVI ^{98c}
Boc-Ala-azaPro-L-Ala-NH <i>i</i> Pr	SS	coude βVI + α-turn ^{98a}
Boc-Ala-azaPro-D-Ala-NH <i>i</i> Pr	SS	coude βVI ^{98a}

Tableau 12 : Caractéristiques géométriques et conformationnelles de pseudopeptides incorporant l'azaproline

L'étude des deux pseudotripeptides semble révéler que la configuration R ou S des deux atomes d'azote du cycle est induite par l'acide α aminé précédant l'azaproline et non pas par la chiralité du résidu situé du côté C_{term}. Par ailleurs, la géométrie du cycle pyrazolidine impose à ces atomes d'azote la même configuration absolue (Figure 43).

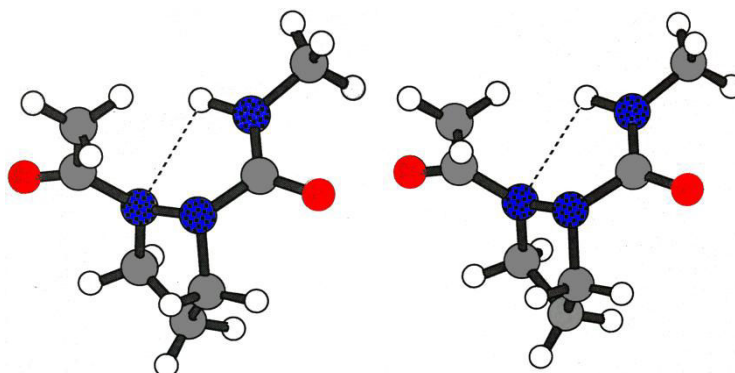


Figure 43 : Vue stéréoscopique de la molécule Ac-azaPro-NHMe dans l'état cristallin

D'un point de vue conformationnel, l'azaproline possède des propriétés structurantes inverses de celles de la proline. Son squelette ($\Phi \approx \pm 110^\circ$; $\Psi \approx \pm 20^\circ$) induit un repliement avec le résidu qui la précède et impose une conformation *cis* pour le lien amide du côté N_{term}, d'où la conformation en coude βVI privilégiée au sein des pseudopeptides Boc-Ala-azaPro-NH*i*Pr et Boc-Ala-azaPro-L-Ala-NH*i*Pr.

b. Oxaprolines

Les oxaprolines sont des acides (4*S*)-oxazolidine-4-carboxyliques dérivés de la sérine ou de la thréonine. Leur synthèse et leur étude conformationnelle par RMN dans le DMSO-*d*₆ ont été réalisées par l'équipe de Mutter, qui a ainsi pu déterminer le ration des conformères *cis* et *trans* de

différents pseudodipeptides de formule $\text{Ac-Ala-Xaa}_i[\Psi^{\text{R}_1, \text{R}_2}\text{Pro}]\text{-NHMe}$ ($\text{Xaa}_i = \text{Ser}$ ou Thr , Figure 44).¹⁰⁻¹⁰³

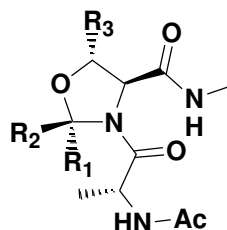


Figure 44 : Pseudopeptides incorporant une oxaproline

La proportion de conformères *cis* et *trans* dépend fortement de la nature des groupements R_1 et R_2 . En effet, lorsque ceux-ci correspondent à des atomes d'hydrogène, la proportion de conformère *cis* est de 33% alors qu'elle atteint presque 100% lorsque R_1 et R_2 sont des groupements méthyles. L'interaction entre ces groupements et la chaîne latérale du résidu alanine défavorise donc l'isomère *trans* de la liaison $\text{Ala-Xaa}_i[\Psi^{\text{Me, Me}}\text{Pro}]$ au profit de l'isomère *cis*. Mais bien qu'étant d'excellents analogues de *cis*-proline, ces oxaprolines restent néanmoins très sensibles à l'hydrolyse acide qui conduit à la formation de la sérine ou de la thréonine de départ. Cette sensibilité permet d'utiliser ces oxaprolines en tant que groupements protecteurs temporaires en synthèse peptidique.

L'équipe de Brigaud a montré que l'introduction d'un groupement trifluorométhyle en position δ du cycle (Tfm-pseudoproline) augmente sensiblement la résistance du cycle aux conditions acides. Ces pseudoprolines, intégrées dans des pseudotripeptides modèles (Figure 45), ont montré leur capacité à favoriser la conformation *cis* d'une liaison $\text{AA-}\Psi\text{Pro}$ grâce à l'effet électroattracteur et l'encombrement stérique du groupement trifluorométhyle, permettant d'obtenir environ 60% de conformères *cis*.¹⁰⁴

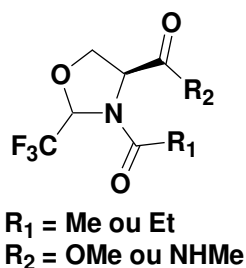


Figure 45 : Conformère *cis* des Tfm-pseudoprolines analysées par l'équipe de Brigaud

103 a) Wöhr, T.; Wahl, F.; Nefzi, A.; Rohwedder, B.; Sato, T.; Sun, X.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218–9227. b) Dumy, P.; Keller, M.; Ryan, D. E.; Rohwedder, B.; Wöhr, T.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 918–925.

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

c. Silaproline

La γ -(diméthylsila)-proline, plus communément appelée silaproline (Sip), est un analogue de la proline dans lequel le groupement méthylène en position γ a été remplacé par un groupement diméthylsilyle, dont la synthèse a été décrite par l'équipe de Martinez.¹⁰⁵ L'analyse conformationnelle en solution par RMN et spectroscopie IR de pseudotriptides de formule Piv-(D ou L)Ala-Sip-Ala-NH $\dot{i}$ Pr a montré que seuls 15% des isomères sont en conformation *cis*, comme ceux de leurs analogues incorporant la proline. Plus particulièrement, cette étude a permis d'observer deux conformères du pseudotriptide Piv-Ala-Sip-Ala-NH $\dot{i}$ Pr, résultants de la flexibilité de ce composé :

- le composé majoritaire aurait une conformation étendue, au sein de laquelle une liaison hydrogène s'établirait entre l'atome d'hydrogène du motif NH $\dot{i}$ Pr et le groupement carbonyle de la liaison Ala-Sip, formant un coude β I ;
- le composé minoritaire serait replié par deux coudes β I des côtés N $_{\text{term}}$ et C $_{\text{term}}$ (Figure 46).¹⁰⁶

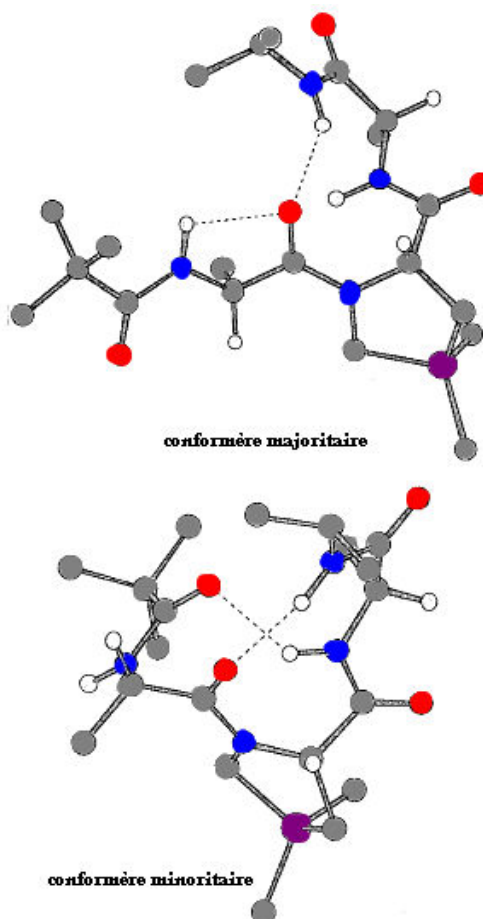


Figure 46 : Conformères majoritaire et minoritaire du pseudotriptide Piv-Ala-Sip-Ala-NH $\dot{i}$ Pr

¹⁰⁵ Vivet, B.; Cavelier, F.; Martinez, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 5, 807-811.

¹⁰⁶ Cavelier, F.; Vivet, B.; Martinez, J.; Aubry, A.; Didierjean, C.; Vicherat, A.; Marraud, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2917-2923.

L'équipe a également obtenu des monocristaux du pseudodipeptide Piv-Sip-Ala-NH/Pr, permettant de réaliser une analyse par diffraction des RX.¹⁰⁷ La structure du composé est de forme repliée grâce à l'établissement d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'atome d'hydrogène de l'amide en extrémité C_{term} et l'atome d'oxygène du groupement pivaloyle, refermant un pseudocycle en C₁₀. L'orientation du groupement amide central, par rapport au plan moyen de la molécule, est typique d'un coude β II (Figure 47).

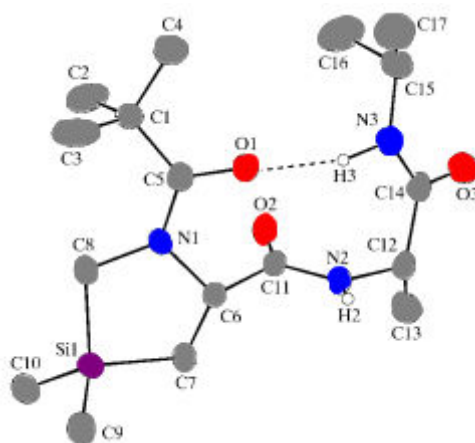


Figure 47 : Structure RX du pseudodipeptide Piv-Sip-Ala-NH/Pr

II.2.2.3 Conclusion

Les analyses conformationnelles présentées ci-dessus montrent que la structure de pseudopeptides de formules AA- Ψ Pro-AA dépend fortement de la nature de l'analogue de proline incorporé. Les différentes méthodes employées vont être utilisées afin de déterminer la structuration des pseudotriptides **19**, **20**, **23**, **24** et **32b** synthétisés.

III Méthodes et techniques d'études conformationnelles

Les outils physico-chimiques, qui permettent la mise en évidence des interactions responsables de la structuration d'oligomères, sont présentés ci-dessous.

III.1 Spectroscopie d'absorption Infrarouge (IR)

Les mouvements de vibration des atomes d'une molécule (étirements, torsions et basculement de ses liaisons) sont à l'origine d'absorption de type vibrationnel dans le domaine des ondes infrarouges.

¹⁰⁷ Vivet, B.; Cavelier, F.; Martinez, J.; Didierjean, C.; Marraud, M.; Aubry, A. *Acta Cryst.* **2000**, C56, 1452-1454.

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 1750-1580 cm^{-1}) et N-H (Bande A dans le domaine 3520-3200 cm^{-1}). Ces vibrateurs 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. Il est couramment admis, dans la littérature, qu'un NH amidique lié par liaison hydrogène a une bande d'absorption IR en dessous de 3400 cm^{-1} .¹⁰⁸

Malheureusement, le champ d'application de cette méthode spectroscopique est souvent limitée par la transparence des solvants dans la zone de fréquences explorée, la solubilité des molécules dans ces solvants, l'auto-association dans ces milieux et par la multiplicité et le chevauchement des bandes NH ou CO, rendant difficile une attribution précise de ces bandes. Pour palier ce problème, dans certains cas, une déconvolution des bandes est réalisée grâce à des programmes informatiques et des algorithmes mathématiques.

III.2 Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire est la méthode physicochimique qui a permis d'étendre les connaissances sur les propriétés des molécules en solution. Son principe 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.

108 Formaggio, F.; Crisma, M.; Tonolio, C.; Broxterman, Q. B.; Kaptin, B.; Corbier, C.; Saviano, M.; Palladino, P.; Benedetti, E. *Macromolecules* **2003**, 36, 8164-8170.

III.2.1 La RMN à deux dimensions

L'attribution univoque des signaux et éventuellement le séquençage ultérieur des pseudo-peptides sont établis grâce aux techniques particulières de la RMN à deux dimensions. La séquence COSY (COrelated SpectroscopY) permet de corrélérer les signaux provenant de noyaux couplés scalairement et éloignés de deux ou trois liaisons (2J , 3J), 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.¹⁰⁹ Cette expérience est souvent associée à une méthode plus sophistiquée, la séquence TOCSY (TOtally COrelated SpectroscopY), qui permet l'attribution de tous les spins au sein d'un même résidu.¹¹⁰

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).^{26,111} 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 5 Å. 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.

III.2.2 Les expériences de RMN à une dimension

Lors de l'étude structurale de pseudo-peptides, la RMN 1D permet de mettre en évidence des liaisons hydrogène s'établissant à partir d'un proton NH d'une fonction amine ou amide. Pour ce faire, quatre expériences peuvent être utilisées :

- Etude de l'influence de la température : elle consiste à interpréter les effets de température selon les propositions suivantes : dans un solvant accepteur de liaison hydrogène, une élévation de la température provoque la rupture des liaisons hydrogène intermoléculaires sous l'effet de l'agitation thermique ; inversement, le déplacement chimique d'un proton NH lié par liaison

109 a) Bax, A.; Freeman, R. *J. Magn. Reson.* **1981**, *44*, 542-561 **b)** Bax, A.; Freeman, R.; Morris, G. *J. Magn. Reson.* **1981**, *42*, 164-168.

110 Günther, R. *La spectroscopie de RMN*; Masson: Paris, **1994**.

111 Bothner-By, A. A.; Stephens, R. L.; Lee, J.; Warren, C. O.; Jeanloz, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 607-609.

hydrogène intramoléculaire reste quasiment indépendant de la température, tant que celle-ci ne sera pas suffisamment élevée pour casser ce type d'interaction ;¹¹²

- Etude de l'influence du solvant : très employée au laboratoire, elle consiste à suivre l'évolution des déplacements chimiques des protons NH lors de l'ajout d'un solvant très polaire (DMSO, qui, par son groupement sulfoxyde, peut établir des liaisons hydrogène avec tout proton NH) dans un solvant peu polaire (couramment CDCl_3). Si les protons NH ne sont pas engagés dans une liaison hydrogène intramoléculaire, leur déplacement chimique se déplace rapidement et notablement vers les champs faibles. En revanche, lorsqu'ils sont liés par liaison hydrogène intramoléculaire, leur déplacement chimique sera peu affecté par le changement de composition du milieu.^{11b} La variation de ces déplacements chimiques est d'autant plus faible que l'interaction intramoléculaire est forte ;

- Etude de l'influence de la concentration : lorsque le milieu de l'étude est concentré, la probabilité de liaisons hydrogène intermoléculaires augmente et un proton NH engagé dans ce type de liaison sera très sensible aux variations de concentration, son déplacement chimique augmentera vers les champs faibles. Au contraire, un proton NH impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire aura un déplacement chimique qui ne variera que très peu ;

- Mesure du $\Delta\delta$ des deux protons de mêmes amides primaires : récemment, l'équipe de Le Grel a montré que l'on peut révéler la présence de liaisons hydrogène lors de la mesure de la différence de déplacement chimique ($\Delta\delta$) des deux protons d'un même amide primaire. Cette interaction va conduire à un déblindage du signal d'un des deux protons et la valeur de $\Delta\delta$ permet de déterminer quel type de pseudocycle est fermé par la liaison hydrogène.¹¹³ Ainsi, une valeur de $\Delta\delta$ d'environ 2 ppm semble indiquer la présence d'une liaison hydrogène faible, fermant un pseudocycle en C_7 , alors qu'un $\Delta\delta$ d'environ 3 ppm correspondrait à une liaison hydrogène relativement forte, fermant un pseudocycle en C_{10} , ou à une liaison hydrogène à caractère bifide, comme celle des aza- β^3 -peptides synthétisés par cette équipe (Figure 48).

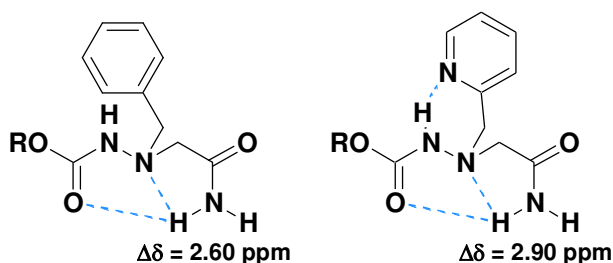


Figure 48 : Valeur du $\Delta\delta$ de deux aza- β^3 -dipeptides

¹¹² Iqbal, M.; Balaram, P. *Biopolymers* **1982**, 21, 1427-1433.

¹¹³ Salaun, A.; Favre, A.; Le Grel, B.; Potel, M.; Le Grel, P. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 150-158.

La RMN 1D permet également de déterminer les proportions d'isomères en équilibre de composés dont la liaison peptidique AA-Pro est en conformation *cis* ou *trans* en solution, et d'en calculer l'énergie d'isomérisation. Cette méthode de calcul a été mise au point par l'équipe de Lubell à partir des spectres RMN ^1H et ^{13}C de *N*-(acetyl)proline-*N'*-methyamidés, comportant une proline ou une 5-*tert*-butylproline, dans le D_2O .⁹⁹ Pour chacun de ces composés, un dédoublement de certains pics est observé en RMN ^1H et ^{13}C . L'équipe s'est particulièrement intéressée aux pics et aux déplacements chimiques des C^α , C^β , C^γ et C^δ du cycle de la pseudoproline en RMN ^{13}C . Les signaux des C^α et C^β des conformères *cis* sont situés vers les champs faibles par rapport à ceux des conformères *trans*, alors que ceux des C^γ et C^δ des conformères *cis* sont situés vers les champs forts comparés aux signaux des conformères *trans*. Grâce à ces informations, les proportions des isomères *cis* ont pu être calculées d'après la RMN ^1H en intégrant les massifs des protons α - et *N*-acetyl, ainsi que ceux du CH^δ et du groupement *tert*-butyl. L'énergie d'isomérisation de cette liaison amide peut alors être calculée à partir de ces proportions de conformères et de la température de coalescence en RMN ^1H des signaux étudiés.

III.3 Dichroïsme circulaire

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. L'absence de réponse en dichroïsme circulaire ou l'absence d'organisation régulière des chromophores des molécules à étudier conduit à un spectre de dichroïsme circulaire avec un signal d'intensité nulle, alors qu'une structuration conduit à un spectre avec des bandes positives et/ou négatives, appelées effet Cotton.

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 coudes et les feuillets β et les structures désordonnées.

III.4 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.

III.5 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 méthode 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 rayons X 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 : sont un mélange des méthodes *ab initio* et empiriques.

III.6 Conclusion

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.

IV Etude structurale des pseudotriptides AA₁-δ-azaPro-AA₃

Afin de déterminer les caractéristiques conformationnelles en solution des pseudotriptides AA₁-δ-azaPro-AA₃ synthétisés (Figure 14, page 52), des analyses par spectroscopies IR et RMN 1D et 2D ont été réalisées conjointement. Le but de ces analyses est de vérifier s'il existe une différence de structuration de ces pseudotriptides lorsque l'atome d'azote N^δ est sous forme protégée ou non, et également de confirmer l'hypothèse établie en Introduction Générale de ce manuscrit, à savoir la possibilité que la liaison AA₁-δ-azaPro se retrouve de façon privilégiée en conformation *cis*. Une analyse par RMN 1D a également été menée sur le pseudotriptide Boc-Phe-Pyr-Gly-OMe (Schéma 58, page 70) afin de vérifier si des liaisons hydrogène peuvent s'établir au sein de ce composé.

IV.1 Matériels et méthodes

Les spectres IR ont été réalisés dans le chloroforme à une concentration de 10 mM, concentration la plus faible possible pour avoir un signal IR exploitable. Ils ont été enregistrés sur un spectromètre TENSOR 27 et traités à l'aide du programme OPUS de Bruker. La cellule utilisée a des parois en fluorure de calcium et un chemin optique de 50 μm. Les spectres RMN une dimension ont été réalisés, à l'aide d'un spectromètre Avance 300 MHz, dans le chloroforme deutéré ou le DMSO deutéré à une concentration de 5 mM. Ces deux concentrations sont suffisamment diluées pour empêcher l'établissement de liaisons hydrogène intermoléculaires.

Les spectres ROESY des pseudotriptides **20**, **23** et **24** ont été réalisés, à l'aide d'un spectromètre Bruker 600 MHz, équipé d'une crysonde de 5 mm à triple-résonance (1H, 13C et 15N), dans le chloroforme deutéré à une concentration de 5 mM à 280 K. Les spectres ROESY ont été enregistrés en mode phase-sensible *States-TPPI* avec une matrice composée de 256 (t₁) × 2048 (t₂) points. Huit scans par incrément t₁ avec un délai de relaxation de 1 s et une largeur spectrale de 5100 Hz dans les deux dimensions ont été utilisés. Le temps de mélange est de 400 ms pour l'expérience ROESY. Les spectres ont été traités avec le logiciel Topspin (Bruker Biospin) et visualisés avec Topspin ou NMRView. Les matrices ont subi un *zero-filled* 1024 (t₁) × 2048 (t₂) points après une apodisation par une fonction sinus carré et une prédiction linéaire en F₁. Les pics croisés ROE ont été attribués et leurs volumes ont été mesurés avec le logiciel NMRView. Le volume d'un ROE entre une paire de protons méthyléniques a été utilisé comme référence de 1,8 Å. La limite inférieure pour toutes les contraintes a été fixée à 1,8 Å et les limites supérieures à 2,7, 3,3 et 5 Å pour les corrélations respectivement fortes, moyennes et faibles. Les corrections des pseudo-atomes des limites supérieures ont été effectuées pour les signaux non résolus des protons aromatiques, des méthylènes et des méthyles.

Les calculs de structure ont été effectués avec le logiciel AMBER 10 en deux étapes : chauffe et recuit simulé sous vide. L'étape de chauffe a été réalisée à 1000 K pour générer 100 structures aléatoires initiales. Les calculs SA ont duré 20 ps (20000 étapes par pas de 1 fs). La température a tout d'abord été rapidement augmentée et maintenue à 1000 K pour les 5000 premières étapes, puis le système a été refroidi graduellement de 1000 K à 100 K de l'étape 5001 à l'étape 18000. Finalement, la température a été portée à 0 K pendant les 2000 dernières étapes. Durant les 3000 premières étapes, la constante de force des contraintes de distance a été graduellement augmentée de 2,0 kcal.mol⁻¹.Å à 20 kcal.mol⁻¹.Å. Pour le reste de la simulation (étapes 3001 à 20000), la constante de force est fixée à 20 kcal.mol⁻¹.Å. Les 20 structures de plus basses énergies sans violation des contraintes de distance supérieures à 0,3 Å sont considérées comme étant représentatives de la structure du pseudotriptide étudié. Les représentations et l'analyse quantitative des structures calculées ont été effectuées en utilisant MolMol et PyMol (Delano Scientific).

Aucun spectre de dichroïsme circulaire n'a pu être exploité puisqu'aucun signal n'a été détecté lors de l'analyse des pseudotriptides, contrairement à l'équipe de Lubell qui avait pu obtenir un signal pour ses *N*-acetyl-proline-*N'*-methyldamides.⁹⁹ De même, malgré des tentatives de cristallisation de ces composés, aucun monocristal n'a pu être obtenu et donc aucun spectre de diffraction des rayons X n'a pu être enregistré.

IV.2 Etude conformationnelle de Boc-Phe-Pyr-Gly-OMe (32a)

Les deux liaisons hydrogène qui ont la plus grande probabilité de s'établir au sein du tripeptide **32a** sont celles entre l'atome d'azote hybridé sp² du cycle pyrazolique et le proton NH de la liaison amide Pyr-Gly, formant en pseudocycle en C₅, ou le proton NH carbamidique de la phénylalanine, formant un pseudocycle en C₆ (Figure 49).

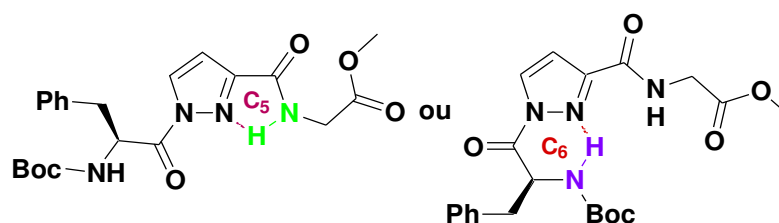
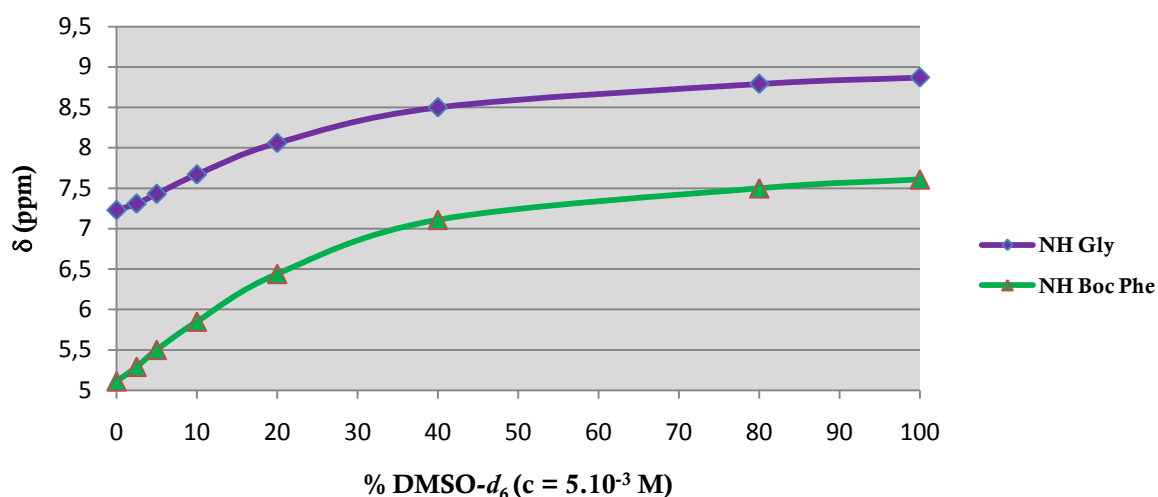


Figure 49 : Liaisons hydrogènes pouvant s'établir au sein du pseudotriptide 32a

Afin de vérifier l'implication de ces protons NH dans une liaison hydrogène, seule l'étude dans des mélanges CDCl₃/DMSO-*d*₆ en RMN ¹H a été réalisée. En effet, le pseudotriptide **32a** n'ayant pas pu être isolé, le spectre IR du brut réactionnel n'était pas exploitable alors que les déplacements chimiques en RMN ¹H des protons NH ont pu être attribués grâce aux expériences

RMN 2D. Les déplacements chimiques des protons amides ont été mesurés en fonction de la concentration en DMSO, ces proportions ayant été augmentées de 0 jusqu'à 100%, dépassant la valeur de 10% usuellement rencontrée dans la littérature, les travaux de Lecoq menés au laboratoire ayant montré qu'il était nécessaire d'aller au-delà de cette concentration en DMSO- d_6 pour que des protons NH libres puissent établir une liaison hydrogène avec le DMSO.^{11b} Les variations des déplacements des protons NH sont reportées dans le Graphe 1.



Graphe 1 : Influence du DMSO- d_6 sur les déplacements chimiques des protons NH de 32a

Ces deux déplacements chimiques subissent fortement l'augmentation de la concentration en DMSO- d_6 . Les variations de 1,6 ppm du proton NH de la glycine (violet) et de 2,5 ppm du proton NH de la phénylalanine (vert) indiquent clairement que ceux-ci ne sont pas engagés dans une liaison hydrogène intramoléculaire.

