



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 (ENSIC)
Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)
Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM) UMR 7375

Thèse

présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Génie des Procédés et des Produits

par

Lucie FLAUDER

***La δ -azaproline : impact conformationnel de son
incorporation dans des pseudopeptides***

Soutenue publiquement le 20 octobre 2014 devant la commission d'examen :

Membres du jury

Pr. T. BRIGAUD (SOSCO, Université de Cergy Pontoise) Rapporteur

Pr. S. ROUTIER (ICOA, Universités d'Orléans) Rapporteur

Pr. M. BAUDY-FLOC'H (DR-CNRS, ICMV Rennes) Examinatrice

Pr. B. JAMART-GREGOIRE (LCPM, UL Nancy) Directrice de thèse

Dr. A. ARRAULT (MCF, LCPM, UL Nancy) Co-directrice de thèse

A mes parents,

Remerciements

Ce présent travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, UMR 7375, de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy.

Je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Brigitte Jamart-Grégoire pour avoir dirigé ma thèse et m'avoir fait confiance au long de ces quatre années. J'ai beaucoup apprécié travailler à ses côtés et ses nombreux conseils qui ont été et seront très productifs. Je voudrais lui exprimer ma reconnaissance.

Je remercie aussi le Docteur Axelle Arrault pour avoir co-dirigé cette thèse et pour ses précieux conseils.

Je suis sensible à l'honneur que les Professeurs Sylvain Routier et Thierry Brigaud m'ont fait en acceptant de juger mon travail en tant que rapporteur.

Je suis également reconnaissante au Professeur Michèle Baudy-Floc'h d'avoir participé à mon jury de thèse.

Je remercie aussi:

Alain Durand pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Olivier Fabre pour la spectroscopie RMN, qui était parfois conceptuelle et pour sa bonne humeur.

Mathilde Achard pour la spectroscopie de masse, ses explications minutieuses et ses petites histoires qui donnent toujours le sourire.

Guillaume Pickaert pour ses précieux conseils sur l'analyse conformationnelle, son aide, sa pédagogie et ses encouragements.

Samir Acherar pour cette idée de génie la « SN2 » et pour sa gentillesse.

Régis Vanderesse pour ses anecdotes, ses stimulations craniennes qui devraient être brevetées et sa sagesse.

Jacques Bodiguel pour sa bonne humeur et toujours venir en aide quand on en a besoin.

Marie-Christine Averlant-Petit pour sa bonne humeur. Ton rire va me manquer.

Chrystel Beaufiles pour ses encouragements, sa gentillesse, ses bonnes adresses et d'avoir été mon infirmière de choc quand mon index a embrassé d'un peu trop près une pipette Pasteur.

Jérôme Babin et Carole Arnalt-Hérault pour votre bonne humeur, vos conseils, votre soutien et vos sourires : mes deux rayons de soleil.

Nathalie Brenon pour m'avoir aidé en plein rush pré-dépôt et pour sa gentillesse.

Jean-Lux Six pour ses encouragements et son humour.

Anne Jonquières pour ses discussions très enrichissantes.

Jean Claude Sivault parce que parler 5 minutes avec toi ça redonne le sourire et pour ce merveilleux cadeau de Saint Valentin tant désiré par toute femme chimiste : Le passeur de tube !

Je ne pourrais oublier de remercier les thésards et post-doctorants qui ont croisé mon chemin au sein du LCPM :

Emelyne Humbert-Voss pour ses conseils et sa gentillesse.

Ralph pour ce rire indescriptible, ses blagues et pour l'heaume de chevalier.

Zhou pour avoir été mon traducteur officiel de publi chinoises.

Maxime pour avoir été mon bras droit au bureau, mon bras gauche sous la hotte et mon miroir à la paillasse. Merci pour les « night laboratory », pour les sessions nutella et surtout merci d'avoir été là quand l'évier s'est enflammé ☺.

Miao et Xavier pour le concept du jambon beurre, et le fromage : Oui, le fromage c'est la vie !

Eugénie pour avoir été ma coloc de choc, pour ses petits plats qui me font encore saliver, pour les soirées / brunch en mode détente, pour le soutien et les bons conseils, la découverte du Cappucin, ta capuche en renard et surtout de m'avoir rendue addict à l'encre noire...

Khalid pour les soirées pockers et ses longs débats philosophiques.

Vincent et Isabelle pour leur bonne humeur et leur conseil.

Michou pour tes précieux conseils et encouragements, et parce que grâce à toi la poupée Chucky a retrouvé une deuxième vie.

Florent et Pasquale pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

Sébastien pour m'avoir aidé dans l'analyse de mes spectres IR et encore mille mercis pour tes gâteau à la noix de coco.

Mohammed I, Mohammed II, Faten, Poop and Amirah because working with you was really "meinaini".

Je tenais aussi à remercier les quatre stagiaires que j'ai pu encadrer au cours de cette thèse et dont j'estime les grandes qualités : Nicolas Vavon, Pierre Haye, Thibaut Schehl et Shanez Sahli.

Merci à Sophie, Chloé, Alice, Julie, Amélie, Béné et Audrey : vous êtes des amies en or. Merci à vos oreilles qui ont écouté de longs monologues existentiels sur la puissance du peptide et l'importance de la cristallisation.

Merci aux DJ Pampmousse & Capuche, Baby, Elliot, Turi, Mattou, Julien et Anthonu : c'est toujours euphorisant de vous voir !

Merci à mes compagnons de Bush : Kinder, Fiflo, Romain, Olive, Nico, Pilip, Tom B, Chaponey et Princesse Prigent.

Merci à Lilou pour les sessions running à la Pep, chocolat chaud et miaou miaou.

Merci à Damien, Clara, Imane, Alex, Serkan et Guillaume : même à distance, vous êtes toujours là !

Merci aux belles personnes que j'ai pu rencontrer à la SECO en particulier Coco, Nico, Sasha, Rémy, Fanny, Geogeo, Xavier et Amandine pour ce merveilleux trophée qui orne mon salon.

Merci à Nath, France, Eric, Leia, Sanja, Alex, Jona, Josh pour le gros coup de pep's pré-dépôt.

Merci à Dimitri d'avoir su m'écouter et d'avoir été là.

Merci à Codi d'avoir écouté mes débriefs after work pendant plus d'un an, et ce, avec beaucoup d'attention. Je suis sûre que tu comprenais tout ce que je racontais le civet.

Merci à mon chaton d'avoir participé à l'écriture de ces remerciements.

En dernier lieu, je tenais à remercier ma famille, en particulier mes parents et mon frère qui y ont toujours cru et ont toujours fait en sorte que tout se passe pour le mieux.

Merci à tous, et à ceux que j'aurais pu oublier.

Lucie,

Montargis, le 04 décembre 2014

Tables des Matières

Liste des abréviations	15
Introduction générale	19
Chapitre I : Synthèse et analyse conformationnelle de pseudotripeptides contenant la δ-azaproline	25
<i>I. Introduction</i>	27
I.1 Les coudes ou turns	28
I.1.1 Les coudes γ ou C7	28
I.1.2 Les coudes β ou C10	29
I.2 Aspects conformationnels de pseudo-peptides contenant une pseudoproline	30
I.2.1 Les alkyl-prolines	30
I.2.2 Les oxaprolines substituées	31
I.2.3 Influence d'un groupement aromatique	33
I.2.3.1 Interaction proline-aromatique	33
I.2.3.2 Interaction aromatique-proline	34
I.2.3.3 Interaction $n \rightarrow \pi^*$	34
I.2.4 Influence d'un atome d'azote supplémentaire en position α du cycle de la proline	35
I.2.5 Influence d'un atome d'azote supplémentaire en position δ du cycle de la proline	36
I.3 Choix des pseudotripeptides à synthétiser	37
I.A Synthèse de pseudotripeptides contenant le motif δ-azaPro	41
<i>I Introduction</i>	43
<i>II Synthèse de la δ-azaproline orthogonalement protégée</i>	44
<i>III Synthèse des pseudotripeptides</i>	46
III.1 Stratégie de synthèse	46
III.2 Synthèse des pseudotripeptides Z-AA₁-δazaPro(Boc)-AA₃-OMe	47
III.2.1 A partir de la δ -azaproline 1	47
III.2.2 A partir du <i>tert</i> -butyl carbazate et de l' α -hydroxy- γ -butyrolactone 11	50
III.2.2.1 Synthèse en 6 étapes du pseudotripeptides 5b	51
III.2.2.1.1 Synthèse des hydrazinolactones 12 et 13b	51

II.2.2.1.2 Synthèse du pseudodipeptide 9b par ouverture de la lactone 13b suivie d'une estérification et d'une réaction de Mitsunobu intramoléculaire	52
<i>Ouverture de la lactone 13b et estérification</i>	52
<i>Synthèse du pseudodipeptide 10b à partir du carboxylate 14b</i>	53
II.2.2.1.3 Déprotection de l'extrémité C-terminale et couplage peptidique	55
II.2.2.1.4 Conclusions	56
III.2.2.2 Synthèse en 6 étapes du pseudotriptide 5a	56
III.2.2.3 Synthèse en 4 étapes des pseudotriptides 5a et 5b	57
III.3 Synthèse des pseudotriptides Z-AA₁-δazaPro-AA₃-OMe et de l'analogue thiocarbonylé 7a	59
III.4 Synthèse de pseudotriptides de type P₁-δazaPro(Gly-P₂)-Gly-OP₃	59
III.5 Synthèse du pseudotriptide 20	61
IV Composés modèles utiles pour l'analyse conformationnelle	61
V Conclusions	63
I.B Analyse conformationnelle des pseudotriptides synthétisés	65
<i>I. Introduction</i>	67
I.1 Spectroscopie d'absorption Infrarouge (IR)	67
I.2 Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	68
I.2.1 La RMN à une dimension	68
I.2.1.1 Etude de la valeur des déplacements chimiques des protons NH	68
I.2.1.2 Effet de la concentration	68
I.2.1.3 Influence de l'ajout de DMSO	69
I.2.2 La RMN à deux dimensions	69
I.2.2.1 Spectre COSY	69
I.2.2.2 Spectre ROESY	69
I.3 Description de la méthodologie utilisée lors d'analyse conformationnelle	69
<i>II. Analyses conformationnelles des pseudotriptides de type P₂-δazaPro(Boc-Gly)-Gly-OMe</i>	70
II.1 Analyse par IR du pseudodipeptide 22 : détermination des bandes NH et CO amidique libres	70
II.1.1 Analyse par IR des fonctions NH du composé modèle 22	71
II.1.2 Analyse par IR des fonctions CO du composé modèle 22	71

II.2 Analyse conformationnelle du pseudotripeptide 5c	73
II.2.1 Analyse par IR du pseudotripeptide 5c	73
II.2.2 Etude de la valeur des déplacements chimiques de protons NH	79
II.2.3 Influence du DMSO- d_6	80
II.2.3 Conclusions	81
II.3 Analyse conformationnelle du pseudotripeptide 18	81
II.3.1 Analyse par IR du pseudotripeptide 18	81
II.3.2 Conclusions	84
II.4 Analyse conformationnelle du pseudotripeptide 6c	84
II.4.1 Analyse par IR des bandes NH et CO du pseudotripeptide 6c	84
II.4.2 Analyse par RMN : Influence de la concentration sur le pseudotripeptide 6c	86
II.4.3 Influence du DMSO- d_6	87
II.4.4 Conclusions	88
III. Analyses conformationnelles du peptide 27 et des pseudotripeptides de type	
<i>Z-Gly-δazaPro(P₂)-Gly-OMe</i>	88
III.1 Analyse conformationnelle du tripeptide 27	88
III.1.1 Analyse par IR des fonctions NH des composés 28 et 27	88
III.1.2 Analyse par IR des fonctions CO des composés 28 et 27	90
III.1.3 Etude des déplacements chimiques du tripeptide 27	92
III.1.4 Analyse par RMN : Influence de la concentration sur le tripeptide 27	92
III.1.5 Expérience ROESY : Analyses des couplages dipolaires du tripeptide 27 en solution (CDCl ₃ / 10 mM)	94
III.1.6 Influence du DMSO- d_6	95
III.1.7 Conclusions	95
III.2 Analyse conformationnelle du pseudotripeptide 6a	96
III.2.1 Etude des déplacements chimiques des protons NH du pseudotripeptide 6a	96
III.2.2 Influence du DMSO- d_6	96
III.2.3 Analyse par IR des fonctions NH du pseudotripeptide 6a	97
III.2.4 Analyse par RMN : Influence de la concentration sur le pseudotripeptide 6a dans le CDCl ₃	98
III.2.5 Analyse par IR des bandes CO du pseudotripeptide 6a	99
III.2.6 Expérience ROESY : Analyses des couplages dipolaires du pseudotripeptide 6a en solution (CDCl ₃ / 10 mM)	101
III.2.7 Conclusions	102
III.3 Analyse conformationnelle du pseudotripeptide 7a	102
III.3.1 Influence du DMSO- d_6	102

III.3.2 Etude du déplacement chimique des protons NH des composés 29 et 7a	103
III.3.3 Analyse par IR des fonctions NH du pseudotripeptide 7a	103
III.3.4 Analyse par RMN : Influence de la concentration sur le pseudotripeptide 7a dans le CDCl ₃	104
III.3.5 Analyse par IR des fonctions CO du pseudotripeptide 7a	105
III.3.6 Expérience ROESY : Analyses des couplages dipolaires du pseudotripeptide 7a (CDCl ₃ / 10 mM)	106
III.3.7 Conclusions	107
IV. Analyses conformationnelles des pseudotripeptides de type	
<i>Z-Ala-δazaPro(P₂)-Phe-OMe</i>	107
IV.1 Analyse par IR des fonctions NH et CO du pseudodipeptide 9b	108
IV.2 Analyse conformationnelle du pseudotripeptide 5b	109
IV.2.1 Analyse par IR des fonctions NH du pseudotripeptide 5b	109
IV.2.2 Etude des déplacements chimiques des protons NH du pseudotripeptide 5b	109
IV.2.3 Analyse par RMN : Influence de la concentration sur le pseudotripeptide 5b dans le CDCl ₃	110
IV.2.3 Influence du DMSO- <i>d</i> ₆	110
IV.2.4 Analyse par IR des fonctions CO du pseudotripeptide 5b	111
IV.2.5 Expérience ROESY : Analyses de couplages dipolaires du pseudotripeptide 5b en solution (CDCl ₃ / 10 mM)	113
IV.2.6 Conclusions	114
IV.3 Analyse conformationnelle du pseudotripeptide 6b	115
IV.3.1 Etude des déplacements chimiques des protons NH du pseudotripeptide 6b	115
IV.3.2 Influence du DMSO- <i>d</i> ₆	115
IV.3.2 Analyse par IR des fonctions NH du pseudotripeptide 6b	116
IV.3.3 Analyse par RMN : Influence de la concentration sur le pseudotripeptide 6b dans le CDCl ₃	117
IV.3.4 Analyse par IR des bandes CO du pseudotripeptide 6b	118
IV.3.5 Conclusions	120
V. Conclusions	121
Chapitre II : Incorporation de la δ-azaproline dans des pseudopeptides en	
vue d'applications biologiques	123
I Introduction	125
II Synthèse par fragment (C-terminale vers N-terminale) des composés 45' et 46	127
II.1 Rétrosynthèse des synthons 45' et 46	127
II.2 Synthèse du fragment 36	129
II.2.1 Synthèse du monobenzyl succinate	130

II.2.1.1 A partir du composé commercial : monométhyl succinate	130
II.2.1.2 A partir de l'anhydride succinique	131
II.2.2 Synthèse du dipeptide H-Ala-Ala-OP ₁	131
II.2.2.1 Choix du groupement protecteur P ₁ du dipeptide H-Ala-Ala-OP ₁	131
II.2.2.2 Couplage peptidique des résidus Z-Ala-OH et HCl.H-Ala-O ^t Bu et déprotection de l'extrémité N-terminale	132
II.2.3 Couplage entre le monobenzyl succinate et H-Ala-Ala-O ^t Bu / Déprotection C-terminale	132
II.2.4 Conclusions	133
II.3 Synthèse du fragment 2	134
II.4 Synthèse du fragment 42	134
II.5 Synthèse du fragment 44	136
II.5.1 Couplage entre les fragments 2 et 42	136
II.5.2 Déprotection du groupement protecteur Z du pseudotripeptide 43	137
II.5.2.1 Méthodes classiques	138
II.5.2.1.1 Avec les dérivés palladiés	138
II.5.2.1.2 En milieu acide	139
II.5.2.2 Alternatives : changement de groupes protecteurs	140
II.5.2.2.1 Transprotection du groupement Boc en Fmoc	140
II.5.2.2 Transprotection/déprotection <i>via</i> le groupement Teoc	142
II.5.2.2.3 En milieu basique	144
II.5.2.3.1 Par utilisation du réactif de Lawesson et de la base K ₃ PO ₄	144
II.5.2.3.2 A partir de bases classiques	145
II.5.3 Changement de groupements protecteurs de la δ-azaproline 1	148
II.5.3.1 Transprotection du groupement Z en P ₁	148
II.5.3.2 Transestérification iPr en P ₂ et transprotection du Z en Fmoc	151
II.5.4 Conclusions	153
III Synthèse par fragment (N-terminale vers C-terminale)	155
III.1 Rétrosynthèse du synthon 46 (N-terminale vers C-terminale)	155
III.2 Synthèse de Bzl-Suc-Ala-Ala-δazaPro(Boc)-OiPr 78	156
III.2.1 Synthèse de Bzl-Suc-Ala-Ala-δazaPro(Boc)-OiPr par fragment	156
III.2.2 Synthèse de Bzl-Suc-Ala-Ala-δazaPro(Boc)-OiPr pas à pas	157
III.2.2.1 Couplage entre la δ-azaproline 64 et Z-Ala-Ala-OH	157
III.2.2.2 Couplage entre la δ-azaproline 47 et Z-AA-OH	158
III.3 Conclusions et perspectives	160

<i>IV Synthèse du synthon 46 avec introduction du résidu Z-Ala-OH avant la réaction de Mitsunobu intramoléculaire</i>	160
V Synthèse du synthon 46 avec introduction du fragment ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH 82 avant la réaction de Mitsunobu intramoléculaire	162
V.1 Synthèse de l'hydrazinolactone 82	163
V.1.1 Synthèse pas à pas de l'hydrazinolactone 82	163
V.1.2 Synthèse par fragment de l'hydrazinolactone 82	164
V.2 Conclusions	166
<i>VI. Conclusions</i>	166
Conclusions générales et perspectives	171
Experimental part	177
Références bibliographiques	235

Liste des abréviations

δ-azaPro	δ-azaproline
1D	une dimension
2D	deux dimensions
3D	trois dimensions
Å	Angström
AA	acide aminé
Ac	Acétate
Ala	résidu alanine
aq.	Aqueux
Asn	résidu asparagine
Asp	résidu acide aspartique
Bn/Bzl	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
Cm	Centimètres
COSY	COrelated SpectroscopY
DBAD	di- <i>tert</i> -butylazodicarboxylate
DBzAD	Dibenzylazodicarboxylate
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DEAD	Diéthylazodicarboxylate
deg.	Degrés
DIEA	<i>N</i> - <i>N</i> '-diisopropyléthylamine
DMAP	4,4-diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDC	1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide
eq.	Equivalents
ESI	ElectroSpray Ionization
Et	Ethyle
EtOAc	acétate d'éthyle
FKBP	FK506-binding proteins
Fm	Formyle
Fmoc	9-fluorénylméthyloxycarbonyl

Fmoc-Cl	chloroformiate de fluorénylméthoxy-carbonyle
Fmoc-OSu	9-Fluorenylmethyl <i>N</i> -succinimidyl carbonate
Fs	Femtosecondes
G	Grammes
HAUT	fluorophosphate de O-(1H-azatriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetra-methyluronium
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
iPr	Isopropyle
IR	Infrarouge
K	Kelvin
Kcal	Kilocalories
Leu	résidu leucine
LR	réactif de Lawesson
Me	Méthyle
Met	Résidu méthionine
MHz	mégaHertz
mL	Millilitres
mM	Millimolaires
Mp	melting point
Ms	Millisecondes
MW	micro-waves
Γ	nombre d'onde
NaEH	2-éthylhexanoate de sodium
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PE	éther de pétrole
Ph	Phényle
Phe	résidu phénylalanine
Pht	Phtalimide
Piv	Pivaloyle
PPIases	Peptidyl Proline Isomérases
Ppm	parties par million
Preoc	Prenyloxycarbonyl
Pro	résidu proline
Ps	Picosecondes
PyBOP	hexafluorophosphate de benzotriazolyl-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium
Pyr	Pyrazole
Rf	rapport frontal
RMN ou NMR	Résonnance Magnétique Nucléaire

ROESY	Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
S	Secondes
Ser	résidu sérine
Suc	Succinyle
TA	température ambiante
TBAF	fluorure de tétrabutylammonium
TBTU	tetrafluoroborate de O-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N,N'-tetramethyluronium
^tBu	<i>tert</i> -butyle
TEA	Triéthylamine
Teoc	2-triméthylsilyléthoxycarbonyle
Teoc-Cl	chloroformiate de triméthylsilyléthoxycarbonyle
Tf₂O	anhydride trifluorométhanesulfonique
TFA	acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
Thr	résidu thréonine
Tmf	Trifluorométhyle
TMS	Tétraméthylsilane
TOCSY	TOTally Correlated Spectroscopy
UV	Ultraviolet
Val	résidu valine
Z	Benzyloxycarbonyle
Z₂O	dicarbonate de dibenzyle
Z-Cl	chloroformiate de benzyloxycarbonyle

Introduction générale

La proline est un acide aminé particulier, qui du fait de sa structure cyclique, induit certaines contraintes au sein des peptides qui l'héberge. En effet, dans le cas d'un lien peptidique formé à partir d'acides aminés autres que la proline, la conformation *trans* est nettement favorisée au détriment de l'isomère *cis* pour lequel l'encombrement stérique généré par les chaînes latérales R_1 et R_2 déstabilise fortement cette conformation (Schéma 1).¹ Dans le cas d'une liaison X-Pro (où X est un acide aminé) à l'équilibre, la proportion d'isomère *cis* est plus importante que dans le cas précédent bien que l'isomère *trans* reste majoritaire.

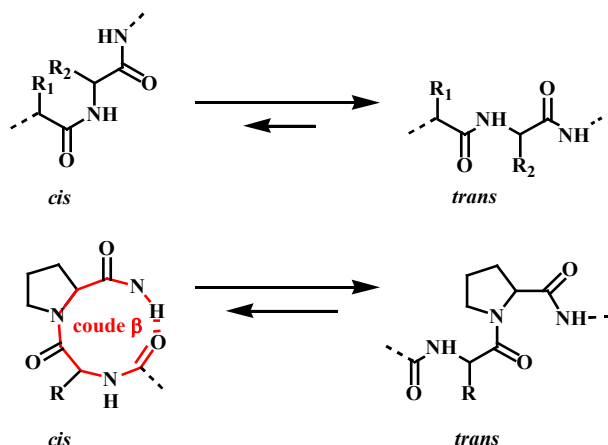


Schéma 1 – Isomérisation *cis/trans* d'un lien AA_1-AA_2 et X-Pro

La présence du cycle pyrrolidine produit une distorsion qui crée un coude dans la chaîne peptidique. Une chaîne peptidique, contenant un résidu proline, en cours d'assemblage aura donc de grandes chances de se placer en conformation *cis* et de bloquer la mise en plis définitive de la protéine. En effet, la configuration *cis* ou *trans* de la liaison X-Pro a une grande influence sur la structure du peptide qui l'héberge. Afin d'obtenir la conformation *trans* du lien X-Pro, une isomérisation de la liaison peptidique est nécessaire. Cependant la présence de la proline dans des chaînes peptidiques rend difficile la gestion de l'isomérisation *cis/trans* de la liaison amide car l'isomérisation spontanée est un phénomène relativement lent.²

Des enzymes appelées PPIases (peptidyl prolyl isomérase) sont capables d'isomériser la forme *cis* vers la forme *trans*. Trois principales familles de PPIases ont pu être répertoriées : les cyclophilines, les FK506-binding proteins (FKBP)^{3,4,5} et les parvulines.⁶ Certaines de ces enzymes sont utilisées dans la prévention des rejets de greffes et dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.^{7,8,9} Par exemple, les cyclophilines qui présentent une affinité pour la cyclosporine A (un polypeptide cyclique), sont capables de former un complexe capable 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.¹⁰ Cette action immunosuppressive a pu être utilisée dans la prévention des rejets de greffes mais ce traitement induit de lourdes complications ainsi que des interactions médicamenteuses. Au-delà de la toxicité élevée des immunosuppresseurs utilisés dans le traitement de ces maladies, leur mécanisme d'action reste encore mal connu et ont dirigé les recherches vers de nouveaux inhibiteurs des PPIases.

L'activité de telles enzymes a été mise en évidence pour la première fois par l'équipe de Fischer.¹¹ Elle a mis au point une méthode (Schéma 2) permettant de mesurer efficacement l'activité enzymatique des PPIases

qui repose sur la forte sélectivité conformationnelle de la chymotrypsine vis-à-vis de substrats de type Suc-Ala-X-Pro-Phe-*p*-NA (où X est un acide aminé).

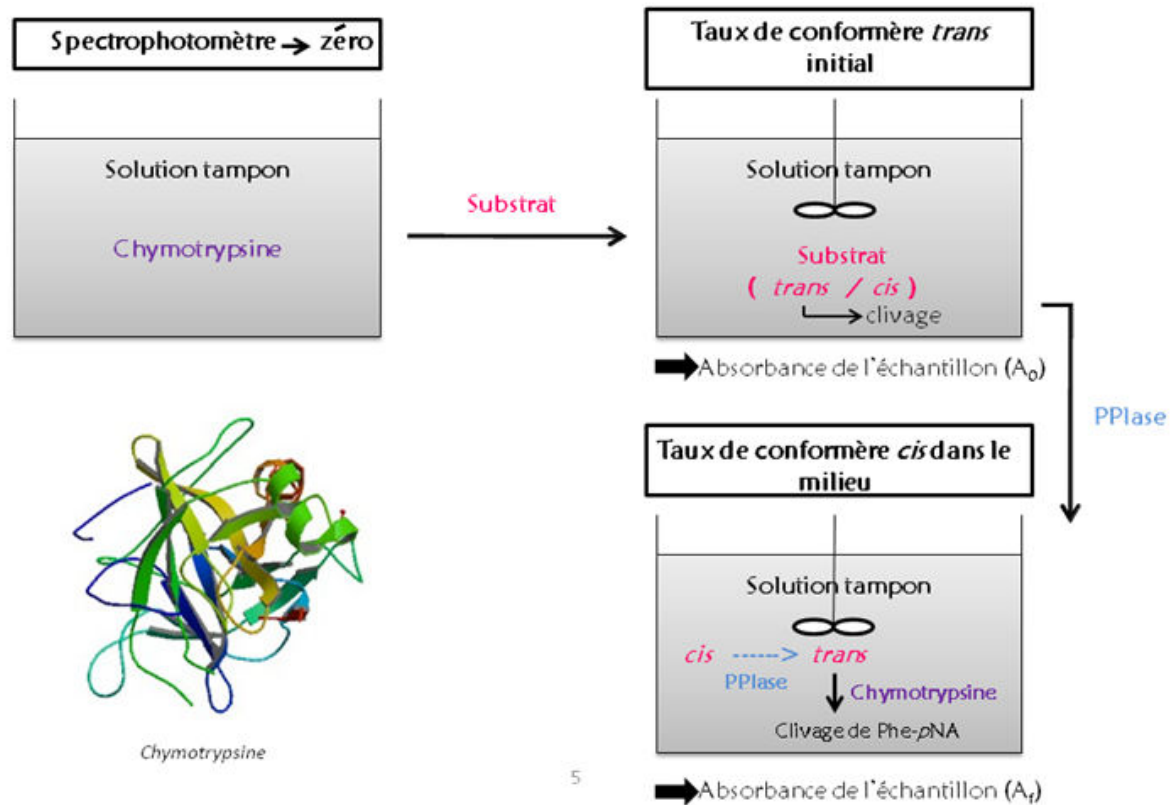


Schéma 2 – Principe de mesure de l'activité des PPIases

La mesure est réalisée comme suit :^{12,13}

- Une première mesure de l'absorbance d'un échantillon ne contenant que la chymotrypsine dans une solution tampon est réalisée de manière à obtenir une référence du milieu.
- Le substrat est alors introduit dans le milieu : l'isomère de conformation *trans* est alors hydrolysé par la chymotrypsine pendant le temps de mélange. L'absorbance du mélange est alors mesurée : cette donnée correspond à la quantité de substrat sous forme *trans* dans le mélange initial.
- Les PPIases sont ensuite ajoutées de manière à favoriser l'isomérisation de la forme *cis* vers la forme *trans* : l'absorbance est mesurée au cours du temps de manière à déterminer le mécanisme de catalyse des PPIases. Le taux de conformation *cis* est alors déterminé par différence de l'absorbance mesurée avec l'absorbance déterminée dans le mélange initial.

Bien que cette méthode soit assez simple à mettre en œuvre, la mesure de l'activité enzymatique des PPIases est limitée par le fait que seulement 10% du substrat soit en conformation *cis*. La recherche d'analogues de synthèse à Suc-Ala-X-Pro-Phe-*p*-NA présentant un taux *cis* du lien X-Pro plus important paraissait un challenge intéressant à relever et plusieurs groupes de recherche se sont penchés sur ce problème.^{14,15}

Depuis plusieurs années, le Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM, UMR UL 7375) a dirigé ses recherches sur de nouvelles méthodes de synthèse de composés bis-azotés (Figure 1) comme les hydrazinopeptides,^{16,17,18} les *N*-aminopeptides^{19,20,21,22} ou les azapeptides^{23,24,25} et de leur incorporation dans des pseudopeptides linéaires ou cycliques en vue d'analyses conformationnelles.

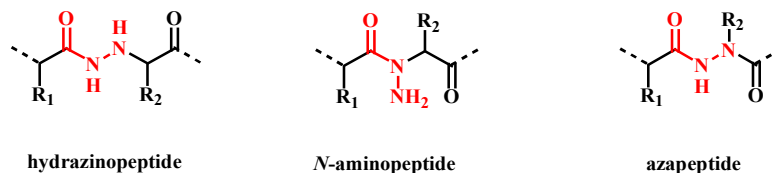


Figure 1 – Structure des hydrazinopeptides, *N*-aminopeptides et azapeptides

Ces différents motifs ont déjà pu être intégrés dans des oligomères linéaires ou cycliques afin d'étudier la conformation des pseudopeptides synthétisés. Plus particulièrement dans la série des azapeptides, la synthèse de la δ -azaproline a pu être réalisée. L'étude structurale de pseudotripeptides intégrant un lien X- ψ Pro a permis de mettre en évidence une conformation *cis* privilégiée de ce lien notamment au sein du composé Z-Gly- δ azaPro-Gly-NH₂ (Figure 2), et ce, grâce à la formation d'une liaison hydrogène renfermant un pseudocycle en C₁₀.

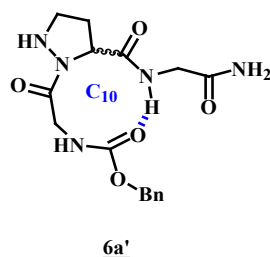


Figure 2 – Conformation du pseudotripeptide Z-Gly- δ azaPro-Gly-NH₂ 6a'

En prenant en compte ce résultat, il nous a semblé intéressant d'étudier l'impact conformationnel du remplacement de la proline par une δ -azaproline dans le substrat Suc-Ala-X-Pro-Phe-*p*-NA. (Figure 3).

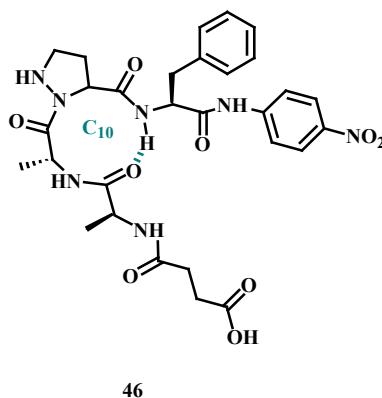


Figure 3 – Conformation possible du substrat 46

Ce manuscrit s'articulera en deux chapitres. Dans une première partie, nous avons poursuivi l'étude de la réactivité de la δ -azaproline. La comparaison de la réactivité des deux atomes d'azote a été abordée ainsi que l'étude conformationnelle de tripeptides de type X_1 -azaPro- X_3 (Figure 4). Ces travaux d'analyse nous ont permis d'identifier les éléments structuraux favorisant la conformation *cis* en comparant les différents résultats obtenus. Dans une deuxième partie nous décrirons la synthèse d'un analogue de substrat de PPIases dont la structure est basée sur les résultats obtenus dans le Chapitre I.

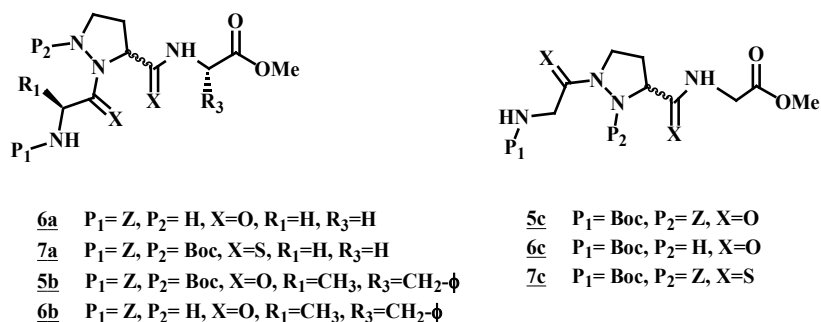


Figure 4 – Pseudotripeptides synthétisés

Chapitre I : Synthèse et analyse conformationnelle de pseudotripeptides contenant la δ -azaproline

I. Introduction

L'arrangement spatial des atomes constituant les peptides est décrite à l'aide de trois angles de torsion autour des liaisons $\text{NH}-\text{C}^\alpha$, $\text{C}^\alpha-\text{CO}$ et $\text{CO}-\text{NH}$, respectivement notés ψ , ϕ et ω (Figure 5). La convention de ces angles est telle qu'ils sont considérés comme positifs lorsque l'observateur, situé du côté *N-term*, voit la partie *C-term* tourner dans le sens des aiguilles d'une montre. Un angle de valeur nulle est attribué à la disposition éclipsée des atomes du squelette peptidique.

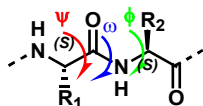


Figure 5 -Représentation des angles dièdres caractérisant la structure du squelette peptidique

La liaison amide possède ses six atomes C^α , O, C, N, H et C^α dans un même plan de part son caractère de liaison partiellement double. La valeur de l'angle ω peut être proche de 0° ou 180° selon que la liaison peptidique soit respectivement *cis* ou *trans*. Seuls les angles ϕ et ψ peuvent varier et jouer sur la conformation des liaisons de la chaîne principale. Cependant, toutes les valeurs d'angles des couples (ϕ , ψ) ne sont pas permises à cause des contraintes stériques ou de la formation de liaisons hydrogène qui limite les degrés de liberté de la chaîne peptidique. Le diagramme de Ramachandran²⁶ permet de connaître les zones énergiquement favorables (Figure 6).

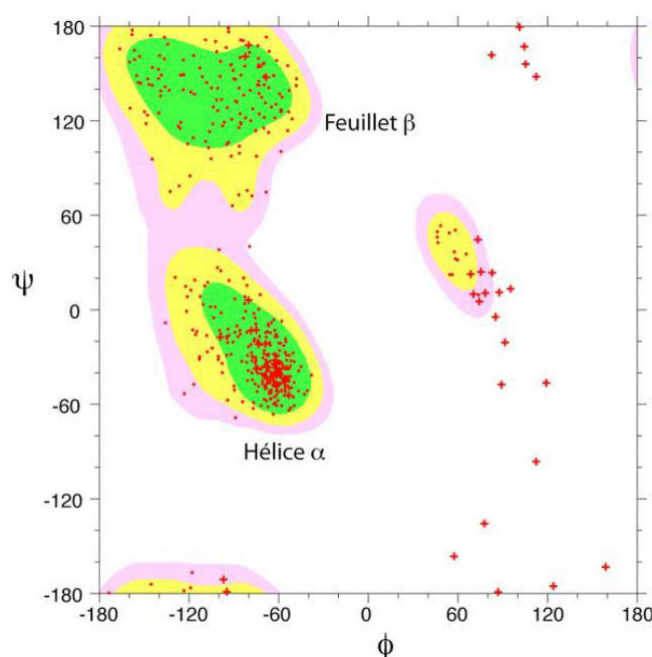


Figure 6 - Diagramme de Ramachandran indiquant les valeurs des angles (ϕ , ψ) possibles dans les protéines

Dans un peptide, une liaison hydrogène peut se former entre un site donneur de proton NH du résidu *i* et un site accepteur de proton CO d'un résidu *i+x*. La force de cette interaction (notée $i \rightarrow i+x$) est étroitement liée à la distance $\text{N} \cdots \text{O}$ qui sépare le site donneur du site accepteur. La distance optimale $\text{N} \cdots \text{O}$ est comprise entre 2.8 et 3.1 Å et les trois atomes $\text{N}-\text{H} \cdots \text{O}$ doivent être colinéaires (l'angle $(\text{N}-\text{H} \cdots \text{O})$ a une valeur comprise entre -20°

et $+20^\circ$). Cette liaison hydrogène crée un pseudocycle en C_n , où n correspond au nombre d'atomes au sein de ce dernier. Cette auto-structuration caractérise les différents types de structures secondaires dont les principales sont représentées dans la Figure 7.

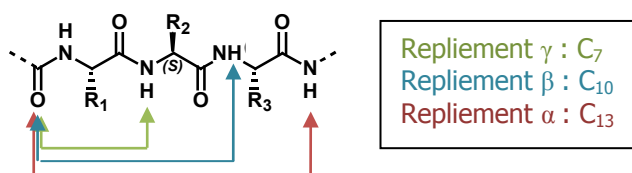


Figure 7 -Différents pseudocycles rencontrés dans les peptides

Les méthodes d'analyse conformationnelle comme la résonance magnétique nucléaire et la spectroscopie infrarouge ont déjà permis de mettre en évidence différentes interactions intramoléculaires au sein des peptides. Quelques exemples d'éléments structuraux rencontrés dans les peptides ou pseudopeptides sont présentés dans la suite de ce paragraphe.

I.1 Les coudes ou turns

Le repliement particulier d'un peptide est régi par la présence de coudes (ou turn) qui sont des éléments de structure secondaire. Ces turns sont caractérisés par le nombre d'atomes qui composent le pseudocycle.

I.1.1 Les coudes γ ou C_7

Les coudes γ renferment un pseudocycle à sept atomes, stabilisé par une liaison hydrogène de type $i+2 \rightarrow i$.^{27,28} Il existe deux types de repliement γ :

- le γ -turn inverse (le plus rencontré dans les protéines) où la chaîne latérale du résidu $i+1$ est en position équatoriale par rapport au plan moyen du pseudocycle,²⁹
- le γ -turn classique où la chaîne latérale du résidu $i+1$ est en position axiale par rapport au plan moyen du pseudocycle (Figure 8).

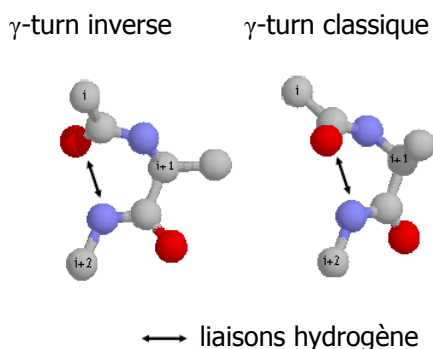


Figure 8 - Représentation des γ -turns

II.1.2 Les coudes β ou C_{10}

Un coude β caractérise une liaison hydrogène qui renferme un pseudocycle à 10 atomes de type $i+3 \rightarrow i$ dont la distance entre les C^α des résidus i et $i+3$ reste inférieure à 7 Å. Ce type de repliement permet d'inverser le sens de propagation d'une chaîne peptidique et se révèle être un élément architectural primordial dans les structures tridimensionnelles des protéines. Plusieurs études théoriques et expérimentales ont démontré que ce type d'auto-structuration est stable dans la chaîne peptidique. Plusieurs familles ont été identifiées à partir de structures cristallines des protéines³⁰ dont les caractéristiques des sous-types sont rassemblées dans le Tableau 1.

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

Tableau 1 – Angles dièdres moyens dans les coudes β

Les β -turns de type I et II sont le plus souvent rencontrés pour la plupart des acides aminés (Figure 9).

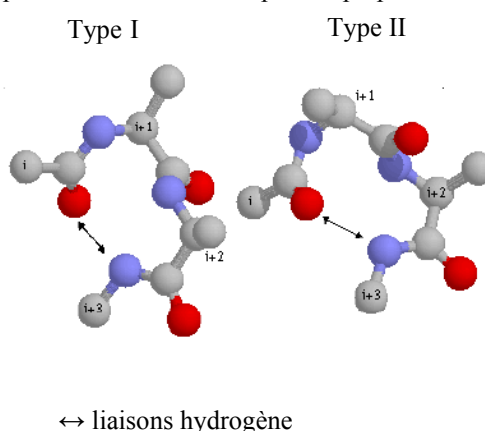


Figure 9 - Structure des β -turns de type I et II

Les coudes β de type VI ne sont possibles que lorsque le résidu $i+2$ possède un lien peptidique en conformation *cis* ($\omega = 0^\circ$). Ce sous-type de coude β est essentiellement présent lorsque le résidu $i+2$ 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 10).³¹

-Pour le type VIa, l'angle dièdre ψ de la proline vaut environ 0° et une liaison hydrogène entre le CO du résidu i et le groupement NH du résidu $i+3$ se forme,

- Dans le type VIb, l'angle dièdre ψ de la proline est proche de 160° et aucune liaison hydrogène intramoléculaire n'est observée.

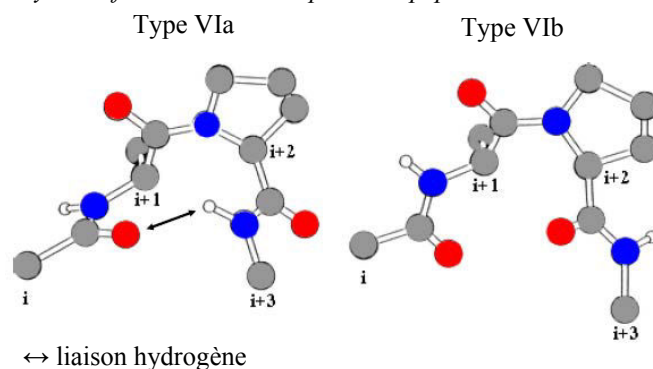


Figure 10 – Structure des β -turns de type VIa et VIb

I.2 Aspects conformationnels de pseudopeptides contenant une pseudoproline

De nombreuses recherches ont été consacrées à la synthèse et l'étude structurale de pseudopeptides contenant une proline modifiée favorisant la conformation *cis* du lien X- ψ Pro (où X est un acide aminé). Ces différents résultats sont présents dans la suite de ce paragraphe.

I.2.1 Les alkyl-prolines

L'équipe de Lubell a étudié l'impact conformationnel lié au remplacement d'un résidu proline par la 5-méthylproline et la 5-*tert*-butylproline dans des composés de type *N*-Ac- Ψ Pro-*N*'-méthylamide (Figure 11).³² Elle s'est plus particulièrement intéressée à la détermination par RMN du ratio *cis/trans* du lien Ac- Ψ Pro de composés diversement alkylés.

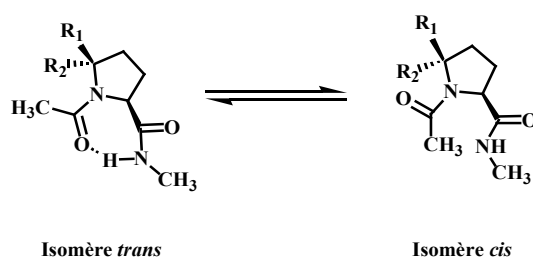


Figure 11 –Equilibre *cis* / *trans* des composés de type Ac- ψ Pro-NHMe

Les résultats de cette étude sont regroupés dans le Tableau 2

R ₁	R ₂	Isomère <i>cis</i> (%)
H	H	27
Me	H	25
^t Bu	H	49
H	Me	30
H	^t Bu	66

Tableau 2 – Ratio *cis/trans* de la liaison amide de composés *N*-acetyl-Proline-*N*'-acétylamide diversement substitués mesuré par RMN ¹H (D₂O, 25°C).