Ces résultats semblent montrer qu'aucune autostructuration ne semble avoir lieu au sein du pseudotriptide **32a**, mais comme l'expérience RMN 1D seule ne permet pas de conclure quant à la structure de ce composé, il sera nécessaire de mener d'autres expériences d'analyse conformationnelle sur ce peptide, au préalable purifié.

IV.3 Etude conformationnelle des pseudotriptides Z-Ala-(D+L)- δ -azaPro(Boc)-Phe-OMe (19) et Z-Gly-(D+L)- δ -azaPro(Boc)-Gly-OMe (20)

IV.3.1 Par RMN à une dimension

Les pseudotriptides Z-Ala-(D+L)- δ -azaPro(Boc)-Phe-OMe **19** et Z-Gly-(D+L)- δ -azaPro(Boc)-Gly-OMe **20** possèdent chacun un proton NH carbamidique et un proton NH

amidique, seuls motifs pouvant générer des liaisons hydrogène avec un groupement carbonyle. Deux pseudocycles peuvent alors se former : un pseudocycle en C₇ entre le proton du NH amidique de l'acide aminé AA₃ et le groupement carbonyle de la liaison AA₁-δ-azaPro, ou un pseudocycle en C₁₀ entre le même proton du NH amidique et le groupement carbonyle de la protection Z terminale. De façon moins probable, un troisième pseudocycle en C₈ peut s'établir entre le carbonyle de la protection Boc et le proton NH de l'alanine ou la glycine (Figure 50).

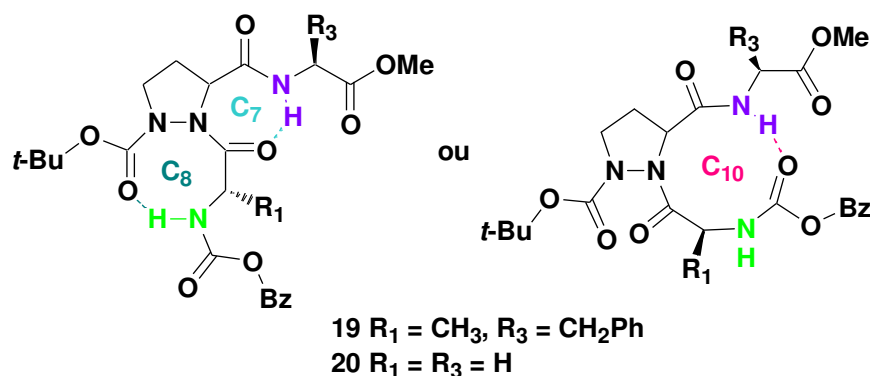
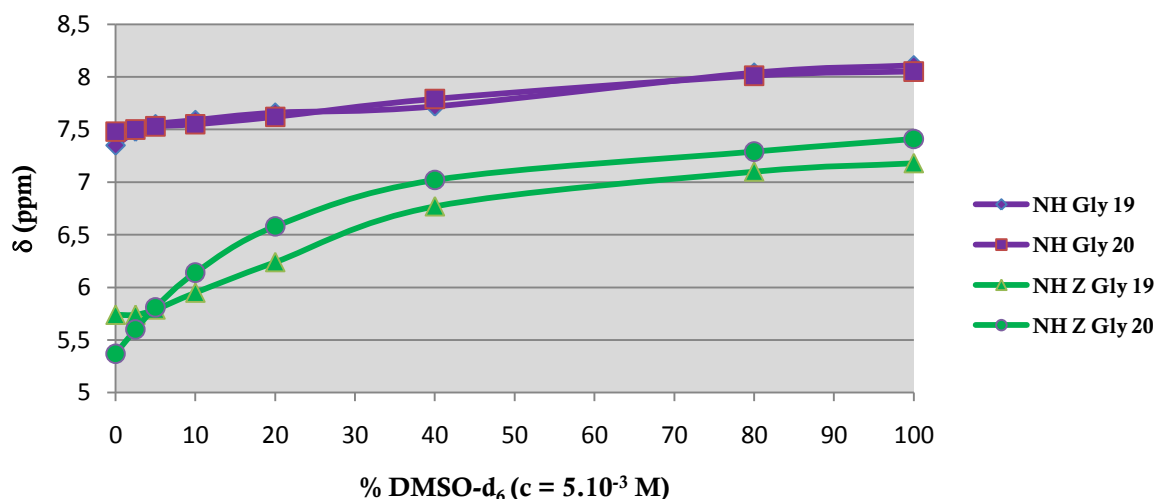


Figure 50 : Liaisons hydrogène pouvant s'établir au sein des pseudotriptides 19 et 20

L'influence de l'introduction du DMSO-*d*₆ a été étudiée par spectroscopie RMN ¹H. Les variations des déplacements des protons NH sont reportées dans le Graphe 2.



Graphe 2 : Influence du DMSO-*d*₆ sur les déplacements chimiques des protons NH de 19 et de 20

Les résultats obtenus pour les deux pseudotriptides sont assez similaires : le déplacement chimique du proton NH carbamidique du résidu alanine ou glycine (en vert) varie significativement vers les champs faibles, il n'est donc pas lié par liaison hydrogène ($\Delta\delta = 1,53$ ppm pour **19** et $\Delta\delta = 2,04$ ppm pour **20** de 0 à 100% de DMSO-*d*₆) ; par contre, le proton amidique du résidu phénylalanine ou glycine (en violet) n'est pas très perturbé par l'ajout de

DMSO dans le milieu ($\Delta\delta = 0,78$ ppm pour **19** et $\Delta\delta = 0,57$ ppm pour **20** de 0 à 100% de DMSO- d_6). Ces résultats sont à comparer avec ceux obtenus par Lecoq pour le peptide modèle des repliements en C_7 Piv-Pro-NHMe, pour lequel la variation de déplacement chimique du proton NHMe est de 0,50 ppm de 0 à 100% de DMSO- d_6 .^{11b} Comme la variation de déplacement chimique des protons NH du résidu AA₃ se rapproche de cette valeur de 0,50 ppm, ces proton amidiques seraient donc plutôt impliqués dans une liaison hydrogène refermant un C_7 au sein des pseudotripeptides **19** et **20**.

Les spectres ^1H et ^{13}C enregistrés à température ambiante des pseudotripeptides **19** et **20** ne présentent pas de dédoublements de signaux, caractéristiques de la présence de deux conformères en solution. Ce résultat peut être expliqué par le fait que :

- soit il n'y a pas d'équilibre entre les formes *cis* et *trans* et un seul conformère est donc présent en solution ;

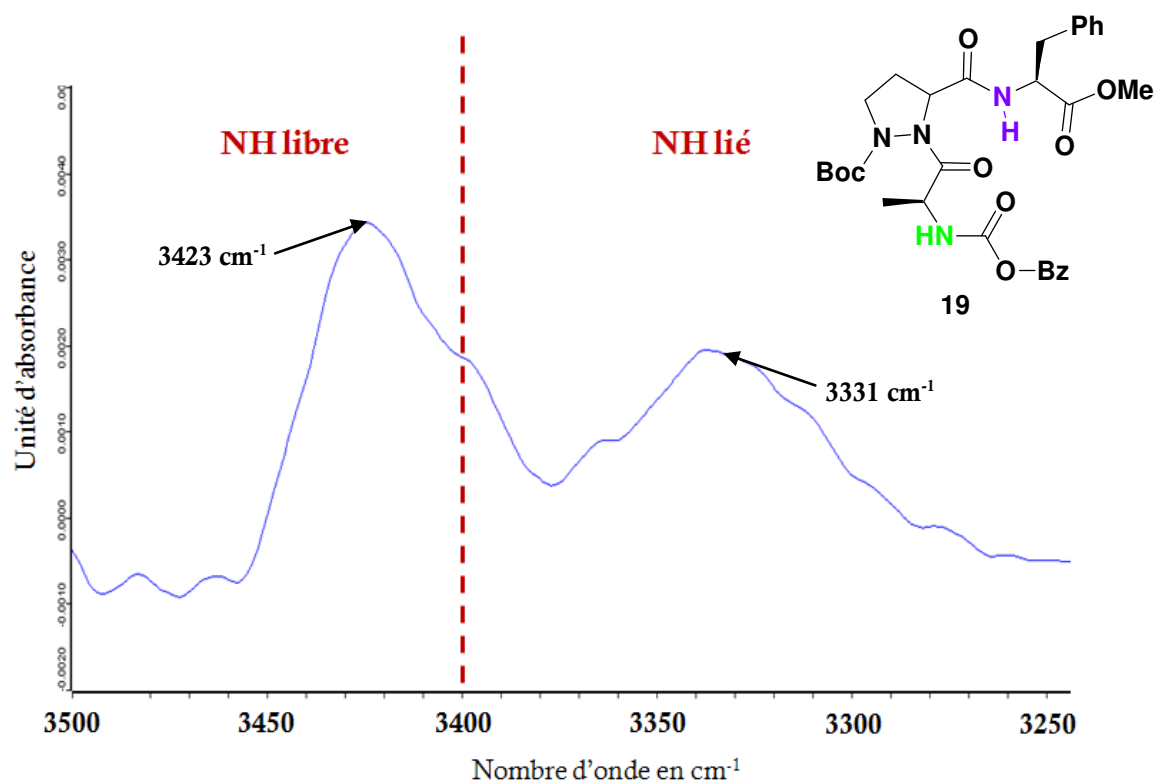
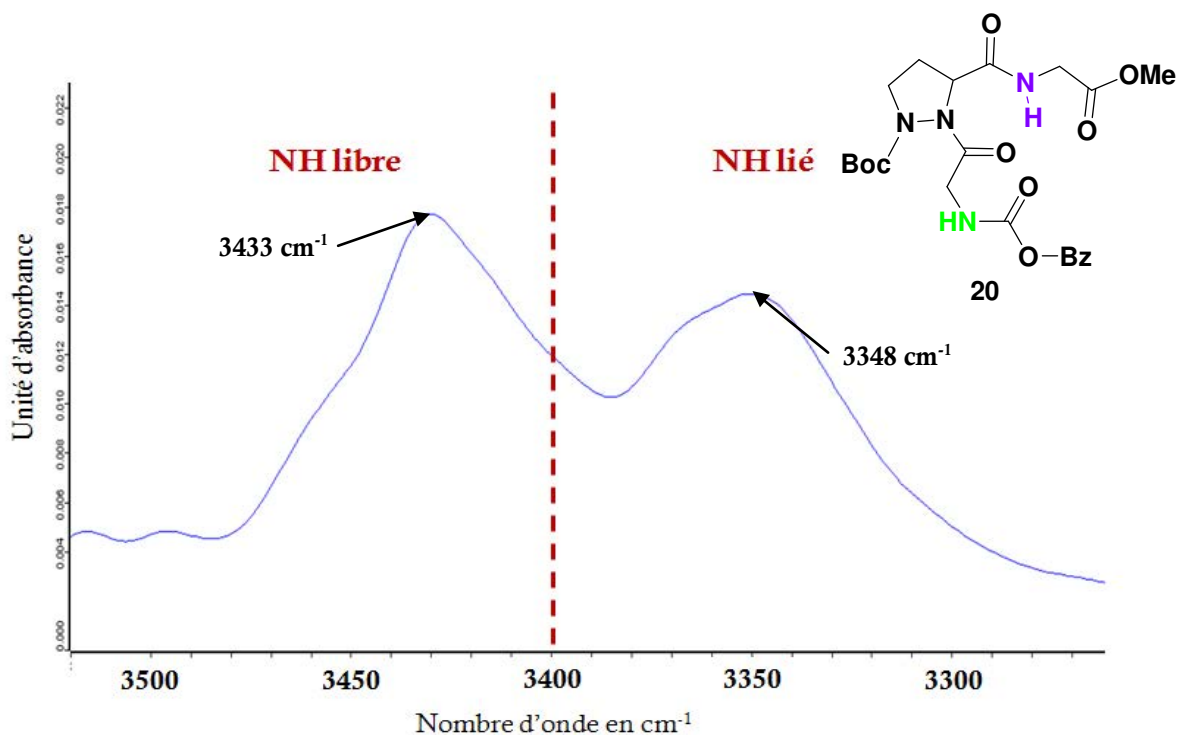
- soit l'échange entre les deux isomères est trop rapide dans les solvants utilisés pour être visible en RMN : il aurait fallu pouvoir enregistrer des spectres dans le D_2O afin de ralentir cet échange,¹¹⁴ mais malheureusement, les pseudotripeptides étudiés ne sont pas solubles dans l'eau.

Le spectre ^1H du pseudotripeptide **20** a cependant pu être réalisé à 280 K sur le spectromètre 600 MHz, dans le but de ralentir l'échange entre les deux conformations. Dans ces conditions, des signaux de très faible surface apparaissent, correspondants aux signaux d'un deuxième isomère. Ce résultat montre qu'un conformère est donc largement majoritaire par rapport à l'autre

IV.3.2 Par spectroscopie IR

Les pseudotripeptides **19** et **20** ont ensuite été étudiés par spectroscopie infrarouge. La zone de vibration d'élongation des bandes NH a tout d'abord été étudiée (Figure 51 et Figure 52).

¹¹⁴ Stein, R. L. *Adv. Protein Chem.* **1993**, *44*, 1-24.

Figure 51 : Spectre IR (CHCl₃), zone des vibreurs NH du pseudotripeptide 19Figure 52 : Spectre IR (CHCl₃), zone des vibreurs NH du pseudotripeptide 20

Le vibreur NH est considéré comme lié en solution lorsque le nombre d'onde est inférieur à 3400 cm⁻¹. Sur les deux figures, deux bandes très larges qui correspondent aux vibrations de liaisons N-H apparaissent. Compte tenu des résultats obtenus en RMN, les maxima

situés à 3423 et à 3433 cm^{-1} , correspondant à une vibration d'élongation de liaison NH lorsque l'atome d'hydrogène est libre, peuvent être attribuées aux groupements NH carbamidiques des résidus alanine et glycine. De même, les bandes à 3431 et 3348 cm^{-1} répondent à la vibration d'élongation des groupements NH amidique des résidus phénylalanine et glycine et indiquent que ces atomes d'hydrogène sont liés par liaison hydrogène.

Afin de déterminer la nature du groupement accepteur de la liaison hydrogène, la zone du vibreur C=O a été analysée. Etant donné le nombre de groupements carbonyles différents, il est très difficile de distinguer une limite libre/lié comme pour les vibreurs NH. En revanche, l'engagement dans une liaison hydrogène entraîne l'apparition d'une bande supplémentaire, dont le nombre d'onde est diminué de 5 à 20 cm^{-1} par rapport à celui de sa bande libre. Le traitement après acquisition de déconvolution des bandes dans la zone de vibration des C=O dans le programme OPUS de Bruker a été réalisé d'après la méthode de Levenberg-Maquard. Les bandes d'absorption de la zone des C=O ont été extraites par calcul de la dérivée seconde du spectre expérimental. L'ajustement de la somme des pics est effectué suivant un modèle Gaussien.

Malheureusement, en raison de la mauvaise résolution du spectre infrarouge dans cette gamme spectrale du pseudotripeptide **19**, seule l'étude sur le composé **20** a pu être réalisée (Figure 53).

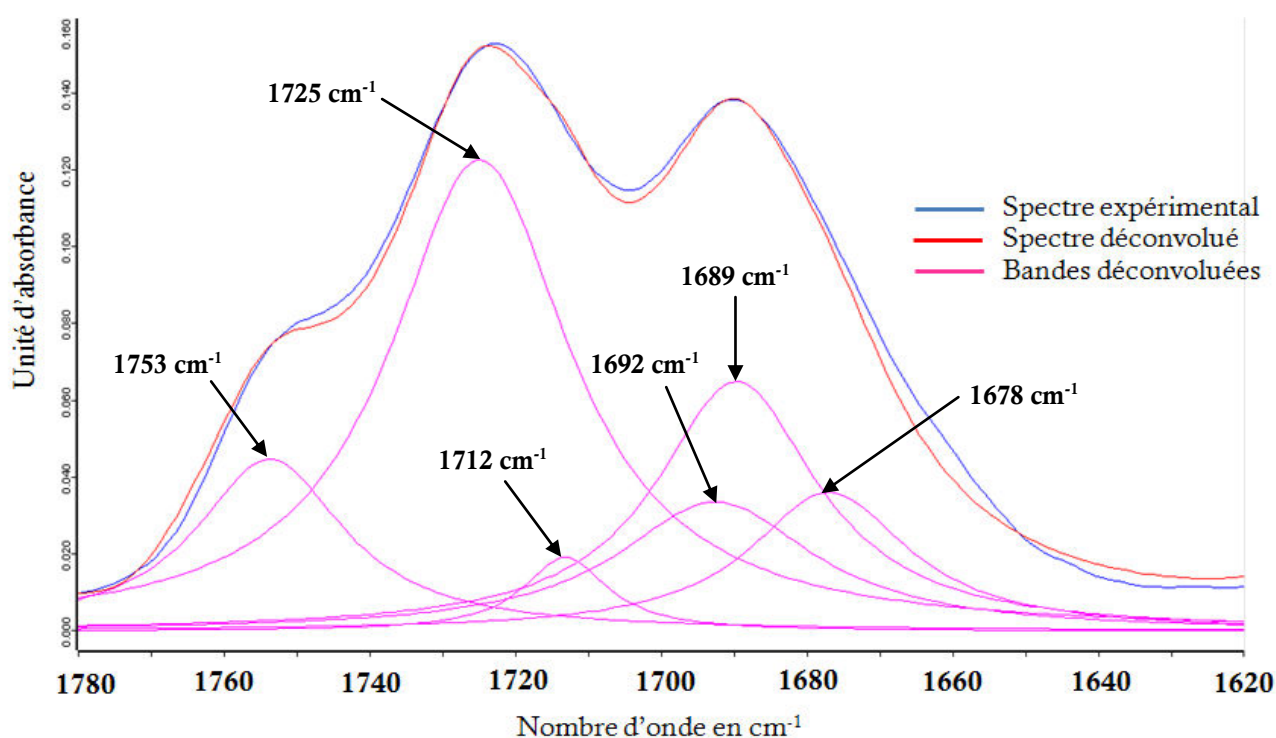


Figure 53 : Spectre IR (CHCl_3), déconvolution de la zone des vibreurs CO du pseudotripeptide **20**

L'attribution des bandes a été réalisée à l'aide des données spectroscopiques obtenues au laboratoire par Felten⁹² et Dautrey⁹³ sur des *N*-aminodipeptides (Figure 54).

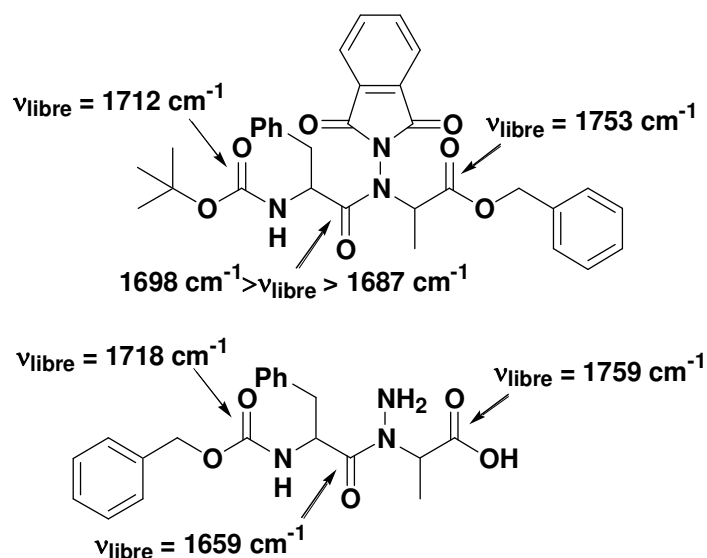


Figure 54 : Nombre d'ondes des différents carbonyles de deux *N*-aminodipeptides

Une bande caractéristique du carbonyle de l'ester méthylique est visible à 1753 cm^{-1} . D'après les attributions effectuées par Felten et Dautrey, le carbonyle du groupement Z peut être attribué à la bande à 1725 cm^{-1} , correspondant au nombre d'onde d'un carbonyle non impliqué dans une liaison hydrogène, et la bande caractéristique du carbonyle du groupement Boc est quant à elle située à 1712 cm^{-1} . Les trois dernières contributions à 1692 , 1689 et 1678 cm^{-1} correspondent aux carbonyles des deux liaisons peptidiques, les bandes à 1692 et 1689 cm^{-1} pouvant être attribuées au carbonyle de la liaison Gly- δ -azaPro sous ses formes, respectivement, libre et engagé dans une liaison hydrogène.

D'après les résultats des expériences RMN 1D et IR, l'hypothèse de la formation d'un pseudocycle en C_7 entre le proton du NH amidique et le carbonyle de la liaison AA₁- δ -azaPro peut être posée. La conformation *trans* de la liaison AA₁- δ -azaPro serait donc majoritaire pour les pseudotriptides **19** et **20**, l'encombrement stérique du groupement Boc ne favorisant pas la conformation *cis* de cette liaison (Figure 55).

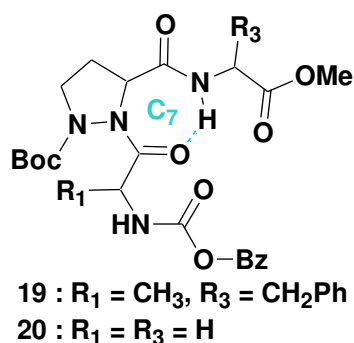


Figure 55 : Structure majoritaire des pseudotriptides **19** et **20** en solution

IV.3.3 Par RMN deux dimensions et modélisation par dynamique moléculaire sous contraintes RMN

Afin de vérifier l'hypothèse conformationnelle qui prend place au sein de ces pseudopeptides, l'étude conformationnelle a été approfondie par RMN en relevant les corrélations ROE intéressantes par spectroscopie RMN à deux dimensions du pseudotripeptide **20**. La recherche des corrélations dans une carte ROESY a permis de connaître les interactions à moyennes distances qui s'établissent dans le composé étudié. Cette carte ROESY est représentée en Figure 56, où les corrélations ROE les plus significatives sont entourées.

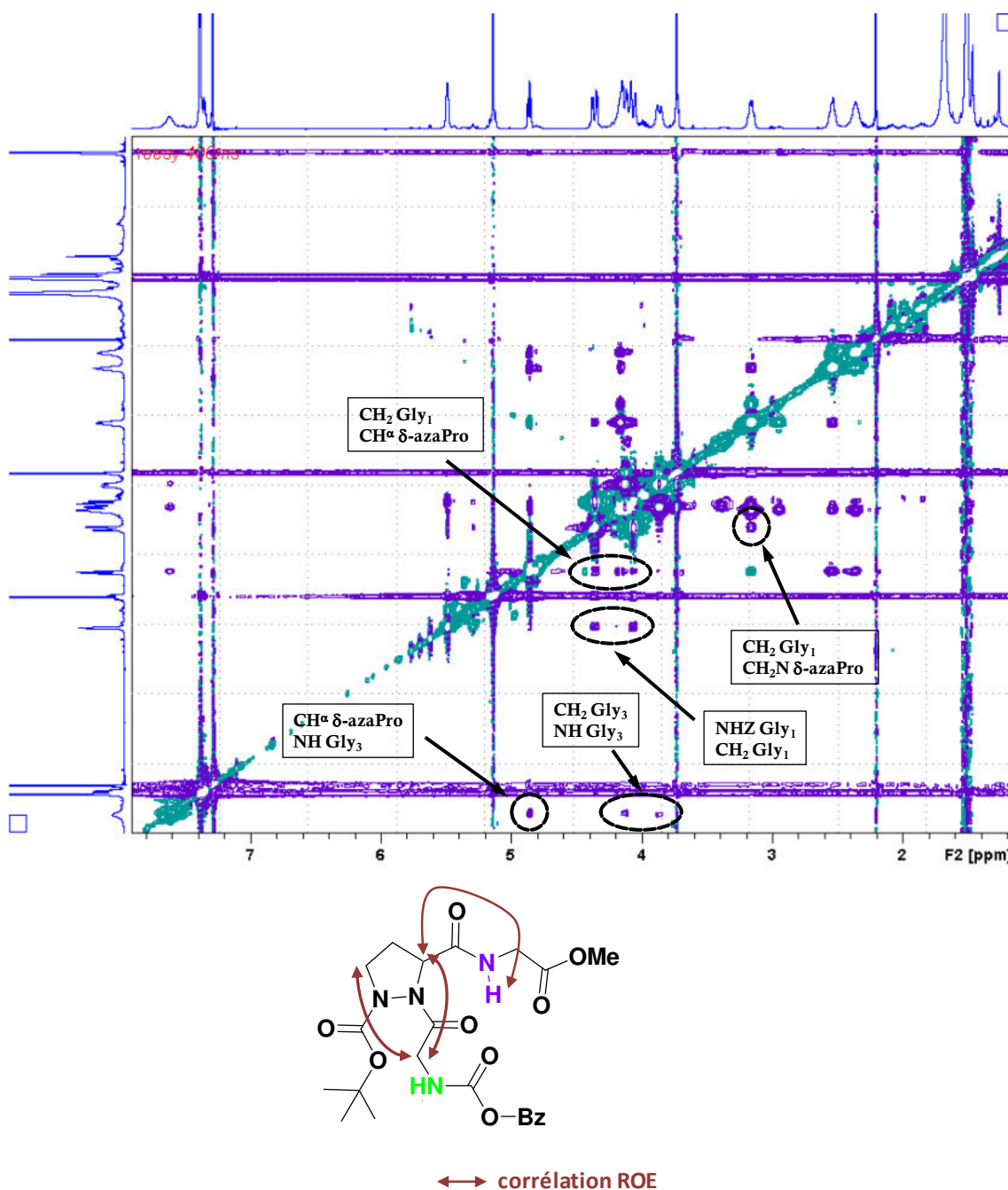


Figure 56 : Carte 2D ROESY (CDCl_3) du pseudotripeptide **20**

Des corrélations ROE s'établissent entre les couples de groupements $\text{CH}_2\text{Gly}_1/\text{CH}_2\text{N}\delta\text{-azaPro}$, $\text{CH}_2\text{Gly}_1/\text{CH}^\alpha\delta\text{-azaPro}$ et $\text{CH}^\alpha\delta\text{-azaPro}/\text{NHGly}_3$ représentés sur la structure du tripeptide **20** de la Figure 55. Ces effets confirment l'hypothèse de la conformation *trans* de la liaison Gly- δ -azaPro puisqu'ils montrent que le groupement CH_2 de Gly_1 est proche des protons du cycle de la δ -azaproline.

La structure du pseudotripeptide **20** a ensuite été modélisée par dynamique moléculaire en prenant en compte les corrélations ROE. L'ensemble des 20 structures obtenu montre que le groupement NH de la liaison δ -azaPro-Gly peut être lié par liaison hydrogène intramoléculaire avec le groupement carbonyle de la liaison Gly- δ -azaPro, en formant un pseudocycle en C_7 (Figure 57).