On remarque que quelque soit la stéréochimie du carbone en position δ , l'incorporation d'une 5-méthylproline ne permet pas d'augmenter le taux de conformation *cis* du lien amide : la population d'isomère *cis* est comprise entre 25 et 30% contre 27% dans le cas de la proline. Bien que les populations d'isomères *cis* et *trans* soient équi-réparties dans le cas du dérivé (2S,5R)-5-*tert*-butylproline, la conformation *cis* est majoritaire pour le composé (2S,5S)-5-*tert*-butylproline-*N'*-métylamide avec un ratio de 66%. Ces travaux démontrent l'influence de l'encombrement stérique en position δ qui favorise la population d'isomère *cis*. Ceci a pu être confirmé par l'étude conformationnelle des pseudodipeptides de type Ac-X-5-^tBuPro-NHMe (Figure 12).³³

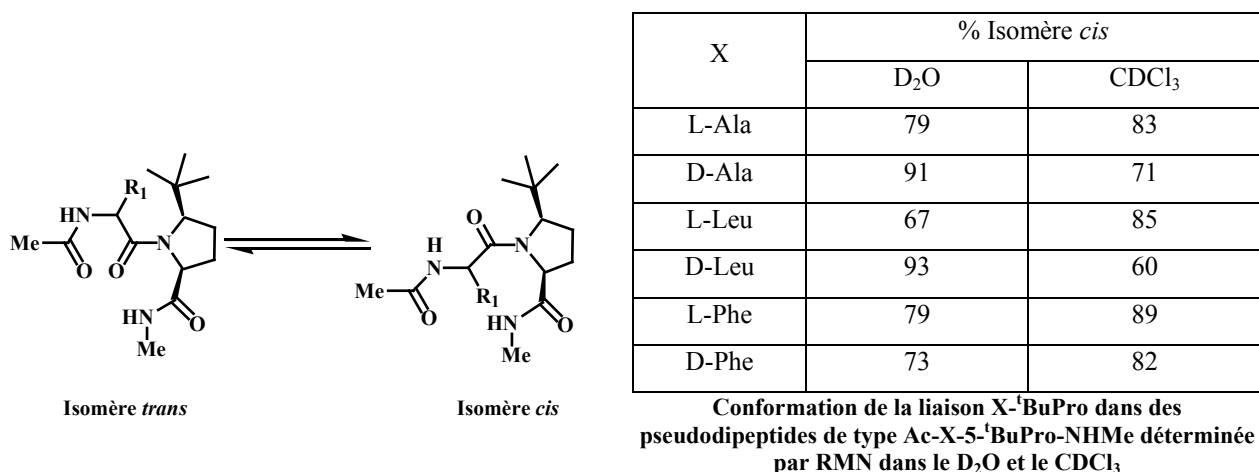


Figure 12 – Isomérisation *cis* / *trans* de la liaison X-^tBuPro dans des pseudodipeptides de type Ac-X-5-^tBuPro-NHMe

Comme le montre les résultats de la Figure 12, le taux d'isomère *cis* augmente avec l'encombrement stérique généré par la chaîne latérale du résidu X. De plus, il apparaît qu'un acide aminé de la série L favorise également la conformation *cis* par rapport à un résidu de la série D. En fait, la gêne stérique engendrée entre la chaîne latérale du résidu X de série L et le groupement *tert*-butyl greffé en position δ de la proline aurait tendance à défavoriser la conformation *trans* du lien X- ψ Pro au profit de la conformation *cis*.

De plus, il est à noter que le comportement de tel pseudopeptide dans le D₂O est similaire à celui-ci dans le CDCl₃. Les conclusions obtenues lors de l'analyse conformationnelle de tel composé dans le CDCl₃ peuvent être transposées au cas du D₂O. Les analyses conformationnelles menées dans la Partie B de ce chapitre seront donc menées dans le CDCl₃.

1.2.2 Les oxaprolines substituées

Les oxaprolines sont des acides (4S)-oxazolidine-4-carboxyliques dérivés de la sérine ou de la thréonine. L'équipe de T. Brigaud a étudié des oxaprolines substituées par des groupements trifluorométhyle en position δ (Tfm-pseudoproline).

Une première étude avait été menée sur des dérivés de type Ac-Ser(ψ^{R_1,R_2} Pro)-NHMe (où R₁, R₂= H ou CF₃) comme décrit sur la Figure 13.³⁴

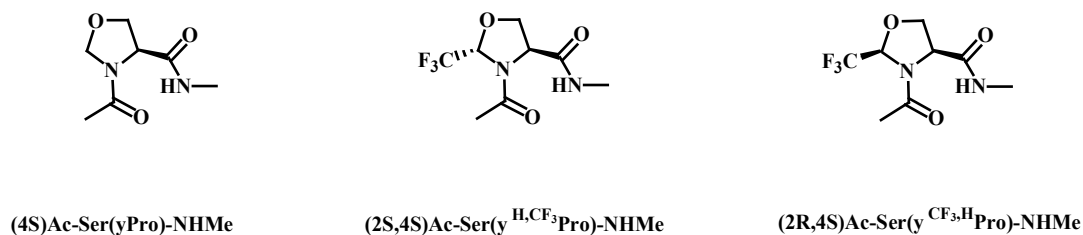


Figure 13 – Composés Ac-Ser(ψ^{R₁,R₂}Pro)-NHMe (R₁, R₂= H ou CF₃)

Le taux de conformation *cis* de ces composés avait pu être déterminé dans des solvants comme le CDCl₃ ou le DMSO-*d*₆ (Tableau 3).

Composé	% Isomère <i>cis</i>	
	CDCl ₃	DMSO- <i>d</i> ₆
Ac-Ser(ψPro)-NHMe	27	46
(2S,4S)Ac-Ser(ψ ^{H,CF₃} Pro)-NHMe	40	66
(2R,4S)Ac-Ser(ψ ^{CF₃,H} Pro)-NHMe	24	55

Tableau 3 – Conformation de la liaison Ac-Ser(ψPro) dans des composés de type Ac-Ser(ψ^{R₁,R₂}Pro)-NHMe (R₁, R₂= H ou CF₃)

Il découle de cette étude que l'introduction d'un substituant (2R)-CF₃ en position δ n'a aucune influence sur la conformation du lien Ac-Ser(ψPro) dans le CDCl₃. Cependant, la conformation désirée est largement dominante dans le DMSO-*d*₆ et ce indépendamment de la stéréochimie du substituant. L'examen par RMN ¹H de la présence d'une liaison hydrogène entre le NH amidique et le carbonyle du groupement acétyle a permis de mettre en avant qu'aucune liaison ne se formait dans le cas du (2S)-CF₃-oxapeptide, contrairement aux composés (2R,4S)Ac-Ser(ψ^{H,CF₃}Pro)-NHMe et Ac-Ser(ψPro)-NHMe pour lesquels une liaison hydrogène intramoléculaire assez faible qui renferme un pseudocycle en C₇ stabilise la conformation *trans*.

L'équipe de T. Brigaud s'est aussi intéressée à l'incorporation du motif (2R,4S)Ac-Ser(ψ^{CF₃,H}Pro)-NHMe au sein de composés de type P₁-Ala-Ser(ψ^{CF₃,H}Pro)-P₂³⁵ comme décrit dans la Figure 14.

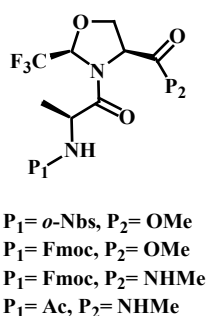


Figure 14 – Pseudopeptides incorporant une Tfm-pseudoproline

L'incorporation d'un tel motif au sein de pseudodipeptides a permis de mettre en évidence l'influence d'un groupement encombré et fortement électroattracteur sur la conformation du lien Ala-ψPro (Tableau 4).

composé	Solvant	% isomère <i>cis</i>
P ₁ = <i>o</i> -Nbs, P ₂ = OMe	CDCl ₃	45
P ₁ = Fmoc, P ₂ = OMe	CDCl ₃	12
P ₁ = Fmoc, P ₂ = NHMe	CDCl ₃	58
P ₁ = Ac, P ₂ = NHMe	CDCl ₃	70
P ₁ = Ac, P ₂ = NHMe	DMSO- <i>d</i> ₆	66
P ₁ = Ac, P ₂ = NHMe	H ₂ O :D ₂ O (90 :10)	58

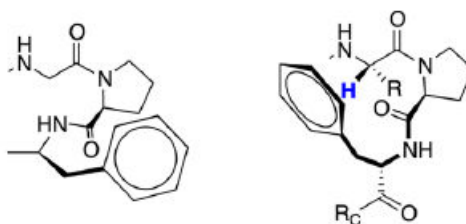
Tableau 4 – Taux de conformation *cis* de pseudodipeptide de type P₁-Ala-Ser($\psi^{CF_3,H}$ Pro)-P₂ (274K)

Le changement du groupement *o*-Nbs en un groupement plus encombré comme le Fmoc déstabilise la conformation *cis* du lien Ala- ψ Pro. Cet équilibre est rétabli avec l'introduction d'un groupement méthylamide sur l'extrémité C-terminale du pseudodipeptide. Le meilleur taux de conformation *cis* est obtenu avec l'introduction d'un acétate sur l'extrémité N-terminale du composé à étudier. Il est possible de noter l'importante influence du solvant utilisé en ce qui concerne le composé Ac-Ala-Ser($\psi^{CF_3,H}$ Pro)-NHMe car la conformation désirée est largement privilégiée dans le chloroforme deutéré. Contrairement à ce qui avait pu être observé lors de l'analyse conformationnelle du composé (2*R*,4*S*)(Ac-Ser($\psi^{CF_3,H}$ Pro)-NHMe, l'incorporation d'un motif (2*R*)-CF₃-oxapeptide au sein d'un pseudodipeptide de type Ac-Ala- ψ Pro-NHMe favorise la conformation *cis*.

I.2.3 Influence d'un groupement aromatique

I.2.3.1 Interaction proline-aromatique

Les protéines qui contiennent des noyaux aromatiques sur les chaînes latérales possèdent une charge partielle négative sur la face π tandis que le cycle de la proline aura tendance à être chargé positivement de façon partielle. Un lien Pro-X_{arom}, où X_{arom} est un acide aminé avec une chaîne latérale comprenant un aromatique, a une grande probabilité d'adopter la conformation *cis* car ce noyau riche en électrons interagit avec le cycle de la proline (Figure 15).³⁶

Figure 15 – Interactions proline-aromatique (à gauche) et H ^{α} (i-2)-aromatique (à droite)

De plus, le noyau aromatique est capable d'interagir avec le proton en α du résidu (i-2) favorisant ainsi la conformation *cis* du lien X-Pro. Il a été déterminé que le taux de conformation *cis* du lien X-Pro est optimal dans le cas où l'acide aminé greffé en amont de la proline est une glycine, créant ainsi une interaction avec le noyau aromatique de la phénylalanine.

I.2.3.2 Interaction aromatique-proline

La conformation *cis* du lien X_{arom} -Pro (où X_{arom} est un résidu aminé dont la chaîne latérale contient un motif aromatique para substitué par un groupement X) est favorisée de part la possibilité de « stacking » entre le motif aromatique du résidu X_{arom} et le cycle de la proline (Figure 16).

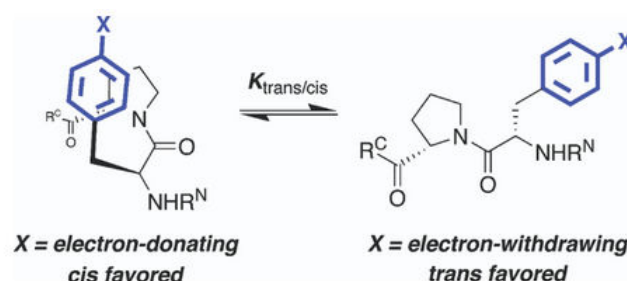


Figure 16 – Equilibre *cis* / *trans* de pseudopeptides contenant un lien $\psi\text{Phe-Pro}$ ($R^c = \text{Asn-NH}_2$, $R^N = \text{Ac-Thr-}$)

Dans le cas où cet aromatique serait para-substitué par un groupement électro-donneur, la conformation *cis* du lien X_{arom} -Pro serait favorisée. A l'inverse, des aromatiques déficients en électrons favoriseront la conformation *trans*. Différentes mesures de constante d'équilibre $K_{\text{trans/cis}}$ ont été réalisées avec différents groupements donneurs et attracteurs d'électrons sur des composés de type Ac-Thr- $\psi\text{Phe-Pro-Asn}$ ³⁷ et sont regroupées dans le Tableau 5.

X	$K_{\text{trans/cis}}$
4-NO ₂ -	5.5
4-CF ₃ -	4.7
4- ⁺ NH ₃ -	4.4
F ₅ -	4.4
4-I-	4.1
4-NH ₂ -	2.1
4-O ⁻ -	1.7

Tableau 5 - Ratios *trans*/ *cis* de composé de type Ac-Thr- $\psi\text{Phe-Pro-Asn}$ (H₂O + 5mM phosphate + 25 mM NaCl, 23°C)

Lorsque la phénylalanine est substituée en position 4 par un groupement donneur d'électrons, l'interaction CH- π est possible et crée un effet stabilisant. Cet effet électronique peut être utilisé pour ajuster la structure et la stabilité du peptide ou de la protéine. L'isomérisation *cis* / *trans* peut alors être contrôlée grâce aux effets électronique et stéréoélectronique du noyau aromatique et du cycle de la proline.

I.2.3.3 Interaction $n \rightarrow \pi^*$

L'interaction $n \rightarrow \pi^*$ est une interaction entre l'oxygène du résidu O_{i-1} qui est capable de donner des électrons à l'orbitale non liante du carbone $C_i=O_i$ (Figure 17).

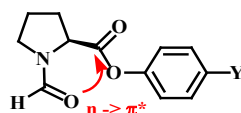


Figure 17 – Interaction $n \rightarrow \pi^*$ au sein de Fm-Pro-OC₆H₄

Cette interaction peut être vue comme l'approche d'un nucléophile vers un carbone électrophile du groupement acyle. Cette géométrie est retrouvée dans certains polypeptides qui décrivent une hélice α . Dans le cas d'une liaison X-Pro, l'interaction $n \rightarrow \pi^*$ est observée lorsque le lien peptidique est en conformation *trans*. Afin de diminuer l'électrophilie du carbonyle C=O_i, Hodges *et al.* ont parasubstitué l'ester phénylique par des groupements électroattracteurs X tels que NO₂ ou CN.³⁸ La mesure de la constante d'équilibre $K_{trans/cis}$ (Tableau 6) a permis de déterminer que la présence d'un groupement électroattracteur favorise la conformation *trans* du lien X-Pro.

Y	$K_{trans / cis}$
NO ₂	4.13
CN	3.95
H	2.12
OMe	2.01
NMe ₂	1.67

Tableau 6 – Ratios *trans* / *cis* de composé de type Fm-Pro-OC₆H₄-p-Y (CDCl₃, 25°C)

Cette interaction a lieu uniquement avec les groupements amide et esters et peut être vue comme une ramification de protéine. Cette interaction de type non covalente sert donc à la mise en plis des protéines et présente un effet stabilisant pour la conformation *trans*. Afin de pouvoir favoriser la conformation *cis*, le substituant greffé en position para devra être donneur d'électrons par effet inductif.

I.2.4 Influence d'un atome d'azote supplémentaire en position α du cycle de la proline

Lecoq *et al.* ont étudié la conformation d'un pseudodipeptide dans lequel une α -azaproline a été intégrée. L'analyse structurale du pseudodipeptide Boc-Ala- α azaPro-NHiPr a permis de mettre en évidence la formation d'un pseudocycle en C₁₀ qui favorise la conformation *cis* du lien Ala- α azaPro.³⁹ Cette conformation particulière est régie par la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le CO amidique du lien Ala- α azaPro et le proton NH côté C-terminal qui induit un coude β de type VI (Figure 18).

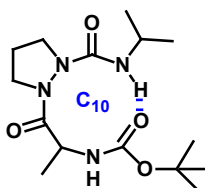


Figure 18 – Conformation du pseudodipeptide Boc-Ala- α azaPro-NHiPr

L'insertion d'un atome d'azote en position α permet de favoriser la conformation *cis* contrairement au cas où une proline est intégrée dans le peptide Boc-Ala-Pro-NHiPr.

L'équipe de Lucente a aussi intégré cet analogue de la proline dans des pseudotriptides de type HCO-Met- α azaPro-Phe-OMe en vue d'analyses conformationnelles.⁴⁰ Un tel composé renferme un pseudocycle en C₁₀ par formation d'une liaison hydrogène entre le proton NH du résidu phénylalanine et le carbonyle du formyle (Figure 19).

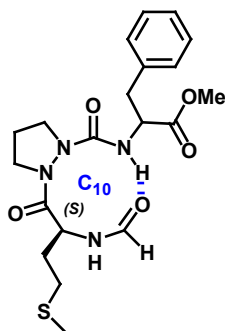


Figure 19 – Conformation du pseudotriptide HCO-Met- α azaPro-Phe-OMe

Cette auto-structuration met en évidence la présence d'un coude β qui favorise la conformation *cis* du lien Met- α azaPro.

I.2.5 Influence d'un atome d'azote supplémentaire en position δ du cycle de la proline

Au cours de sa thèse, E. Humbert-Voss avait synthétisé et étudié la conformation des pseudotriptides décrits dans la Figure 20. La présence d'un groupement Boc sur l'atome d'azote supplémentaire de la δ -azaproline a permis d'identifier que la conformation *trans* était favorisée avec la formation d'un pseudocycle en C₇ pour les composés **5a** et **5a'**.²³ L'analyse conformationnelle du composé **6a'** a permis de mettre en évidence que l'introduction d'une fonction NH en position δ dans le cycle de la proline induit la formation d'un pseudocycle en C₁₀ qui favorise la conformation *cis*. Il est à noter qu'aussi bien pour le composé **5a'** que **6a'**, la présence d'une fonction amide primaire côté C-terminale n'a aucune influence sur la conformation du lien Gly- δ azaPro car aucun de ces protons n'est impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire. Ce résultat important laisse penser qu'une elongation côté C-terminal n'aura *a priori* pas d'influence sur la conformation du lien Gly- δ azaPro.

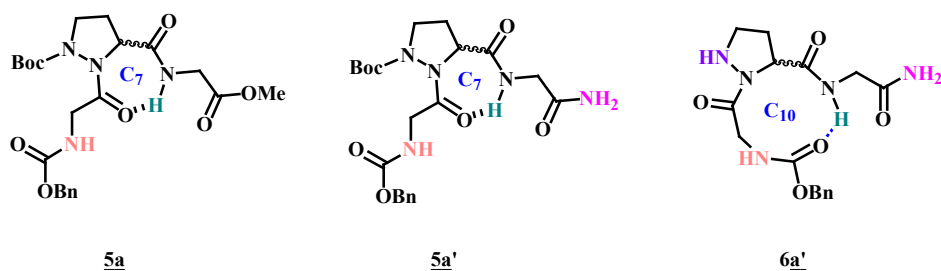


Figure 20 – Conformations des pseudotriptides de type Z-Gly- δ azaPro(P₂)-Gly-P₃

Conclusions : L'incorporation d'une α ou δ -azaproline au sein de pseudotriptide favorise la conformation *cis* du lien X-azaPro par formation d'un pseudocycle en C₁₀. Ces résultats laissent penser que les pseudotriptides, dont l'atome d'azote supplémentaire serait déprotégé, privilégieraient la conformation souhaitée. De plus, les différentes études ont permis de mettre en évidence l'influence d'un groupement encombré en position δ du cycle de la proline sur la conformation du lien X- ψ Pro : le conformère *cis* est favorisé par rapport à l'isomère *trans* qui est fortement déstabilisé par la gêne stérique engendrée entre la chaîne latérale de l'acide aminé X et le groupement substitué en position δ .

I.3 Choix des pseudotriptides à synthétiser

En tenant compte des données précédentes, nous avons pu identifier plusieurs facteurs pouvant avoir une influence sur la conformation du lien X- ψ Pro dans des pseudotriptide de type P₁-X₁- ψ Pro-X₃-P₃. Ainsi, la conformation *cis* devrait être favorisée par :

- La présence d'un atome d'azote supplémentaire dans le cycle de la proline en position α ou δ qui permettrait la formation de liaison hydrogène intramoléculaire
- L'encombrement stérique généré entre la chaîne latérale du résidu i+2 et un groupement encombré en position δ sur le cycle de la proline qui défavoriserait l'isomère *trans*.
- Des interactions de type Pro-arom où le noyau aromatique du résidu i interagit avec le cycle de la proline.

Ces différents résultats ont dirigé le choix des pseudopeptides à étudier comme décrit sur la Figure 21.

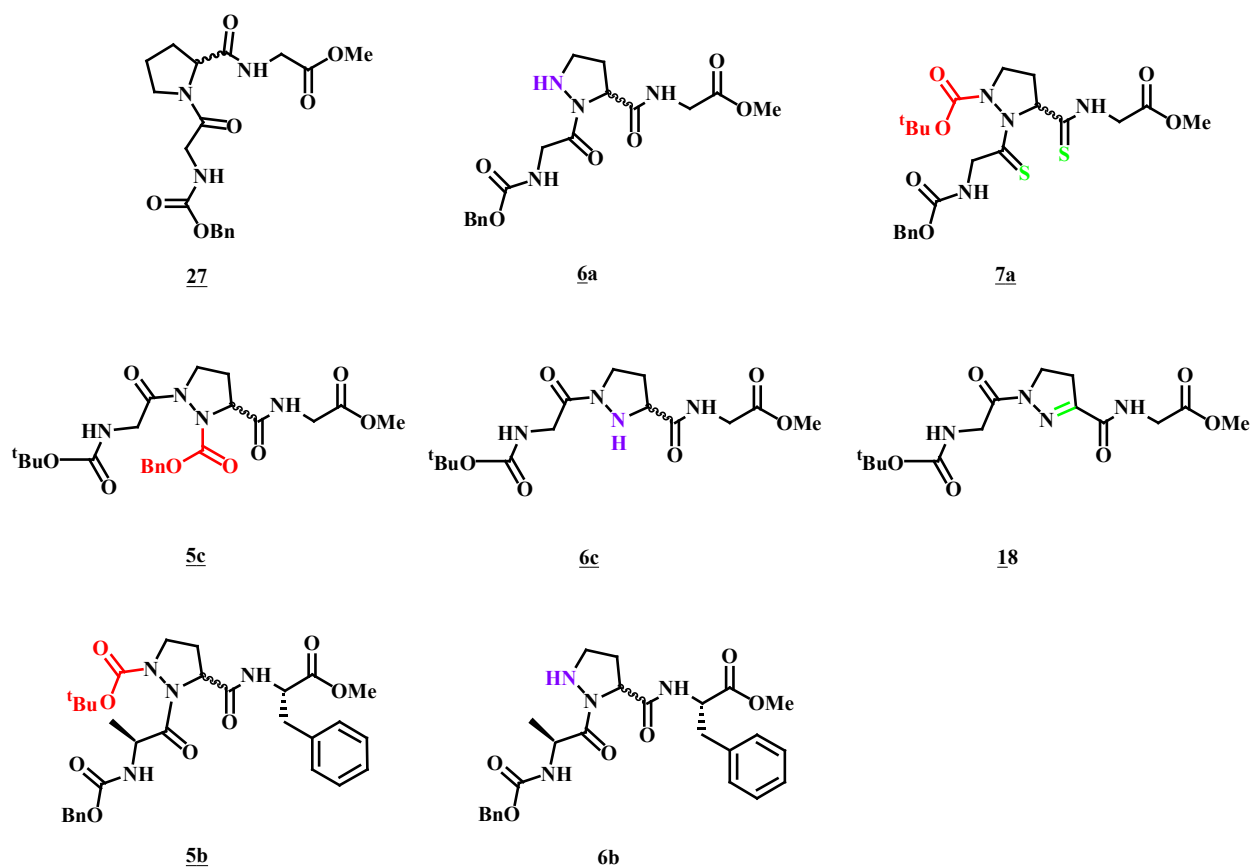


Figure 21 – Pseudotripeptides à étudier

Ces différents composés seront comparés comme suit :

- Le composé **27** contient la proline naturelle et sera considéré comme produit de référence pour la série **a**.
- La comparaison des composés **27** et **6a** permettra de connaître l'impact de la présence d'un atome d'azote supplémentaire déprotégé dans le cycle de la proline.
- La comparaison des pseudotripeptides **6a** et **5a** permettra d'évaluer l'influence de l'encombrement stérique en position δ de la proline.
- Le composé thiocarbonylé **7a** sera comparé à son analogue **5a** de manière à étudier l'incidence de l'électronégativité de l'hétéroatome impliqué dans une liaison hydrogène ainsi que sur la force de celle-ci.
- Les composés de la série **c** sont substitués par un acide aminé en position δ : cette série sera comparée aux pseudotripeptides de la série **a**.
- Les composés de la série **b** présentent la séquence Ala- δ azaPro-Phe retrouvée dans la structure des substrats à synthétiser pour la mesure de l'activité des PPIases. De plus, la comparaison de cette série avec la série **a** permettra d'évaluer l'impact de la nature des acides aminés sur la conformation adoptée par les pseudotripeptides.
- Le composé **18**, produit secondaire de réaction, sera également étudié afin de connaître sa conformation.

Chapitre I : Synthèse et analyse conformationnelle de pseudotripeptides contenant la δ -azaproline

Nous allons décrire dans un premier temps les synthèses des différents produits puis nous nous intéresserons à leur étude conformationnelle.

I.A Synthèse de pseudotripeptides contenant le motif δ -azaPro

I Introduction

Au cours de sa thèse, E. Humbert-Voss a étudié l'intégration de la δ -azaproline, analogue de la proline, dans des pseudotriptides de type Z-AA₁- δ azaPro(P₂)-AA₃-P₃ (Figure 22). La série Gly-AzaPro-Gly avait tout d'abord été choisie afin de s'affranchir de la résolution diastéréoisomérique du dipeptide Z- δ azaPro(Boc)-Gly-OMe et de faciliter la cristallisation des pseudotriptides obtenus. Les composés synthétisés ont tous été obtenus sous forme d'huile et aucune étude cristallographique n'avait pu être réalisée. Le pseudotriptide Z-Ala- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe mimant une séquence du synthon de type Suc-X-Ala- δ azaPro(Boc)-Phe-*p*-NA (où X est un acide aminé) a ensuite été étudié. L'extrémité N^δ-terminale du pseudotriptide Z-Ala- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe **5b** n'avait malheureusement pas pu être déprotégée.

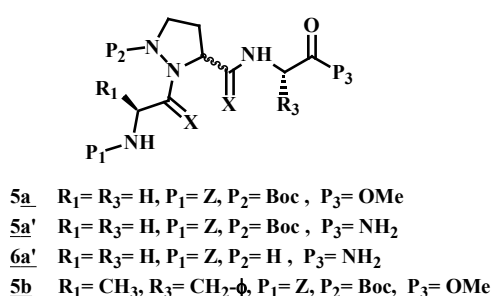


Figure 22 – Pseudotriptides précédemment synthétisés par E. Humbert-Voss⁴¹

Nous avons poursuivi ces travaux en abordant tout d'abord la synthèse d'autres analogues pseudopeptidiques de type Z-Gly- δ azaPro(P₂)-Gly-OMe (Figure 23) diversement substitués en position ϵ . Dans un second temps, la réactivité de l'atome d'azote supplémentaire de la δ -azaproline a été étudiée afin d'obtenir des pseudotriptides de type P₂- δ azaPro(Boc-Gly)-Gly-OMe et d'en déterminer leur conformation.

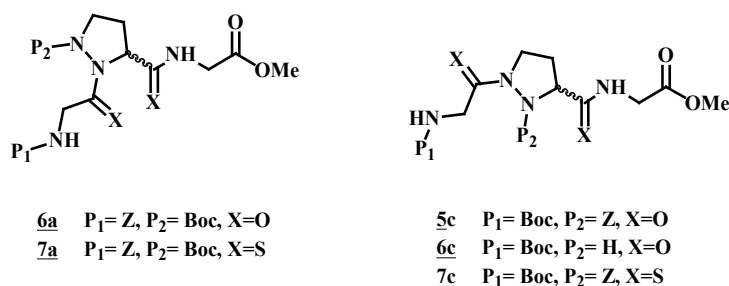


Figure 23 – Pseudotriptides à synthétiser

De plus, les travaux sur la série Ala- δ azaPro-Phe ont été poursuivis. En effet l'analyse conformationnelle du composé Z-Ala- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe **5b** n'avait pas été réalisée. Grâce à cette étude, il serait possible de mettre en évidence l'influence de la gêne stérique engendrée par le groupement protecteur Boc et la chaîne latérale du résidu alanine sur la conformation du lien Ala- δ azaPro (Figure 24). Afin de mimer la conformation d'un synthon de type Suc-X-Ala- δ azaPro-Phe-*p*-NA (où X est un acide aminé) en solution, il s'est avéré intéressant de synthétiser le pseudotriptide Z-Ala- δ azaPro-Phe-OMe. Il pourra ainsi être déterminé si la

présence d'un atome d'azote supplémentaire déprotégé dans le cycle de la proline privilégie la conformation *cis* du lien peptidique Ala- δ azaPro par formation d'une liaison hydrogène.

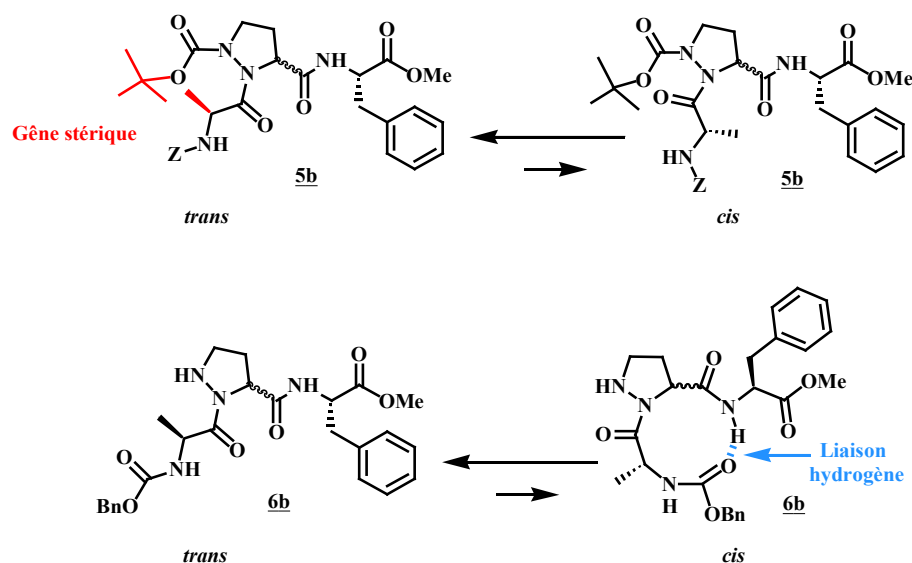


Figure 24 – Hypothèses de conformation des pseudotriptides **5b** et **6b**

II Synthèse de la δ -azaproline orthogonalement protégée

Le synthon clé de toutes les synthèses que nous voulions aborder était bien évidemment la δ -azaproline. Une méthode de synthèse de la δ -azaproline orthogonalement protégée **1** avait préalablement été mise au point au laboratoire en seulement six étapes.⁴² Cette suite réactionnelle conduit au produit **1** avec un rendement de 41% calculé par rapport à l'anhydride phtalique de départ (Schéma 3). Nous avons donc dans un premier temps repris à notre compte cette méthodologie de synthèse. La δ -azaproline **1** peut être obtenue énantiomériquement pure, dans notre cas nous avons travaillé en mélange racémique.

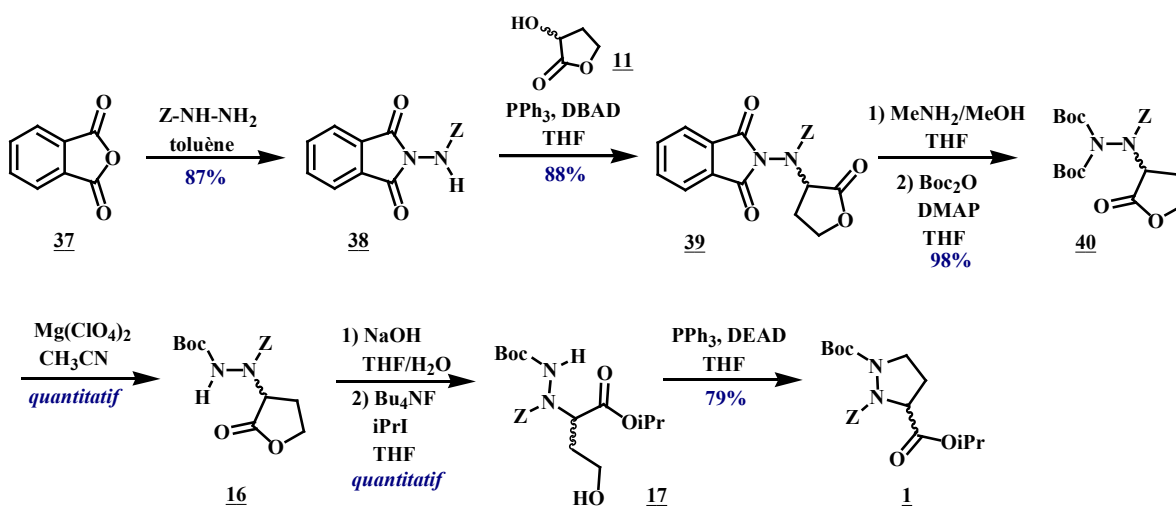


Schéma 3 – Synthèse de la δ -azaproline orthogonalement protégée **1**⁴²

La synthèse du Z-aminophthalimide **38** a tout d'abord été réalisée à partir de l'anhydride phthalique par réaction avec le benzylcarbazate dans le toluène à reflux^{16,43-45} avec un très bon rendement de 87%.

L'hydrazinolactone **39** a ensuite été générée avec un très bon rendement de 88% par une réaction de Mitsunobu^{46,47} entre la fonction hydroxyle de l' α -hydroxy- γ -butyrolactone **11** et le partenaire acide du Z-aminophthalimide **38** en présence de triphénylphosphine et de DBAD. Cette réaction de substitution nucléophile d'ordre 2 s'est déroulée avec succès du fait de la présence de trois groupements électroattracteurs qui contribuent à augmenter le pKa du proton du groupement NH du composé **38** et rend, par conséquent, ce proton très acide. De plus, le N-aminophthalimide a la particularité d'être plan ce qui limite l'encombrement stérique, permettant ainsi à la réaction de type SN₂ de se dérouler dans de bonnes conditions.

Le motif phthalimide de l'hydrazinolactone **39** a ensuite été remplacé par deux groupements Boc^{43,45-48} avec un très bon rendement de 98%. Pour ce faire, le groupement phthalimide a été ouvert en présence d'une solution de méthylamine suffisamment nucléophile pour éliminer le motif aromatique. Le produit résultant a été traité avec le di-*tert*-butyl dicarbonate et une quantité catalytique de DMAP afin de générer le composé bis protégé.

L'utilisation du perchlorate de magnésium dans l'acétonitrile a permis de cliver un seul groupement Boc de l'hydrazinolactone **40** afin de générer **16** avec un rendement quantitatif.⁴⁸

L'ouverture de la lactone a été réalisée à partir du composé **16** par utilisation d'hydroxyde de sodium dans un mélange THF/H₂O. Le carboxylate obtenu a ensuite été transformé en ester afin d'éviter la cyclisation intramoléculaire en lactone. De manière générale, les carboxylates de sodium sont de bons nucléophiles, c'est pourquoi l'utilisation du dérivé halogéné iPrI comme partenaire électrophile de l'estérification a conduit quantitativement à la formation du composé **17**.

Une réaction de Mitsunobu intramoléculaire entre la fonction hydroxyle et le groupement NH de l'ester **17** a permis d'obtenir la δ -azaproline **1** avec un bon rendement de 79%. Il est à noter que cette réaction de Mitsunobu intramoléculaire nécessite uniquement la présence de deux groupements électroattracteurs, contrairement à une réaction intermoléculaire où trois groupements électroattracteurs sont nécessaires. Ce phénomène s'explique par le fait que les réactions de Mitsunobu intramoléculaires se font généralement plus facilement que les réactions intermoléculaires.⁴⁹

Le rendement global conduisant à cette pseudoproline était auparavant de 41%.⁴² Des études systématiques menées sur les deux réactions de Mitsunobu, visant à faire varier le temps d'agitation, ont permis d'améliorer le rendement de ces deux étapes afin de générer la δ -azaproline **1** à 59%.

III Synthèse des pseudotriptides

III.1 Stratégie de synthèse

Au cours de sa thèse, E. Humbert-Voss avait déjà pu synthétiser efficacement les pseudotriptides **5a**, **5a'**, **6a'** et **5b**^{41,23} selon la voie de synthèse décrite dans le Schéma 4. La stratégie de synthèse qui avait été retenue consistait à déprotéger sélectivement l'extrémité C-terminale de la δ -azaproline² **1** afin d'engager le composé généré dans un couplage peptidique avec l'ester de la phénylalanine ou de la glycine. L'atome d'azote natif de la δ -azaproline des pseudodipeptides **3a** et **3b** ont été sélectivement déprotégés avant d'être respectivement couplés au résidu Z-Gly-OH et Z-Ala-OH pour former les pseudotriptides **5a** et **5b**. La fonction ester de l'extrémité C-terminale de **5a** a été remplacée par une fonction amide primaire, mimant ainsi une nouvelle liaison peptidique. Finalement, la protection Boc de l'extrémité N ^{δ} -term du composé **5a'** a été éliminée.

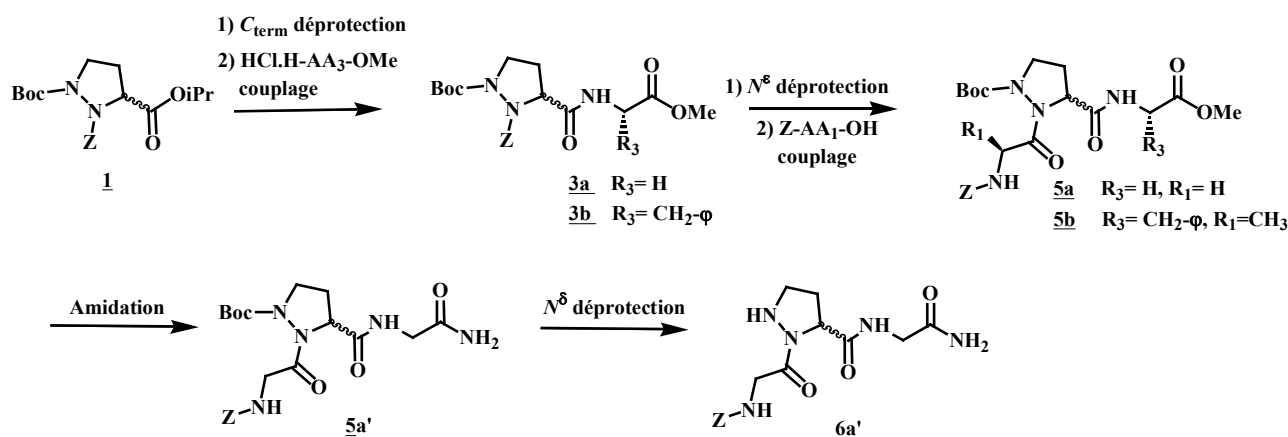


Schéma 4 – Voie de synthèse des pseudotriptides étudiés par E. Humbert-Voss

A partir des composés **5a** et **5b** précédemment synthétisés, nous avons décidé de cliver la fonction Boc en milieu acide pour former les pseudopeptides **6a** et **6b** (Schéma 5). L'étude conformationnelle de ces deux composés déprotégés permettrait de déterminer si un atome d'azote supplémentaire au sein du cycle pyrazolique privilégie la conformation *cis* du lien AA- δ azaPro par formation d'une liaison hydrogène entre le carbonyle de la liaison AA₁- δ azaPro et l'atome d'hydrogène du groupement N ^{δ} -H.

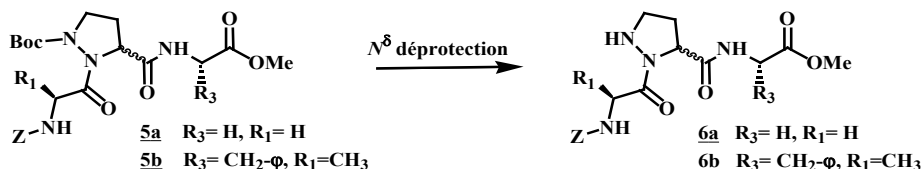


Schéma 5 – Déprotection de l'extrémité N ^{δ} -terminale des pseudotriptides **5a** et **5b**

Afin de pouvoir comparer la réactivité des atomes d'azote de la δ -azaproline, l'extrémité N ^{δ} terminale du composé **3a** sera déprotégée de son groupement Boc afin de l'engager dans un couplage peptidique avec un dérivé de la glycine. Ce couplage permettrait de fonctionnaliser l'atome d'azote supplémentaire de la

(100°C, 150W) et à l'aide de 1,4-cyclohexadiène en présence de Pd/C, générant du dihydrogène *in situ*.⁵⁰ La protection Z a pu aussi être clivée quantitativement par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon.^{51,52} La méthode de déprotection retenue a été celle assistée par micro-ondes qui permet un gain de temps : les pseudodipeptides **4a** et **4b** sont générés en 10 minutes, tandis que 24 heures sont nécessaires dans le cas d'une hydrogénation catalytique classique.

Il est à noter que cette étape de déprotection du groupement Z peut s'accompagner d'une réaction parasite conduisant à la formation des pyrazolines **8a** et **8b**^{23,41} (Schéma 9). Cette oxydation spontanée débute après quelques heures à température ambiante et est totale en 48 heures.⁴¹

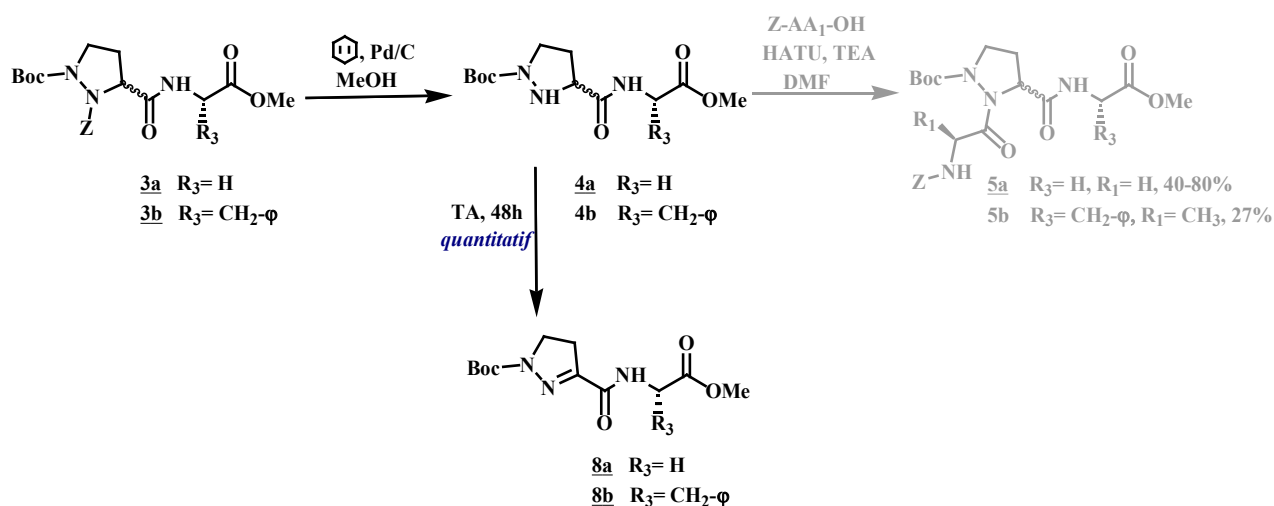


Schéma 9 – Voie de synthèse des pseudotripeptides de type P₁-Gly- δ azaPro(P₂)-Gly-OP₃ et réaction parasite conduisant à la formation de pyrazolines **8a** et **8b**

Afin de minimiser cette réaction, les pseudodipeptides **4a** et **4b** sont engagés juste après leur formation dans un couplage peptidique avec les acides aminés commerciaux Z-Gly-OH ou Z-Ala-OH afin de former respectivement les composés **5a** et **5b**.

La formation des pseudotripeptides **5a** et **5b** semble plus délicate qu'un couplage peptidique classique. En effet, l'atome d'azote N^c de la δ -azaproline est moins réactif que l'atome d'azote de la proline naturelle du fait de la présence du groupement électroattracteur Boc rendant également le site beaucoup plus encombré. Plusieurs équipes de recherche ont démontré qu'un couplage peptidique entre un dérivé carbamate (NH₂-NH-R) et un acide aminé N-protégé nécessitait des activations relativement fortes.⁵³⁻⁵⁷ Dans notre cas, la δ -azaproline est engagée en tant que dérivé d'un carbamate, et c'est pour cette raison qu'une étude systématique du couplage peptidique entre **4a** et Z-Gly-OH avait été menée par E. Humbert-Voss⁴¹ afin de déterminer des conditions de couplage pour rendre cette réaction possible.