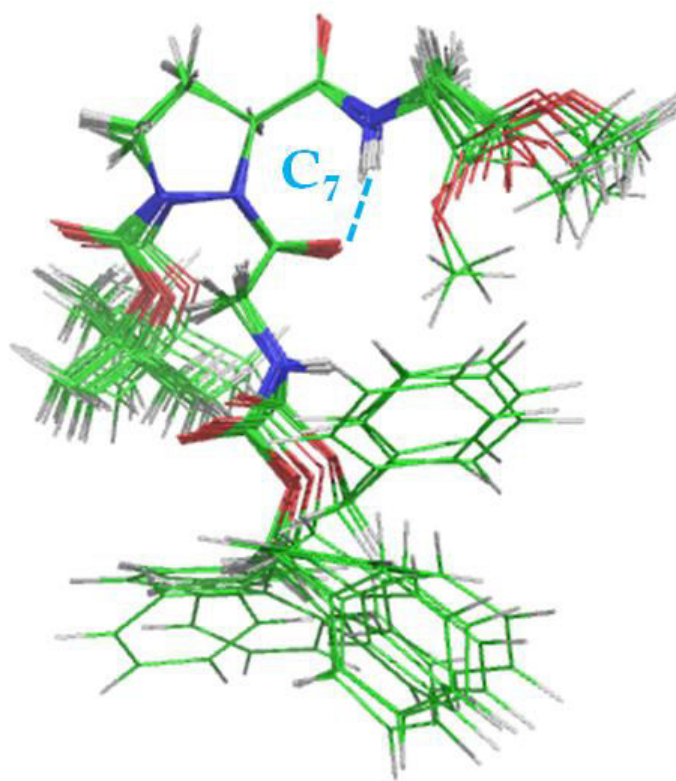


Figure 57 : Structure du pseudotripeptide 20 obtenue par dynamique moléculaire sous contrainte RMN par AMBER 10

Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus par RMN et IR selon lesquels le proton NH de la liaison δ -azaPro-Gly et la liaison Gly- δ -azaPro est majoritairement en conformation *trans*.

IV.4 Etude conformationnelle du pseudotriptide Z-Gly-(D+L)- δ -aza-Pro(Boc)-Gly-NH₂ (**23**)

Afin de mimer un peptide plus long, l'extrémité C_{term} du pseudotriptide **20** sous forme ester a été modifiée en groupement amide primaire. Le même type de structuration peut s'établir au sein du composé Z-Gly-(D+L)- δ -azaPro(Boc)-Gly-NH₂ **23** que dans le tripeptide **20**, à savoir un pseudocycle en C₇ entre le proton du NH amidique de l'acide aminé Gly₃ et le groupement carbonyle de la liaison Gly₁- δ -azaPro, ou un pseudocycle en C₁₀ entre le même proton du NH amidique et le groupement carbonyle de la fonction Z terminale. Grâce à la présence des deux protons amidiques NH supplémentaires sur l'extrémité C_{term}, deux autres pseudocycles, un en C₇ et l'autre en C₁₀, peuvent se former entre ces protons et le groupement carbonyle de la liaison δ -azaPro-Gly₃ ou le groupement carbonyle de la liaison Gly₁- δ -azaPro (Figure 58).

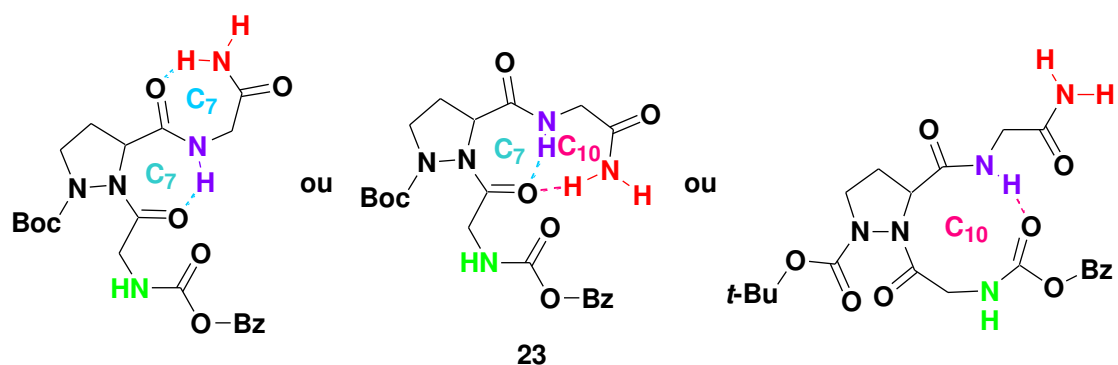
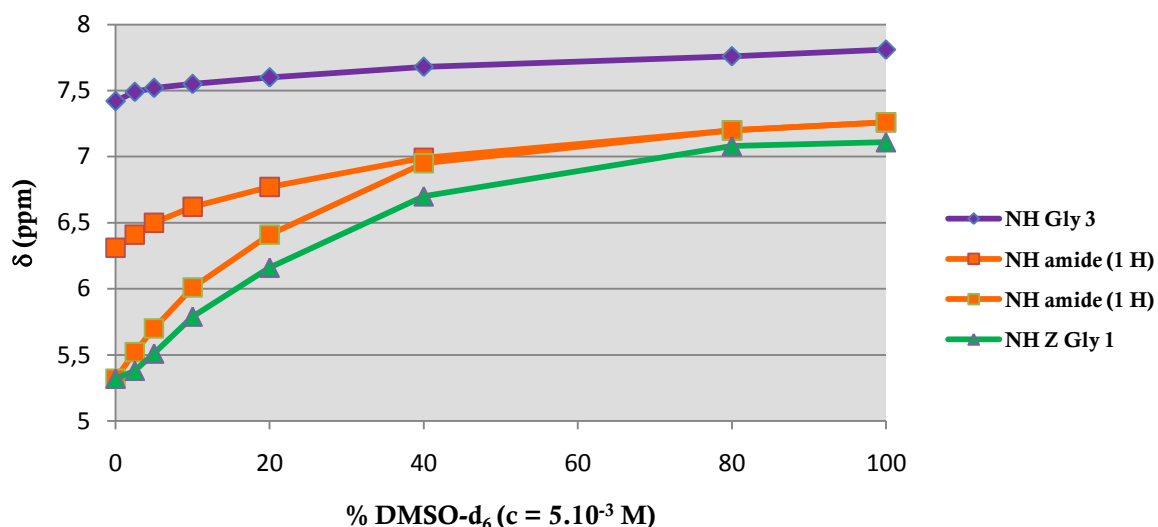


Figure 58 : Liaisons hydrogènes pouvant s'établir au sein du pseudotriptide **23**

Aucun dédoublement de signaux n'a été observé en RMN ¹H et ¹³C, aussi bien à température ambiante qu'à 280 K : il semble qu'un seul conformère du pseudotriptide **23** soit présent en solution. Ce composé a été étudié dans des mélanges de solvant (CDCl₃/DMSO-*d*₆) et les déplacements chimiques des différents NH ont été mesurés en fonction de la concentration en DMSO-*d*₆. L'étude a mis en évidence le même comportement des protons NH amidiques et carbamidiques que pour le pseudotriptide **20** (Graphe 3).



Graphe 3 : Influence du DMSO-d₆ sur les déplacements chimiques des protons NH de **23**

La variation du déplacement chimique d'environ 2 ppm du proton carbamidique (en vert) et d'un des deux protons amides de l'extrémité C_{term} (en orange) indique clairement que ces protons sont libres. Le proton du groupement NH du résidu Gly₃ (en violet, $\Delta\delta = 0,39$ ppm) ne subit que très peu l'influence du DMSO : il est donc lié par liaison hydrogène intramoléculaire.

Par contre la variation de 0,9 ppm du deuxième proton amidique de l'extrémité N_{term} indique soit un proton libre, soit l'implication d'une partie de la population du composé **23** dans une liaison hydrogène. La mesure de la différence entre les déplacements chimiques de chacun de ces deux protons amidiques permet de déterminer quel est le type de pseudocycle qui s'établit. Comme décrit par l'équipe de Le Grel, l'amide primaire de l'extrémité C_{term} permet de mettre en évidence une liaison hydrogène par la mesure de la différence de déplacement chimique entre les deux protons amidiques notée $\Delta\delta$.¹¹³ Si celui-ci est supérieur à 2 ppm à une concentration inférieure ou égale à 10⁻² M, il y a donc existence d'une liaison hydrogène. Dans le cas du pseudotripeptide **23**, le $\Delta\delta$ entre ces deux protons est d'environ 1 ppm : cette valeur est une moyenne correspondant à un équilibre entre les formes libre et liée d'un des deux protons de l'extrémité C_{term}, et elle conviendrait plutôt à une structuration de type C₇.

Ces résultats sont confirmés par l'étude du composé **23** par infrarouge. En effet, une seule bande inférieure à 3400 cm⁻¹ est observée dans ce cas : le signal à 3369 cm⁻¹ correspond à la vibration d'élongation de la liaison NH du résidu Gly₃ lorsque le proton est lié par liaison hydrogène. Les trois bandes situées au-delà de 3400 cm⁻¹ correspondent à la vibration des groupements NH carbamidique et amidiques de l'extrémité N_{term} non liés par liaison hydrogène intramoléculaire (Figure 59).

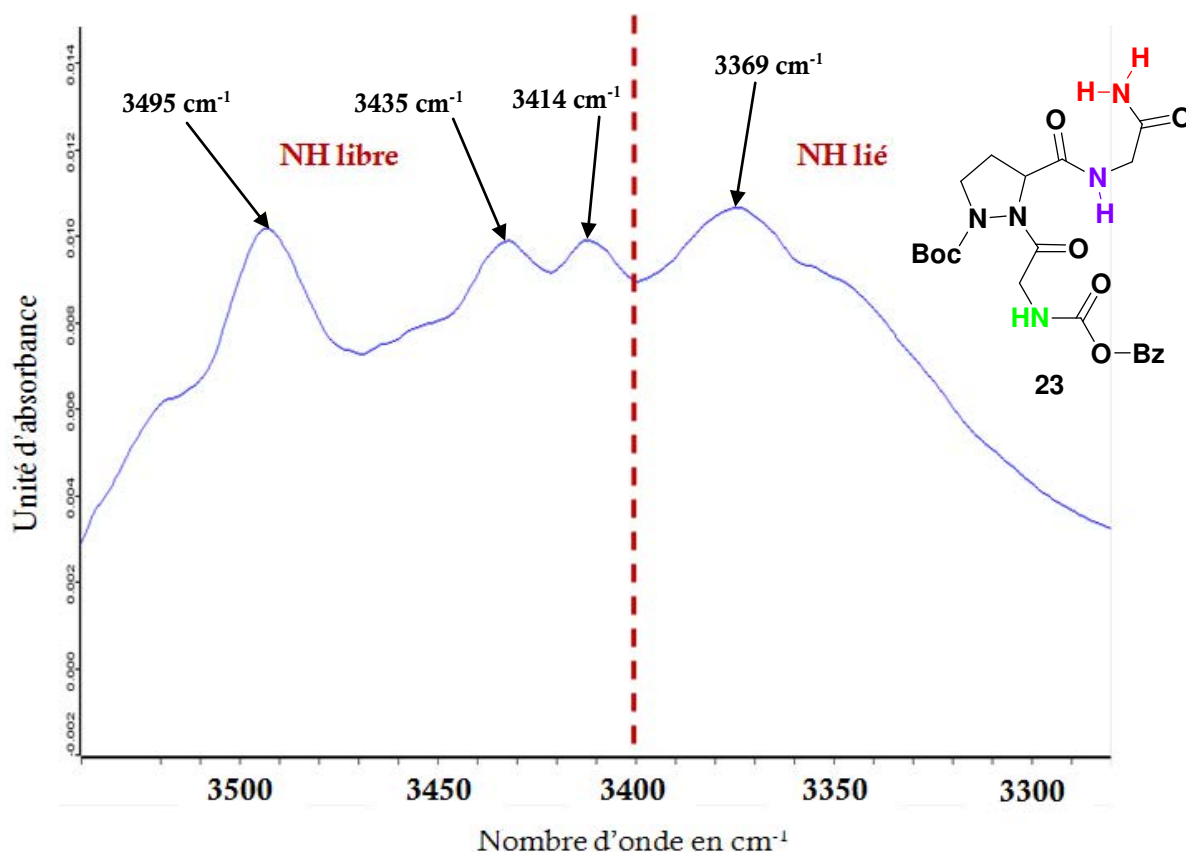


Figure 59 : Spectre IR (CHCl_3), zone des vibrateurs NH du pseudotripeptide **23**

La déconvolution des bandes carbonyle du pseudotripeptide **23** a été réalisée pour permettre de déterminer le type de liaisons hydrogène s'établissant en son sein (Figure 60). La bande caractéristique du $\text{C}=\text{O}$ de l'ester méthylique a disparu, laissant place à une bande large et une autre très faible pouvant correspondre à un groupement carbonyle d'une fonction amide primaire sous forme non liée (1663 cm^{-1}) et faiblement liée (1656 cm^{-1}) dans une liaison hydrogène. Les trois autres bandes présentes dans cette zone (1793, 1689 et 1679 cm^{-1}) peuvent être attribuées, selon la valeur des nombres d'onde des groupements carbonyles du pseudotripeptide **20**, aux deux autres fonctions $\text{C}=\text{O}$ des liaisons amides Gly₁- δ -azaPro et δ -azaPro-Gly₃. Aucune variation des nombres d'onde des carbonyles carbamidiques des fonctions Z (1724 cm^{-1}) et Boc (1712 cm^{-1}) n'est observée : ces deux groupements ne sont donc pas impliqués dans des liaisons hydrogène intramoléculaires.

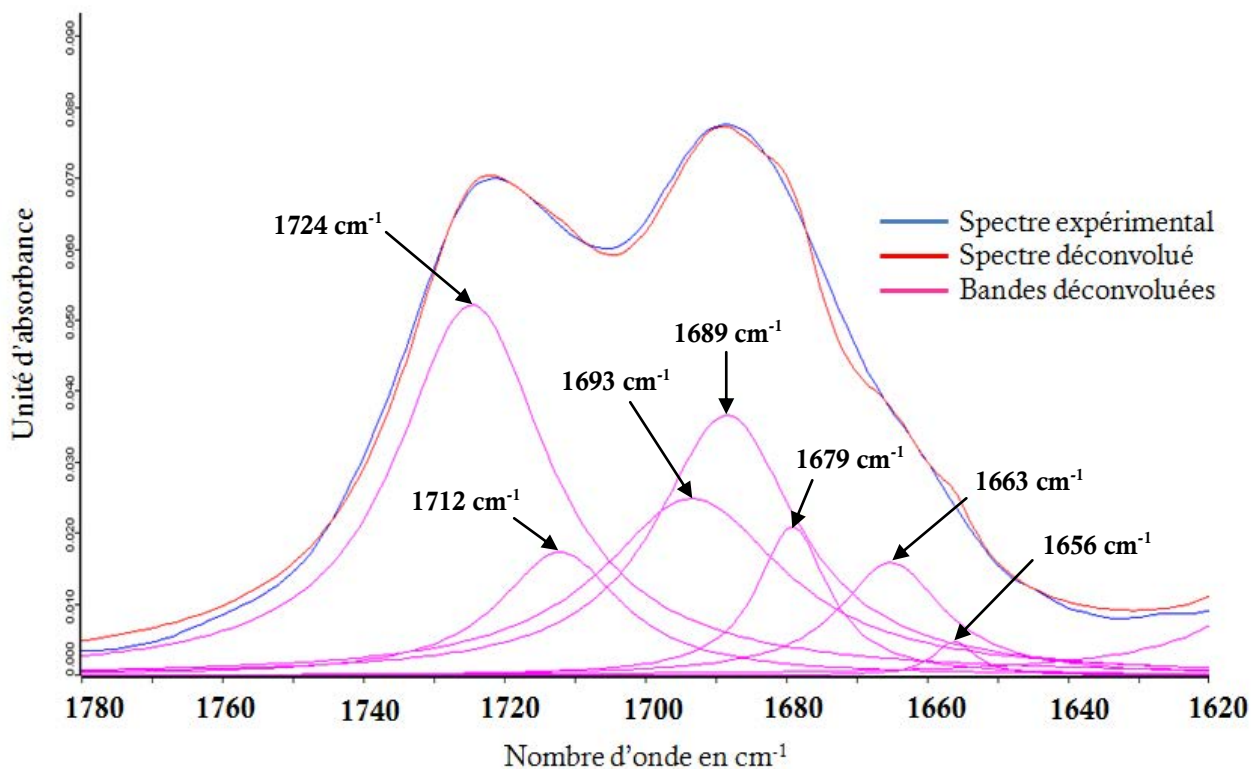


Figure 60 : Spectre IR, déconvolution de la zone des vibrateurs CO du pseudotripeptide 23

L'étude conformationnelle a également été approfondie par RMN en relevant les corrélations ROE intéressantes par spectroscopie RMN à deux dimensions du pseudotripeptide **23** (Figure 61).

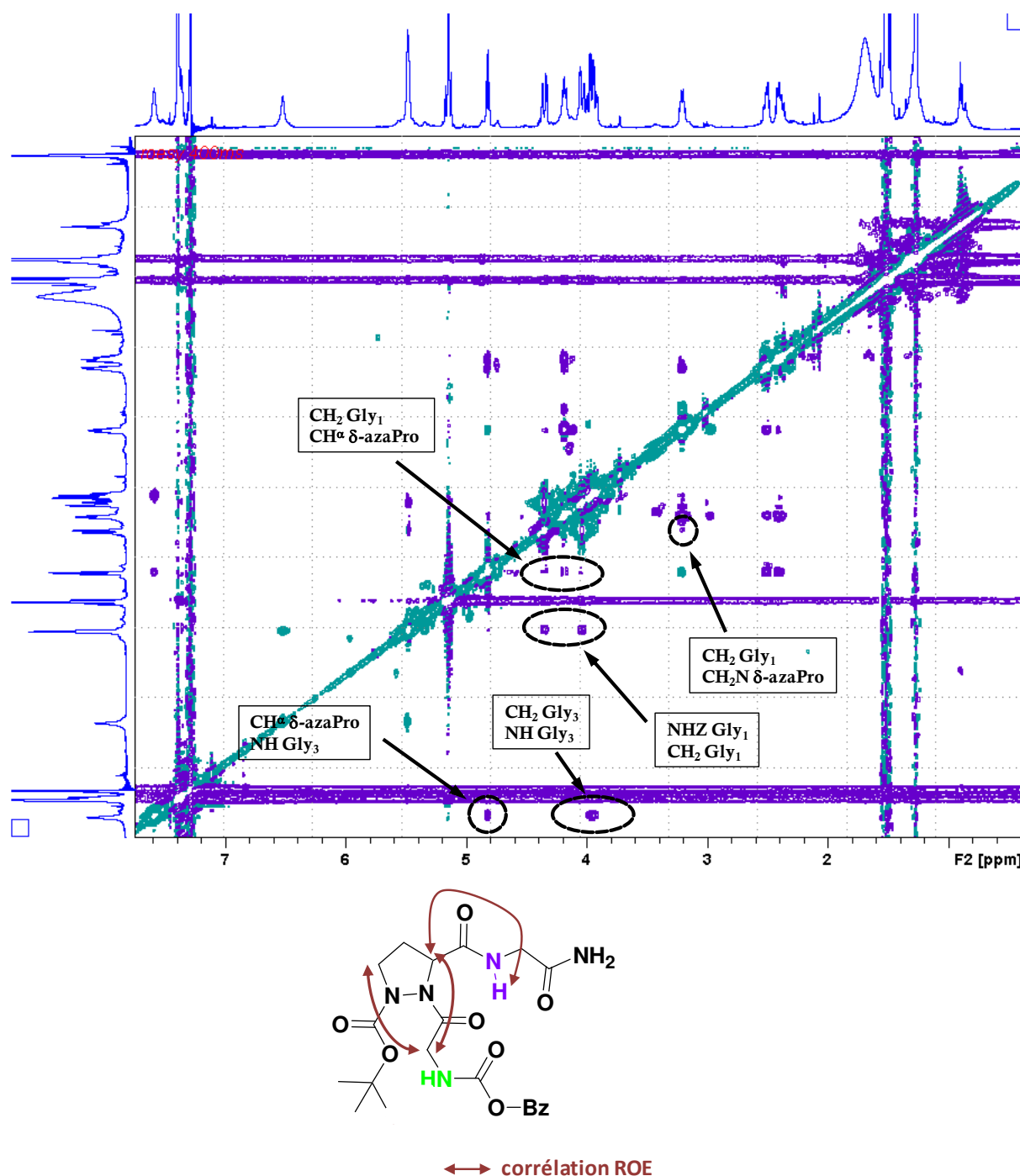


Figure 61 : Carte 2D ROESY (5 mM dans CDCl₃) du pseudotriptide **23**

Les mêmes corrélations ROE s'établissant entre les groupements CH₂Gly₁/CH₂Nδ-azaPro, CH₂Gly₁/CH^αδ-azaPro et CH^αδ-azaPro/NHGly₃ du pseudotriptide **20** sont relevées pour le pseudotriptide **23** (Figure 60) : l'hypothèse de la conformation *trans* de la liaison Gly-δ-azaPro est aussi confirmée puisque le groupement CH₂ de Gly₁ est proche des protons du cycle de la δ-azaproline.

La structure du pseudotriptide **23** a été modélisée par dynamique moléculaire en prenant en compte les corrélations ROE. Cette étude montre la possibilité pour le groupement

NH de la liaison δ -azaPro-Gly de se lier par liaison hydrogène intramoléculaire avec le groupement carbonyle de la liaison Gly- δ -azaPro pour former un pseudocycle en C₇ (Figure 62).

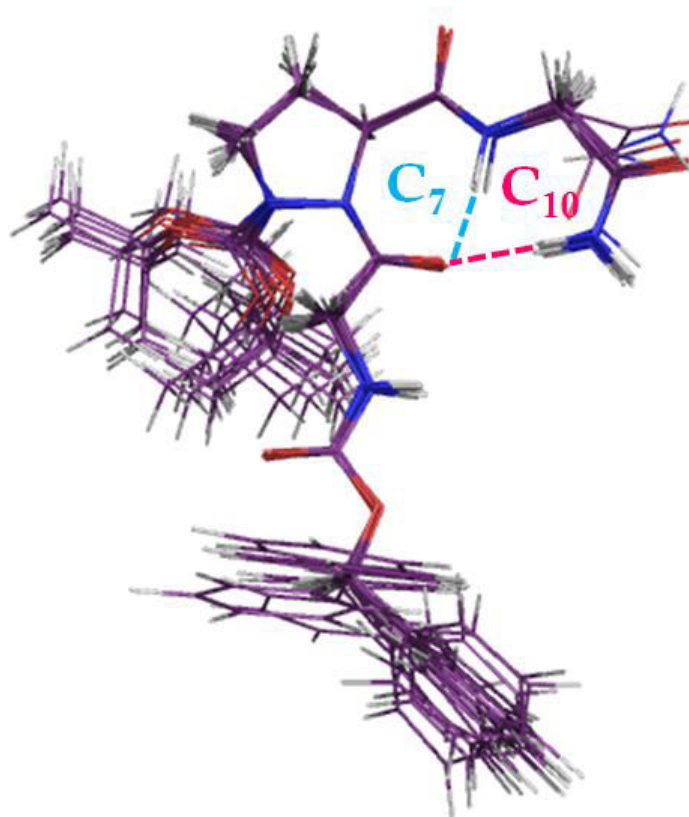


Figure 62 : Structure du pseudotriptide 20 obtenue par dynamique moléculaire sous contrainte RMN par AMBER 10

Le résultat de dynamique moléculaire sous contrainte RMN confirme la conclusion émise pour la structure du composé **20**, qui peut être appliquée à ce pseudotriptide **23** : le proton NH amidique est engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire avec le groupement carbonyle de la liaison Gly₁- δ -azaPro, fermant un pseudocycle en C₇ et favorisant la conformation *trans* de cette liaison (Figure 63). En revanche, l'étude par dynamique moléculaire montre également que pour la moitié des structures de plus faible énergie retenues, un des protons amide de l'extrémité C_{term} est lié par liaison hydrogène avec le groupement carbonyle de la liaison Gly₁- δ -azaPro, fermant un pseudocycle en C₁₀. Ce résultat ne corrobore pas celui obtenu lors de l'expérience RMN 1D.

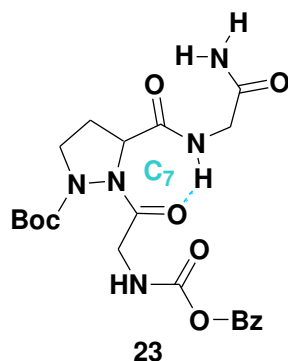


Figure 63 : Structure du pseudotriptide 23 en solution

IV.5 Etude conformationnelle du pseudotriptide Z-Gly-(D+L)- δ -aza-Pro-Gly-NH₂ (24)

D'après les prévisions de départ, il peut être attendu à ce que la déprotection de la fonction Boc de l'atome d'azote N^δ de la δ -azaproline du pseudotriptide **23**, permette, au sein du composé Z-Gly-(D+L)- δ -azaPro-Gly-NH₂ **24**, l'établissement d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le proton NH amine résultant et l'atome d'oxygène de la fonction carbonyle de la liaison amide Gly₁- δ -azaPro. Cette interaction favoriserait la conformation *cis* en formant un pseudocycle à cinq atomes. Cette liaison entre donc en concurrence avec les autres liaisons hydrogène pouvant être observée dans le tripeptide : une liaison hydrogène entre le proton NH de la liaison amide δ -azaPro-Gly₃ et le groupement carbonyle de la liaison amide Gly₁- δ -azaPro, fermant un pseudocycle en C₇, ou de la fonction Z, fermant un pseudocycle en C₁₀ (Figure 64).

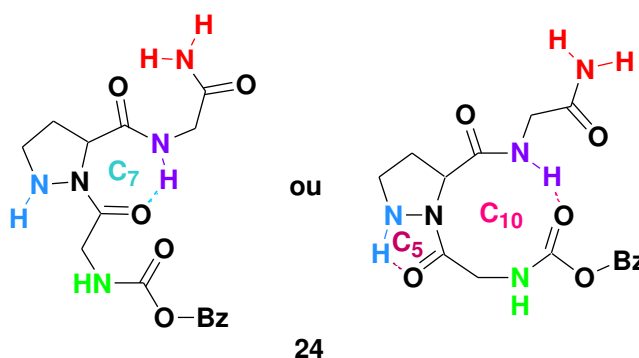
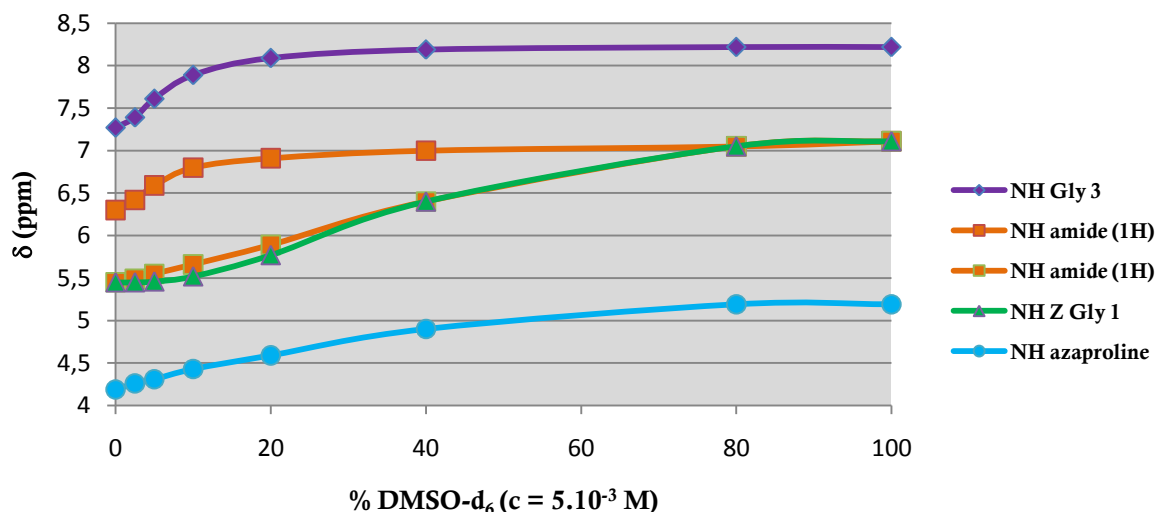


Figure 64 : Liaisons hydrogène pouvant s'établir au sein du pseudotriptide 24

Afin de mettre en évidence ce changement conformationnel, les résultats des études conformationnelles en solution ont été comparés, de la même manière que précédemment, par spectroscopies RMN et infrarouge des composés **23** et **24**.

L'étude de la sensibilité du déplacement chimique des protons NH en fonction de la composition du mélange ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$) par RMN donne les résultats reportés dans le Graphe 4. Contrairement aux pseudotriptides **19**, **20** et **23**, le déplacement chimique du proton NH de la liaison amide $\delta\text{-azaPro-Gly}_3$ varie lors de l'ajout de DMSO. Cette variation n'est toutefois que de 0,95 ppm, pouvant correspondre soit à un équilibre entre une population liée par liaison hydrogène et une population libre, soit à une liaison hydrogène faible. Le même comportement est observé pour le proton NH de l'atome d'azote N^δ et un des protons NH de la fonction amide primaire de l'extrémité C_{term} , dont les déplacements chimiques varient d'environ 1 ppm quand la concentration en DMSO augmente. Les déplacements chimiques des trois autres protons NH de la molécule subissent fortement l'ajout de DMSO dans le milieu : ils ne sont pas engagés dans des liaisons hydrogène intramoléculaires.



Graphe 4 : Influence du DMSO- d_6 sur les déplacements chimiques des protons NH de **24**

Les déplacements chimiques des protons NH du composé **24** ont également été comparés à ceux du pseudotriptide **23**. Les résultats sont reportés dans le Tableau 13.

Tripeptide	Solvant	Déplacement chimique (ppm)				
		NH Gly ₃	NH amide 1	NH amide 2	NH Z Gly ₁	NH $\delta\text{-azaPro}$
23	CDCl_3	7,42	6,31	5,32	5,32	/
	DMSO	7,81	7,26	7,26	7,11	/
24	CDCl_3	7,27	6,30	5,45	5,45	4,19
	DMSO	8,22	7,11	7,11	7,11	5,19

Tableau 13 : Déplacements chimiques (5mM dans CDCl_3 ou DMSO) des protons NH des pseudotriptides **23** et **24**

Ce tableau montre que les déplacements chimiques de la majorité des protons NH varient peu lorsque l'atome d'azote N^δ est protégé ou non. Seul le déplacement chimique du proton amidique du résidu Gly₃ varie en fonction de la présence ou non de la fonction Boc : une différence de 0,41 ppm dans le DMSO est observée entre les pseudotriptides **23** et **24**. La différence de comportement du proton amidique du résidu Gly₃ analysé par RMN 1D indique donc que la conformation du composé **24** ne peut pas être identique à celle du tripeptide **23**.

L'analyse du spectre IR dans la zone des bandes NH du pseudotriptide **24** montre que trois protons NH ne sont pas liés par liaison hydrogène intramoléculaire puisque leurs nombres d'onde (3486, 3438 et 3411 cm^{-1}) sont au-delà de la limite de 3400 cm^{-1} . Les deux protons NH sont donc caractérisés par une large bande en deçà de 3400 cm^{-1} , correspondant à des protons impliqués dans des liaisons hydrogène intramoléculaires (Figure 65).

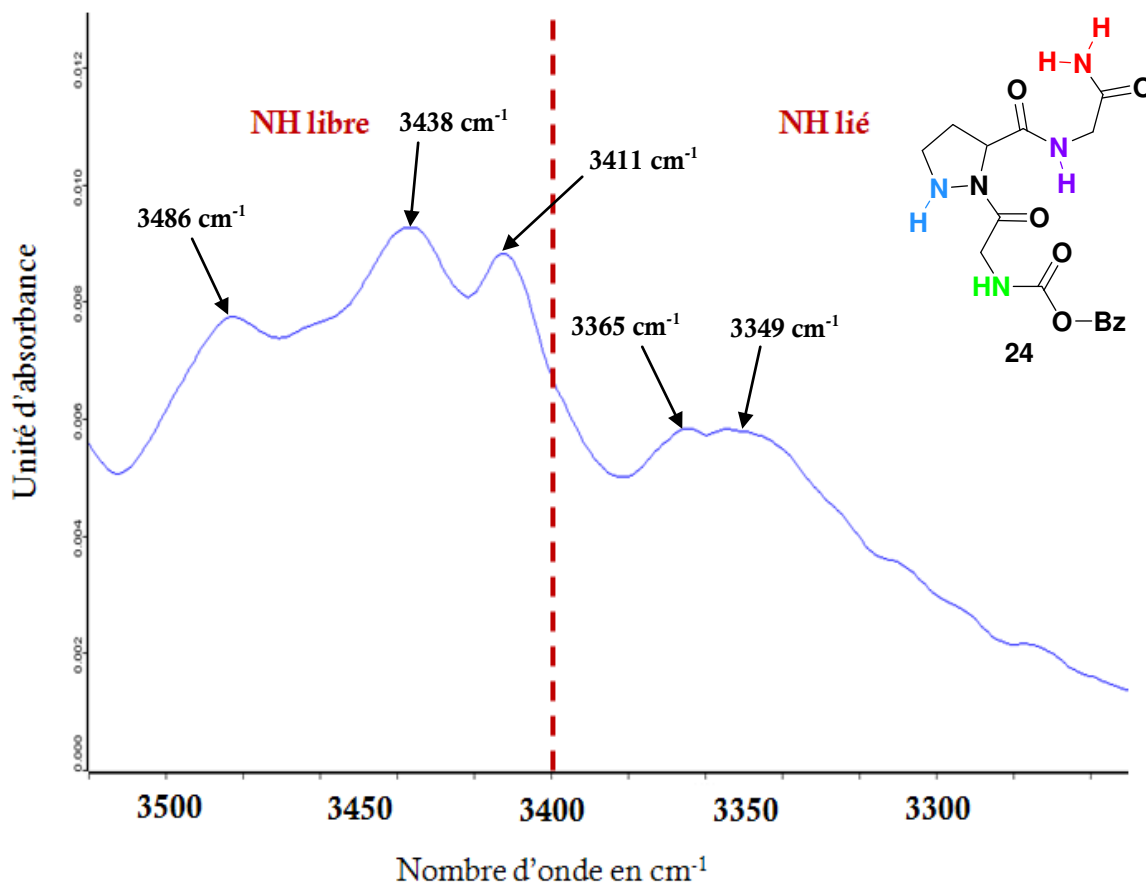


Figure 65 : Spectre IR (10 mM dans CHCl_3), zone des vibrateurs NH du pseudotriptide **24**

Afin de déterminer la nature exacte des liaisons hydrogène impliquant les protons NH de l'atome d'azote N^δ et de la liaison amide δ -azaPro-Gly₃, la déconvolution de la zone des carbonyles du spectre IR a été réalisée (Figure 66).

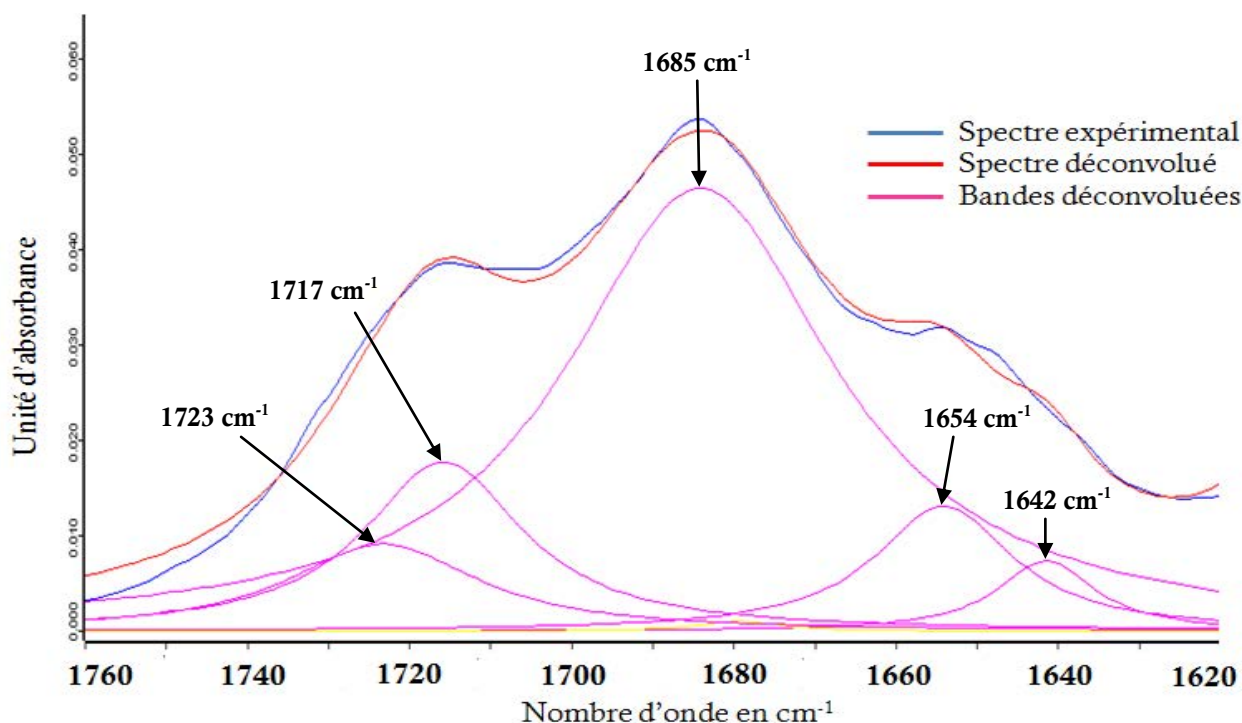


Figure 66 : Spectre IR (10 mM dans CHCl_3), déconvolution de la zone des vibreurs CO du pseudotriptide **24**

Cette déconvolution met en évidence une bande CO liée de la fonction Z à 1717 cm^{-1} , inférieure à 1723 cm^{-1} correspondant au groupement carbonyle de la fonction Z non liée par liaison hydrogène intramoléculaire.

L'interprétation du spectre ROESY montre que les corrélations ROE entre le CH_2 de Gly_1 et les protons de la δ -azaproline présentes pour les pseudotriptides **22** et **23** ne figurent plus sur le spectre du composé **24** : seuls des effets séquentiels ont pu être détectés. Ce résultat indique que la conformation en solution du pseudotriptide **24** n'est pas la même que celles des composés **20** et **23**. L'introduction de ces contraintes en dynamique moléculaire a conduit à l'obtention de plusieurs structures du pseudotriptide **24**, dans lesquels la liaison Gly- δ -azaPro peut être en conformation *trans* ou *cis*

Les résultats des expériences en RMN et IR montrent donc que la conformation *cis* de la liaison Gly- δ -azaPro est favorisée au sein du pseudotriptide **24**. L'absence de dédoublement de signaux en RMN ^1H et ^{13}C , et ce même à basse température, permet d'établir deux hypothèses :

- soit les conformères *cis* et *trans* coexistent en solution et l'équilibre d'isomérisation est largement déplacé vers la forme *cis* (Schéma 60). Dans ce cas, l'absence de dédoublement de signaux en RMN 1D peut être expliqué par un échange trop rapide pour être visible en RMN ;
- soit seul le conformère *cis* est présent en solution : dans ce cas, il y aurait un équilibre entre la structuration, stabilisée par liaison hydrogène intramoléculaire, de type βVIa , et l'autre, au sein

de laquelle aucune liaison hydrogène ne s'établit, de type β Vib.⁸⁶ La liaison hydrogène s'établissant au préalable, dans le tripeptide **23**, entre le proton NH de la liaison amide δ -azaPro-Gly₃ et l'atome d'oxygène de la liaison amide Gly₁- δ -azaPro se rompt donc au profit de la formation d'une liaison hydrogène entre ce même proton NH et le groupement carbonyle de la fonction Z. L'établissement d'une autre liaison hydrogène intramoléculaire entre le proton NH amine de l'atome d'azote N^δ et le groupement carbonyle de la liaison amide Gly₁- δ -azaPro, fermant un pseudocycle en C₅, peut alors s'établir.

Il faut également rappeler que, dans le cas de ces deux hypothèses, le proton amidique de l'extrémité C_{term} du pseudotripeptide peut également fermer un pseudocycle en C₇ avec le groupement carbonyle de la liaison δ -azaPro-Gly₃ (Schéma 60), les résultats obtenus indiquant qu'il existe un équilibre entre population libre et liée par liaison hydrogène.

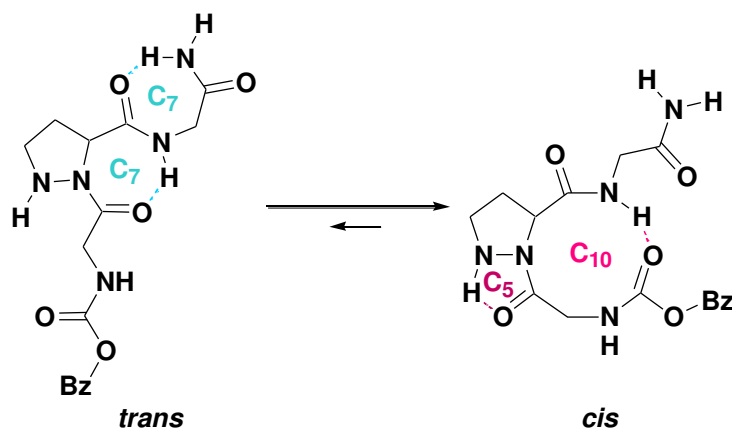


Schéma 60 : Equilibre déplacé vers la conformation *cis* du pseudotripeptide **24**

IV.6 Conclusion

L'analyse conformationnelle en RMN 1D menée sur le pseudotripeptide **32a** n'a pas mis en évidence l'établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires. Si le composé peut être synthétisé sous forme pure et si des cristaux peuvent en être obtenus, alors la diffraction des RX permettra de conclure quant à la structure de ce pseudopeptide.

Les résultats de l'étude conformationnelle menée sur les pseudotriptides **19**, **20**, **23** et **24** mettent en évidence que le groupement Boc en position N^δ de la δ -azaproline influence fortement la conformation de la liaison amide AA₁- δ -azaPro puisque :

- lorsque l'atome d'azote N^δ est protégé par un groupement Boc, la liaison AA₁- δ -azaPro des pseudotriptides **20** et **23** adopte une conformation *trans* ;
- lorsque l'atome d'azote N^δ est déprotégé, la conformation de la liaison Gly₁- δ -azaPro du composé **24** est majoritairement *cis*.

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail de thèse est consacré à la synthèse d'analogues bis-azotés de la proline et aux études conformationnelles de pseudotriptides incorporant ces résidus.

Dans un premier temps, une méthode de synthèse de la (*S*)- δ -azaproline orthogonalement protégée a été mise au point en solution. Les étapes clés de cette synthèse consistaient en deux réactions de Mitsunobu, l'une intermoléculaire et l'autre intramoléculaire, et en la réaction d'estérification qui nécessitait de trouver un groupement alkyle à greffer suffisamment encombré afin d'éviter une rétrolactonisation. Cette voie de synthèse s'est avérée énantiosélective, puisque la configuration du carbone α des intermédiaires réactionnels est conservée, et a présenté un bon rendement global de 41%, supérieur à ceux des synthèses déjà décrites.

Dans un deuxième temps, la réactivité de cet analogue de la proline et son incorporation dans des petits pseudopeptides ont été étudiées. Ces travaux ont permis de montrer qu'il était possible d'incorporer la δ -azaproline dans une chaîne peptidique en tant qu'analogue d'acide α -aminé ou β -aminé. Malheureusement, la racémisation de son C^α a été observée lors de la déprotection de son extrémité C_{term} , ne rendant pas possible la formation de pseudopeptides diastéréoisomériquement purs. Il a été montré que malgré la faible réactivité de leur extrémité N_{term} , les dipeptides H- δ -azaPro-AA₃-OMe peuvent réagir avec des fluorures d'acides aminés, ou dans des couplages peptidiques en présence d'HATU, et conduire à des pseudotriptides de formule Z-AA₁- δ -azaPro-AA₃-X avec des rendements corrects.

Les résultats obtenus lors de la formation des pseudotriptides Z-AA₁- δ -azaPro-AA₃-X ont orienté les travaux, dans un troisième temps, vers l'analyse de la réactivité et vers la synthèse d'un pseudotriptide incorporant un noyau pyrazolique (forme oxydée de la δ -azaproline). Ces travaux ont permis de mettre en évidence la sensibilité de la liaison amide AA-Pyr aux attaques nucléophiles et au milieu ambiant. Les études conformationnelles en RMN 1D menées sur le pseudotriptide synthétisé ont révélé qu'aucune liaison hydrogène ne s'établit au sein de ce composé. Il serait intéressant de trouver une méthode permettant d'obtenir de tels pseudotriptides sous forme pure, sur lesquels des analyses complémentaires pourraient être conduites.

Finalement, des études conformationnelles des pseudotriptides de formule Z-AA₁- δ -azaPro-AA₃-X ont été menées. Ces analyses, réalisées principalement par spectroscopies RMN et IR, ont permis de mettre en évidence l'influence du groupement Boc sur la conformation de la liaison pseudopeptidique AA₁- δ -azaPro. En effet, la présence de ce groupement impose à cette liaison de se retrouver en conformation *trans*, afin d'éviter toute gêne stérique entre les

groupements méthyl de la fonction Boc et le résidu AA₁. Dans ce cas, une liaison hydrogène se forme entre le proton NH de la liaison δ -azaPro-AA₃ et le groupement carbonyle de la liaison AA₁- δ -azaPro, formant un pseudocycle en C₇. Par contre, lorsque l'extrémité N ^{δ} est déprotégée, la liaison pseudopeptidique est libre d'adopter majoritairement une conformation *cis*, par établissement d'une liaison hydrogène entre le proton NH δ et le groupement carbonyle de la liaison AA₁- δ -azaPro, formant un pseudocycle en C₅, et une liaison hydrogène entre le proton NH de la liaison δ -azaPro-AA₃ et le groupement carbonyle de la fonction Z, formant en pseudocycle en C₁₀. L'hypothèse établie en Introduction Générale a donc été vérifiée : les pseudopeptides incorporant un résidu δ -azaprolyle se structurent à son niveau en coude de type β VI.

Ces travaux vont se poursuivre sur la synthèse du synthon Succinyl-Ala-Ala- δ -azaPro-Phe-*p*-nitroanilide (Figure 66) sur lequel une étude conformationnelle sera conduite : si la conformation *cis* de la liaison Ala- δ -azaPro s'avère majoritaire, alors ce synthon pourra être utilisé pour mesurer l'activité des PPIases.

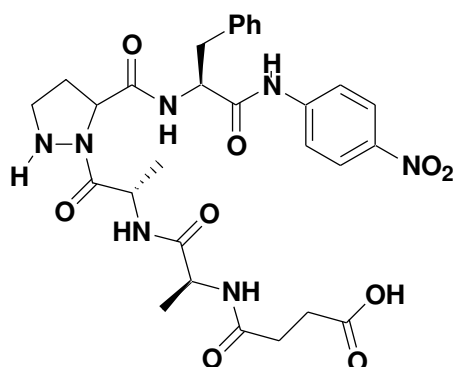


Figure 66 : Formule semi-développée du synthon Succinyl-Ala-Ala- δ -azaPro-Phe-*p*-nitroanilide

Experimental Part

General Methods

All reactions were carried out with dry solvents. Dry THF was obtained by distillation over sodium and benzophenone; MeCN and acetone were purchased in anhydrous form. Reagents were obtained from commercial source and were used without further purification.

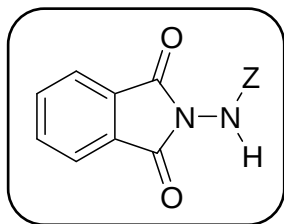
The microwaves reactions were carried out in a CEM Discover SPS.

Reactions were monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) using Kieselgel 60 with fluorescent indicator UV₂₅₄ (purchased from Merck or Macherey-Nagel). Detection was performed by UV, phosphomolybdic acid or ninhydrine.

Columns chromatographies were carried out on silica gel 60 (70-200 μ m). All yields have been calculated from pure isolated products.

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a spectrometer operating at 300 MHz, in deuterated chloroform (CDCl₃) or deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d₆). Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) and are referenced to the residual solvent signal for deuterated DMSO or to the signal of tetramethylsilane (TMS) as internal standard. Coupling constants (*J* values) are given in Hertz. Peaks are described using the following abbreviations: br, broad; s, singlet; t, triplet; m, multiplet; arom, aromatic.

HRMS spectra were obtained in ESI method. All melting points are uncorrected. $[\alpha]_D$ is given in units of deg.dm⁻¹.cm².g⁻¹; concentrations are quoted in g/100 mL.

N-Benzyloxycarbonylaminophthalimide (1) $C_{16}H_{12}N_2O_4$ $M=296.08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

white solid ; 91%

To a suspension of phthalic anhydride (44 g, 0.30 mol) in toluene (325 mL) was added benzylcarbazate (50 g, 0.30 mol, 1 eq.) and the resulting mixture was heated to reflux, the water formed in the reaction being trapped in a Dean-Stark receiver. After 6 h, the solution was cooled to 0°C; after filtration, the solid obtained by precipitation was recrystallised from $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$ to give *N*-benzyloxycarbonylaminophthalimide **1** (81 g, 91%) as a white solid.

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.93-7.80 (m, 4H, H_{Pht}), 7.80-7.19 (m, 5H, H_{arom}), 6.78 (br s, 1H, NH), 5.29-5.23 (m, 2H, OCH_2).

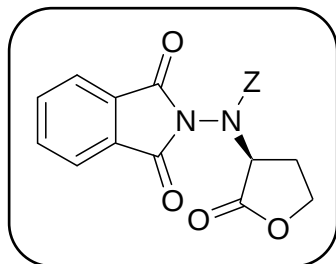
^{13}C NMR (CDCl_3) δ 165.8 (CO), 155.3 (2 CO), 135.7 (C), 135.3 (2 CH), 130.4 (2 C), 129.1 (5 CH), 124.6 (2 CH), 69.1 (OCH_2).

IR (KBr) ν (cm^{-1}) 3266 (C=C), 1797, 1720 (C=O).

HRMS calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}]^+$ $m/z = 296.0797$, found 296.0790

mp = 134 °C

R_f (PE/EtOAc : 60/40) = 0.78

(S)- α -(N-Benzylloxycarbonylaminophtamido)- γ -butyrolactone (4) $C_{20}H_{16}N_2O_6$ $M=380.09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

white solid ; 80%

Under Nitrogen and at 0°C, to a stirred solution of **1** (5.2 g, 17.4 mmol), PPh_3 (5.5 g, 20.9 mmol, 1.2 eq.), and (*R*)- α -hydroxy- γ -butyrolactone (1.36 mL, 17.4 mmol, 1 eq.) in dry THF (80 mL) was added in one portion di-*tert*-butylazodicarboxylate (4.8 g, 20.9 mmol, 1.2 eq.). The resulting solution was stirred at room temperature for 4 h and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc as eluant to give lactone **4** (5.3 g, 80%) as a white solid.

1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.85-7.70 (m, 4H, H_{Ph}), 7.35-6.90 (m, 5H, H_{arom}), 5.25-4.91 (m, 2H, OCH_2), 4.82-4.68 (t, J 10.5 Hz, 1H, $CHCH_2$), 4.42-4.27 (m, 1H, OCH_2), 4.27-4.05 (m, 1H, OCH_2), 2.79-2.40 (m, 2H, $CHCH_2$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 171.8 (CO), 165.8 (CO), 155.3 (CO), 154.0 (CO), 135.7 (CH), 135.6 (CH), 130.5 (C), 130.2 (2 C), 129.2 (2 CH), 129.1 (2 CH), 127.9 (CH), 124.8 (CH), 124.7 (CH), 69.5 (OCH_2), 66.1 (OCH_2), 59.1 (CH), 28.1 (CH_2).

IR (KBr) ν (cm^{-1}) 1800, 1780, 1740 (C=O).

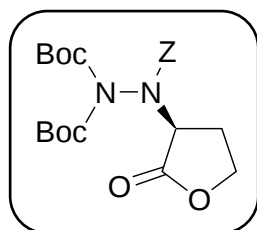
ESI calculated for $C_{20}H_{16}N_2O_6$ $[M + Na]^+$ $m/z = 403.0901$, found 403.0886

$[\alpha]_D^{22} = -2.63$ (c 0.760, EtOH)

mp = 136°C

R_f (PE/EtOAc : 60/40) = 0.27

(S)- α -[N^α-(Benzyloxycarbonyl)-N^β,N^β-bis(*tert*-butyloxycarbonyl)-hydrazino]- γ -butyrolactone (5a)


 $C_{22}H_{30}N_2O_8$
 $M=450.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

yellow oil; 94%

To a solution of **4** (1.9 g, 5.00 mmol) in THF (100 mL) was added a solution of MeNH₂ 2M in MeOH (4.00 mL, 7.50 mmol, 1.5 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solvent and the excess of MeNH₂ were removed under *vacuum*. The white solid those obtained was dissolved in THF (100 mL) and Boc₂O (3.3 g, 15.0 mmol, 3 eq.) and a catalytic amount of DMAP were added. The mixture was stirred at room temperature overnight and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc as eluant to give lactone **5a** (2.1 g, 94%) as a yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.41-7.22 (m, 5H, H_{arom}), 5.31-5.14 (m, 2H, OCH₂), 4.54-4.32 (m, 2H, OCH₂), 4.32-4.07 (m, 1H, CHCH₂), 2.79-2.45 (m, 2H, CHCH₂), 1.61-1.26 (m, 18H, 2 C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.6 (CO), 154.3 (CO), 151.0 (CO), 150.8 (CO), 136.1 (C), 129.2 (2 CH), 129.0 (CH), 128.7 (2 CH), 85.4 (C), 85.3 (C), 69.1 (OCH₂), 66.1 (OCH₂), 59.9 (CH), 28.5 (6 CH₃), 27.2 (CH₂).

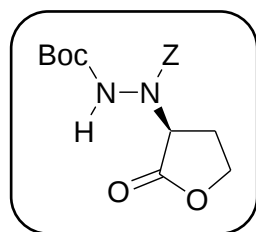
IR (NaCl) ν (cm⁻¹) 1792, 1767, 1726 (C=O).