Il a donc fallu chercher le meilleur agent de couplage parmi ceux décrits ci-dessous :

L'**EDC** (1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide) aussi appelé EDAC ou EDCI,⁵⁸ est une alternative à l'utilisation de la dicyclohexylcarbodiimide (DCC),⁵⁹ et il présente l'avantage de se transformer en urée soluble dans l'eau, facilement éliminée par lavages aqueux ;

Le PyBOP (hexafluorophosphate de benzotriazolyl-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium),⁶⁰⁻⁶¹ est préférable au réactif de Castro, l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium (BOP),⁶² car 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,⁶³

Le TBTU (tétrafluoroborate de *O*-(1H-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N'*-tetramethyluronium)⁶⁴ et l'HATU (fluorophosphate de *O*-(1H-azatriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetra-methyluronium),⁶⁵⁻⁶⁶ utilisés 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),⁶⁷

Les fluorures des acides aminés AA₁, préparés en utilisant le fluorure de cyanuryle⁶⁸⁻⁶⁹ ou l'hexafluorophosphate de *N,N,N',N'*-tétraméthyl-formamidinium (TFFH),⁷⁰ 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.}⁶⁹⁻⁷³ En effet, les chlorures d'acides correspondants ne sont pas stables et se transforment en leurs anhydrides de Leuch.⁶⁹⁻⁷³

Une étude systématique du couplage peptidique entre Z-Gly-X et **4a** avait permis d'obtenir les résultats suivants (Tableau 7).⁴¹

X	Conditions de couplage	T (°C)	P (W)	t	Rdt (%)
OSu	TEA/DCM	TA	/	24h	/
OH	HATU/TEA/DMF	TA	/	4h	36
		75	50	3x5 min	40
F	NaHCO ₃ /DCM/H ₂ O	TA	/	24h	48

Tableau 7 – Conditions et rendements de couplage peptidique entre **4a** et Z-Gly-X

A la vue de ces résultats, le choix de la méthode de couplage s'est porté vers celle utilisant l'HATU avec l'assistance micro-ondes car ce type de réaction paraissait plus rapide et simple à mettre en œuvre. Les pseudotripeptides **5a** et **5b** ont donc pu être obtenus par couplage peptidique entre **4a** et Z-Gly-OH, **4b** et Z-Ala-OH en présence d'HATU avec l'assistance des micro-ondes avec des rendements respectifs de 80 et 27% (Schéma 10).

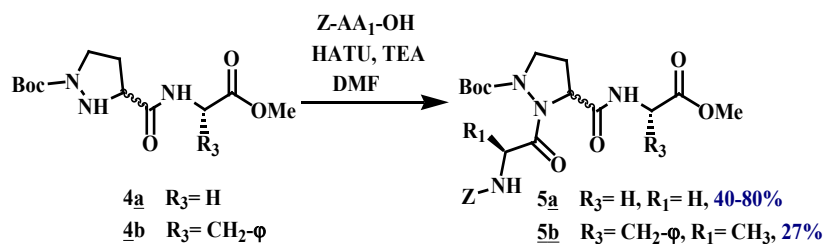


Schéma 10 – Voie de synthèse des pseudotripeptides **5a** et **5b**

Malheureusement, la réaction de couplage conduisant au pseudotripeptide **5a** s'est avérée non reproductible du fait de la formation spontanée de la pyrazoline **8a** en quantité non négligeable.

Cette voie de synthèse a permis d'obtenir les pseudotripeptides **5a** et **5b** avec un rendement global de 29% et, respectivement, 15% à partir de l'anhydride phtalique.

III.2.2 A partir du *tert*-butyl carbazate et de l' α -hydroxy- γ -butyrolactone **11**

Afin de réduire le nombre d'étapes conduisant à la formation des pseudotripeptides **5a** et **5b**, une nouvelle voie de synthèse a été élaborée à partir des composés commerciaux *tert*-butyl carbazate et α -hydroxy- γ -butyrolactone **11** via la formation du pseudodipeptide **9b**.

La synthèse du pseudodipeptide **9b** a été pensée en quatre étapes (Schéma 11). Dans un premier temps, une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2 entre le *tert*-butyl carbazate et de l' α -hydroxy- γ -butyrolactone **11** permettrait de générer l'hydrazinolactone **12**. Le résidu glycine Z-Gly-OH ou alanine Z-Ala-OH pourrait alors être engagé dans un couplage peptidique avec l'hydrazinolactone précédemment synthétisée. Ensuite, une étape d'ouverture de la lactone en milieu basique suivie d'une estérification en présence d'iodure d'isopropyle permettrait d'obtenir l'ester **15a**, respectivement **15b**. Finalement, une réaction de Mitsunobu intramoléculaire entre la fonction hydroxyle et le groupement NH du composé **15a** ou **15b** mènerait à la formation du pseudodipeptide **9a**, respectivement **9b**. Finalement, la déprotection de l'extrémité C-terminale suivi d'un couplage peptidique permettrait de générer les pseudotripeptides **5a** et **5b**.

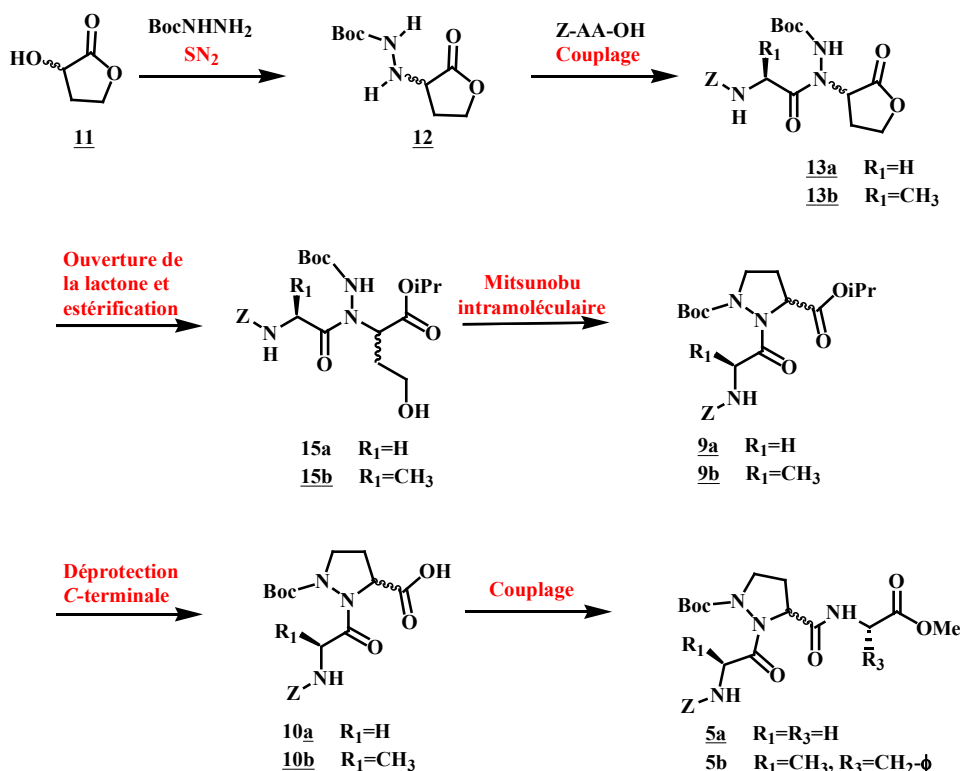


Schéma 11 – Plan de synthèse des pseudotriptides **5a** et **5b** avec introduction de résidu alanine Z-Ala-OH avant cyclisation par Mitsunobu intramoléculaire

II.2.2.1 Synthèse en 6 étapes du pseudotriptides **5b**

II.2.2.1.1 Synthèse des hydrazinolactones **12** et **13b**

Afin de pouvoir obtenir l' α -hydrazinolactone **12**, nous nous sommes intéressé à la méthode décrite par Hoffman⁷⁴ qui consiste en une substitution nucléophile d'un motif triflate par le *tert*-butyl carbazate (Schéma 12).

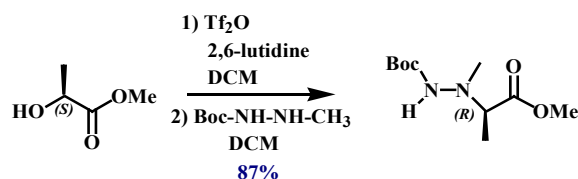


Schéma 12 – Réaction $\text{S}_{\text{N}}2$

Au cours de cette étape, l' α -hydroxyester est traité par un équivalent de TF_2O , l'équivalent de 2,6-lutidine servant à piéger le premier équivalent d'acide triflique libéré au cours de la formation de triflate *in situ*. Deux équivalents de *tert*-butyl carbazate sont ajoutés, le premier servant à réagir avec le dérivé triflate par une réaction $\text{S}_{\text{N}}2$ et le second à piéger le deuxième équivalent d'acide triflique généré. L'hydrazinolactone **12** a pu être ainsi obtenue à partir de l' α -hydroxy- γ -butyrolactone avec un bon rendement de 79% selon une réaction de type $\text{S}_{\text{N}}2$ avec le *tert*-butyl carbazate.⁵⁷

En utilisant des nombres d'équivalents quelque peu différents, l'hydrazinolactone obtenue a ensuite été condensée avec un chlorure d'acyle formé par une réaction entre le résidu alanine Z-Ala-OH, le 1-chloro-*N,N*-2-triméthyl-1-propen-1-amine et la collidine permettant ainsi de générer l'amide **13b** avec un bon rendement de 84%⁵⁷ (Schéma 13).

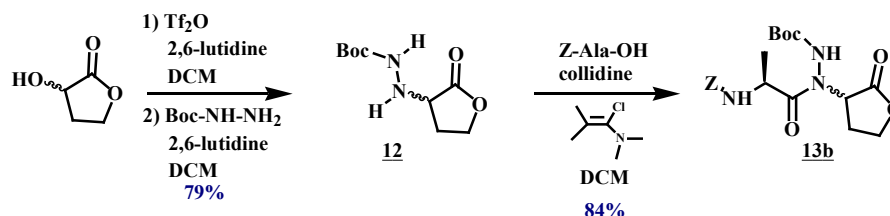


Schéma 13 – Synthèse de l'hydrazinolactone **13b**

II.2.2.1.2 Synthèse du pseudodipeptide **9b** par ouverture de la lactone **13b** suivie d'une estérification et d'une réaction de Mitsunobu intramoléculaire

Ouverture de la lactone **13b** et estérification

Dans un premier temps, l'ouverture de la lactone a été réalisée à partir du composé **13b**, en milieu basique, par utilisation d'hydroxyde de sodium dans un mélange THF/H₂O. Le carboxylate **14b** a été obtenu quantitativement (Schéma 14).

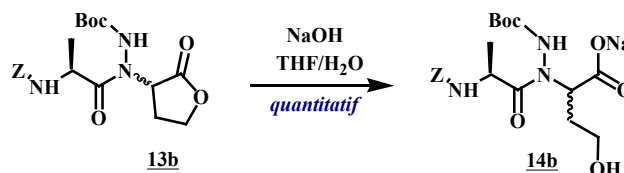


Schéma 14 – Ouverture de la lactone **13b**

Dans un second temps, l'estérification du carboxylate **14b** a été tentée dans des conditions analogues à celles utilisées lors de la formation de l'ester **17**, c'est à dire en présence d'iodure d'isopropyle et de fluorure de *tetra*-butylammonium dans le THF.

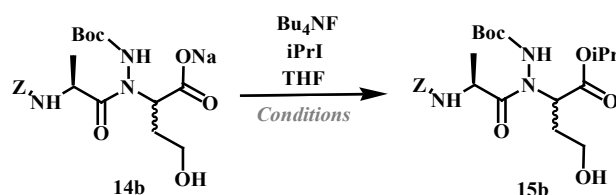


Schéma 15 – Estérification du carboxylate **14a**

Cette étape s'est avérée assez délicate à suivre par chromatographie sur couche mince car l'ester **15b** et l'hydrazinolactone **13b** possèdent des rapports frontaux quasi similaires et ce dans tous les éluants utilisés. Une première étude systématique visant à faire varier la température ainsi que le temps d'agitation a été réalisée de manière à déterminer les conditions optimales d'obtention de l'ester **15b** (voir Tableau 8).

Essais	Température	Temps	Rdt (%) ester 15b	Rdt (%) lactone 13b
1	TA	3 j	Produits 15b et 13b inséparables^a	
2a	30°C	3j	Produits 15b et 13b inséparables^a	
2b	30°C	5 j	^b	37
3a	35°C	4 j	9	69
3b	35°C	6 j	^b	91
4	40°C	3 j	^b	94

a : obtention d'un mélange de lactone **13b** et ester **15b** b : pas de formation de l'ester **15b**

Tableau 8 – Etude systématique de l'estérification du carboxylate **14b par l'iodure d'isopropyle**

Au cours de cette étude, l'ester **15b** a bien été synthétisé à des températures inférieures à 35°C (Essais 1, 2a et 3a). Dans chaque cas, la réaction parasite de rétrolactonisation a pu être observée et régénère ainsi la lactone **13b** très majoritairement. Cette réaction secondaire a engendré des problèmes de purification ne permettant pas de déterminer les différents rendements de formation de l'ester **15b** dans les conditions opératoires utilisées car il a été quasiment impossible de séparer le composé **15b** de la lactone **13b** par colonne chromatographique. Cependant, le composé désiré a pu être néanmoins isolé avec un très faible rendement de 9% (Essais 3a).

Les effets de la température et du temps d'agitation ont aussi pu être étudiés. A température fixée, la formation de la lactone **13b** est d'autant plus favorisée que le temps d'agitation est long (Essais 3a et 3b). Pour une température de réaction supérieure ou égale à 35°C, la lactone est régénérée de manière quasi quantitative (Essais 3b et 4).

Cette première étude systématique a permis de mettre en évidence que l'étape d'estérification doit être menée à une température inférieure à 30°C et un temps d'agitation de maximum 3 jours de manière à limiter la réaction parasite de rétrolactonisation.

Synthèse du pseudodipeptide **10b** à partir du carboxylate **14b**

Bien que l'obtention de l'ester **15b** totalement purifié par colonne chromatographique soit assez ardue, l'étape de Mitsunobu intramoléculaire a tout de même pu être tentée sur un mélange d'ester **15b** et d'hydrazinolactone **13b** (Schéma 16).

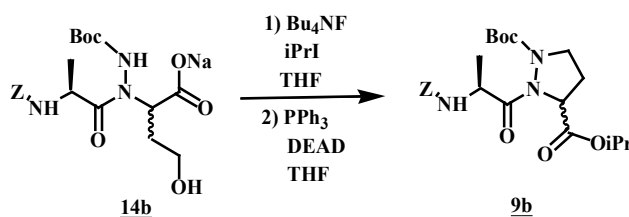


Schéma 16 – Synthèse du pseudodipeptide **9b à partir du carboxylate **14b****

En effet, la réaction de Mitsunobu conduisant à la δ -azaproline orthogonalement protégée avait pu s'effectuer à partir d'un mélange d'ester **17** et de la lactone **16**⁴¹ (Figure 25).

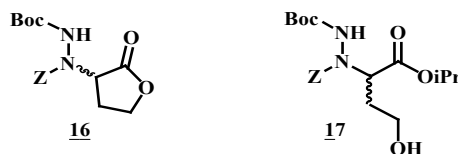


Figure 25 – Structure de la lactone **16** et ester **17**

De ce fait, cette dernière étape conduisant au pseudodipeptide **9b** a été réalisée à partir d'un mélange de lactone **13b** et d'ester **15b**.

Une seconde étude systématique a donc été menée visant à faire varier la température et le temps d'agitation de l'étape d'estérification du carboxylate **14b** (étape 1). A partir des résultats obtenus lors de la première étude systématique, les choix de la température et du temps d'agitation se sont orientés vers des valeurs, respectivement, inférieures à 30°C et 3 jours (Tableau 9) de manière à pouvoir limiter la réaction conduisant à l'hydrazinolactone **13b**.

De plus, il a pu être déterminé que lorsque le carboxylate **14b** est mis en solution dans du THF, la réaction de rétrolactonisation n'a pas lieu aussi bien à 0°C qu'à température ambiante. Cette réaction parasite a donc lieu lorsque le carboxylate est soumis au fluorure de tétrabutylammonium et à l'iodure d'isopropyle en solution dans du THF. De ce fait, l'étape d'estérification a été tentée à des températures allant de 0 à 30°C de façon à limiter la cinétique de la réaction parasite.

La réaction de Mitsunobu intramoléculaire a quant à elle été effectuée à partir de 1.5 équivalents de triphénylphosphine et de DEAD sous agitation à température ambiante pendant une nuit (étape 2), conditions utilisées lors de l'étape de Mitsunobu intramoléculaire conduisant à la δ -azaproline orthogonalement protégée **1**.

Essai	Etape 1 (Estérification du carboxylate 14b)		Rdt pseudodipeptide 9b
	T (°C)	T	
1	30°C	3 jours	2%
2a	TA	3 jours	3%
2b	TA	1 jour	23%
3a	0°C-TA	1h - 3 jours	12%
3b	0°C-TA	1h - 1 jour	30%
4	0°C-10°C	8h-15h	37%
5	0°C	7h	11%

Tableau 9 – Deuxième étude systématique de l'estérification du carboxylate **14b** par l'iodure d'isopropyle (étape 1)

Dans un premier temps, le pseudodipeptide **9b** a pu être isolé avec un très faible rendement de 2% lorsque l'étape d'estérification a été menée à 30°C pendant 3 jours (Essai 1).

La température de l'étape 1 a ensuite été abaissée de manière à déterminer les conditions optimales de formation du pseudodipeptide **9b**. Le produit désiré a pu être obtenu avec des rendements de 3 et 23% lorsque le milieu réactionnel a été mis sous agitation à température ambiante avec des temps d'agitation respectifs de 3 et 1 jours (Essais 2a et 2b).

La température du milieu réactionnel a ensuite été abaissée à 0°C de manière à limiter au maximum la réaction parasite de rétro lactonisation. Au bout d'une heure d'agitation, aucune évolution n'a pu être observée par chromatographie sur couche mince, c'est pourquoi le milieu réactionnel a été progressivement porté à température ambiante (Essais 3a et 3b). Le pseudodipeptide a pu être isolé avec un rendement de 12 et 30% pour des temps d'agitation respectifs de 3 et 1 jours. Ces faibles rendements s'expliquent par le fait que la réaction de rétro lactonisation se produit spontanément à température ambiante.

Afin de limiter toute réaction secondaire et permettre la faisabilité de l'ester **15b**, le milieu réactionnel a tout d'abord été mis sous agitation à 0°C pendant 8h, puis à 10°C pendant 15h (Essai 4). Ces conditions ont permis de générer le pseudodipeptide **9b** avec un rendement de 37%. Il a pu être déterminé par chromatographie sur couche mince qu'une quantité non négligeable d'hydrazinolactone **13b** a été régénérée lors de l'étape d'estérification, c'est pourquoi une dernière tentative d'estérification a été réalisée à 0°C avec un temps d'agitation de 7h (Essai 5). Le composé **9b** a pu alors être isolé avec un faible rendement de 11%.

L'étape d'estérification du carboxylate **14b** conduit à un rendement assez limité du fait de la réaction parasite de rétro lactonisation. Malgré cela, le rendement global de synthèse du pseudopeptide **9b** a tout de même pu être amélioré. En effet, dans le cas où ce pseudodipeptide est synthétisé à partir de l' α -hydroxy- γ -butyrolactone **11** et de Z-phthalimide, 8 étapes sont nécessaires pour conduire au produit désiré avec rendement global de 11% (voir paragraphe III.2.2.2 du chapitre II). L'intégration du résidu Z-Ala-OH avant l'étape de cyclisation par réaction de Mitsunobu a donc permis de synthétiser le pseudodipeptide **9b** avec un rendement global satisfaisant et en un minimum d'étapes.

II.2.2.1.3 Déprotection de l'extrémité C-terminale et couplage peptidique

L'extrémité C-terminale a pu être quantitativement déprotégée en présence d'hydroxyde de sodium dans un mélange THF/H₂O (1:1). L'acide **10b** formé a pu être engagé dans un couplage peptidique avec l'ester de la phénylalanine afin de générer le pseudotripeptide **5b** avec un rendement de 60% (Schéma 17).

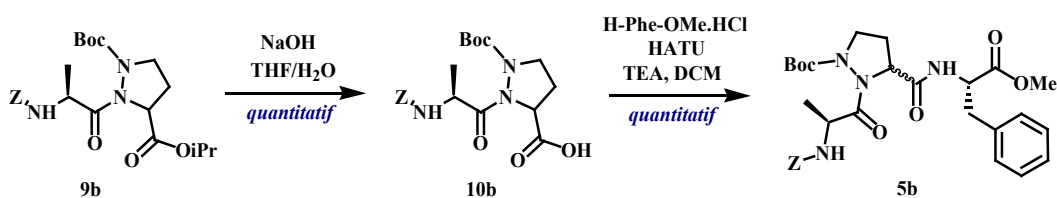


Schéma 17 – Déprotection de l'extrémité C-terminale du pseudodipeptide **9b** et couplage peptidique

II.2.2.1.4 Conclusions

Cette voie de synthèse permet d'obtenir le composé **5b** en 6 étapes avec un rendement de 17% (Schéma 18).

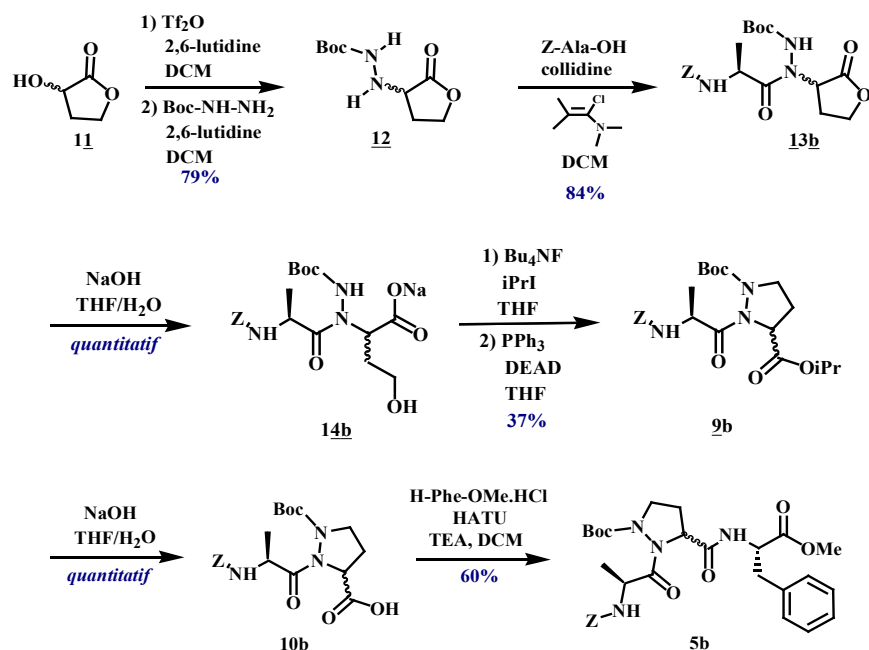
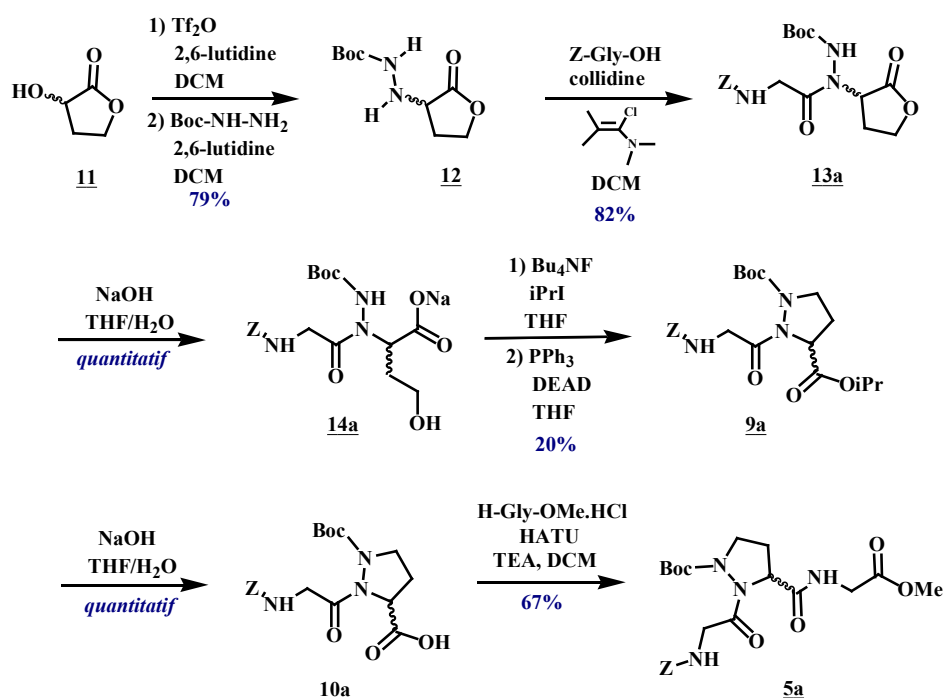


Schéma 18 – Synthèse du pseudotriptide **5b** par intégration du résidu Z-Ala-OH avant cyclisation par réaction de Mitsunobu intramoléculaire

Pour rappel, la voie de synthèse utilisant la δ -azaprolidine **1** permettait l'obtention du pseudotriptide **5b** en 10 étapes avec un rendement global de 12%. En intégrant le résidu Z-Ala-OH avant l'étape de cyclisation par réaction de Mitsunobu intramoléculaire, le rendement global a été amélioré, et le temps nécessaire à l'obtention de ce pseudotriptide a pu être nettement optimisé. De plus, cette voie de synthèse permet de s'affranchir de la formation de la pyrazoline **8b** qui limite à 27% le rendement de la réaction de couplage entre le résidu Z-Ala-OH et H- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe **4b**.

III.2.2.2 Synthèse en 6 étapes du pseudotriptide **5a**

De manière analogue, cette nouvelle voie de synthèse a été appliquée à la synthèse du pseudotriptide **5a** à partir de l'hydrazinolactone **12** et du résidu Z-Gly-OH (Schéma 19).

Schéma 19 – Voie de synthèse du pseudotriptide **5a** à partir de l'hydrazinolactone **12** et du résidu Z-Gly-OH

L'hydrazinolactone **13a** a pu être synthétisée à partir du composé **12** avec un rendement de 82% par couplage peptidique avec le résidu Z-Gly-OH. L'ouverture de la lactone a pu s'effectuer quantitativement en présence d'hydroxyde de sodium dans un mélange THF/H₂O. L'estérification du carboxylate **14a** par l'iodure d'isopropyle suivie d'une réaction de Mitsunobu intramoléculaire a généré le pseudodipeptide **9a** avec un faible rendement de 20%. Finalement, la déprotection de l'extrémité C-terminale suivie d'un couplage peptidique en présence de l'ester de la glycine H-Gly-OMe.HCl a conduit au pseudotriptide **5a** avec un rendement de 67%. Cette voie de synthèse a permis de générer le composé désiré avec un rendement global de 10% à partir de l' α -hydroxy- γ -butyrolactone **11**. Cette méthode ne permet pas à l'heure actuelle d'améliorer le rendement global de la synthèse du pseudotriptide **5a** car ce composé est obtenu avec un rendement de 29% à partir de l'anhydride phthalique. Comme nous pouvons le constater la réaction d'estérification suivie d'une réaction de Mitsunobu intramoléculaire est l'étape limitante de cette voie de synthèse. Une étude systématique visant à faire varier la température et le temps d'agitation pourrait contribuer à améliorer cette étape.

III.2.2.3 Synthèse en 4 étapes des pseudotriptides **5a** et **5b**

De manière à diminuer le nombre d'étapes nécessaires à la formation des pseudotriptides **5a** et **5b**, nous avons tenté d'ouvrir les lactones **13a** et **13b** directement par les amines respectives H-Phe-OMe.HCl, et H-Gly-OMe.HCl avant de réaliser une étape de Mitsunobu intramoléculaire. En effet, E. Humbert-Voss avait pu observer que l'ouverture de la lactone **16** par H-Phe-OMe.HCl en présence de 2-ethylhexanoate de sodium (NaEH) avait généré le composé **17** avec un rendement de 58% (Schéma 20).⁴¹

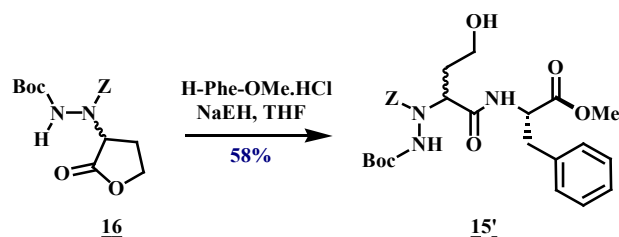


Schéma 20 – Ouverture de la lactone **16** par H-Phe-OMe.HCl et NaEH

L'utilisation de 2-éthyl-hexanoate de sodium est classiquement utilisé afin d'aminolysier les lactones. En effet, ce composé qui agit en temps que catalyseur et « base » présente un pH quasi neutre ce qui permet d'ouvrir sélectivement une lactone présente un composé sensible aux conditions acides et/ou basique.

L'ouverture des lactones **13a** et **13b** par attaque d'un résidu glycine ou alanine en présence de 2-éthylhexanoate de sodium à reflux dans le THF ⁷⁵ a permis de générer les composé **15a'** et **15b'** avec des rendements respectifs de 60 et 57% (Schéma 21).

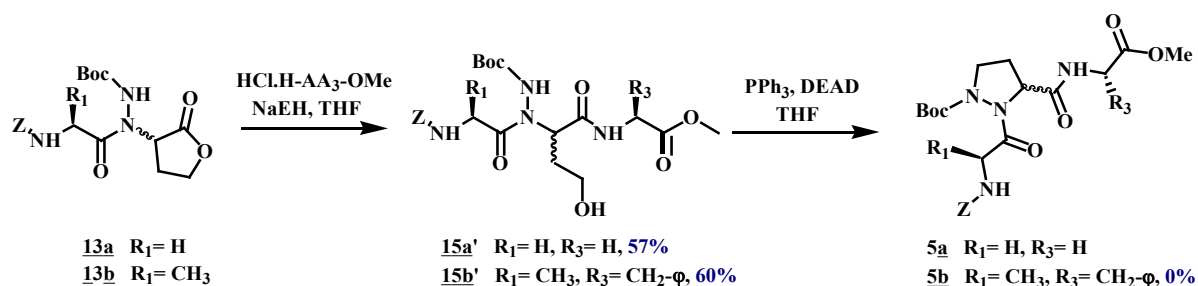


Schéma 21 – Synthèse des pseudotripeptides **5a** et **5b** en 4 étapes

La synthèse en quatre étapes des pseudotripeptides **5a** et **5b** n'a pas pu être réalisée de manière optimale :

- La synthèse du pseudotripeptide **5a** a été réalisée dans les mêmes conditions que celles conduisant à la δ -azaproline **1** à savoir 1.5 éq. de DEAD et de PPh₃. Un suivi CCM montre que le composé désiré a bien été généré cependant il nous a été impossible de le purifier. En effet, il a été assez fastidieux de séparer le composé **5a** des oxydes de triphénylphosphine formés au cours de la réaction de Mitsunobu intramoléculaire.

- L'utilisation des agents activants diéthylazodicarboxylate et di-*tert*-butylazodicarboxylate à reflux et à température ambiante n'ont pas permis de former le pseudotripeptide **5b**. Cet échec peut certainement s'expliquer par l'encombrement stérique généré par les chaînes latérales des acides aminés alanine et phénylalanine. La présence d'un seul groupement électroattracteur Boc sur les composés **15a'** et **15b'** ne permet pas au proton NH hydrazidique d'être assez acide et de permettre la faisabilité de la réaction de Mitsunobu intramoléculaire contrairement au proton NH du composé **15'** assez acide du fait de la présence des groupements électroattracteurs Boc et Z.

III.3 Synthèse des pseudotriptides Z-AA₁- δ azaPro-AA₃-OMe et de l'analogue thiocarbonylé **7a**

La partie N ^{δ} -terminale des pseudotriptides **5a** et **5b** a été libérée de son groupement Boc au moyen d'acide trifluoroacétique en proportion 15:85 dans le dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (Schéma 22). Avec cette méthode, les pseudotriptides **6a** et **6b** ont pu être générés quantitativement.

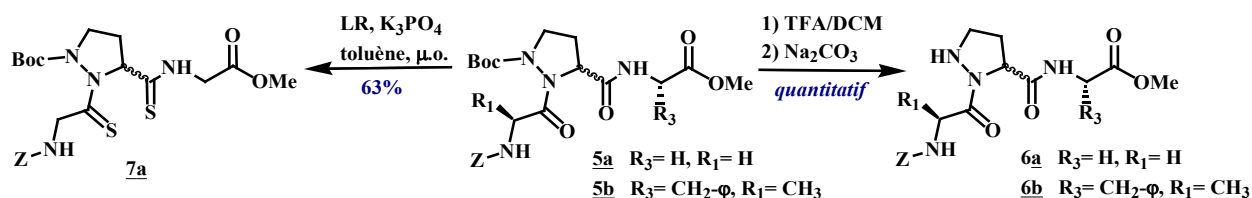


Schéma 22– Synthèse des pseudotriptides **6a**, **6b** et **7a**

Finalement, l'utilisation du réactif de Lawesson et de la base K₃PO₄ avec assistance micro-ondes (105°C, 150W)⁷⁶ a permis une thiocarbonylation sélective des carbonyles impliqués dans les liens peptidiques Gly- δ azaPro et δ azaPro-Gly du pseudotriptide **5a** avec un rendement de 63%. Cette étape de synthèse a permis la formation de liens thioamide et *N*-aminothioamide sans que les carbonyles carbamidiques et l'ester méthylique ne soit touchés.⁷⁷ En effet, il a été répertorié par l'équipe de Ozturk que la réactivité des esters vis-à-vis du réactif de Lawesson nécessitait des conditions beaucoup plus fortes que celles utilisées dans notre cas.⁷⁸ De plus, les carbonyles impliqués dans une liaison carbamidique sont insensibles au réactif de Lawesson d'où la sélectivité de la réaction.

III.4 Synthèse de pseudotriptides de type P₁- δ azaPro(Gly-P₂)-Gly-OP₃

Afin d'étudier la réactivité de l'atome d'azote N ^{δ} du pseudodipeptide **3a**, la protection Boc a été clivée quantitativement au moyen d'une solution de 40% d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane (Schéma 23). Le pseudodipeptide **4c** précédemment généré a été engagé dans une réaction de couplage avec l'acide aminé Boc-Gly-OH en présence d'HATU pour former le pseudotriptide **5c** avec un très bon rendement de 95%.

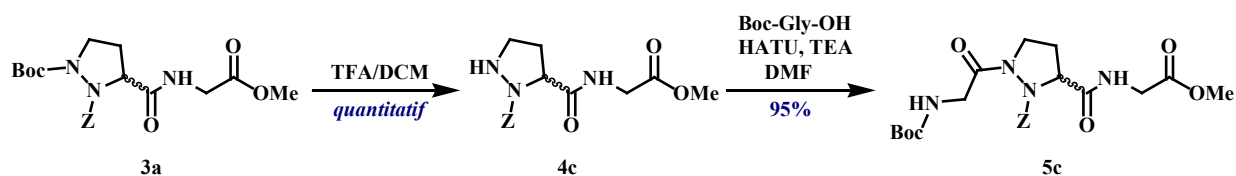


Schéma 23 – Synthèse du pseudotriptide **5c**

La partie N ^{ϵ} -terminale a ensuite été libérée quantitativement de son groupement Z au moyen de palladium sur charbon et de 1,4-cyclohexadiène avec assistance des micro-ondes⁵⁰ générant le composé **6c** de manière

quantitative. (Schéma 24). Malheureusement, le pseudotriptide **6c** est très sensible à l'oxydation et a conduit après plusieurs jours à l'air libre et à température ambiante au produit d'oxydation correspondant **18**.

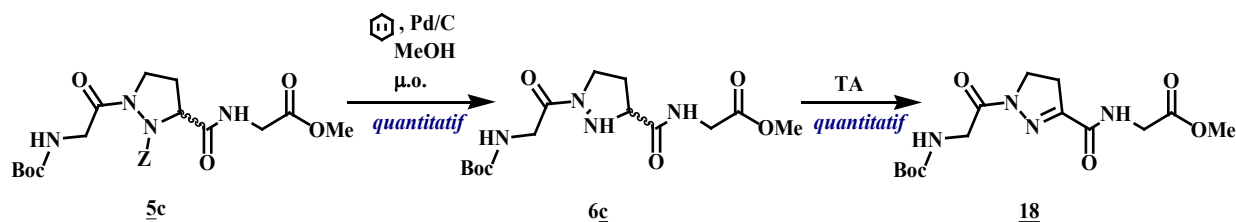


Schéma 24 – Déprotection de l'atome d'azote N ϵ du pseudotriptide **5c**

Nous avons tenté une réaction de thiocarbonylation sur le pseudotriptide **5c** en présence du réactif de Lawesson et de la base K₃PO₄ avec assistance des micro-ondes (105°C, 150W).⁷⁶

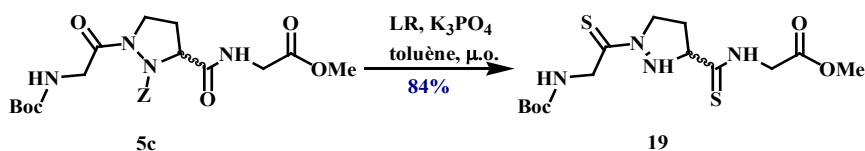


Schéma 25 – Thiocarbonylation et déprotection du groupement Z du pseudotriptide **5c**

Au cours de cette réaction, les carbonyles des liens peptidiques Gly- δ azaPro et δ azaPro-Gly ont bien été transformés en lien *N*-aminothioamide et thioamide, cependant nous avons été confrontées à plusieurs problèmes :

- De manière inattendue, ces conditions ont également conduit à la déprotection de l'azote de la δ -azaproline générant ainsi le pseudotriptide **19** avec un rendement de 84%. Ce résultat est d'autant plus surprenant que la déprotection d'une telle fonction est assez difficile à réaliser sur ce composé car le soufre est connu comme un poison de catalyseur. L'équipe de Meyers a ainsi déterminé que ce type de clivage ne peut être effectué que de manière partielle et uniquement en présence de « black » palladium.⁷⁹
- De plus, le composé **19** s'est avéré très instable à température ambiante et son analyse conformationnelle n'a pas pu totalement aboutir.

Afin de pouvoir tout de même étudier l'influence de l'électronégativité sur la force des liaisons hydrogène lorsque l'atome d'azote supplémentaire de la δ -azaproline est fonctionalisé, nous avons cherché à synthétiser le pseudopeptide **20** (analogue soufré du composé **5b**) (Figure 26) dont le carbonyle impliqué dans le lien peptidique Gly- δ azaPro a été thiocarbonylé.

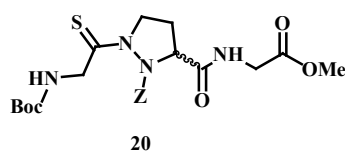


Figure 26 – Pseudopeptide **20**

III.5 Synthèse du pseudotriptide 20

La synthèse a été envisagée de l'extrémité *N*-terminale vers l'extrémité *C*-terminale de manière à thiocarboxyler uniquement le carbonyle du résidu i+2. La protection Boc de la δ -azaproline a été quantitativement clivée en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane en proportion 40 :60 suivie d'un lavage par une solution au bicarbonate de sodium (Schéma 26). L'amine libérée a été engagée dans un couplage peptidique avec le résidu Boc-Gly-OH permettant de générer le pseudodipeptide 22 avec un rendement de 65%. La thiocarboxylation du lien Gly- δ azaPro a été possible en présence du réactif de Lawesson et de phosphate de potassium avec assistance des micro-ondes et a conduit au composé 23 avec un rendement de 64%.

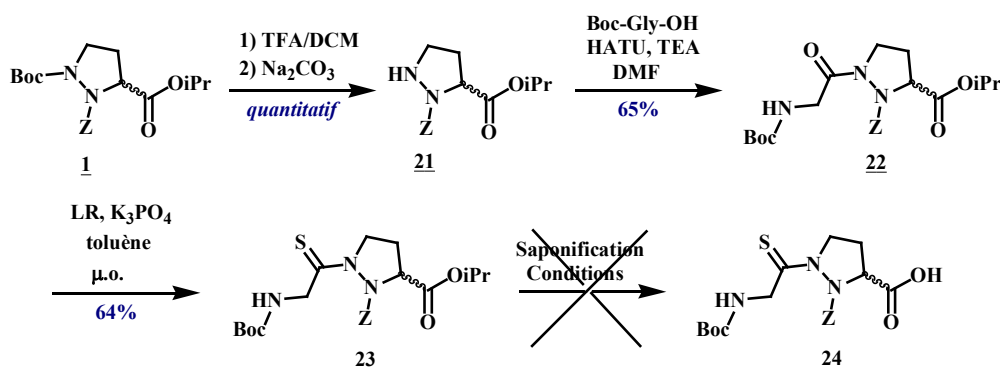


Schéma 26 – Tentative de synthèse du pseudopeptide 24

L'hydrolyse de l'ester isopropylique a été tentée en présence de bases comme l'hydroxyde de sodium ou de lithium, et a conduit à chaque fois à la dégradation du produit de départ. L'analyse de la RMN ^1H n'a pas permis de déterminer le produit qui a été formé. Au vu de ces problèmes d'hydrolyse, la synthèse du pseudotriptide 20 a dû être abandonnée.

IV Composés modèles utiles pour l'analyse conformationnelle

Lors d'analyses conformationnelles, il est important de pouvoir se référer à des composés dit « modèles ». Le but de telles molécules est de faciliter l'interprétation des résultats obtenus en IR, notamment lors de l'attribution des bandes CO en solution. Un composé modèle représente donc une sorte de référence correspondant à un mime de la molécule à étudier.

Le choix des composés modèles s'est donc porté vers les pseudopeptides de type AA- δ azaPro (Figure 27). Afin de pouvoir étudier si la présence d'un atome d'azote supplémentaire protégé a une influence sur la conformation du composé 5a en solution, il nous a semblé judicieux de mener une analyse conformationnelle comparé de 5a avec le peptide Z-Gly-Pro-Gly-OMe 27. Le composé modèle de ce tripeptide sera le composé Z-Gly-Pro-OH 28.

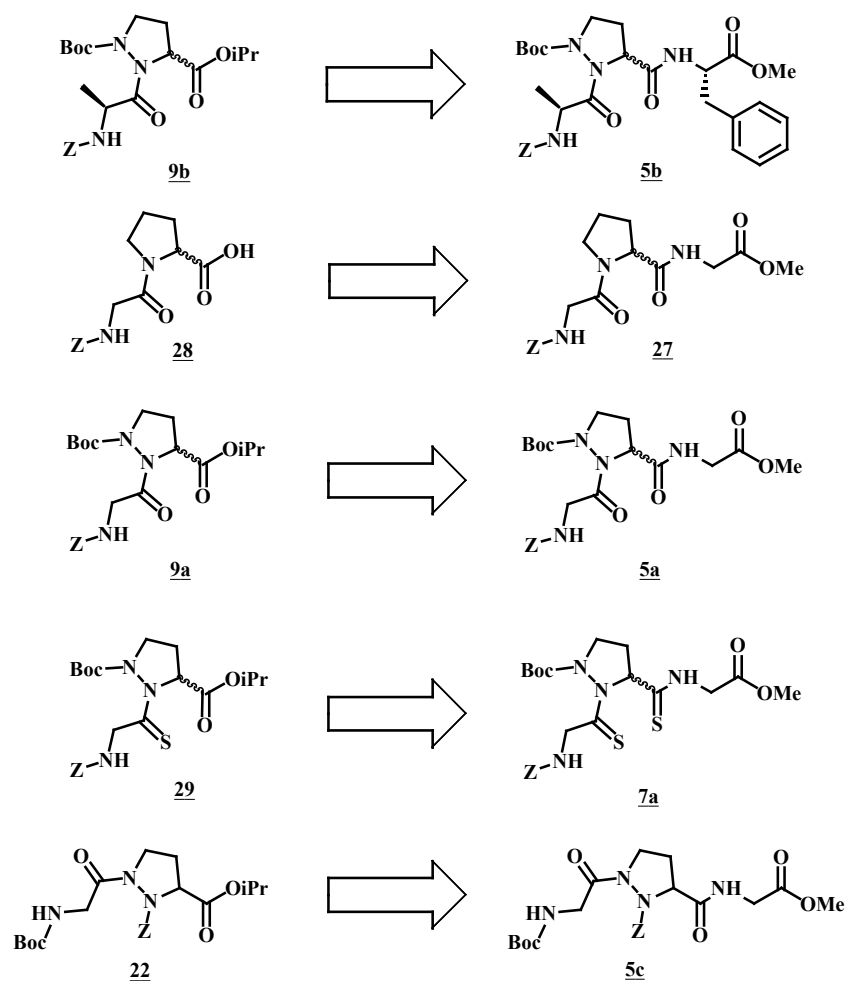


Figure 27 – Composés modèles des molécules **5a**, **5b**, **5c**, **7c** et **27** en vue d'analyses conformationnelles

L'analyse des molécules **9b**, **28**, **9a** et **22** doit permettre de déterminer aisément la valeur des bandes carbonyles impliquées dans le lien peptidique AA- δ azaPro et faciliter leur attribution lors de l'analyse conformationnelle des pseudotripeptides à étudier par spectroscopie infrarouge (voir Partie B de ce chapitre). La synthèse de ces composés modèles a déjà été décrite en amont de ce manuscrit, excepté celles des composés **29**, **27** et **28** qui sont décrites succinctement dans la suite de ce chapitre.

Le composé **29** peut être obtenu à partir du pseudodipeptide **9a** par réaction de thiocarbonylation avec assistance des micro-ondes avec un rendement de 45% (Schéma 27).