ESI calculated for C₂₂H₃₀N₂O₈ [M + Na]⁺ m/z = 473.1894, found 473.1891

$[\alpha]_D^{22} = -2.54$ (c 1.180, EtOH)

R_f (PE/EtOAc : 70/30) = 0.44

(S)- α -[N ^{α} -(Benzyloxycarbonyl)-N ^{β} -(*tert*-butyloxycarbonyl)hydrazino]- γ -butyrolactone (5b)

C₁₇H₂₂N₂O₆M=350.14 g.mol⁻¹

white solid

Starting from lactone 4 :

To a solution of lactone **4** (680 mg, 1.50 mmol) in THF (15 mL) was added pyrrolidine (0.38 mL, 4.50 mmol, 3 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 30 min. The solvent and the excess of pyrrolidine were removed under *vacuum*. The residue was dissolved in THF (15 mL) and Boc₂O (630 mg, 2.25 mmol, 1.5 eq.) and a catalytic amount of DMAP were added. The mixture was stirred at room temperature overnight and concentrated under *vacuum*. The residue was dissolved in THF (15 mL) and a solution of MeNH₂ 2M in MeOH (1.20 mL, 2.25 mmol, 1.5 eq.) was added. The solution was stirred at room temperature for 48 h. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc as eluant to give lactone **5b** (168 mg, 32%) as a white solid.

Starting from lactone 5a :

To a solution of lactone **5a** (1.2 g, 3.40 mmol) in CH₃CN (40 mL) was added Mg(ClO₄)₂ (152 mg, 0.68 mmol, 0.2 eq.). The mixture was stirred at room temperature overnight and then partitioned between water (100 mL) and diethylether (50 mL). The aqueous layer was extracted with diethylether (2×50 mL), and the combined organic layers were dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (7/3) as eluant to give lactone **5b** (1.1 g, 90%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.53-7.00 (m, 5H, H_{arom}), 6.52 (br s, 1H, NH), 5.43-4.75 (m, 3H, CHCH₂ and OCH₂), 4.40-4.08 (m, 2H, OCH₂), 2.61-2.29 (m, 2H, CHCH₂), 1.52-1.15 (m, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.9 (CO), 155.0 (CO), 154.8 (CO), 134.8 (C), 128.0 (2 CH), 127.9 (CH), 127.5 (2 CH), 81.6 (C), 68.3 (OCH₂), 65.3 (OCH₂), 57.4 (CH), 27.3 (3 CH₃), 25.3 (CH₂).

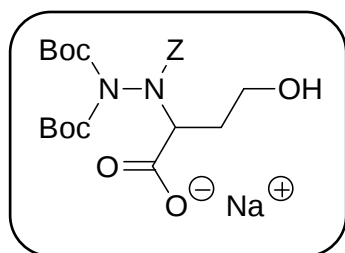
IR (KBr) ν (cm⁻¹) 3263 (NH), 1781, 1742, 1701 (C=O).

ESI calculated for C₁₇H₂₂N₂O₆ [M + Na]⁺ *m/z* = 373.1370, found 373.1370

[α]_D²² = -2.86 (c 1.050, EtOH)

mp = 103°C

R_f (PE/EtOAc : 70/30) = 0.40

Sodium carboxylate (6a) $C_{22}H_{31}N_2NaO_9$ $M=490.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

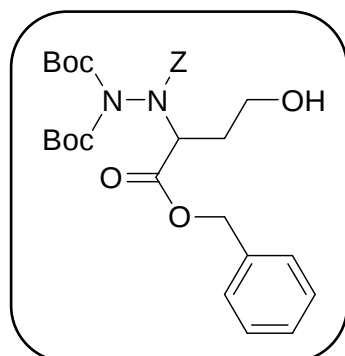
white solid; 100%

To a solution of racemic mixture of **5a** (180 mg, 0.40 mmol) in THF/H₂O (6 mL, 1:1) was added a solution of NaOH 1M (0.4 mL, 0.40 mmol, 1 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 24 h and concentrated under *vacuum*. The resultant white solid was suspended in toluene and concentrated to remove trace of water to give sodium carboxylate **6a** (196 mg, 100%) as a white solid without further purification.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.22 (bs, 1H, OH), 7.41-7.26 (m, 5H, H_{arom}), 5.24-4.93 (m, 2H, OCH₂), 4.46-4.38 (m, 1H, CHCH₂), 4.15-4.09 (m, 2H, OCH₂), 2.21-1.58 (m, 2H, CHCH₂), 1.43-1.10 (m, 18H, C(CH₃)₃).

R_f (EP / AcOEt : 50 / 50) = 0.00

Benzyl 2-[*N*^α-(Benzyloxycarbonyl)-*N*^β,*N*^β-bis(*tert*-butyloxycarbonyl)-hydrazino]-4-hydroxy-butanoate (3a)



$C_{29}H_{38}N_2O_9$

$M=558.25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil; 80%

To a suspension of the racemic mixture of sodium carboxylate **6a** (196 mg, 0.40 mmol) and tetrabutylammonium bromide (7 mg, 0.02 mmol, 0.05 eq.) in acetone (10 mL) was added benzyl bromide (0.05 mL, 0.44 mmol, 1.1 eq.). The solution was heated at reflux for 24 h. The reaction mixture was cooled, concentrated and EtOAc (25 mL) and Na_2SO_4 1N (10 mL) were added. The organic layer was washed with solutions of 1N aqueous Na_2SO_4 (2×10 mL), saturated aqueous Na_2CO_3 (3×10 mL) and brine (3×10 mL), dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc as eluant to give the ester **3a** (178 mg, 80%) as an oil.

¹H NMR ($CDCl_3$) δ 7.45-7.25 (m, 10H, H_{arom}), 6.49 (br s, 1H, OH), 5.32-4.88 (m, 5H, $CHCH_2$ and 2 OCH_2), 4.43-4.10 (m, 2H, OCH_2), 2.40-2.22 (m, 1H, $CHCH_2$), 2.20-2.05 (m, 1H, $CHCH_2$), 1.50-1.27 (m, 18H, $C(CH_3)_3$).

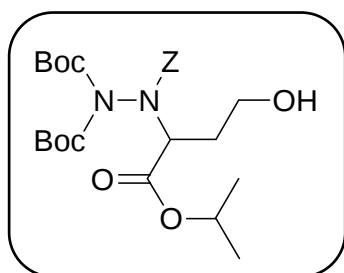
¹³C NMR ($CDCl_3$) δ 171.5 (CO), 157.0 (CO), 155.7 (CO), 154.0 (CO), 136.3 (C), 135.8 (C), 129.4-127.6 (10 CH), 82.6 (2 C), 69.2 (CH_2), 68.1 (CH_2), 64.1 (OCH_2), 58.6 (CH), 28.7 (2 CH_3), 28.4 (4 CH_3), 28.4 (CH_2).

IR (NaCl) ν (cm^{-1}) 3322 (OH), 1741 (C=O).

ESI calculated for $C_{29}H_{38}N_2O_9$ $[M + Na]^+$ $m/z = 581.2470$, found 581.2470

Rf (PE/EtOAc : 80/20) = 0.61

isoPropyl 2-[*N*^α-(Benzyloxycarbonyl)-*N*^β,*N*^β-bis(*tert*-butyloxycarbonyl)-hydrazino]-4-hydroxybutanoate (3c)



$C_{25}H_{38}N_2O_9$

$M=510.27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

yellow oil; 97%

To a suspension of the racemic mixture of sodium carboxylate **6a** (196 mg, 0.40 mmol) and tetrabutylammonium bromide (7 mg, 0.02 mmol, 0.05 eq.) in acetone (10 mL) was added *isopropyl* bromide (0.11 mL, 2.40 mmol, 6 eq.). The solution was heated at reflux for 24 h. The reaction mixture was cooled and concentrated. The residue was partitioned between EtOAc (25 mL) and Na_2SO_4 1N (10 mL). The organic layer was washed with portions of saturated aqueous Na_2CO_3 (10 mL) and brine (10 mL), dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under *vacuum* to give the ester **3c** (198 mg, 97%) as a yellow oil.

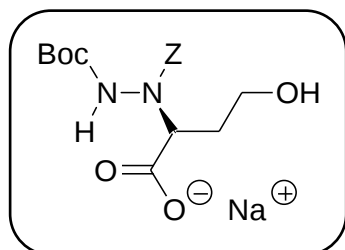
¹H NMR ($CDCl_3$) δ 7.33-7.27 (m, 5H, H_{arom}), 6.54 (br s, 1H, OH), 5.25-4.85 (m, 4H, $CHCH_2$ and OCH_2 and $CH(CH_3)_2$), 4.29 (m, 2H, OCH_2), 2.39-2.07 (m, 2H, $CHCH_2$), 1.67-1.30 (m, 24H, $C(CH_3)_3$ and $CH(CH_3)_2$).

¹³C NMR ($CDCl_3$) δ 171.1 (CO), 157.2 (CO), 154.0 (2 CO), 136.3 (C), 129.1 (2 CH), 128.9 (CH), 128.5 (2 CH), 82.6 (2 C), 70.3 (CH), 69.1 (CH_2), 64.2 (OCH_2), 58.5 (CH), 28.7 (CH_2), 28.7 (2 CH_3), 28.4 (4 CH_3), 22.4 (2 CH_3).

IR (NaCl) ν (cm^{-1}) 3334 (OH), 1740 (C=O).

ESI calculated for $C_{25}H_{38}N_2O_9$ $[M + H]^+$ $m/z = 511.2650$, found 511.2624

Rf (PE/EtOAc : 80/20) = 0.44

Sodium carboxylate (6b)
 $C_{17}H_{23}N_2NaO_7$
 $M=390.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

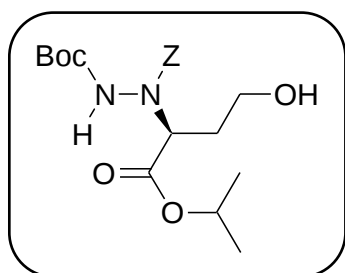
white solid ; 100%

To a solution of racemic mixture of **5b** (140 mg, 0.40 mmol) in THF/H₂O (6 mL, 1:1) was added a solution of NaOH 1M (0.4 mL, 0.40 mmol, 1 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 24 h and concentrated under *vacuum*. The resultant white solid was suspended in toluene and concentrated to remove trace of water to give sodium carboxylate **6b** (156 mg, 100%) as a white solid without further purification.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.64 (m, 1H, OH), 8.19 (m, 1H, NH), 7.34-7.25 (m, 5H, H_{arom}), 5.26-5.01 (m, 2H, OCH₂), 4.49-4.44 (m, 1H, CHCH₂), 3.73-3.54 (m, 2H, OCH₂), 1.96-1.66 (m, 2H, CHCH₂), 1.39-1.30 (m, 9H, C(CH₃)₃).

R_f (EP / AcOEt : 50 / 50) = 0.00

isoPropyl (2S)-2-[N^α-(Benzyloxycarbonyl)-N^β-(tert-butyloxycarbonyl)-hydrazino]-4-hydroxy-butanoate (3d)


 $C_{20}H_{30}N_2O_7$
 $M=410 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil; 100%

To a suspension of the sodium carboxylate **5b** (156 mg, 0.40 mmol) in THF (1.5 mL) were added tetrabutylammonium fluoride 1M in THF (0.48 mL, 0.48 mmol, 1.2 eq.) and *isopropyl* iodide (0.05 mL, 0.48 mmol, 1.2 eq.). The solution was heated at 30°C for 76 h. The reaction mixture was cooled and concentrated. The residue was partitioned between EtOAc (25 mL) and Na₂SO₄ 1N (10 mL). The organic layer was washed with portions of 1N aqueous Na₂SO₄ (2×10 mL), saturated aqueous Na₂CO₃ (3×10 mL) and brine (3×10 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give the ester **3d** (164 mg, 100%) as an oil.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 9.00 (br s, 1H, NH), 7.35-7.32 (m, 5H, H_{arom}), 5.33-5.06 (m, 2H, OCH₂), 5.06-4.76 (m, 2H, CHCH₂ and CH(CH₃)₂), 4.51 (br s, 1H, OH), 3.69-3.47 (m, 2H, OCH₂), 1.98-1.68 (m, 2H, CHCH₂), 1.52-1.24 (m, 9H, C(CH₃)₃), 1.24-1.05 (m, 6H, CH(CH₃)₂).

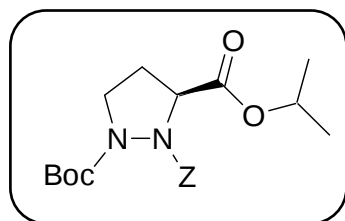
¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.1 (CO), 155.4 (2 CO), 136.2 (C), 128.2 (2 CH), 127.8 (CH), 127.2 (2 CH), 79.6 (C), 68.3 (CH), 67.0 (OCH₂), 57.9 (CH), 57.2 (OCH₂), 31.4 (CH₂), 27.9 (3 CH₃), 21.4 (CH₃), 21.3 (CH₃).

IR (NaCl) ν (cm⁻¹) 3337 (OH), 3322 (NH), 1731 (C=O).

ESI calculated for C₂₀H₃₀N₂O₇ [M + H]⁺ *m/z* = 411.2126, found 411.2098

[α]_D²² = -0.74 (c 1.360, EtOH)

R_f (PE/EtOAc : 70/30) = 0.40

(S)- δ -Azaproline (7) $C_{20}H_{28}N_2O_6$ $M=392.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil; 61%

Under Nitrogen and at 0°C , to a stirred solution of **3d** (271 mg, 0.66 mmol) and PPh_3 (253 mg, 0.99 mmol, 1.5 eq.) in dry THF (5 mL) was added in one portion diethylazodicarboxylate (0.12 mL, 0.99 mmol, 1.5 eq.). The resulting solution was stirred at room temperature overnight and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc as eluant to give δ -azaproline **7** (158 mg, 61%) as an oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.39-7.27 (m, 5H, H_{arom}), 5.27-5.13 (m, 2H, OCH_2), 5.13-4.90 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.72-4.58 (br s, 1H, CHCH_2), 4.07 (br s, 1H, NCH_2), 3.22-3.20 (br s, 1H, NCH_2), 2.43-2.14 (m, 2H, CHCH_2), 1.52-1.30 (m, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.30-1.10 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

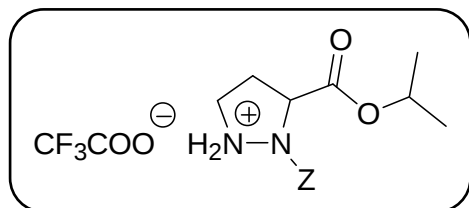
^{13}C NMR (CDCl_3) δ 170.6 (CO), 156.9 (2 CO), 136.6 (C), 129.1 (2 CH), 128.7 (CH), 128.5 (2 CH), 82.2 (C), 69.7 (CH), 68.6 (OCH_2), 60.4 (CH), 46.9 (NCH_2), 31.0 (CH_2), 28.6 (3 CH_3), 22.3 (2 CH_3).

IR (NaCl) ν (cm^{-1}) 1708 (C=O).

ESI calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $m/z = 415.1840$, found 415.1840

$[\alpha]_D^{22} = -12.94$ (c 0.850, EtOH)

Rf (PE/EtOAc : 70/30) = 0.62

CF₃CO₂H.Z- δ -AzaPro(H)-O*i*Pr (8)C₁₇H₂₁F₃N₂O₆M = 406.15 g.mol⁻¹

yellow oil, 100%

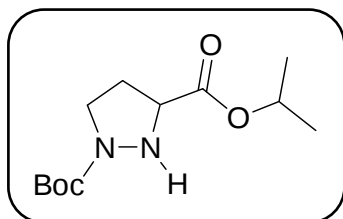
To a solution of **7** (157 mg, 0.40 mmol) in DCM (1 mL) was added, at 0°C, TFA (0.40 mL). The mixture was stirred at room temperature for 1 h and concentrated under *vacuum*. The resultant product was diluted in toluene and concentrated to remove trace of TFA to give δ -azaproline **8** (162 mg, 100%) as a yellow oil without further purification.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.85 (br s, 2H, NH₂⁺), 7.39-7.05 (m, 5H, H_{arom}), 5.20-4.98 (m, 2H, OCH₂), 4.98-4.78 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 4.55-4.32 (m, 1H, CHCH₂), 3.50-3.15 (m, 2H, NCH₂), 2.76-2.40 (m, 1H, CHCH₂), 2.25-2.00 (m, 1H, CHCH₂), 1.30-0.95 (m, 6H, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 170.7 (CO), 154.4 (CO), 135.7 (C), 129.1 (2 CH), 129.1 (1 CH), 128.7 (2 CH), 70.6 (CH), 69.3 (OCH₂), 59.7 (NCH), 46.6 (NCH₂), 31.9 (CH₂), 22.0 (2 CH₃).

ESI calculated for C₁₅H₂₁N₂O₄ [M]⁺ *m/z* = 293.1496, found 293.1643.

R_f (PE/EtOAc : 70/30) = 0.13

H- δ -AzaPro(Boc)-OiPr (9) $C_{12}H_{22}N_2O_4$ $M = 258.15 \text{ g.mol}^{-1}$

oil; 100%

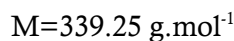
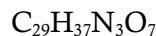
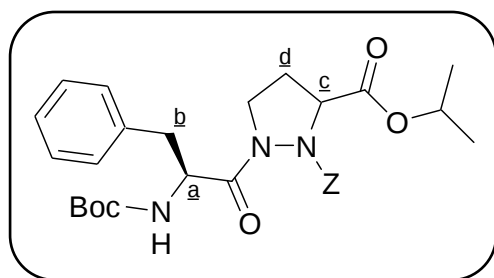
To a solution of **7** (157 mg, 0.40 mmol) in dry methanol (10 mL) was added a catalytic amount of palladium on charcoal (16 mg, 10%). The mixture was vigorously stirred overnight under dihydrogen atmosphere. The reaction was filtered through a celite pad and the solution was concentrated under *vacuum* to give δ -azaproline **9** (103 mg, 100%) as an oil without further purification.

^1H NMR (CDCl_3) δ 5.05 (dq, J 6.3 Hz, J 6.3 Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.43 (br s, 1H, NH), 3.81 (t, J 7.3 Hz, 1H, CHCH_2), 3.61-3.48 (m, 1H, NCH_2), 3.44-3.30 (m, 1H, NCH_2), 2.40-2.21 (m, 1H, CHCH_2), 2.10-1.92 (m, 1H, CHCH_2), 1.50-1.32 (m, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.22-1.11 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.8 (CO), 155.7 (CO), 81.0 (C), 69.7 (CH), 60.5 (NCH), 46.2 (NCH₂), 32.5 (CH₂), 28.9 (3 CH₃), 22.2 (2 CH₃).

ESI calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 281.1472$, found 281.1491.

Rf (PE/EtOAc : 70/30) = 0.18

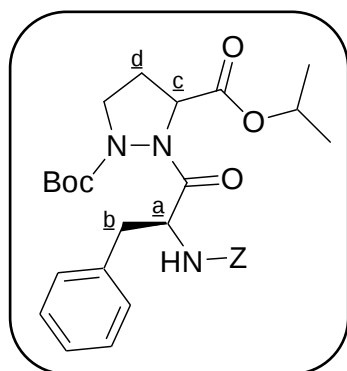
Z- δ -AzaPro-(Boc-Phe)-OiPr (10)

To a solution of **8** (609 mg, 1.50 mmol) in THF (15 mL) were added : triethylamine (0.45 mL, 3.30 mmol, 2.2 eq.), Boc-Phe-OH (477 mg, 1.80 mmol, 1.2 eq.) and HOBT (243 mg, 1.80 mmol, 1.2 eq.) and at 0°C EDC (346 mg, 1.80 mmol, 1.2 eq.) was added. The mixture was stirred for 24 h. The solvent was removed under *vacuum*. The residue was dissolved in DCM (80 mL) and the solution was washed successively with HCl 1M (3×30 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (3×30 mL) and brine (3×30 mL). The organic layer was dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give pseudodipeptide **10** and impurities.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.38-6.89 (m, 10H, H_{arom}), 5.11-5.00 (m, 3H, OCH₂ and NH), 5.00-4.83 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 4.62-4.41 (m, 1H, CHCH₂ **a**), 4.41-4.31 (m, 1H, CHCH₂ **c**), 3.61-3.22 (m, 4H, NCH₂ and CHCH₂ **b**), 2.55-2.36 (m, 1H, CHCH₂ **d**), 2.05-1.82 (m, 1H, CHCH₂ **d**), 1.44-1.13 (m, 9H, C(CH₃)₃), 1.13-0.99 (m, 6H, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 175.2 (CO), 171.8 (CO), 155.8 (CO), 155.1 (CO), 136.8 (C), 136.4 (C), 130.3 (CH), 129.9 (2 CH), 129.2 (CH), 128.9 (2 CH), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 127.4 (CH), 126.9 (CH), 80.3 (C), 69.9 (CH), 68.4 (OCH₂), 59.6 (CH), 54.8 (CH), 47.3 (NCH₂), 38.5 (CH₂), 33.6 (CH₂), 28.8 (3 CH₃), 22.1 (2 CH₃).

ESI calculated for C₂₉H₃₇N₃O₇ [M + Na]⁺ m/z = 562.2524, found 562.2502

Z-Phe- δ -AzaPro(Boc)-O*i*Pr (11) $C_{29}H_{37}N_3O_7$ $M=339.25 \text{ g.mol}^{-1}$

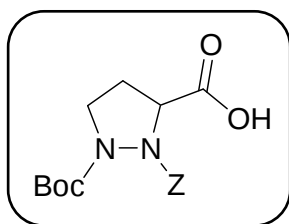
oil

To a solution of **9** (387 mg, 1.50 mmol) in THF (15 mL) were added : triethylamine (0.45 mL, 3.30 mmol, 2.2 eq.), Z-Phe-OH (538 mg, 1.80 mmol, 1.2 eq.) and HOBt (243 mg, 1.80 mmol, 1.2 eq.) and at 0°C EDC (346 mg, 1.80 mmol, 1.2 eq.) was added. The mixture was stirred for 24 h. The solvent was removed under *vacuum*. The residue was dissolved in DCM (80 mL) and the solution was washed successively with HCl 1M (3×30 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (3×30 mL) and brine (3×30 mL). The organic layer was dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give pseudodipeptide **11** and impurities.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.30-6.84 (m, 10H, H_{arom}), 5.50-5.27 (d, J 8.0 Hz, 1H, NH), 5.15-4.63 (m, 3H, OCH₂ and CH(CH₃)₂), 4.62-4.31 (m, 1H, CHCH₂ **a**), 4.91-3.81 (m, 1H, CHCH₂ **c**), 3.61-3.22 (m, 2H, NCH₂), 3.19-2.77 (m, 2H, CHCH₂ **b**), 2.48-1.91 (m, 2H, CHCH₂ **d**), 1.52-1.28 (m, 9H, C(CH₃)₃), 1.28-1.10 (m, 6H, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 174.5 (CO), 171.4 (CO), 156.4 (CO), 155.7 (CO), 136.8 (C), 136.5 (C), 129.9 (3 CH), 128.9 (4 CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 127.4 (CH), 81.7 (C), 69.0 (CH), 67.3 (OCH₂), 60.0 (CH), 55.2 (CH), 46.0 (NCH₂), 31.0 (CH₂), 29.5 (CH₂), 28.5 (3 CH₃), 22.1 (2 CH₃).

ESI calculated for C₂₉H₃₇N₃O₇ [M + Na]⁺ m/z = 562.2524, found 562.2513

Z- δ -AzaPro(Boc)-OH (12) $C_{17}H_{22}N_2O_6$ $M = 350.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

clear oil

With NaOH 1M in CH_3CN :

To a solution of **7** (157 mg, 0.40 mmol, 1 eq.) in CH_3CN (2 mL) was added, at $0^\circ C$, a solution of NaOH 1M (0.8 mL, 0.80 mmol, 2 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. A solution of HCl 1M was added until pH=2 and the aqueous layer was extracted with DCM (3×5 mL). The organic layers were combined, dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under *vacuum* to give carboxylic acid **12** (140 mg, 100%) as a clear oil.

With NaOH 1M in THF/ H_2O :

The previously procedure, using THF/ H_2O (3 mL, 1:1) instead of CH_3CN , gave carboxylic acid **12** (76 mg, 54%) as a clear oil.

With LiBr in THF/ H_2O :

To a solution of **7** (157 mg, 0.40 mmol, 1 eq.) in CH_3CN/H_2O (3 mL, 98:2) was added lithium bromide (347 mg, 4.0 mmol, 10 eq.) and Et_3N (0.16 mL, 1.20 mmol, 3 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. A solution of HCl 1M was added until pH=2 and the aqueous layer was extracted with DCM (3×5 mL). The organic layers were combined, dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under *vacuum* to give carboxylic acid **12** (88 mg, 63%) as a clear oil.

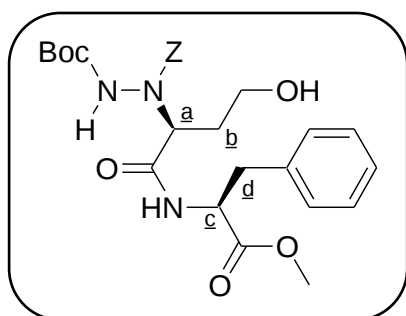
1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.39-7.10 (m, 5H, H_{arom}), 6.57 (br s, 1H, CO_2H), 5.31-4.86 (m, 2H, OCH_2), 4.80-4.61 (m, 1H, $CHCH_2$), 4.01-3.80 (m, 1H, NCH_2), 3.21-2.94 (m, 1H, NCH_2), 2.40-2.21 (m, 1H, $CHCH_2$), 2.48-2.00 (m, 1H, $CHCH_2$), 1.40-1.24 (m, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 173.5 (CO), 157.7 (CO), 156.7 (CO), 136.3 (C), 129.2 (CH), 129.1 (CH), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 127.6 (CH), 83.3 (C), 69.1 (OCH_2), 60.3 (NCH), 47.7 (NCH_2), 31.2 (CH_2), 28.5 (3 CH_3).

ESI calculated for $C_{17}H_{22}N_2O_6$ $[M+Na]^+$ $m/z = 373.1370$, found 373.1350.

Rf (PE/EtOAc : 70/30) = 0.00 (corresponding sodium carboxylate).

N-phenylalanyl(OMe)-2-[N^α-(Benzyloxycarbonyl)-N^β-(tert-butyloxy-carbonyl)-hydrazino]-4-hydroxybutanamide 14


 $C_{27}H_{35}N_3O_8$
 $M=529.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil, 60%

To a solution of lactone **5b** (140 mg, 0.40 mmol, 1 eq.) in dry THF (2.5 mL) were added HCl.H-Phe-OMe (130 mg, 0.60 mmol, 1.5 eq.) and sodium 2-ethylhexanoate (166 mg, 1.00 mmol, 2.5 eq.). The mixture was stirred and heated at reflux for 76 h. The solvent was removed under *vacuum*. The residue was dissolved in EtOAc (25 mL) and the solution was washed successively with HCl 1M (3×10 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (3×10 mL) and brine (3×10 mL). The organic layer was dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc as eluant to give compound **14** (127 mg, 60%) as an oil.

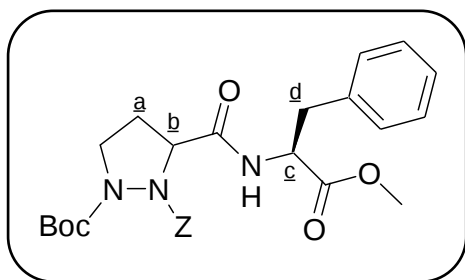
¹H NMR (CDCl₃) δ 8.74-8.40 (m, 1H, NNH), 7.47-6.93 (m, 10H, H_{arom}), 6.88-6.63 (m, 1H, NH), 5.31-4.91 (m, 2H, OCH₂), 4.91-4.49 (m, 2H, CHCH₂ c and OH), 4.32-3.82 (m, 2H, CHCH₂ a and CHCH₂ d), 3.82-3.67 (m, 3H, OCH₃), 3.67-2.72 (m, 3H, CHCH₂ d and OCH₂), 2.40-1.79 (m, 2H, CHCH₂ b), 2.65-1.30 (m, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.5 (CO), 170.7 (CO), 157.6 (CO), 154.3 (CO), 137.4 (C), 135.4 (C), 129.7 (2 CH), 127.8 (6 CH), 127.4 (2 CH), 83.6 (C), 69.2 (OCH₂), 65.6 (CH₂), 64.0 (CH), 54.7 (CH), 52.7 (OCH₃), 37.8 (OCH₂), 28.7 (3 CH₃), 26.7 (CH₂).

IR (NaCl) ν (cm⁻¹) 3272 (OH and NH), 1721, 1671 (C=O).

ESI calculated for C₂₇H₃₅N₃O₈ [M + Na]⁺ m/z = 552.2316, found 552.2320

Rf (PE/EtOAc : 40/60) = 0.31

Z- δ -AzaPro(Boc)-Phe-OMe (13) $C_{27}H_{33}N_3O_7$ $M=511.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil

Coupling reaction using EDC/HOBt as coupling reagents :

To a solution of **12** (271 mg, 0.77 mmol) in THF (15 mL) were added : triethylamine (0.23 mL, 1.69 mmol, 3 eq.), HCl.H-Phe-OMe (199 mg, 0.92 mmol, 1.2 eq.) and HOBt (124 mg, 0.92 mmol, 1.2 eq.) and at 0°C EDC (177 mg, 0.92 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred for 24 h. The solvent was removed under *vacuum*. The residue was dissolved in DCM (80 mL) and the solution was washed successively with HCl 1M (3×30 mL) and brine (1×30 mL). The organic layer was dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc as eluant to give diastereoisomeric mixture of pseudodipeptide **13** (338 mg, 86%) as an oil.

Intramolecular Mitsunobu reaction on dimer 14 :

Under Nitrogen, to a stirred solution of **14** (147 mg, 0.28 mmol, 1 eq.), PPh_3 (108 mg, 0.42 mmol, 1.5 eq.) in dry THF (5 mL) and was added in one portion dibenzylazodicarboxylate (125 mg, 0.42 mmol, 1.5 eq.) at 0°C. The resulting solution was stirred at room temperature overnight and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc as eluant to give pseudodipeptide (**S,S**)-**13** (56 mg, 39%) as an oil.

(R,S)-Z- δ -AzaPro(Boc)-Phe-OMe (13a)

1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.53 (br s, 1H, NH), 7.43-6.92 (m, 10H, H_{arom}), 5.41-4.90 (m, 2H, OCH_2), 4.87-4.69 (m, 1H, $CHCH_2$ c), 4.62-4.45 (m, 1H, $CHCH_2$ b), 3.95-3.74 (m, 1H, NCH_2), 3.61-3.49 (m, 3H, OCH_3), 3.22-2.99 (m, 2H, NCH_2 and $CHCH_2$ d), 2.91-2.75 (m, 1H, $CHCH_2$ d), 2.47-2.10 (m, 1H, $CHCH_2$ a), 2.05-1.75 (m, 1H, $CHCH_2$ a), 1.49-1.27 (m, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 172.1 (CO), 170.6 (2 CO), 158.5 (CO), 136.8 (C), 136.2 (C), 129.8 (CH), 129.7 (CH), 129.1 (4 CH), 129.0 (CH), 128.9 (CH), 128.5 (CH), 127.5 (CH), 83.5 (C), 69.2 (OCH_2), 62.3 (CH), 54.0 (CH), 52.8 (OCH_3), 47.7 (NCH_2), 39.1 (CH_2), 31.7 (CH_2), 28.7 (3 CH_3).

IR (ATR) ν (cm^{-1}) 3335, 3322 (NH), 1744, 1708, 1682 (C=O).

ESI calculated for $C_{27}H_{33}N_3O_7$ $[M + Na]^+$ $m/z = 534.221$, found 534.2199

Rf (PE/EtOAc : 40/60) = 0.54

(S,S)-Z- δ -AzaPro(Boc)-Phe-OMe (13b)

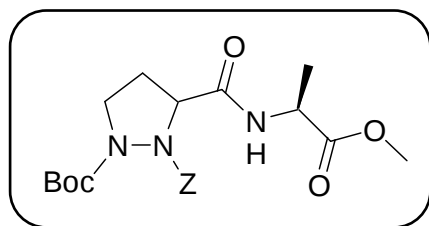
1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.70 (br s, 1H, NH), 7.40-6.90 (m, 10H, H_{arom}), 5.35-4.85 (m, 2H, OCH_2), 4.70-4.43 (m, 2H, 2 $CHCH_2$ c), 3.98-3.75 (m, 1H, NCH_2), 3.72-3.45 (m, 3H, OCH_3), 3.30-2.98 (m, 2H, NCH_2 and $CHCH_2$ d), 2.92-2.70 (m, 1H, $CHCH_2$ d) 2.55-2.18 (m, 2H, $CHCH_2$ a), 1.52-1.30 (m, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 172.1 (CO), 171.4 (2 CO), 158.5 (CO), 136.8 (C), 136.2 (C), 129.8 (CH), 129.7 (CH), 129.1 (4 CH), 129.0 (CH), 128.9 (CH), 128.5 (CH), 127.5 (CH), 83.6 (C), 69.1 (OCH_2), 62.2 (CH), 54.6 (CH), 52.8 (OCH_3), 48.2 (NCH_2), 38.3 (CH_2), 32.6 (CH_2), 28.8 (3 CH_3).

IR (ATR) ν (cm^{-1}) 3335, 3322 (NH), 1744, 1708, 1682 (C=O).

ESI calculated for $C_{27}H_{33}N_3O_7$ $[M + Na]^+$ $m/z = 534.221$, found 534.2199

Rf (PE/EtOAc : 40/60) = 0.41

Z-(D+L)- δ -AzaPro(Boc)-Ala-OMe (15) $C_{21}H_{29}N_3O_7$ $M=435.19 \text{ g.mol}^{-1}$

oil, 81%

To a solution of **12** (545 mg, 1.56 mmol) in THF (15 mL) were added : triethylamine (0.50 mL, 3.43 mmol, 3 eq.), HCl.H-Ala-OMe (261 mg, 1.87 mmol, 1.2 eq.) and HOBt (252 mg, 1.87 mmol, 1.2 eq.) and at 0°C EDC (359 mg, 1.87 mmol, 1.2 eq.) was added. The mixture was stirred for 24 h. The solvent was removed under *vacuum*. The residue was dissolved in DCM (80 mL) and the solution was washed successively with HCl 1M (3×30 mL) and brine (1×30 mL). The organic layer was dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc as eluant to give diastereoisomeric mixture of pseudodipeptide **15** (550 mg, 81%) as an oil.

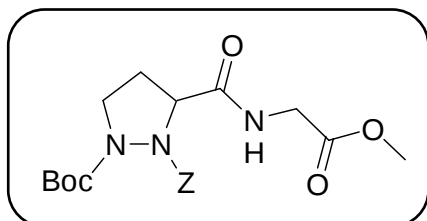
1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.81-7.63 (m, 1H, NH), 7.36-7.08 (m, 5H, H_{arom}), 5.25-4.97 (m, 2H, OCH_2), 4.72-4.61 (m, 1H, $CHCH_3$), 4.50-4.26 (m, 1H, $CHCH_2$), 3.91-3.72 (m, 1H, NCH_2), 3.70-3.50 (m, 3H, OCH_3), 3.28-3.17 (m, 1H, NCH_2), 2.51-2.04 (m, 2H, $CHCH_2$), 1.41-1.21 (m, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.21-1.10 (m, 3H, $CHCH_3$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 173.2 and 173.1 (CO and CO'), 171.5 (CO), 170.7 (CO), 157.1 (CO), 136.2 (C), 129.2 and 128.9 (CH and CH'), 128.5 (2 CH), 128.1 and 127.6 (CH and CH'), 127.2 and 126.7 (CH and CH'), 83.6 and 83.4 (C and C'), 69.2 (OCH_2), 62.1 (CH), 53.1 and 53.0 (OCH_3 and OCH_3'), 48.3 and 48.2 (CH and CH'), 47.7 (NCH_2), 31.6 (CH_2), 29.0 (3 CH_3), 18.6 and 17.7 (CH_3 and CH_3').

ESI calculated for $C_{21}H_{29}N_3O_7$ $[M + Na]^+$ $m/z = 458.1898$, found 458.1885

Rf 15a (PE/EtOAc : 40/60) = 0.40

Rf 15b (PE/EtOAc : 40/60) = 0.29

Z-(D+L)- δ -AzaPro(Boc)-Gly-OMe (16) $C_{20}H_{27}N_3O_7$ $M=421.17 \text{ g.mol}^{-1}$

oil, 79%

To a solution of **12** (440 mg, 1.26 mmol) in THF (15 mL) were added : triethylamine (0.42 mL, 2.77 mmol, 3 eq.), HCl.H-Gly-OMe (189 mg, 1.51 mmol, 1.2 eq.) and HOBt (204 mg, 1.51 mmol, 1.2 eq.) and at 0°C EDC (296 mg, 1.51 mmol, 1.2 eq.) was added. The mixture was stirred for 24 h. The solvent was removed under *vacuum*. The residue was dissolved in DCM (80 mL) and the solution was washed successively with HCl 1M (3×30 mL) and brine (1×30 mL). The organic layer was dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc as eluant to give pseudodipeptides **16** (419 mg, 79%) as an oil.

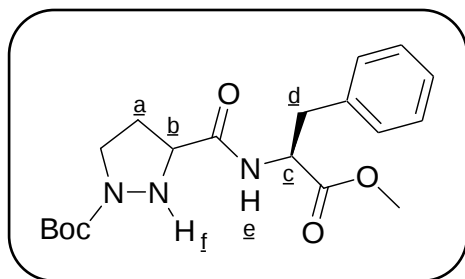
1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.78 (br s, 1H, NH), 7.40-7.21 (m, 5H, H_{arom}), 5.36-5.05 (m, 2H, OCH_2), 4.80-4.69 (m, 1H, $CHCH_2$), 4.19-4.08 (m, 1H, CH_2), 4.08-3.90 (m, 1H, NCH_2), 3.90-3.81 (m, 1H, CH_2), 3.73-3.67 (m, 3H, OCH_3), 3.32-3.18 (m, 1H, NCH_2), 2.61-2.28 (m, 2H, $CHCH_2$), 1.49-1.42 (m, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 171.7 (CO), 170.0 (2 CO), 156.9 (CO), 136.1 (C), 129.1 (2 CH), 129.0 (CH), 128.5 (2 CH), 83.4 (C), 69.1 (OCH_2), 62.1 (CH), 52.7 (OCH_3), 48.0 (NCH_2), 41.5 (CH_2), 31.9 (CH_2), 28.6 (3 CH_3).

IR (NaCl) ν (cm^{-1}) 3359 (NH), 1750, 1712, 1680 (C=O).

ESI calculated for $C_{20}H_{27}N_3O_7$ $[M + Na]^+$ $m/z = 444.1741$, found 444.1730

Rf (PE/EtOAc : 40/60) = 0.33

H-(D+L)- δ -AzaPro(Boc)-Phe-OMe (17)
 $C_{19}H_{27}N_3O_5$
 $M = 377.18 \text{ g.mol}^{-1}$

oil, 100%

Deprotection with dihydrogen:

To a solution of **13** (347 mg, 0.68 mmol) in dry methanol (20 mL) was added a catalytic amount of palladium on charcoal (35 mg, 10%). The mixture was vigorously stirred overnight under dihydrogen atmosphere. The reaction was filtered through a celite pad and concentrated under *vacuum* to give pseudodipeptide **17** (256 mg, 100%) as an oil.

Deprotection without dihydrogen, with microwave heating:

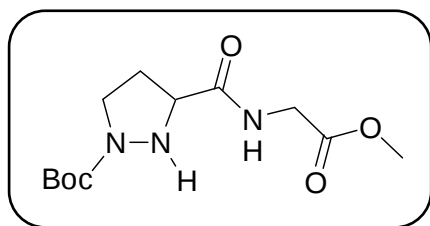
A 5 mL CEM microwave process tube was charged with **13** (101 mg, 0.20 mmol), palladium on charcoal (10 mg, 10 %), and dry methanol (1 mL). 1,4-Cyclohexadiene (0.11 mL, 1.20 mmol, 6 eq.) was added and the tube was capped. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 100°C for 5 min. The reaction mixture was filtered through a celite pad and concentrated under *vacuum* to give pseudodipeptide **17** (75 mg, 100%) as an oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.02 (br s, 1H, NH_e), 7.43-6.92 (m, 6H, NH_f and H_{arom}), 4.71-4.58 (m, 1H, CHCH₂_c), 4.58-4.31 (m, 1H, CHCH₂_{c'}), 3.83-3.62 (m, 1H, CHCH₂_b), 3.62-3.49 (m, 3H, OCH₃), 3.49-3.10 (m, 2H, NCH₂), 3.10-2.69 (m, 2H, CHCH₂_d), 2.44-2.01 (m, 2H, CHCH₂_a), 1.49-1.29 (m, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.1 and 170.9 (CO and CO'), 160.4 (CO), 155.8 and 154.8 (CO and CO'), 135.9 and 135.7 (C and C'), 128.6 (2 CH and 2 CH'), 128.0 and 127.9 (2 CH and 2 CH'), 126.5 and 126.4 (CH and CH'), 81.6 and 80.2 (C and C'), 60.2 (CH), 53.5 and 52.9 (CH and CH'), 51.7 and 51.6 (OCH₃ and OCH₃'), 45.2 (NCH₂), 37.9 and 37.4 (CH₂ and CH₂'), 31.1 (CH₂), 27.6 (3 CH₃).

ESI calculated for C₁₉H₂₇N₃O₅ [M + Na]⁺ m/z = 400.1843, found 400.1856

Rf (PE/EtOAc : 30/70) = 0.34

H-(D+L)- δ -AzaPro(Boc)-Gly-OMe (18) $C_{12}H_{21}N_3O_5$ $M = 287.14 \text{ g.mol}^{-1}$

oil, 99%

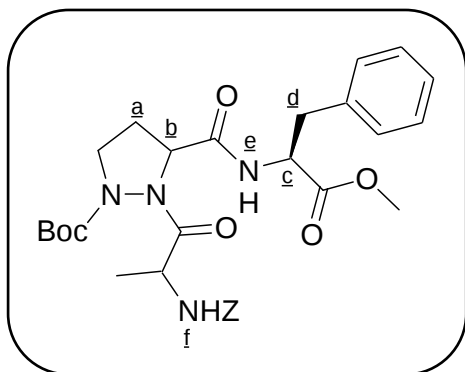
The same procedures than formation of pseudodipeptides **17**, starting from pseudodipeptides **16**, gave pseudodipeptides **18** (99%) as an oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8.15 (br s, 1H, NH), 4.55 (br s, 1H, NH), 4.11-3.81 (m, 3H, CHCH₂ and CH₂), 3.79-3.68 (m, 3H, OCH₃), 3.68-3.50 (m, 1H, NCH₂), 3.40-3.14 (m, 1H, NCH₂), 2.67-2.41 (m, 1H, CHCH₂), 2.41-2.12 (m, 1H, CHCH₂), 1.51-1.43 (m, 9H, C(CH₃)₃).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172.8 (CO), 170.3 (CO), 156.7 (CO), 81.3 (C), 61.4 (CH), 52.7 (OCH₃), 46.6 (NCH₂), 41.4 (CH₂), 32.0 (CH₂), 28.8 (3 CH₃).

ESI calculated for $C_{12}H_{21}N_3O_5$ $[M + \text{Na}]^+$ $m/z = 310.1373$, found 310.1378

R_f (PE/EtOAc : 20/80) = 0.11

Z-Ala- δ -AzaPro(Boc)-Phe-OMe 19 $C_{30}H_{38}N_4O_8$ M= 582.26 g.mol⁻¹

oil

Acid fluoride preparation :

Under Nitrogen, to a stirred solution of Z-Ala-OH (714 mg, 3.20 mmol) in dry DCM (10 mL) and pyridine (0.32 mL, 3.20 mmol, 1 eq.) was slowly dropwise added cyanuric fluoride (0.54 mL, 6.40 mmol, 2 eq.) at -20°C. The solution was stirred at -10°C during 1 or 2 hours and a precipitate formed and gradually increased amount. Crushed ice (20 mL) was added along an additional DCM (10mL). The organic layer was separated and the aqueous layer extracted with cold DCM (5×10 mL). The combined organic layers were washed with cold-ice water (3×10 mL) and dried over MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* without heating to give Z-Ala-F (720 mg, 100%).

Coupling reaction :

To a stirred solution of **17** (777 mg, 2.06 mmol, 1 eq.) and NaHCO₃ (350 mg, 4.12 mmol, 2 eq.) in DCM (25 mL) and water (50 mL) was added a solution of Z-Ala-F (695 mg, 3.09 mmol, 1.5 eq.) in DCM (25 mL). The resulting solution was stirred overnight at room temperature. The organic layer was separated and washed with solutions of HCl 1M (3×50 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (3×50 mL) and brine (3×50 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of cyclohexane/EtOAc as eluant to give pseudotripeptides **19a** (252 mg, 21%) and **19b** (72 mg, 6%) as oils.

Z-Ala-(D+L)- δ -AzaPro(Boc)-Phe-OMe (19a)

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.40 (br s, 1H, NH_e), 7.37-6.92 (m, 10H, H_{arom}), 5.61 (br s, 1H, NH_f), 5.12-4.99 (m, 2H, OCH₂), 4.87-4.69 (m, 3H, CHCH₂_a and CHCH₂_c and CHCH₃), 4.18-3.96 (m, 1H, NCH₂), 3.60-3.49 (m, 3H, OCH₃), 3.31-2.62 (m, 3H, NCH₂ and CHCH₂_d), 2.48-2.05 (m, 2H, CHCH_{2a}), 1.45-1.27 (m, 9H, C(CH₃)₃), 1.27-1.09 (m, 3H, CHCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 175.1 (CO), 171.9 (CO), 170.0 (CO), 157.9 (CO), 155.8 (CO), 137.1 (C), 136.8 (C), 136.2 (C'), 129.9 (2 CH and 2 CH'), 129.2 (CH and CH'), 129.0 (2 CH and 2 CH'),

128.9 (CH and CH'), 128.8 (CH and CH'), 128.7 (CH and CH'), 127.6 (CH and CH'), 127.5 (CH and CH'), 85.2 (C), 67.3 (OCH₂), 60.7 (CH), 54.6 and 54.4 (CH and CH'), 52.9 and 52.7 (OCH₃ and OCH₃'), 49.2 (NCH₂), 48.8 (CH), 38.3 (CH₂), 30.8 (CH₂), 28.7 (3 CH₃), 19.2(CH₃).

IR (CHCl₃, 10 mM) ν (cm⁻¹) 3423, 3331 (NH).

ESI calculated for C₃₀H₃₈N₄O₈ [M + Na]⁺ m/z 605.2582, found 605.2585

Rf (PE/EtOAc : 40/60) = 0.36

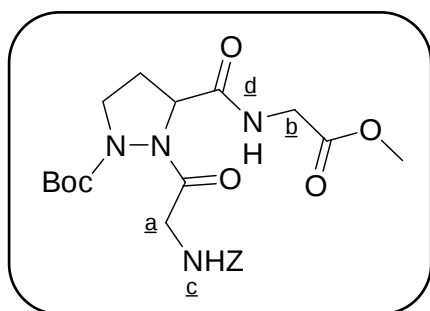
Z-(D)-Ala-(D+L)- δ -AzaPro(Boc)-Phe-OMe (19b)

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.55 (br s, 1H, NH_e), 7.40-7.04 (m, 10H, H_{arom}), 5.24 (br s, 1H, NH_f), 5.19-4.91 (m, 2H, OCH₂), 4.91-4.61 (m, 3H, CHCH₂_a and CHCH₂_c and CHCH₃), 4.27-4.01 (m, 1H, NCH₂), 3.80-3.56 (m, 3H, OCH₃), 3.34-2.88 (m, 3H, NCH₂ and CHCH₂_d), 2.40-2.09 (m, 2H, CHCH_{2a}), 1.60-1.36 (m, 12H, C(CH₃)₃ and CHCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.5 (CO), 172.1 (CO), 169.7 (2 CO), 158.2 (CO), 136.8 (2 C), 129.9 (2 CH and 2 CH'), 129.2 (CH and CH'), 129.0 (2 CH and 2 CH'), 128.9 (2 CH and 2 CH'), 128.8 (CH and CH'), 128.6 (CH and CH'), 127.5 (CH and CH'), 84.3 (C), 67.5 (OCH₂), 60.3 (CH), 54.3 and 53.9 (CH and CH'), 52.8 (OCH₃), 49.9 (NCH₂), 47.6 (CH), 38.9 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.6 (3 CH₃), 18.8 (CH₃).

ESI calculated for C₃₀H₃₈N₄O₈ [M + Na]⁺ m/z 605.2582, found 605.2585

Rf (PE/EtOAc : 40/60) = 0.53

Z-Gly-(D+L)- δ -AzaPro(Boc)-Gly-OMe (20)

$$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_8$$

$$M = 478.20 \text{ g.mol}^{-1}$$

oil

Coupling reaction with HATU :

To a stirred solution of **18** (221 mg, 0.77 mmol), Z-Gly-OH (192 mg, 0.92 mmol, 1.2 eq.), triethylamine (0.34 mL, 0.92 mmol, 3 eq.) in DMF (5 mL) was added in one portion HATU (350 mg, 0.92 mmol, 1.2 eq.). The resulting solution was stirred at room temperature overnight and was partitioned between EtOAc (15 mL) and HCl 1M (10 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 1M (2×10 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (3×10 mL) and brine (3×10 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of cyclohexane/EtOAc as eluant to give pseudotriptides **20** (133 mg, 36%) as an oil.

Coupling reaction with HATU, with microwave heating :

A 5 mL CEM microwave process tube was charged with **18** (393 mg, 1.37 mmol), Z-Gly-OH (343 mg, 1.64 mmol, 1.2 eq.), and triethylamine (0.60 mL, 4.11 mmol, 3 eq.) in DMF (5 mL). HATU (623 mg, 1.64 mmol, 1.2 eq.) was added in one portion and the tube was capped. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 75°C (3×5 min). The solution was partitioned between EtOAc (30 mL) and HCl 1M (20 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 1M (2×20 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (3×20 mL) and brine (3×20 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of cyclohexane/EtOAc as eluant to give pseudotriptides **20** (262 mg, 40%) as an oil.

Coupling reaction with acid fluoride :

The same procedure than formation of pseudotriptides **19**, starting from pseudodipeptides **18** and Z-Gly-F, gave pseudotriptides **20** (48%) as an oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.54 (br s, 1H, NH_d), 7.41-7.19 (m, 5H, H_{arom}), 5.62 (br s, 1H, NH_c), 5.19-5.00 (m, 2H, OCH₂), 4.92-4.68 (m, 1H, CHCH₂), 4.40-4.21 (m, 1H, CH_{2a}), 4.21-3.93 (m, 3H, CH_{2a}, NCH₂ and CH_{2b}), 3.91-3.75 (m, 1H, CH_{2b}), 3.75-3.56 (m, 3H, OCH₃), 3.22-2.98 (m, 1H, NCH₂), 2.52-2.21 (m, 2H, CHCH₂), 1.53-1.32 (m, 9H, C(CH₃)₃).

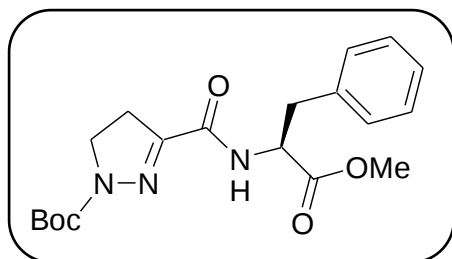
^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172.8 (CO), 170.6 (CO), 170.1 (CO), 157.8 (CO), 156.9 (CO), 136.9 (C), 129.03 (2 CH), 128.6 (CH), 128.5 (2 CH), 84.8 (C), 67.5 (OCH_2), 60.0 (CH), 52.7 (OCH_3), 52.7 (NCH_2), 42.9 (CH_2), 41.6 (CH_2), 30.3 (CH_2), 28.5 (3 CH_3).

IR (CHCl_3 , 10 mM) ν (cm^{-1}) 3433, 3348 (NH), 1753, 1725, 1712, 1692, 1689, 1678 (C=O).

ESI calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $m/z = 501.1956$, found 501.1950

Rf (PE/EtOAc : 40/60) = 0.27

Boc-pyrazoline-Phe-OMe (21)



$C_{19}H_{25}N_3O_5$

$M = 375.21 \text{ g.mol}^{-1}$

oil

The compound **17**, after 48h at room temperature, gave Boc-pyrazoline-Phe-OMe **21**.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.47-7.21 (m, 4H, H_{arom}), 7.21-7.12 (m, 2H, H_{arom} and NH), 4.98-4.82 (m, 1H, CHCH_2), 3.92 (t, J 10.7 Hz, 2H, NCH_2), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.22-2.93 (m, 4H, CHCH_2 and CCH_2), 1.54 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

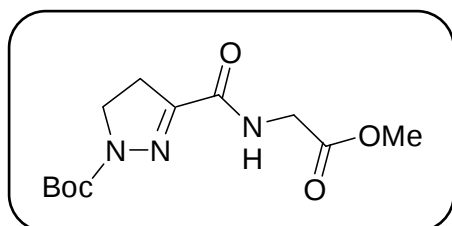
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 172.0 (CO), 161.5 (CO), 152.2 (CO), 150.2 (CN), 136.4 (C), 129.7 (CH), 129.2 (CH), 129.1 (CH), 128.5 (CH), 127.6 (CH), 82.8 (C), 53.9 (CH), 52.9 (OCH_3), 47.4 (NCH_2), 38.7 (CH_2), 30.3 (CH_2), 28.6 (3 CH_3).

IR (NaCl) ν (cm^{-1}) 1732, 1706 (C=O), 1670 (N=C).

ESI calculated for $C_{19}H_{25}N_3O_5$ $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ $m/z = 393.2132$, found 393.2130

Rf (PE/EtOAc : 30/70) = 0.76

Boc-pyrazoline-Gly-OMe (22)



$C_{12}H_{19}N_3O_5$

$M = 285.17 \text{ g.mol}^{-1}$

oil

The compound **18**, after 48h at room temperature, gave Boc-pyrazoline-Gly-OMe **22**.

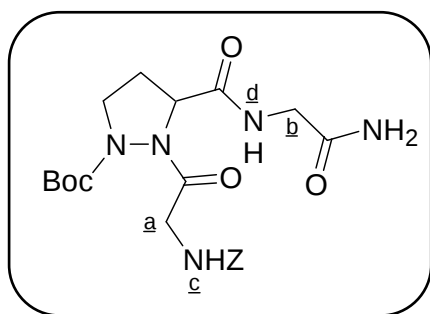
^1H NMR (CDCl_3) δ 7.32 (br s, 1H, NH), 4.09 (d, J 5.8 Hz, 2H, CH_2), 3.92 (t, J 10.7 Hz, 2H, NCH_2), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.08 (t, J 10.8 Hz, 2H, CCH_2), 1.51 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 172.4 (CO), 162.1 (CO), 152.3 (CO), 150.3 (CN), 82.9 (C), 52.9 (OCH_3), 47.5 (NCH_2), 41.5 (CH_2), 30.3 (CH_2), 28.6 (3 CH_3).