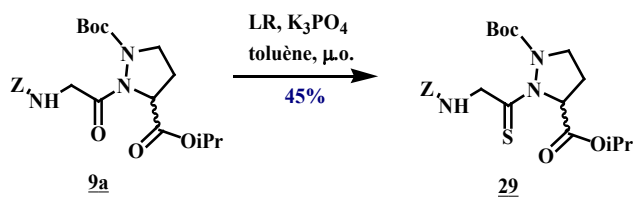


Schéma 27 – Synthèse du composé référence **29**

La synthèse des peptides Z-Gly-Pro-Gly-OMe **27** et Z-Gly-Pro-OH **28** a été envisagée de l'extrémité N-terminale vers C-terminale comme décrite par l'équipe de Schäfer (Schéma 28).⁸⁰

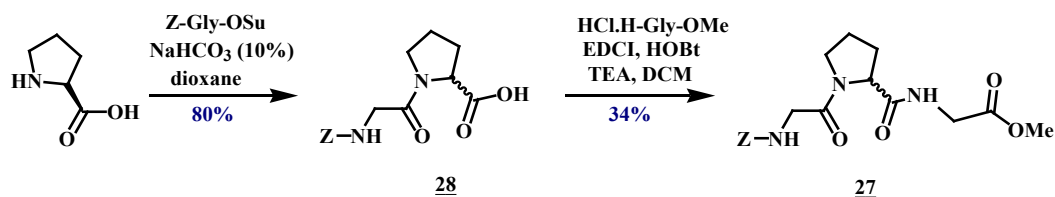


Schéma 28 – Synthèse du tripeptide Z-Gly-Pro-Gly-OMe

Un couplage peptidique entre les composés commerciaux Z-Gly-OSu et H-Pro-OH a permis de former le dipeptide **28** avec un bon rendement de 80%. Dans un second temps, le résidu HCl.H-Gly-OMe a été couplé à l'acide **27** pour générer le tripeptide désiré avec un faible rendement de 34%. Le tripeptide Z-Gly-Pro-Gly-OMe a été obtenu avec un rendement global de 27%.

V Conclusions

La synthèse des pseudotriptides de type Z-AA₁- δ azaPro(Boc)-AA₃-OMe **5a** et **5b** (où AA₁= Gly ou Ala, et respectivement AA₂= Gly ou Phe) a pu être réalisée selon deux méthodes différentes. Une première consistant à intégrer la δ -azaproline au sein des acides aminés par un jeu de déprotections sélectives et couplages peptidiques. Seul le couplage de l'extrémité N^e-terminale s'est avéré délicat du fait de l'oxydation inattendue des composés **4a** ou **4b** conduisant aux pyrazolines **8a** et **8b** correspondantes. Cette voie de synthèse permet de générer les pseudotriptides **5a** et **5b** en 10 étapes avec des rendements respectifs de 29 et 12%.

Nous avons mis au point une seconde stratégie de synthèse qui repose sur une réaction de Mitsunobu intramoléculaire capable de générer le pseudodipeptide Z-Ala- δ azaPro(Boc)-OiPr **9b** en seulement 6 étapes. Les composés **5a** et **5b** ont pu être obtenus avec des rendements respectifs de 10 et 17%. Bien que la synthèse du composé **5b** ait pu être optimisée aussi bien en termes de rendements qu'en nombre d'étapes, cela n'a pas été le cas pour le pseudotripeptide **5a** qui est obtenu avec un meilleur rendement global selon la première méthode malgré un nombre d'étapes supérieur.

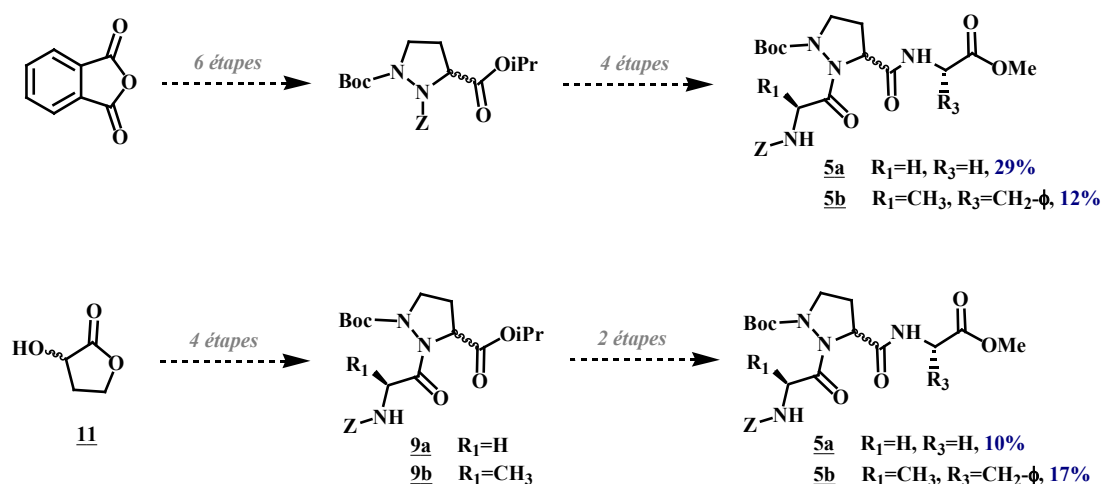


Schéma 29 – Voies de synthèse des pseudotriptides **5a** et **5b**

Il a aussi été possible de déprotéger sélectivement et quantitativement les extrémités N^δ -terminales des pseudotriptides **5a** et **5b** (Figure 28). L'atome d'azote supplémentaire de la δ -azaproline a pu être efficacement fonctionnalisé par la glycine. La déprotection de l'atome d'azote supplémentaire s'est avérée assez délicate du fait de la formation de la pyrazoline **18**. De plus, la thiocarbonylation des composés **5a** et **5b** a été tentée mais seul le pseudotriptide **7a** a pu être identifié comme étant stable.

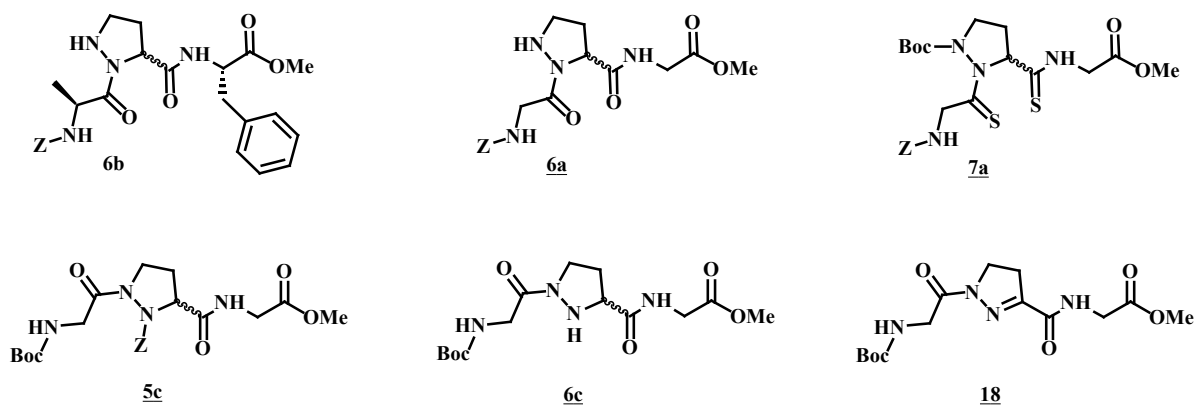


Figure 28 – Nouveaux pseudotriptides synthétisés

La cristallisation de tous ces composés s'est avérée infructueuse car ces produits ont tous été obtenus sous forme d'huile (voir Partie Expérimentale).

I.B Analyse conformationnelle des pseudotripeptides synthétisés

I. Introduction

La seconde partie de ce chapitre est dédiée à l'analyse conformationnelle des pseudotriptides précédemment synthétisés. Afin de déterminer d'éventuelles autostructurations dues à l'établissement de liaisons hydrogène, plusieurs techniques d'analyses spectroscopiques basées sur l'Infrarouge et la Résonance magnétique nucléaire ont été utilisées. Nous décrirons ici brièvement ces différentes méthodes.

I.1 Spectroscopie d'absorption Infrarouge (IR)

Appliquée à nos molécules, cette méthode d'analyse permettra de déterminer si les fonctions NH et CO sont libres et/ou engagées dans une liaison hydrogène.

Dans le spectre IR d'un peptide, les zones couramment étudiées correspondent aux vibrations d'élongation et de déformation des fonctions C=O ($1760-1580\text{ cm}^{-1}$) et NH ($3500-3250\text{ cm}^{-1}$). Ces vibreurs permettent de déterminer si ces fonctions sont liées ou non par liaison hydrogène.

En effet, la littérature indique clairement qu'un proton NH est libre si son nombre d'onde est supérieur à 3400 cm^{-1} .⁸¹ Dans le cas contraire, on observera une bande en deçà de 3350 cm^{-1} . La zone d'élongation comprise entre 3400 et 3350 cm^{-1} est un peu plus délicate à analyser car elle dépend de la nature du proton. En effet, un proton NH amidique est considéré comme lié si son nombre d'onde est compris entre 3400 et 3350 cm^{-1} , contrairement à un proton hydrazidique qui est libre dans cette zone d'élongation.

En ce qui concerne l'analyse des fonctions CO, l'attribution de certaines bandes peut se faire *via* les tables IR. Cependant, cette attribution peut s'avérer assez ardue si plusieurs CO amidiques sont présents au sein d'un composé. De manière à faciliter cette tâche, l'analyse préliminaire de composés modèles est souvent nécessaire.

Dans notre étude nous avons choisi de plus de réaliser une étude IR de tous les composés dans le DMSO afin de définir les valeurs des nombres d'ondes des CO libres. En effet, ce solvant présente la particularité de pouvoir rompre la plupart des liaisons hydrogène intra ou intermoléculaires si celles-ci ne sont pas trop fortes en se liant aux sites donneurs de liaisons hydrogène. A priori, les sites accepteurs de liaisons hydrogène sont de ce fait à l'état libre. Ainsi, la comparaison des nombres d'ondes obtenus dans le DMSO et le solvant d'analyse de nos composés permettra de déterminer si les CO sont dans ce dernier, à l'état libre ou lié. D'un point de vue général, on peut admettre qu'une fonction CO est liée si son nombre d'onde varie d'au moins 5 cm^{-1} vers les champs faibles. La force d'une liaison sera d'autant plus forte que la variation du nombre d'onde sera importante.

Cette méthode est limitée par la transparence des solvants dans les zones à exploiter ainsi que par la multiplicité et le chevauchement des bandes NH et CO. Pour pallier à cela, la déconvolution des bandes CO et NH sera réalisée à l'aide du logiciel OPUS de Bruker et de l'algorithme de Levenberg-Maquard. Cependant, l'IR est un outil de travail très apprécié lors d'analyse conformationnelle car son temps d'expérience court

permet de visualiser des phénomènes conformationnels intermittents qu'il n'est pas possible de voir à l'échelle du temps de la RMN.

I.2 Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire est la méthode physiochimique 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.

I.2.1 La RMN à une dimension

I.2.1.1 Etude de la valeur des déplacements chimiques des protons NH

Appliquée à nos molécules, l'étude des valeurs des déplacements chimiques des protons NH permet de mettre en évidence si un tel proton est libre ou engagé dans une liaison hydrogène.

En effet, si une fonction NH est engagée dans une liaison hydrogène, ce proton aura tendance à être déblindé et son déplacement chimique se verra déplacé dans les champs faibles.

I.2.1.2 Effet de la concentration

Dans notre cas, l'étude de l'influence de la concentration sur les déplacements chimiques des protons NH permet de déterminer si une liaison hydrogène est de type intra ou intermoléculaire.

Dans le cas où un échantillon est concentré, la probabilité de former des liaisons hydrogène intermoléculaire augmente. De ce fait, un proton NH engagé dans une liaison hydrogène intermoléculaire sera très sensible aux variations de concentration : son déplacement chimique se déplacera vers les champs faibles. Dans le cas contraire, le déplacement chimique de ce proton variera très peu en fonction de la concentration.

I.1.2.3 Influence de l'ajout de DMSO

Lors de nos analyses conformationnelles, l'influence du DMSO- d_6 sur les déplacements chimiques des protons NH permettra de déterminer la force d'une liaison hydrogène.

Cette étude repose sur l'évolution des déplacements chimiques des protons NH lors de l'ajout d'un solvant polaire et accepteur de liaison hydrogène (DMSO) dans un solvant peu polaire comme le $CDCl_3$. Si un proton est libre, son déplacement chimique variera rapidement vers les champs faibles car ces protons se lieront par liaison hydrogène avec le groupement sulfoxyde du DMSO. Dans le cas contraire, les protons seront peu affectés par l'ajout de DMSO. Il est à noter qu'une liaison hydrogène sera d'autant plus forte si le déplacement chimique du proton NH ne subit quasiment pas de variation vers les champs faibles.

I.2.2 La RMN à deux dimensions

I.2.2.1 Spectre COSY

L'attribution univoque des signaux et éventuellement le séquençage ultérieur des pseudopeptides sont établis grâce aux techniques particulières de la RMN à deux dimensions. La séquence COSY (COrelated SpectroscopY) permet de corréler 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.^{82,83}

I.2.2.2 Spectre ROESY

Dans notre cas, l'interprétation du spectre ROESY permet de déterminer le type de repliement au sein d'une molécule.

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).⁸⁴ 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 CH_i / NH_i et $C^{\alpha}H_i / NH_{i+1}$ dans une carte NOESY permet le séquençage univoque de l'enchaînement peptidique étudié.

I.3 Description de la méthodologie utilisée lors d'analyse conformationnelle

L'analyse conformationnelle d'un pseudopeptide repose sur l'interprétation de données IR et RMN qui sont complémentaires. La procédure générale nécessaire à toute analyse conformationnelle est décrite ci-dessous.

Dans un premier temps, les analyses IR en solution de composés modèles de type Z-X-ψPro-OP₂ et Z-δazaPro(Boc-Gly)-OiPr (Figure 29) permettront d'une part de déterminer la valeur de la bande du proton NH carbamidique à l'état libre si celui-ci n'est pas impliqué dans une liaison hydrogène dans le CHCl₃, d'autre part de connaître les valeurs des bandes CO libres dans le DMSO-*d*₆ et/ou CHCl₃, en particulier celle du carbonyle amidique qui peut être assez difficile à attribuer.

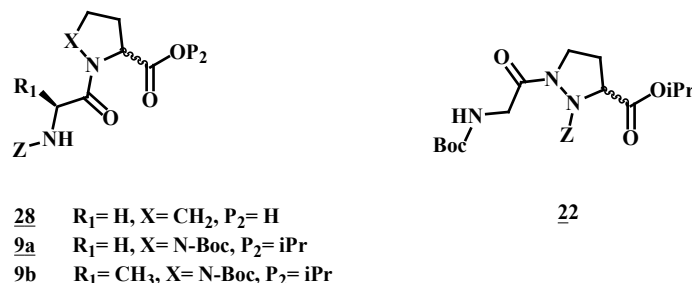


Figure 29 – Composés modèles

Connaissant ces différentes valeurs, l'étude du spectre IR du pseudotriptide à étudier pourra aider à déterminer les protons NH ou carbonyles impliqués dans une liaison hydrogène dans le CHCl₃.

Plusieurs analyses par RMN seront ensuite effectuées. Après avoir attribué univoquement les déplacements chimiques des protons NH à l'aide d'un spectre COSY, ces valeurs seront étudiées de manière à déterminer s'ils sont engagés ou non dans une liaison hydrogène. Cette analyse permettra de valider les différentes hypothèses obtenues lors de l'analyse IR des fonctions N-H. L'influence de la concentration sur les déplacements chimiques des fonctions N-H permettra par la suite de déterminer la nature de la liaison hydrogène : intra ou intermoléculaire. L'influence de DMSO-*d*₆ sur les déplacements chimiques des protons N-H nous donnera une idée de la force de la liaison hydrogène dans laquelle un proton N-H est engagé. Finalement, l'étude de spectre ROESY dans le CDCl₃ à la concentration de 10 mM mettra en évidence la proximité spatiale pour déterminer le type de repliement au sein du pseudotriptide étudié.

II. Analyses conformationnelles des pseudotriptides de type P₂-δazaPro(Boc-Gly)-Gly-OMe

II.1 Analyse par IR du pseudodipeptide **22** : détermination des bandes NH et CO amidique libres

Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier la conformation du composé modèle **22** (Figure 30). Ce pseudodipeptide représente un mime du pseudotriptide **5c** à étudier. Les analyses par IR des bandes NH et CO dans le CHCl₃ permettraient de déterminer si de telles fonctions sont impliquées dans une liaison hydrogène. Dans le cas contraire, l'absence d'auto-structuration permettrait de connaître les valeurs des bandes NH et CO libres et de faciliter en particulier l'attribution des bandes NH carbamidique et du carbonyle du résidu i+2 du pseudotriptide **5c**.

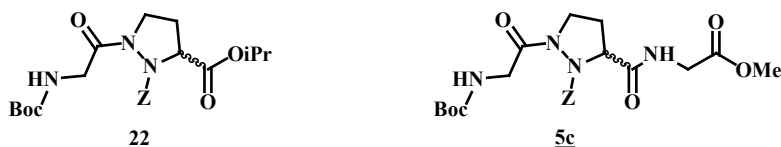


Figure 30 – Pseudodipeptide **22** et pseudotripeptide **5c**

II.1.1 Analyse par IR des fonctions NH du composé modèle **22**

En premier lieu, nous avons tenté de déterminer si le proton NH du composé **22** était impliqué ou non dans une liaison hydrogène dans le CHCl_3 . L'analyse par IR de ce composé modèle est reportée dans la Figure 31.

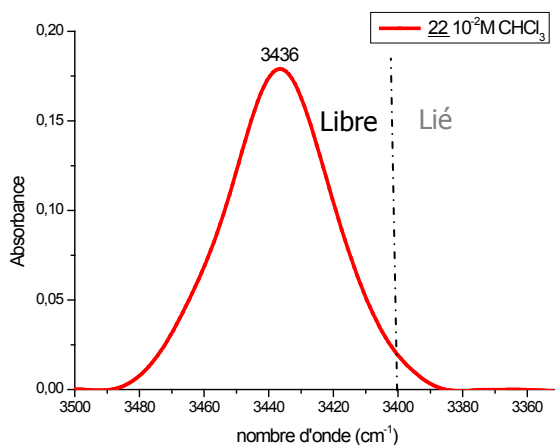


Figure 31 - IR du pseudodipeptide **22** dans la zone d'élongation des liaisons N-H (CHCl_3 / 10mM)

Compte tenu de la structure du composé **22**, nous constatons la présence d'une unique bande au-delà de 3400 cm^{-1} correspondant au NH carbamidique. Cette analyse nous permet de conclure que le proton NH carbamidique du pseudodipeptide **22** n'est pas impliqué dans une liaison hydrogène à la concentration de 10 mM dans le CHCl_3 et possède une vibration d'élongation de 3436 cm^{-1} , valeur qui pourra être utile dans la suite des analyses conformationnelles afin d'attribuer les bandes des protons NH libres. De plus, l'absence de liaison hydrogène nous permet de conclure que tous les CO du composé **22** sont libres dans le CHCl_3 et va nous permettre de déterminer la valeur de toutes ces fonctions lorsqu'elles ne sont pas engagés dans une liaison hydrogène.

II.1.2 Analyse par IR des fonctions CO du composé modèle **22**

Dans un second temps, les bandes CO libres du composé modèle **22** ont été étudiées dans le CHCl_3 à la concentration de 10 mM (Figure 32). D'après les résultats obtenus lors de l'analyse des bandes NH du composé **22**, toutes les valeurs des CO représentées sur ce spectre correspondant à des fonctions carbonyles libres.

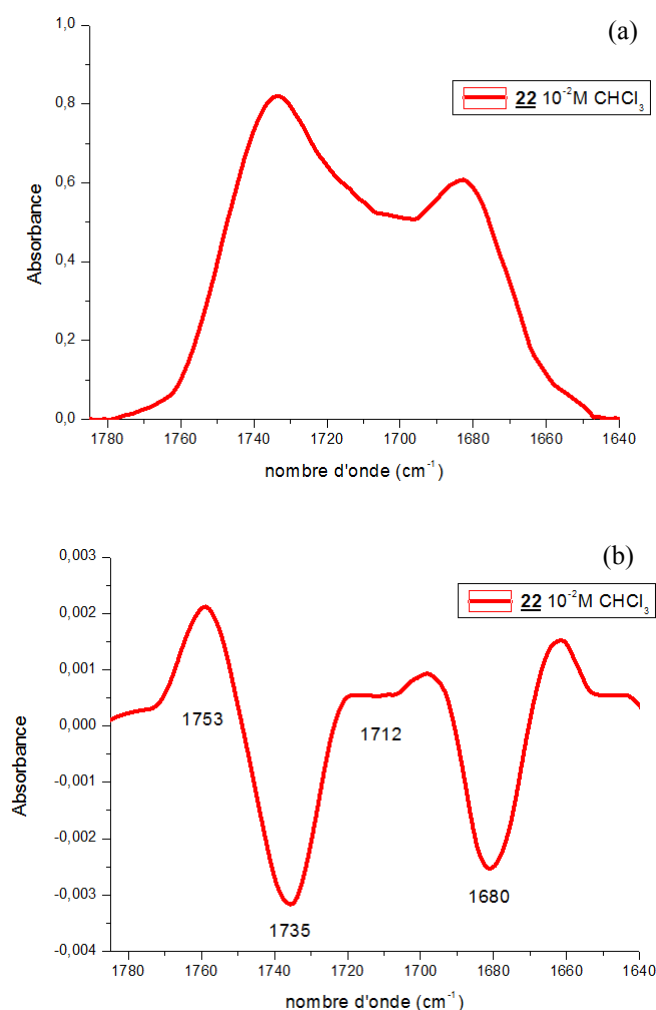


Figure 32 – Spectre IR du pseudodipeptide 22 dans la zone d'élongation des liaisons C=O (CHCl₃ / 10mM)

Le spectre (a) de la Figure 32 correspond au domaine d'élongation des liaisons C=O dans le CHCl₃. Est représentée sur le spectre (b) de cette même figure, la dérivée seconde de la courbe représentée sur le spectre (a), où se distinguent quatre bandes de vibrations correspondant aux différents carbonyles du pseudodipeptide 22 non impliqués dans une liaison hydrogène d'après l'analyse IR de la fonction NH carbamidique libre. Les tables IR permettent d'attribuer facilement les différentes bandes car un vibreur C=O d'un ester est plus élevé que celui d'un C=O carbamidique, qui est lui-même supérieur à un C=O amidique. D'après les attributions réalisées par Felten et Dautrey^{85,86} (Figure 33), les bandes à 1753 et 1680 cm⁻¹ du composé 22 peuvent être respectivement attribuées aux carbonyles de l'ester isopropylique et à celui impliqué dans le lien peptidique Gly-δazaPro.