IR (NaCl) ν (cm^{-1}) 1731, 1700 (C=O), 1674 (N=C).

ESI calculated for $C_{12}H_{19}N_3O_5$ $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ $m/z = 303.1663$, found 303.1660

Rf (PE/EtOAc : 30/70) = 0.56

Z-Gly-(D+L) δ -AzaPro(Boc)-Gly-NH₂ (23)C₂₁H₂₉N₅O₇M = 463.20 g.mol⁻¹

oil, 100%

To a stirred solution of **20** (73 mg, 0.15 mmol) in toluene (1.5 mL) was added ammonium hydroxide (1.5 mL, 25% aq.). The reaction flask was sealed with a rubber septum and vigorously stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was then concentrated under *vacuum* to give pseudotripeptides **23** (70 mg, 100%) as an oil.

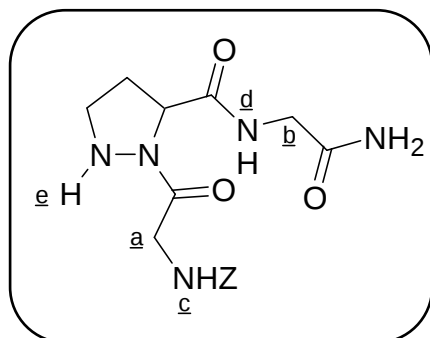
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.67 (br s, 1H, NH_d), 7.42-7.20 (m, 5H, H_{arom}), 6.67 (br s, 1H, NH₂), 6.23 (br s, 1H, NH₂), 5.99 (br s, 1H, NH_c), 5.12-4.98 (m, 2H, OCH₂), 4.87-4.65 (m, 1H, CHCH₂), 4.36-4.14 (m, 1H, CH_{2a}), 4.14-4.02 (m, 1H, NCH₂), 4.02-3.90 (m, 1H, CH_{2a}), 3.90-3.72 (m, 2H, CH_{2b}), 3.22-2.93 (m, 1H, NCH₂), 3.51-2.15 (m, 2H, CHCH₂), 1.54-1.31 (m, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.8 (CO), 172.5 (CO), 170.7 (CO), 158.1 (CO), 157.3 (CO), 137.0 (C), 129.2 (CH), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 128.2 (CH), 127.7 (CH), 85.1 (C), 67.6 (OCH₂), 60.0 (CH), 49.5 (NCH₂), 43.3 (CH₂), 42.9 (CH₂), 29.5 (CH₂), 28.5 (3 CH₃).

IR (CHCl₃, 10 mM) ν (cm⁻¹) 3495, 3435, 3414, 3369 (NH), 1724, 1712, 1693, 1689, 1679, 1663, 1656 (C=O).

ESI calculated for C₂₁H₂₉N₅O₇ [M + Na]⁺ m/z = 486.1959, found 486.1960

R_f (PE/EtOAc : 0/100) = 0.05

Z-Gly-(D+L)-AzaPro-Gly-NH₂ (24)C₁₆H₂₁N₅O₅M= 363.14 g.mol⁻¹

white solid, 100%

To a solution of **19** (100 mg, 0.22 mmol) in DCM (7.48 mL) was added, at 0°C, TFA (1.32 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 h and concentrated under *vacuum*. The residue was diluted in water and basified until pH=10 by saturated aqueous Na₂CO₃ and extracted with EtOAc (8×5 mL). The organic layers were combined, dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give pseudotripeptides **24** (80 mg, 100%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.92 (br s, 1H, NH_d), 7.34-7.08 (m, 5H, H_{arom}), 6.86 (br s, 1H, NH₂), 6.42 (br s, 1H, NH₂), 6.07 (br s, 1H, NH_c), 5.09-4.77 (m, 2H, OCH₂), 4.60 (br s, 1H, NH_e), 4.42-4.31 (m, 1H, CHCH₂), 4.22-4.09 (m, 2H, CH_{2a}), 3.82-3.50 (m, 2H, CH_{2b}), 3.23-2.91 (m, 1H, NCH₂), 2.78-2.44 (m, 1H, NCH₂), 2.31-2.11 (m, 1H, CHCH₂), 2.11-1.89 (m, 1H, CHCH₂).

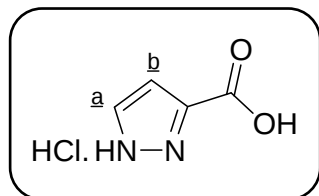
¹³C NMR (CDCl₃) δ 173.4 (CO), 172.7 (CO), 171.4 (CO), 157.6 (CO), 137.1 (C), 129.2 (CH), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 128.2 (CH), 127.7 (CH), 67.5 (OCH₂), 60.5 (CH), 48.7 (NCH₂), 43.9 (CH₂), 43.3 (CH₂), 33.1 (CH₂).

IR (CHCl₃, 10 mM) ν (cm⁻¹) 3486, 3438, 3411, 3365, 3349 (NH), 1723, 1717, 1685, 1654, 1637 (C=O).

ESI calculated for C₁₆H₂₁N₅O₅ [M + Na]⁺ *m/z* = 386.1435, found 386.143

mp = 180°C

Rf (EtOAc/EtOH : 85/15) = 0.10

HCl. 1*H*-pyrazole-3-carboxylic acid (26) $\text{C}_4\text{H}_5\text{ClN}_2\text{O}_2$ $M = 148.03 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

white crystals, 100%

3-Methylpyrazole (9.7 g, 0.12 mol) was dissolved in 450 mL of water. To this solution, aqueous KMnO_4 (41 g, 0.26 mol, 2.2 eq.) was added slowly at room temperature and the mixture was refluxed 4 h. The solution was cooled, filtered on celite and evaporated to a small volume. Recrystallisation was performed in water at pH ~ 2 . After 1 h at 4°C , white crystals were collected, washed with cold acidic water and dried at 60°C overnight, to give carboxylic acid **26** (18 g, 100%).

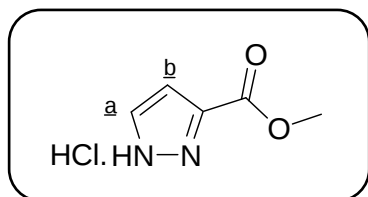
$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ 7.78 (s, 1H, CH_a), 6.89 (s, 1H, CH_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (D_2O) δ 165.9 (CO), 142.7 (CN), 132.9 (CH_a), 108.9 (CH_b).

IR (NaCl) ν (cm^{-1}) 3307 (NH), 3140 (OH), 1718 (C=O), 1690 (N=C).

ESI calculated for $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ $m/z = 113.0346$, found 113.0370

Rf (PE/EtOAc : 0/100) = 0.00

HCl.Methyl 1H-pyrazole-3-carboxylate (27a) $C_5H_7ClN_2O_2$ $M = 162 \text{ g.mol}^{-1}$

white solid

With sulfuric acid :

Under Nitrogen, to a solution of **26** (2.6 g, 17.8 mmol) in dry MeOH (60 mL) was added sulfuric acid (2 mL) and the mixture was refluxed 5h. The solution was cooled and concentrated under *vacuum*. The residue was diluted with water (30 mL), neutralized with NaHCO_3 to pH 7-8 and extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined organic layers were dried with MgSO_4 and concentrated under *vacuum* to give ester **27a** (1.4 g, 50%) as a white solid.

With thionylchloride :

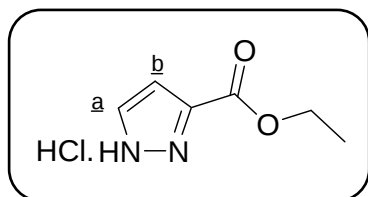
To a solution of **26** (1.3 g, 9.00 mmol) in dry MeOH (35 mL) was added thionylchloride (2.03 mL, 27.0 mmol, 3 eq.) and the mixture was refluxed 3h. The solution was cooled and concentrated under *vacuum* to give ester **27a** (1.5 g, 100%) as a white solid.

^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ 11.25 (br s, 2H, NH_2^+), 7.81 (d, J 2.4 Hz, 1H, CH_a), 6.76 (d, J 2.4 Hz, 1H, CH_b), 3.80 (s, 3H, OCH_3).

^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$) δ 162.0 (CO), 140.8 (CN), 131.9 (CH_a), 107.7 (CH_b), 51.4 (OCH_3).

IR (NaCl) ν (cm^{-1}) 3155 (NH), 1760 (C=O), 1718 (N=C).

ESI calculated for $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ $m/z = 127.0502$, found 127.0490

HCl.Ethyl 1*H*-pyrazole-3-carboxylate (27b) $C_6H_9ClN_2O_2$ $M = 176.05 \text{ g.mol}^{-1}$

white solid

With sulfuric acid :

Under Nitrogen, to a solution of **26** (1.0 g, 9.11 mmol,) in dry EtOH (20 mL) was added sulfuric acid (1.5 mL) and the mixture was refluxed 5h. The solution was cooled and concentrated under *vacuum*. The residue was diluted with water (50 mL), neutralized with NaHCO_3 to pH 7-8 and extracted with EtOAc (3×20 mL). The combined organic layers were dried with MgSO_4 and concentrated under *vacuum* to give ester **27b** (802 mg, 50%) as a white solid.

With thionylchloride :

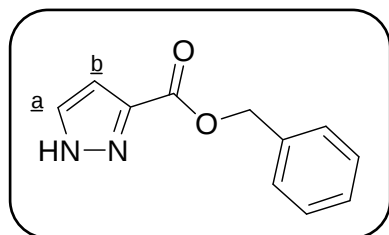
To a solution of **26** (1.0 g, 8.92 mmol) in dry EtOH (30 mL) was added thionylchloride (2.00 mL, 26.8 mmol, 3 eq.) and the mixture was refluxed 3h. The solution was cooled and concentrated under *vacuum* to give ester **27b** (1.6 g, 100%) as a white solid.

^1H NMR (CDCl_3) δ 9.56 (br s, 2H, NH_2^+), 7.83 (d, J 2.2 Hz, 1H, CH_a), 6.85 (d, J 2.2 Hz, 1H, CH_b), 4.43 (q, J 7.1 Hz, 2H, OCH_2), 1.42 (t, J 7.1 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 163.0 (CO), 141.8 (CN), 132.1 (CH_a), 108.3 (CH_b), 61.6 (OCH_2), 15.1 (CH_3).

IR (NaCl) ν (cm^{-1}) 3161 (NH), 1763 (C=O), 1712 (N=C).

ESI calculated for $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $m/z = 163.0478$, found 163.0490

Benzyl 1*H*-pyrazole-3-carboxylate (27c)C₁₁H₁₀N₂O₂M= 202.08 g.mol⁻¹

white solid

With benzyl alcohol and DCC :

To a solution of **26** (266 mg, 1.80 mmol), benzyl alcohol (0.37 mL, 3.60 mmol, 2 eq.) and a catalytic amount of DMAP in DCM (35 mL) was added DCC (556 mg, 2.70 mmol, 1.5 eq.) at 0°C and the mixture was stirred at room temperature for 24h. The precipitated dicyclohexylurea was filtered and the solution was concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (7/3) as eluant to give ester **27c** (302 mg, 83%) as a white solid.

With benzylbromide :

To a solution of **26** (672 mg, 6.00 mmol) in dry EtOH (80 mL) was added KOH (370 mg, 6.60 mmol, 1.1 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 1h and the solution was concentrated under *vacuum*. The residue was diluted in DMF (85 mL) and benzylbromide was dropwise added (0.78 mL, 6.60 mmol, 1.1 eq.) de bromure de benzyle. The mixture was stirred at room temperature overnight. The solution was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ (250 mL) and extracted with EtOAc (3×100 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×100 mL), dried with MgSO₄ and concentrated under *vacuum*. The precipitation with PE from DCM gave ester **27c** (909 mg, 75%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃) δ 10.71 (br s, 1H, NH), 7.58 (d, *J* 2.3 Hz, 1H, CH_a), 7.45-7.24 (m, 5H, H_{arom}), 6.80 (d, *J* 2.3 Hz, 1H, CH_b), 5.39 (s, 2H, OCH₂).

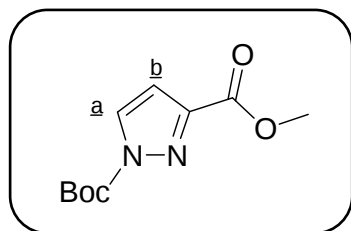
¹³C NMR (CDCl₃) δ 162.9 (CO), 142.9 (CN), 136.3 (C), 132.1 (CH_a), 129.3 (2 CH), 129.1 (2 CH), 129.0 (CH), 108.4 (CH_b), 67.3 (OCH₂).

IR (NaCl) ν (cm⁻¹) 3131 (NH), 1762 (C=O), 1725 (N=C).

ESI calculated for C₁₁H₁₀N₂O₂ [M + H]⁺ *m/z* = 203.0815, found 203.0830

mp = 117°C

R_f (PE/EtOAc : 70/30) = 0.18

Methyl 1-Boc-pyrazole-3-carboxylate (29a)C₁₀H₁₄N₂O₄M = 226.08 g.mol⁻¹

white solid, 89%

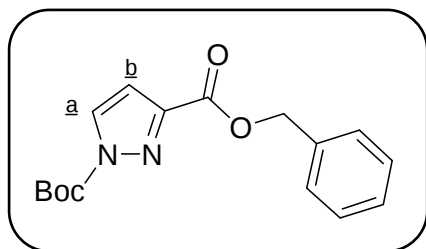
A solution of **27a** (1.2 g, 7.65 mmol), Boc₂O (1.7 g, 7.73 mmol, 1.01 eq.) and triethylamine (1.05 mL, 7.73 mmol, 1.01 eq.) in THF (25 mL) was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was diluted with water (30 mL) and extracted with EtOAc (3×75 mL). The organic layers were dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of cyclohexane/EtOAc (5/5) as eluant to give ester **29a** (1.5 g, 89%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.38 (d, *J* 2.4 Hz, 1H, CH_a), 6.92 (d, *J* 2.4 Hz, 1H, CH_b), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 1.59 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 162.7 (CO), 147.9 (CO), 147.6 (CN), 132.6 (CH_a), 110.9 (CH_b), 87.4 (C), 53.0 (OCH₃), 28.5 (3 CH₃).

ESI calculated for C₁₀H₁₄N₂O₄ [M + Na]⁺ *m/z* = 249.0846, found 249.0850

mp = 85°C

Benzyl 1-Boc-pyrazole-3-carboxylate (29c) $C_{16}H_{18}N_2O_4$ $M = 302.16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil, 67%

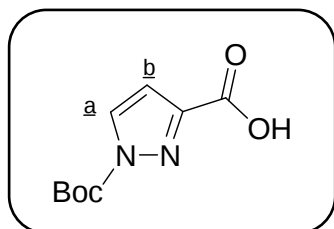
A solution of **27c** (204 mg, 1.01 mmol), Boc_2O (220 mg, 1.01 mmol, 1 eq.) and triethylamine (0.14 mL, 1.01 mmol, 1 eq.) in THF (15 mL) was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was concentrated under *vacuum* and the residue was chromatographed on silica gel with a mixture of cyclohexane/EtOAc (7/3) as eluant to give ester **29c** (204 mg, 67%) as an oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8.11 (d, J 2.7 Hz, 1H, CH_a), 7.34-7.45 (m, 5H, H_{arom}), 6.86 (d, J 2.7 Hz, 1H, CH_b), 5.39 (s, 2H, OCH_2), 1.66 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 162.1 (CO), 147.9 (CO), 147.6 (CN), 136.1 (C), 132.5 (CH_a), 129.2 (2 CH), 129.0 (2 CH), 128.9 (CH), 110.9 (CH_b), 87.4 (C), 67.7 (OCH_2), 28.7 (CH_3), 28.4 (CH_3), 28.0 (CH_3).

ESI calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ $m/z = 320.1605$, found 320.1610

Rf (PE/EtOAc : 70/30) = 0.59

1-Boc-pyrazole-3-carboxylic acid (28) $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ $M = 212.09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

white solid, 97%

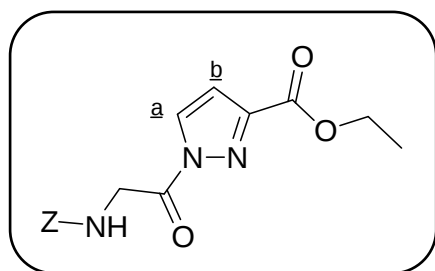
To a solution of **29c** (251 mg, 0.83 mmol) in dry methanol (10 mL) was added a catalytic amount of palladium on charcoal (25 mg, 10%). The mixture was vigorously stirred for overnight under dihydrogen atmosphere. The reaction was filtered through a celite pad and concentrated under *vacuum* to give carboxylic acid **28** (171 mg, 97%) as a white solid.

^1H NMR (CDCl_3) δ 10.03 (br s, 1H, CO_2H), 8.11 (br s, 1H, CH_a), 6.91 (br s, 1H, CH_b), 1.65 (br s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 162.5 (CO), 148.7 (CO), 147.6 (CN), 132.7 (CH_a), 111.1 (CH_b), 87.6 (C), 28.8 (3 CH_3).

ESI calculated for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ $m/z = 213.0870$, found 213.0860

mp = 213°C

Ethyl 1-Z-Gly-pyrazole-3-carboxylate (30a)
 $C_{16}H_{17}N_3O_5$
 $M = 331.13 \text{ g.mol}^{-1}$

white solid, 88%

A 5 mL CEM microwave process tube was charged with **27b** (246 mg, 1.40 mmol), Z-Gly-OH (376 mg, 1.80 mmol, 1.2 eq.), and triethylamine (0.56 mL, 4.20 mmol, 3 eq.) in DMF (5 mL). HATU (684 mg, 1.80 mmol, 1.2 eq.) was added in one portion and the tube was capped. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 75°C (3×5 min). The solution was partitioned between EtOAc (30 mL) and HCl 1M (20 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 1M (2×20 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (3×20 mL) and brine (3×20 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give pseudodipeptide **30a** (408 mg, 88%) as a white solid.

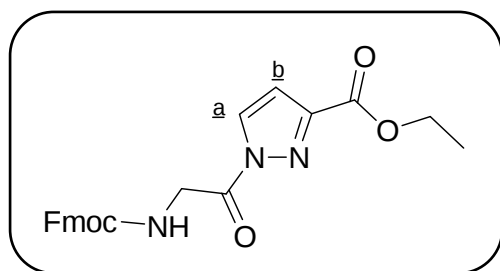
¹H NMR (CDCl₃) δ 8.13 (d, *J* 2.8 Hz, 1H, CH_a), 7.32-7.10 (m, 5H, H_{arom}), 6.80 (d, *J* 2.8 Hz, 1H, CH_b), 5.63 (br s, 1H, NH), 5.05 (s, 2H, OCH₂), 4.77 (d, *J* 5.7 Hz, 2H, CH₂), 4.31 (q, *J* 7.2 Hz, 2H, OCH₂), 1.30 (t, *J* 7.2 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 169.1 (CO), 161.8 (CO), 157.1 (CO), 148.9 (CN), 136.7 (C), 130.4 (CH_a), 129.3 (CH), 129.1 (CH), 128.9 (CH), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 111.8 (CH_b), 67.8 (OCH₂), 62.3 (OCH₂), 44.5 (CH₂), 14.9 (CH₃).

ESI calculated for C₁₆H₁₇N₃O₅ [M + Na]⁺ *m/z* = 354.1323, found 354.1320

mp = 105°C

Rf (PE/EtOAc : 70/30) = 0.36

Ethyl 1-Fmoc-Gly-pyrazole-3-carboxylate (30b)
 $C_{23}H_{21}N_3O_5$
 $M = 419.14 \text{ g.mol}^{-1}$

white solid, 64%

Acid chloride preparation :

To a stirred solution of Fmoc-Gly-OH (297 mg, 1.00 mmol) in dry DCM (10 mL) was dropwise added thionylchloride (0.75 mL, 10.0 mmol, 10 eq.) at 0°C and the mixture was refluxed 2h. The solution was cooled and concentrated under *vacuum* to give Fmoc-Gly-Cl (315 mg, 100%) without further purification.

Coupling reaction :

To a stirred solution of **27b** (107 mg, 0.61 mmol) and NaHCO_3 (101 mg, 1.20 mmol, 2 eq.) in DCM (5 mL) and water (10 mL) was added a solution of Fmoc-Gly-Cl (290 mg, 0.92 mmol, 1.5 eq.) in DCM (5 mL). The resulting solution was stirred overnight at room temperature. The organic layer was separated and washed with portions of HCl 1M (3×10 mL), saturated aqueous NaHCO_3 (3×10 mL) and brine (3×10 mL), dried with MgSO_4 , filtered and concentrated under *vacuum*. The precipitation with EtOAc gives pseudodipeptide **30b** (164 mg, 64%) as a white solid.

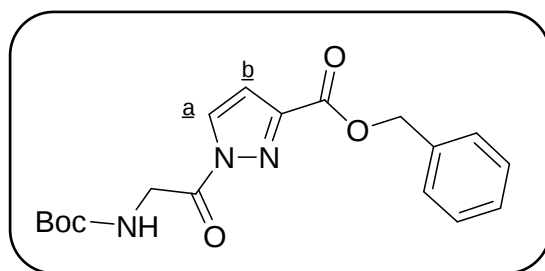
^1H NMR (CDCl_3) δ 8.27 (d, J 2.2 Hz, 1H, CH_a), 7.80-7.75 (m, 2H, H_{arom}), 7.65-7.61 (m, 2H, H_{arom}), 7.45-7.26 (m, 4H, H_{arom}), 6.95 (d, J 2.2 Hz, 1H, CH_b), 5.45 (br s, 1H, NH), 4.92 (d, J 5.3 Hz, 2H, CH_2), 4.50-4.40 (m, 4H, OCH_2CH and OCH_2), 4.27 (t, J 6.7 Hz, 1H, OCH_2CH) 1.44 (t, J 7.1 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 169.1 (CO), 161.9 (CO), 157.1 (CO), 149.1 (CN), 144.4 (2C), 142.0 (2C), 130.4 (CH_a), 128.4 (2 CH), 127.7 (2 CH), 125.7 (2 CH), 120.6 (2 CH), 112.0 (CH_b), 68.0 (OCH_2), 62.4 (OCH_2), 47.8 (CH), 44.6 (CH_2), 14.9 (CH_3).

ESI calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $m/z = 442.1373$, found 442.1370

mp = 168°C

Rf (PE/EtOAc : 60/40) = 0.49

Benzyl 1-Boc-Gly-pyrazole-3-carboxylate (30c) $C_{18}H_{21}N_3O_5$ $M = 359.14 \text{ g.mol}^{-1}$

white solid, 63%

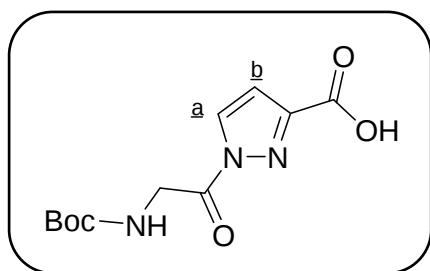
The same procedure than formation of pseudodipeptide **30a**, starting from ester **27c** and Boc-Gly-OH, gave pseudodipeptide **30c** (63%) as a white solid.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8.26 (d, J 2.8 Hz, 1H, CH_a), 7.49-7.35 (m, 5H, H_{arom}), 6.93 (d, J 2.8 Hz, 1H, CH_b), 5.40 (s, 2H, OCH_2), 5.16 (br s, 1H, NH), 4.81 (d, J 5.7 Hz, 2H, CH_2), 1.47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 169.5 (CO), 161.8 (CO), 156.4 (CO), 148.6 (CN), 136.0 (C), 130.4 (CH_a), 129.3 (2 CH), 129.2 (CH), 129.1 (CH), 129.0 (CH), 111.8 (CH_b), 81.0 (C), 68.0 (OCH_2), 44.3 (CH_2), 28.9 (3 CH_3).

ESI calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $m/z = 382.1373$, found 382.1358

Rf (PE/EtOAc : 70/30) = 0.40

1-Boc-Gly-pyrazole-3-carboxylic acid (31a) $C_{11}H_{15}N_3O_5$ $M = 269.10 \text{ g.mol}^{-1}$

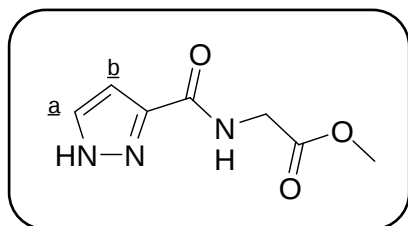
white solid, 100%

A 5 mL CEM microwave process tube was charged with **30c** (144 mg, 0.40 mmol), palladium on charcoal (15 mg, 10 %), and dry methanol (1 mL). 1,4-Cyclohexadiene (2.4 mmol, 6 eq.) was added and the tube was capped. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 100°C for 5 min. The reaction mixture was filtered on celite and concentrated under *vacuum* to give carboxylic acid **31a** (108 mg, 100%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.49 (br s, 1H, CO₂H), 8.20 (br s, 1H, CH_a), 6.89 (br s, 1H, CH_b), 5.30 (br s, 1H, NH), 4.77 (br s, 2H, CH₂), 1.49-1.27 (m, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 175.4 (CO), 165.2 (CO), 156.7 (CO), 148.6 (CN), 130.7 (CH_a), 112.2 (CH_b), 81.1 (C), 42.9 (CH₂), 28.7 (3 CH₃).

R_f (PE/EtOAc : 50/50) = 0.10

1H-pyrazole-Gly-OMe (33) $C_7H_9N_3O_3$ $M = 183.05 \text{ g.mol}^{-1}$

white solid, 100%

Coupling reaction using EDC and NMM :

To a solution of **26** (148 mg, 1.00 mmol) in water (5 mL) were added : NMM (0.34 mL, 3.70 mmol, 3.7 eq.) and HCl.H-Gly-OMe (125 mg, 1.00 mmol, 1 eq.) and at 0°C EDC (216 mg, 1.10 mmol, 1.1 eq.). The mixture was stirred for 24 h. The solution was diluted with water (15 mL) and extracted with EtOAc (8×10 mL). The combined organic layers were dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under *vacuum* to give pseudodipeptide **33** (44 mg, 24%) as a white solid.

Coupling reaction using EDC :

To a solution of **26** (148 mg, 1.00 mmol) in THF (15 mL) were added: few drops of water, triethylamine (0.3 mL, 2.20 mmol, 2.2 eq.) and HCl.H-Gly-OMe (150 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq.) and 0°C EDC (235 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred for 24 h. The solvent was removed under *vacuum*. The residue was dissolved in water (20 mL) and extracted with EtOAc (8×10 mL). The combined organic layers were dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under *vacuum* to give pseudodipeptide **33** (68 mg, 37%) as a white solid.

Coupling reaction with HATU, with microwave heating :

A 5 mL CEM microwave process tube was charged with **26** (148 mg, 1.00 mmol), HCl.H-Gly-OMe (150 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq.), and triethylamine (0.41 mL, 3.00 mmol, 3 eq.) in DMF (5 mL). HATU (456 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq.) was added in one portion and the tube was capped. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 75°C (3×5 min). The solution was diluted with water (15 mL) and extracted with EtOAc (5×5 mL). The combined organic layers were washed with brine (2×5 mL), dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under *vacuum* to give pseudodipeptide **33** (99 mg, 54%).

¹H NMR (CDCl₃) δ 10.37 (br s, 1H, NNH), 7.90 (br s, 1H, NH), 7.55 (d, *J* 2.1 Hz, 1H, CH_a), 6.78 (d, *J* 2.1 Hz, 1H, CH_b), 4.22 (d, *J* 5.8 Hz, 2H, CH₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃).

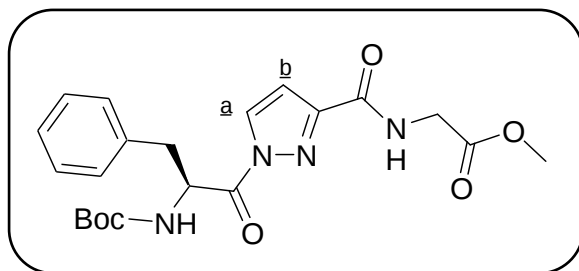
¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.6 (CO), 163.5 (CO), 146.1 (CN), 131.3 (CH_a), 106.7 (CH_b), 53.1 (OCH₃), 41.7 (CH₂).

IR (NaCl) ν (cm⁻¹) 3241, 3190 (NH), 1753, 1711 (C=O), 1650 (N=C).

ESI calculated for C₇H₉N₃O₃ [M + Na]⁺ *m/z* = 206.0536, found 206.0550

mp = 140°C

R_f (PE/EtOAc : 0/100) = 0.46

Boc-Phe-pyrazole-Gly-OMe (32b) $C_{21}H_{26}N_4O_6$ $M = 430.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

A 5 mL CEM microwave process tube was charged with **33** (256 mg, 1.40 mmol), Boc-Phe-OH (398 mg, 1.80 mmol, 1.2 eq.), and triethylamine (0.42 mL, 2.80 mmol, 2 eq.) in DMF (5 mL). HATU (684 mg, 1.80 mmol, 1.2 eq.) was added in one portion and the tube was capped. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 75°C (3×5 min). The solution was partitioned between EtOAc (30 mL) and HCl 1M (20 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 1M (2×20 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (3×20 mL) and brine (3×20 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give pseudotriptide **32b** and impurities.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.21 (m, , 1H, CH_a), 7.73 (br s, 1H, NHCH₂), 7.54-7.01 (m, 5H, H_{arom}), 6.97 (m, 1H, CH_b), 5.82 (m, 1H, CHCH₂), 5.27 (m, 1H, NHCH), 4.30-4.02 (m, 2H, NHCH₂), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.39-2.91 (m, 2H, CHCH₂), 1.48-1.39 (m, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.4 (CO), 163.0 (CO), 161.3 (CO), 155.7 (CO), 146.3 (CN), 136.0 (C), 130.8 (CH_a), 129.2 (CH), 129.1 (CH), 128.8 (CH), 127.8 (2 CH), 110.8 (CH_b), 80.1 (C), 53.1 (CH), 52.9 (OCH₃), 41.7 (CH₂), 39.7 (CH₂), 28.8 (3 CH₃).

ESI calculated for C₂₁H₂₆N₄O₆ [M + Na]⁺ *m/z* = 453.1745, found 453.1740

Rf (PE/EtOAc : 0/100) = 0.81

Références bibliographiques

- 1 Pelmont, J. *Enzymes : Catalyseurs du monde vivant*; Edition Presses universitaires de Grenoble ed., **1995**.
- 2 Fischer, G.; Bang, H.; Mech, C. *Biomed. Biochim. Acta* **1984**, *43*, 1101-1112.
- 3 Handschumacher, R. E.; Harding, M. W.; Rice, J.; Drugge, R. J.; Speicher, D. W. *Science* **1984**, *226*, 544-546.
- 4 Crabtree, G. R. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2313-2316.
- 5 Rahfel, J.-U.; Rücknagel, K. P.; Stollert, G.; Hornes, S. M.; Schierhorn, A.; Young, K. D.; Fischer, G. *J. Bio. Chem.* **1996**, *271*, 22130-22138.
- 6 Pereira, P. J. B.; Vega, M. C.; Gonzales-Rey, E.; Fernandez-Carazo, R.; Macedo-Ribeiro, S.; Gomis-Rüth, F. X.; Gonzales, A.; Coll, M. *Eur. Mol. Bio. Org.* **2002**, *3*, 88-94.
- 7 Fischer, G.; Bang, H.; Berger, E.; Schellenberger, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *791*, 87-97.
- 8 a) Harrison, R.K.; Stein, R. L. *Biochem.*, **1990**, *29*, 3813-3816. b) Albers, M.W.; Walsh, C.T.; Schreiber, S.L. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 4984-4986.
- 9 Kofron, J.L.; Kuzmic, P.; Kishore, V.; Colon-Bonilla, E.; Rich, D.H. *Biochem.*, **1991**, *30*, 6127-6134.
- 10 Keller, M.; Sager, C.; Dumy, P.; Sebutkowski, M.; Fischer, G.S.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 2714-2720.
- 11 a) Aubry, A.; Boussard, G.; Cung, M. T.; Marraud, M.; Vitoux, B. *J. Chim. Phys. Phys. Chim. Biol.* **1988**, *85*, 345-359. b) Lecoq, A. *Thèse d'université : N-amino et hydrazinopeptides. Aspects chimiques et structuraux* **1991**, INPL Nancy. c) Grand, V.; Aubry, A.; Dupont, V.; Vicherat, A.; Marraud, M. *J. Pept. Sci.* **1996**, *2*, 381-391. d) Andre, F.; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M. *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 372-381. e) Vanderesse, R.; David, L.; Grand, V.; Marraud, M.; Mangeot, J. P.; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2669-2672. f) Vanderesse, R.; Grand, V.; Limal, D.; Vicherat, A.; Marraud, M.; Didierjean, C.; Aubry, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9444-9451.
- 12 a) Bouillon, I.; Brosse, N.; Vanderesse, R.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3569-3572. b) Bouillon, I.; Brosse, N.; Vanderesse, R.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *63*, 2223-2234. c) Bouillon, I.; Vanderesse, R.; Brosse, N.; Fabre, O.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9635-9641.
- 13 Felten, A.-S.; Dautrey, S.; Bodiguel, J.; Vanderesse, R.; Didierjean, C.; Arrault, A.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10741-10753.
- 14 a) Abbas C.; Pickaert G.; Didierjean C.; Jamart-Grégoire B.; Vanderesse R. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4158-4160. b) Abbas C.; Jamart-Grégoire B.; Vanderesse R.; Didierjean C. *Acta Cryst.* **2009**, *E65*, o3079.

- 15 a) Niedrich, H. *Chem. Ber.* **1965**, 98, 3451-3461. b) Grupe, R.; Baeck, B.; Niedrich, H. *J. Prakt. Chem.* **1972**, 314, 751-758. c) Dupond, V.; Lecoq, A.; Mangeot, J. P.; Aubry, A.; Boussard, G.; Marraud, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8898-8906. d) Lecoq, A.; Marraud, M.; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 2765-2768. e) Aubry, A.; Bayeul, D.; Mangeot, J. P.; Sterin, S.; Collet, A.; Lecoq, A.; Marraud, M. *Biopolymers* **1991**, 31, 793-801.
- 16 Weigert, F. J. *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 622-626.
- 17 a) Adams, C. E.; Aguilar, D.; Hertel, S.; Knight, W. H.; Paterson, J. *Synth. Commun.* **1988**, 18, 2225-2231. b) Coats, R. A.; Lee, S.-L.; Davis, K. A.; Patel, K. M.; Rhoads, E. K.; Howard, M. H. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 1734-1737. c) Kennedy, J. P.; Brogan, J. T.; Lindsley, C. W. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 4116-4118.
- 18 Kornet, M. J.; Thio, P. A.; Tan, S. I. *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 3637-3639.
- 19 Kanemasa, S.; Tomoshige, N.; Wada, E.; Tsuge, O. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, 62, 3944-3949.
- 20 Kim, H.-O.; Lum, C.; Lee, M. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4935-4938.
- 21 Mish, M.R.; Guerra, F.M.; Carreira, E.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 8379-8380.
- 22 a) Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1, 1-28. b) Brosse, N.; Pinto, M.-F.; Jamart-Grégoire, B. *J. Org. Chem* **2000**, 65, 4370-4374.
- 23 a) Brosse, N.; Pinto, M.-F.; Bodiguel, J.; Jamart-Grégoire, B. *J. Org. Chem* **2001**, 66, 2869-2873. b) Brosse, N.; Pinto, M.-F.; Jamart-Grégoire, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 24, 4757-4764.
- 24 a) Brosse, N.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 249-251. b) Bouillon, I. *Thèse d'université : Synthèse d' α -hydrazinopeptides* **2006**, INPL, Nancy.
- 25 Bouillon, I.; Vanderesse, R.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2004**, 45, 3569-3572.
- 26 Krause, J. G.; Kwon, S.; George, B. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 2040-2042.
- 27 Stafford, J. A.; Brackeen, M. F.; Karanewsky, D. S.; Valvano, N. L. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7873-7876.
- 28 Hayashi, Y.; Yamaguchi, J.; Shoji, M. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 9839-9846.
- 29 Civitello, E.R.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 3775-3782.
- 30 Weber, A.E.; Halgren, T.A.; Doyle, J.J.; Lynch, R.J.; Siegl, P.K.S.; Parsons, W.H.; Grennlee, W.J.; Patchett, A.A. *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 2692-2701.
- 31 a) Darnbrough, S.; Mervic, M.; Condon, S. M.; Burns, C. *J. Synth. Commun.* **2001**, 31, 3273-3280. b) Schlosser, M.; Heiss, C.; Marzi, E.; Scopelliti, R. *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 19, 4398-4404.

- 32 a) Chevallet, P.; Garrouste, P.; Malawska, B.; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7409-7412. b) McNulty, J.; Cheekoori, S.; Nair, J. J.; Larichev, V.; Capretta, A.; Robertson, A. J. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3641-3644.
- 33 a) Wu, Y.-q.; Limburg, D. C.; Wilkinson, D. E.; Vaal, M. J.; Hamilton, G. S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2847-2849. b) Kaul, R.; Brouillette, Y.; Sajjadi, Z.; Hansford, K. A.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6131-6133. c) Yadav, J. S.; E. Balanarsaiah, E.; S. Raghavendra, S.; Satyanarayana, M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4921-4924.
- 34 Wu, C.Y.; Brik, A.; Wang, S.K.; Chen, Y.H.; Wong, C.H. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2176-2180.
- 35 Iwagami, H.; Yasuda, N. *Heterocycles* **1990**, *31*, 529-536.
- 36 Voss, E.; Arrault, A.; Bodiguel, J.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron : Asymmetry*, **2009**, *20*, 1809-1812.
- 37 a) Rosenmund, K. W.; Zetsche, F.; Heise, F. *Ber dtsch Chem Ges* **1921**, *54*, 2038-2042. b) Bergmann, M.; Zervas, L. *Ber. dtsch. Chem. Ges.* **1932**, *65*, 1192-1201.
- 38 Quinn, J. F.; Razzano, D. A. ; Golden, K. C.; Gregg, B. T. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6137-6140.
- 39 Ganellin, C. R.; Bishop, P. B.; Bambal, R. B.; Chan, S. M. T.; Leblond, B.; Moore, A. N. J.; Zhao, L.; Bourgeat, P.; Rose, C.; Vargas, F.; Schwartz, J.-C. *J. Med.Chem.* **2005**, *48*, 7333-7342.
- 40 a) Fellinger L. L.; Audrieth, L. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 579-581. b) Robins, M. J.; Sarker, S.; Xie, M.; Zhang, W.; Peterson, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3921-3924. c) Yong, K. W.; Cannon, J. G.; Rose, J. G. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 1791-1794.
- 41 Liu, W.; Xu, D. D.; Repic, O.; Blacklock, T. J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2439-2441.
- 42 Gilleron, P.; Millet, R.; Domarkas, J.; Farce, A.; Houssin, R.; Hénichart, J.-P. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 140-146.
- 43 a) Kim, H.-O.; Gardner, B.; Kahn, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6013-6016. b) Ciufolini, M. A.; Xi, N. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2320-2321. c) Boger, D. L.; Schüle, G. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6421-6424. d) Liu, F.; Stephen, A. G.; Adamson, C. S.; Gousset, K.; Aman, M. J.; Freed, E. O.; Fisher, R. J.; Burke, T. R. Jr. *Organic Lett.* **2006**, *8*, 5165-5168. e) Li, W.; Gan, J.; Ma, D. *Organic Lett.* **2009**, *11*, 5694-5697.
- 44 Kimura, T.; Takai, M.; Masui, Y.; Morikawa, T.; Sakakibara, S. *Biopolymers* **1981**, *20*, 1823-1832.
- 45 Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- 46 a) Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208. b) Wang, W.; McMurray, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2501-2504.
- 47 Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219-1222.

- 48 Giacomelli, G.; Porcheddu, A.; Salaris, M. *Organic Lett.* **2003**, 5, 2715-2717.
- 49 Pettit, G. R.; Taylor, S. R. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2322-2325.
- 50 a) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398. b) Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9678-9683.
- 51 Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3039-3039.
- 52 a) Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Chao, H. G.; DeSelms, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9651-9652. b) Carpino, L. A.; Mansour, E.-S. M. E.; Sadat-Aalae, D. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2611-2614.
- 53 Carpino, L. A.; El-Faham, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5401-5402.
- 54 a) Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Sadat-Aalae, S. Y.; Tien, J. H.; Langridge, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 3732-3734. b) Beyermann, M.; Bienert, M.; Niedrich, H.; Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, S. Y. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 721-728. c) Carpino, L. A.; Ionescu, D.; El-Faham, A.; Henklein, P.; Wenschuh, H.; Bienert, M.; Beyermann, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 241-244.
- 55 Tiecco, M.; Testaferri, L.; Marine, F. *Tetrahedron*, **1997**, 53, 4441-4446.
- 56 Ternon, M.; Outurqui, F.; Paulmier, C. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 10259-10270.
- 57 Li, Y. A.; Chalker, J. M.; Floyd, N.; Bernardes, G. J. L.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 9642-9643.
- 58 Salaün, A. *Thèse d'université : Synthèse et étude conformationnelle des aza- β^3 -peptides et de leurs dérivés macrocycliques* **2005**, Université de Rennes 1.
- 59 MacDonald, S. J. F.; Clarke, G. D. E.; Dowle, M. D.; Harrison, L. A.; Hodgson, S. T.; Inglis, G. G. A.; Johnson, M. R.; Shah, P.; Upton, R. J.; Walls, S. B. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5166-5175.
- 60 Kim, J.; Kim, Y.; Baek, K.; Ko, Y. H.; Kim, D.; Kim, K. *Tetrahedron* **2008**, 64, 8389-8393.
- 61 a) Routier, S.; Sauge, L.; Ayerbe, N.; Coudert, G.; Mérour, J.-Y. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 589-591. b) El Kazzouli, S.; Koubachi, J.; Bertaina-Raboin, S.; Mouaddib, A.; Guillaumet, G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 8575-8577. c) Dandepally, S. R.; Williams, A. L. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 1071-1074.
- 62 Bekhit, A. A.; El-Sayed, O. A.; Aboul-Enein, H. Y.; Siddiqui, Y. M.; Al-Ahdal, M. N. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, 338, 74-77.
- 63 Erden, B.; Murat, S.; Burcu, C. E.; Sultan, N. B.; Eda, A.; Mustaf, A. *Turk J. Chem.* **2007**, 31, 677-687.

- 64 Leblanc, R.; Dickson, J.; Brown, T.; Stewart, M.; Pati, H. N.; VanDerveer, D.; Arma, H.; Harris, J.; Pennington, W.; Holt, H. L. Jr; Lee, M. *J. Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6025-6034.
- 65 Liu, X.-Y.; Yan, R.-Z.; Wang, Y.; Zhan, P.; De Clerq, E.; Pannecouque, C. ; Witvrouw, M.; Molina, M. T.; Vega, S. *Arch. Pharm.* **2008**, *341*, 216-222.
- 66 Trilok, C.; Neha, G.; Suman, L.; Saxena, K. K.; Ashok, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1772-1776.
- 67 Gouda, M. A.; Berghot, M. A.; Abd El-Ghani, G. E.; Khalil, A. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1338-1345.
- 68 Morio, K.; Shigeko, N.; Takeo, H. *Takeda Keukyusho Ho* **1973**, *32*, 181.
- 69 Mukherjee, R. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *203*, 151-218.
- 70 Fatin-Rouge, N.; Toth, E.; Perret, D.; Backer, R. H.; Merbach, A. E.; Bünzli, J.-C. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10810-10820.
- 71 Dunnill, P. M.; Fowden, L. *Biochem. J.* **1963**, *86*, 388-391.
- 72 Noe, F. F., Fowden, L. *Biochem. J.* **1960**, *77*, 543-546.
- 73 De Luca, L.; Falorni, M.; Giacomelli, G.; Porcheddu, A. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8701-8704.
- 74 a) Takagi, K.; Tanaka, M.; Murakami, Y.; Ogura, K.; Ishii, K.; Morita, H.; Aotsuka, T. *J. Heterocyclic Chem.* **1987**, *24*, 1003-1007. b) Mitkidou, S.; Stephanidou-Stephanatou, J.; Stephopoulou, H. *J. Heterocyclic Chem.* **1993**, *30*, 441-444.
- 75 Kusakiewics-Dawid, A.; Masiukiewicz, E.; Rzeszotarska, B.; Dybala, I.; Koziol, A. E.; Broda, M. A. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 747-752.
- 76 a) Wanka, L.; Cabrele, C.; Vanejews, M.; Schreiner, P. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *9*, 1474-1490. b) Widmer, U. *Synthesis* **1983**, *2*, 135-136.
- 77 Fields, W. H.; Chruma, J. J. *Organic Lett.*, **2010**, *12*, 316-319 5supporting Information).
- 78 Oslob, J. D.; Yu, C. H. *Pyrazolo pyrimidines usefuls as aurora kinase inhibitors*, **2007**.
- 79 Gilbert, E. J. ; Greenlee, W. J.; Li, S. W.; Miller, M. W.; Scott, J. D.; Stamford, A.; Celly, C. S. *Substituted piperazines as CB1 antagonists*, **2009**.
- 80 Schulz, G. E.; Schrimmer, R. H. *Priniciples of Protein Structure* ; Cantor CR, Series éd., Springer, NY, **1979**.
- 81 Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*, 95-99.
- 82 a) Boussard, G.; Marraud, M.; Neel, J. *J. Chem. Phys.* **1974**, *71*, 1081. b) André, F.; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M. *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 372-381.
- 83 Milner-White, E. L. *J. Mol. Biol.* **1990**, *216*, 385-397.
- 84 Milner-White, E. L.; Ross, B. M.; Ismail, R.; Belhadj-Mostefa, K.; Poet, R. *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 777-782.

- 85 Némethy, G.; Scheraga, H. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 95, 320-327.
- 86 Müller, G.; Gurrath, M.; Kurz, M.; Kessler, H. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1993**, 15, 235-251.
- 87 Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. *Protein Sci.* **1994**, 3, 2207-2216.
- 88 a) Viret, J.; Collet, A.; Pichon-Pesme, V.; Aubry, A. *New J. Chem.* **1988**, 12, 253-256. b) Aubry, A.; Bayeul, D.; Mangeot, J.-P.; Vidal, J.; Stérin, S.; Collet, A.; Lecoq, A.; Marraud, M. *Biopolymers* **1991**, 31, 793-801.
- 89 Aubry, A.; Mangeot, J. P.; Vidal, J.; Collet, A.; Zerkout, A.; Marraud, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, 38, 603-605.
- 90 a) Cheguillaume, A.; Salaun, A.; Sinbandhit, S.; Potel, M.; Gall, P.; Baudy-Floch, M.; Le Grel, P. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4923-4929. b) Salaun, A.; Potel, M.; Roisnel, T.; Gall, P.; Le Grel, P. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 6499-6502.
- 91 Lecoq, A.; Marraud, M.; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 2765-2768.
- 92 Felten, A.-S. *Thèse d'université : Synthèse de N-aminopeptides. Application à la synthèse de nouveaux foldamères*, **2007**, INPL Nancy.
- 93 Dautrey, S. *Thèse d'université : Synthèse et étude conformationnelle de nouveaux oligomères mixtes : les [α/α -N-amino]mères*, **2009**, INPL Nancy.
- 94 Benatalah, Z. ; Aubry, A.; Boussard, G.; Marraud, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 38, 603-605.
- 95 Abbas, C. *Thèse d'université : Synthèse et études structurales de nouveaux 2:1- $[\alpha/aza]$ -oligomères, vers de nouveaux foldamères*, **2009**, INPL Nancy.
- 96 a) Delaney, N. G.; Madison, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6635-6641. b) Overberger, C. G.; Jon, Y. S. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1977**, 15, 1413-1421.
- 97 Beausoleil, E.; Sharma, R.; Michnick, S.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6572-6578.
- 98 a) Koskinen, A. M. P.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 1859-1866. b) Tamaki, M.; Han, G.; Hruby, V. J. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 3593-3596.
- 99 Beausoleil, E.; Lubell, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12902-12908.
- 100 Halab, L.; Lubell, W. D. *J. Peptide Sci.* **2001**, 7, 92-104.
- 101 Halab, L.; Lubell, W. D. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 3312-3321.
- 102 a) Marraud, M.; Aubry, A. *Biopolymers* **1996**, 40, 45-83. b) Lecoq, A.; Boussard, G.; Marraud, M.; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5209-5212. c) Lecoq, A.; Boussard, G.; Marraud, M.; Aubry, A. *Biopolymers* **1993**, 33, 1051-1059.
- 103 a) Wöhr, T.; Wahl, F.; Nefzi, A.; Rohwedder, B.; Sato, T.; Sun, X.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9218-9227. b) Dumy, P.; Keller, M.; Ryan, D. E.; Rohwedder, B.; Wöhr, T.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 918-925.

- 104 Chaume, G.; Barbeau, O.; Lesot, P.; Brigaud, T. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4135–4145.
- 105 Vivet, B.; Cavelier, F.; Martinez, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *5*, 807-811.
- 106 Cavelier, F.; Vivet, B.; Martinez, J.; Aubry, A.; Didierjean, C.; Vicherat, A.; Marraud, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2917-2923.
- 107 Vivet, B.; Cavelier, F.; Martinez, J.; Didierjean, C.; Marraud, M.; Aubry, A. *Acta Cryst.* **2000**, *C56*, 1452-1454.
- 108 Formaggio, F.; Crisma, M.; Tonolio, C.; Broxterman, Q. B.; Kaptin, B.; Corbier, C.; Saviano, M.; Palladino, P.; Benedetti, E. *Macromolecules* **2003**, *36*, 8164-8170.
- 109 a) Bax, A.; Freeman, R. *J. Magn. Reson.* **1981**, *44*, 542-561 b) Bax, A.; Freeman, R.; Morris, G. *J. Magn. Reson* **1981**, *42*, 164-168.
- 110 Günther, R. *La spectroscopie de RMN*; Masson: Paris, **1994**.
- 111 Bothner-By, A. A.; Stephens, R. L.; Lee, J.; Warren, C. O.; Jeanloz, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *109*, 607-609.
- 112 Iqbal, M.; Balaram, P. *Biopolymers* **1982**, *21*, 1427-1433.
- 113 Salaun, A.; Favre, A.; Le Grel, B.; Potel, M.; Le Grel, P. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 150-158.
- 114 Stein, R. L. *Adv. Protein Chem.* **1993**, *44*, 1-24.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ooo

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Gérard GUILLAUMET, Professeur, Université d'Orléans

Madame Florine CAVELIER, Directeur de Recherche, Faculté de Pharmacie, Montpellier

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame VOSS Emelyne

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Synthèse d'Analogues Bis-azotés de la Proline et Applications. "

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 28 septembre 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



Synthèse d'Analogues Bis-azotés de la Proline et Applications

La liaison peptidique au sein d'un peptide ou d'une protéine est d'ordinaire plane et en conformation *trans* pour la majorité des acides aminés. La situation est un peu différente en amont d'une proline : la barrière thermodynamique qui s'oppose à la rotation de la liaison amide est plus faible et la tendance de la liaison à rester plane est un peu moins grande. Cette liaison AA-Pro peut donc adopter une conformation *cis*, entraînant la formation d'un coude prononcé dans une chaîne peptidique à son niveau. Ce travail décrit la synthèse et la réactivité chimique de nouveaux analogues bis-azotés de la proline en solution permettant de favoriser la conformation *cis* d'une liaison AA-ΨPro. L'impact conformationnel que peut engendrer ces résidus au sein de pseudopeptides est également exposé.

Dans un premier temps, une nouvelle voie d'accès à la δ-azaproline énantiomériquement pure et orthogonalement protégée a été mise au point en exploitant des travaux antérieurs concernant la synthèse d'α-hydrazinoesters et de *N*-aminodipeptides. L'étude de la réactivité de cette pseudoproline a permis de définir les meilleures conditions de formations de pseudotripeptides de formule P₁-AA₁-δ-azaPro-AA₃-P₃. Elle a également orienté les travaux, dans un second temps, vers la synthèse de pseudopeptides incorporant un motif acide pyrazolique. Enfin, la structure des composés préparés a été analysée par RMN, IR et par modélisation moléculaire. L'examen des P₁-AA₁-δ-azaPro(Boc)-AA₃-P₃ a révélé la formation par liaison hydrogène d'un pseudocycle en C₇, favorisant la conformation *trans* de la liaison AA₁-δ-azaPro, alors que l'absence de la fonction Boc favorise la conformation *cis* de cette liaison.

Mots-clés : proline, δ-azaproline, synthèse peptidique, acide pyrazolique, liaison hydrogène pseudocycle en C₇, conformation *trans*, conformation *cis*.

Synthesis of Bis-nitrogen Containing Proline Analogous and Applications

The peptidic bond in a peptide or a protein is usually flat and in *trans* conformation for the majority of amino acids. The situation is a little bit different upstream the proline: the thermodynamic barrier which opposes the rotation of the amide bond is weaker and the tendency of the bond to remain flat is lesser. So, this AA-Pro bond can adopt a *cis* conformation, leading to the formation of a turn in the peptidic chain. This work describes the synthesis and the chemical reactivity of new bis-nitrogen analogous of proline in solution to facilitate the *cis* conformation of a AA-ΨPro bond. The conformational impact that these residues may generate in pseudopeptides is also exposed.

Initially, a new access road to the orthogonally protected and enantiomerically pure δ-azaproline has been developed by exploiting previous work on the synthesis of α-hydrazinoesters and *N*-aminodipeptides. The study of the reactivity of this pseudoproline helped define the best conditions for forming pseudotripeptides of formula P₁-AA₁-δ-azaPro-AA₃-P₃. It also guided the work, in a second step, towards the synthesis of pseudopeptide incorporating a pyrazole acid motif. Finally, the structure of the prepared compounds was analyzed by NMR, IR and molecular modeling. Examination of the P₁-AA₁-δ-azaPro(Boc)-AA₃-P₃ revealed the formation of a pseudocycle C₇ by a Hydrogen bond, favoring the *trans* conformation of the AA₁-δ-azaPro bond, while the absence of Boc function seems to favor the *cis* conformation of this bond.

Keywords: proline, δ-azaproline, peptidic synthesis, pyrazolic acid, Hydrogen bond, C₇ pseudocycle, *trans* conformation, *cis* conformation.