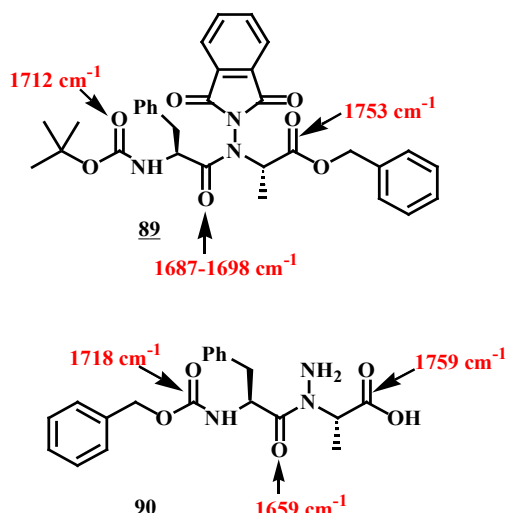


Figure 33 – Nombre d’ondes des différents carbonyles libres de deux *N*-aminodipeptides **89** et **90**^{85,86}

La bande à 1712 cm⁻¹ correspond au C=O de la fonction Boc, tandis que celle à 1735 cm⁻¹ correspond au carbonyle de la protection Z (Figure 34).

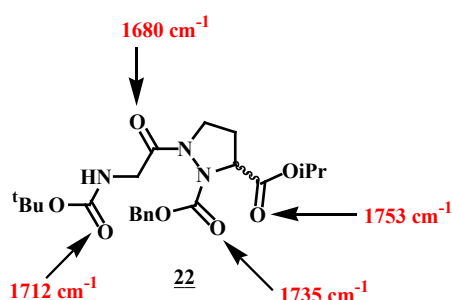


Figure 34 – Attribution des bandes CO du pseudodipeptide **22** (CHCl₃ / 10 mM)

L’analyse de ce spectre a permis d’attribuer les différentes valeurs des bandes CO libres (Boc, Z et Gly-δazaPro) du pseudopeptide dans le CHCl₃, valeurs qui vont permettre de repérer ces fonctions plus facilement lors de l’étude conformationnelle des pseudotriptides **5c**, **6c** et **18** dans le CHCl₃.

II.2 Analyse conformationnelle du pseudotriptide **5c**

II.2.1 Analyse par IR du pseudotriptide **5c**

Le spectre (a) de la Figure 35 correspond au domaine d’élargissement des liaisons N-H dans lequel il est possible de voir une bande en deçà de 3400 cm⁻¹ et deux bandes au-delà de cette même valeur. Nous pouvons attribuer la bande NH à 3436 cm⁻¹ au proton NH carbamidique libre par comparaison avec la valeur obtenue lors de l’analyse par IR du composé modèle **22**. Par déduction la bande à 3463 cm⁻¹ est assignée au proton NH amidique libre. La bande à 3357 cm⁻¹ démontre qu’un des deux protons NH est à la fois libre et impliqué dans une liaison hydrogène.

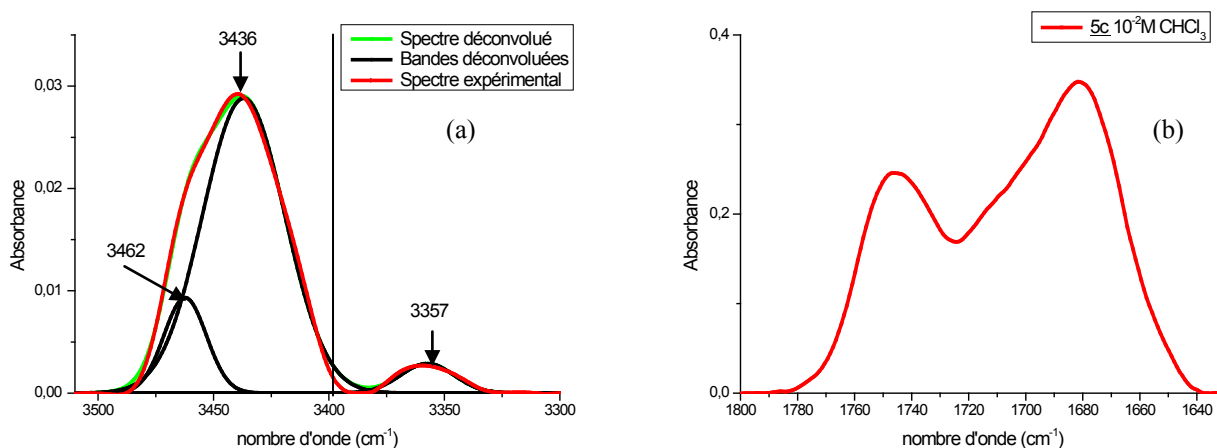


Figure 35 – Spectres IR dans la zone d'élongation des liaisons N-H et des liaisons C=O du pseudotriptide **5c** (CHCl_3 / 10 mM)

Le spectre (b) de la Figure 35 correspond au domaine d'élongation de la liaison C=O. Comme nous pouvons le constater, ce spectre présente des bandes assez larges ce qui laisse penser que certains carbonyles peuvent être à la fois libres ou engagés dans une liaison hydrogène.

Afin de faciliter l'attribution des vibrations des carbonyles du pseudotriptide **5c**, l'IR de ces fonctions a été étudié dans le $\text{DMSO}-d_6$ où tous les carbonyles sont libres (Figure 36).

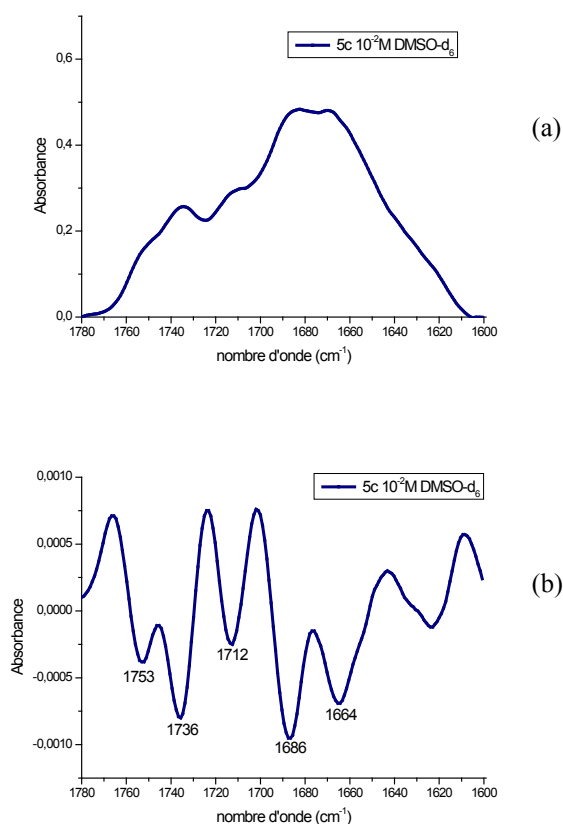


Figure 36 - Spectre IR et dérivée seconde du pseudotriptide **5c** dans la zone d'élongation des liaisons C=O ($\text{DMSO}-d_6$ / 10 mM)

L'analyse de la dérivée seconde (spectre (a)) du pseudotriptide **5c** dans le DMSO ainsi que l'attribution des bandes C=O du pseudodipeptide **22** dans le CHCl₃ permettent d'attribuer aisément la valeur des carbonyles carbamidiques et amidique du lien Gly- δ azaPro dans le DMSO-*d*₆ (Figure 37). Le C=O de l'ester méthylique correspond à la valeur de 1753 cm⁻¹. La comparaison des spectres correspondant à la dérivée seconde dans la zone d'élongation des bandes CO des pseudopeptides **22** et **5c** permet par déduction d'attribuer la bande supplémentaire à 1664 cm⁻¹ au CO du lien peptidique δ azaPro-Gly. La bande aux alentours de 1620 cm⁻¹ ne correspond pas à un carbonyle mais est un artefact dû aux traces de solvants résiduels.

	γ (COOR) (cm ⁻¹)	γ (Boc) (cm ⁻¹)	γ (Z) (cm ⁻¹)	γ (Gly- δ azaPro) (cm ⁻¹)	γ (δ azaPro-Gly) (cm ⁻¹)
Pseudodipeptide 22 (CHCl ₃)	1753 libre (R=iPr)	1712 libre	1735 libre	1680 libre	/
Pseudotriptide 5c (DMSO- <i>d</i> ₆)	1753 (R=Me)	1712	1736	1686	1664

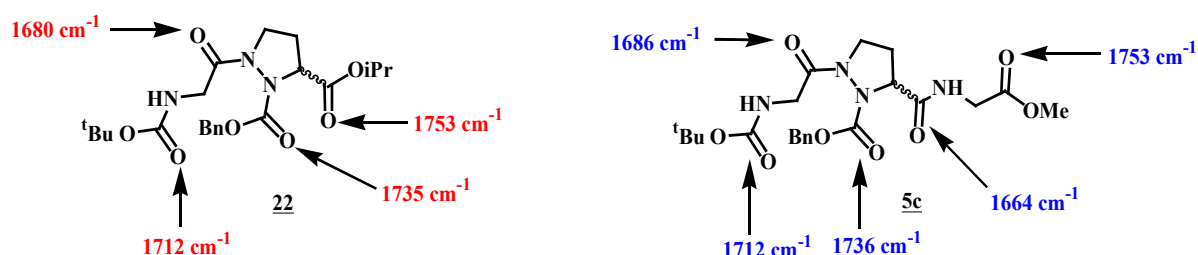


Figure 37 – Attribution des bandes carbonyles des pseudopeptides **5c** et **22** (DMSO-*d*₆ / 10 mM)

Connaissant les valeurs des vibrations d'élongation des carbonyles libres du pseudotriptide **5c** dans le DMSO-*d*₆, nous pouvons analyser la valeur des bandes C=O dans le CHCl₃. L'analyse de la dérivée seconde permet de distinguer quatre pics assez larges à des valeurs de 1749, 1711, 1677 et 1653 cm⁻¹ (Figure 38).

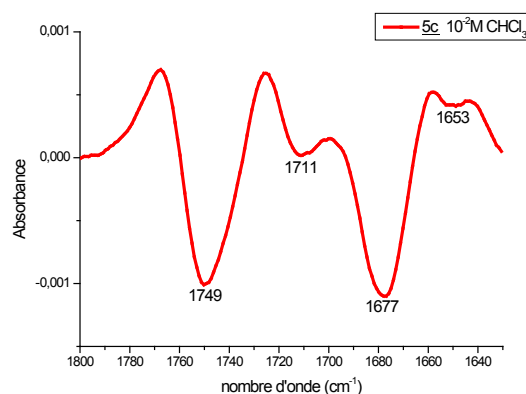


Figure 38 - Spectres IR et dérivées secondes du pseudotriptide 5c dans la zone d'élongation des liaisons C=O (CHCl₃ / 10 mM)

La déconvolution ne peut pas être effectuée uniquement avec ces valeurs car les pics obtenus sont bien trop larges. Les quatre pics principaux ne correspondent donc pas à une seule bande, mais surement à deux, voire plus. Aucun épaulement n'est détecté de manière visible et certaine : la déconvolution des bandes C=O n'a donc pas pu être réalisée dans de telles conditions car l'attribution des bandes supplémentaires aurait été faite de façon très aléatoire.

D'autres solvants ont été testés pour améliorer la résolution de la dérivée seconde dans la zone de vibration d'élongation des fonctions C=O.

Afin de tenter de simplifier le spectre nous avons réalisé une mesure dans le CDCl₃ à une concentration de 10 mM. Les graphes (a) et (b) de la Figure 39 correspondant au domaine de vibration d'élongation des liaisons C=O dans le CDCl₃ et CHCl₃ présentent des allures assez similaires. Les spectres (c) et (d) correspondant à la dérivée seconde sont quelque peu différents car on peut observer la disparition de la bande à 1653 cm⁻¹ lorsque la mesure est effectuée dans le CDCl₃. De manière analogue, la déconvolution des bandes CO n'est pas possible uniquement avec les pics observés sur le graphe (d).

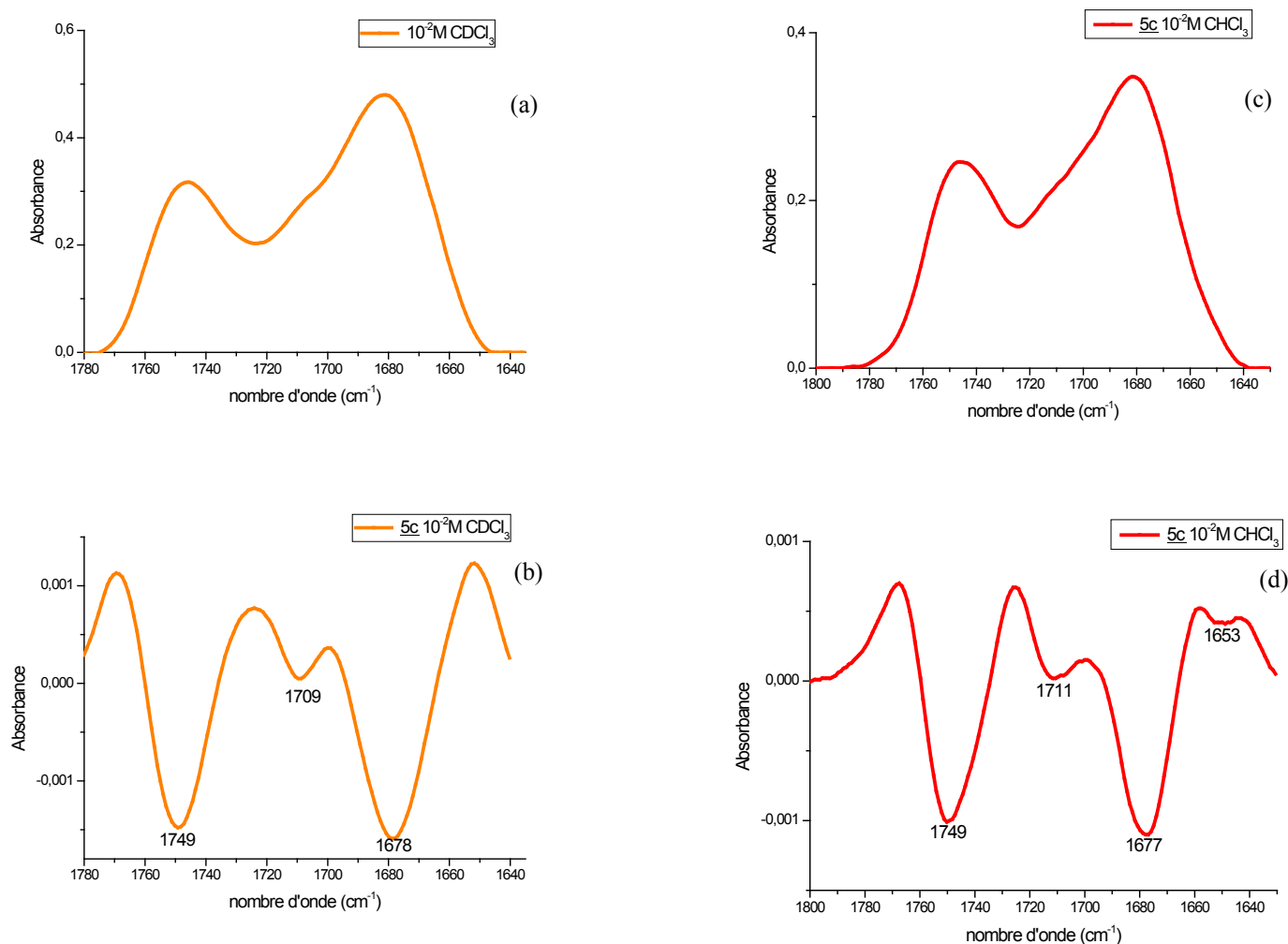


Figure 39 - Spectres IR et dérivées secondes du pseudotriptide 5c dans la zone d'élongation des liaisons C=O (CHCl₃ / 10mM et CDCl₃ / 10 mM)

La concentration de l'échantillon a donc été abaissée à 1mM de manière à déterminer une éventuelle variation du spectre correspondant aux vibrations d'élongation des fonctions C=O : l'intensification d'une bande libre au détriment d'une liée mettrait en évidence la présence d'une liaison hydrogène de nature intermoléculaire car l'abaissement de la concentration est un facteur qui permet de diminuer, voire faire disparaître ce type de liaison hydrogène. Le spectre (b) de la Figure 40 correspondant à la dérivée seconde des bandes C=O du pseudotriptide 5c montre clairement l'intensification du pic à 1710 cm⁻¹ correspondant au C=O du Boc libre. De plus, on observe une meilleure visibilité des pics dans la zone comprise entre 1690 et 1660 cm⁻¹ correspondant à la disparition de la bande C=O du Boc lié par liaison hydrogène. Cependant, même en tenant compte des différents pics, la déconvolution n'a pas été possible car les bandes étaient encore une fois trop larges. Nous pouvons uniquement conclure sur le fait que le carbonyle du Boc est à la fois libre et engagé dans une liaison hydrogène intermoléculaire à la concentration de 10 mM, et uniquement sous forme libre à la concentration de 1 mM.

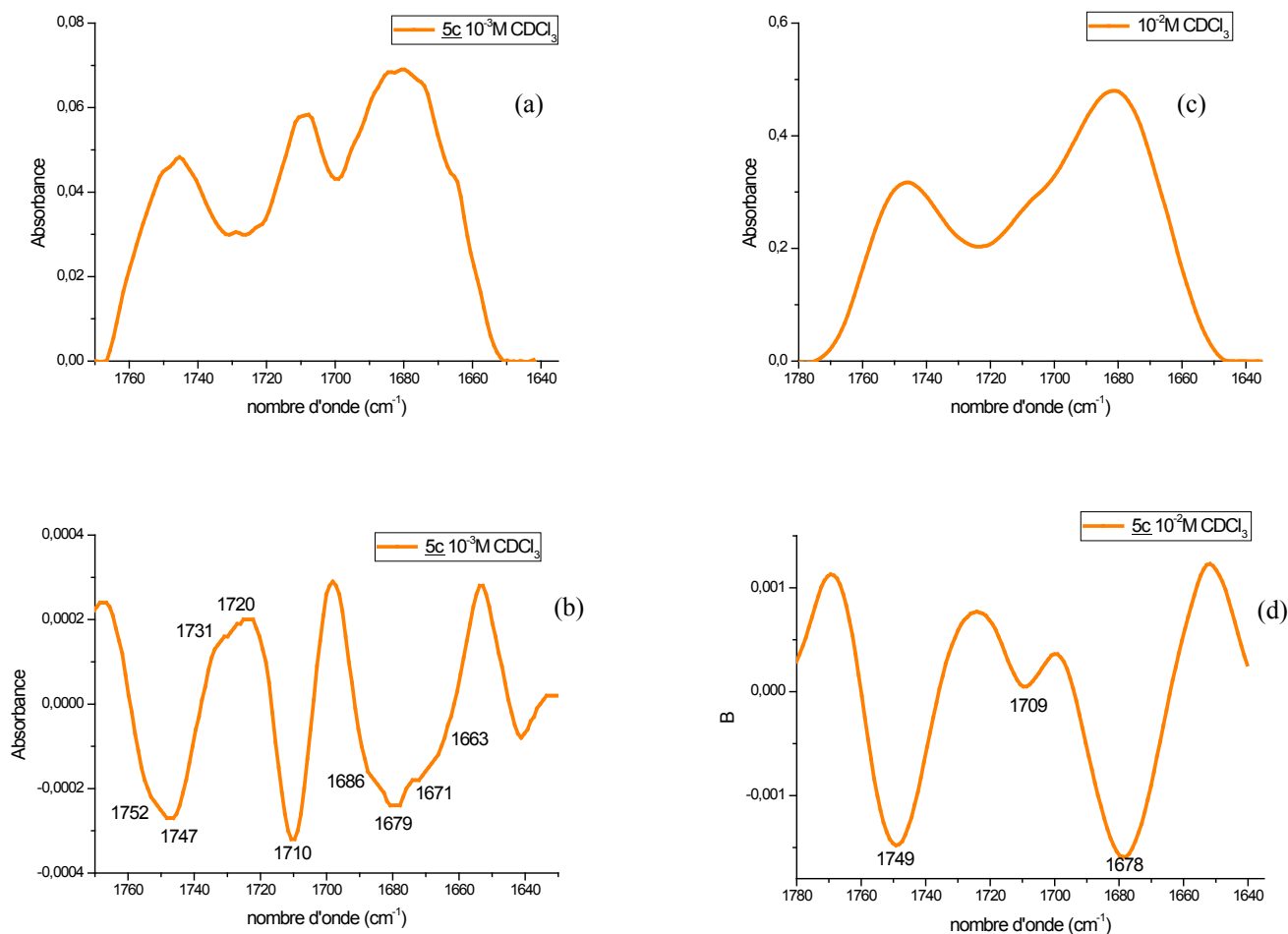


Figure 40 - Spectres IR et dérivées secondes du pseudotripeptide **5c dans la zone d'élongation des liaisons C=O (CDCl₃ / 1 mM et CDCl₃ / 10 mM)**

Malheureusement, l'analyse conformationnelle du pseudotripeptide **5c** ne peut pas être menée à terme dans le solvant CHCl₃ car l'analyse de la dérivée seconde s'est avérée assez compliquée. En effet, les pics observés ne permettent pas de déconvoluer les bandes C=O de manière certaine.

Afin de tenter de résoudre cette analyse, nous avons décidé de changer de solvant et de réaliser le spectre dans le toluène-d₈. Sur le spectre (a) de la Figure 41 correspondant aux vibrations d'élongation des fonctions C=O, on peut distinguer l'apparition d'une bande à 1720 cm⁻¹ dans le toluène-d₈ qui n'était pas présente dans le solvant CDCl₃ (spectre (c)). L'analyse du spectre de la dérivée seconde dans la zone de vibration d'élongation des fonctions C=O dans le toluène-d₈ (Figure 41, spectre (b)) permet de mettre en évidence la présence de quatre pics assez larges (à 1749, 1722, 1690 et 1654 cm⁻¹) qui laissent à leur tour penser que plusieurs bandes se cachent sous chacun de ces massifs. De plus, si l'on compare les pics obtenus dans les solvants toluène-d₈ (spectre (b)) et CHCl₃ (spectre (d)), on peut constater que deux pics sortent aux mêmes nombres d'ondes (1749 et 1654 cm⁻¹) tandis que les deux autres ont des écarts d'environ 12 cm⁻¹.

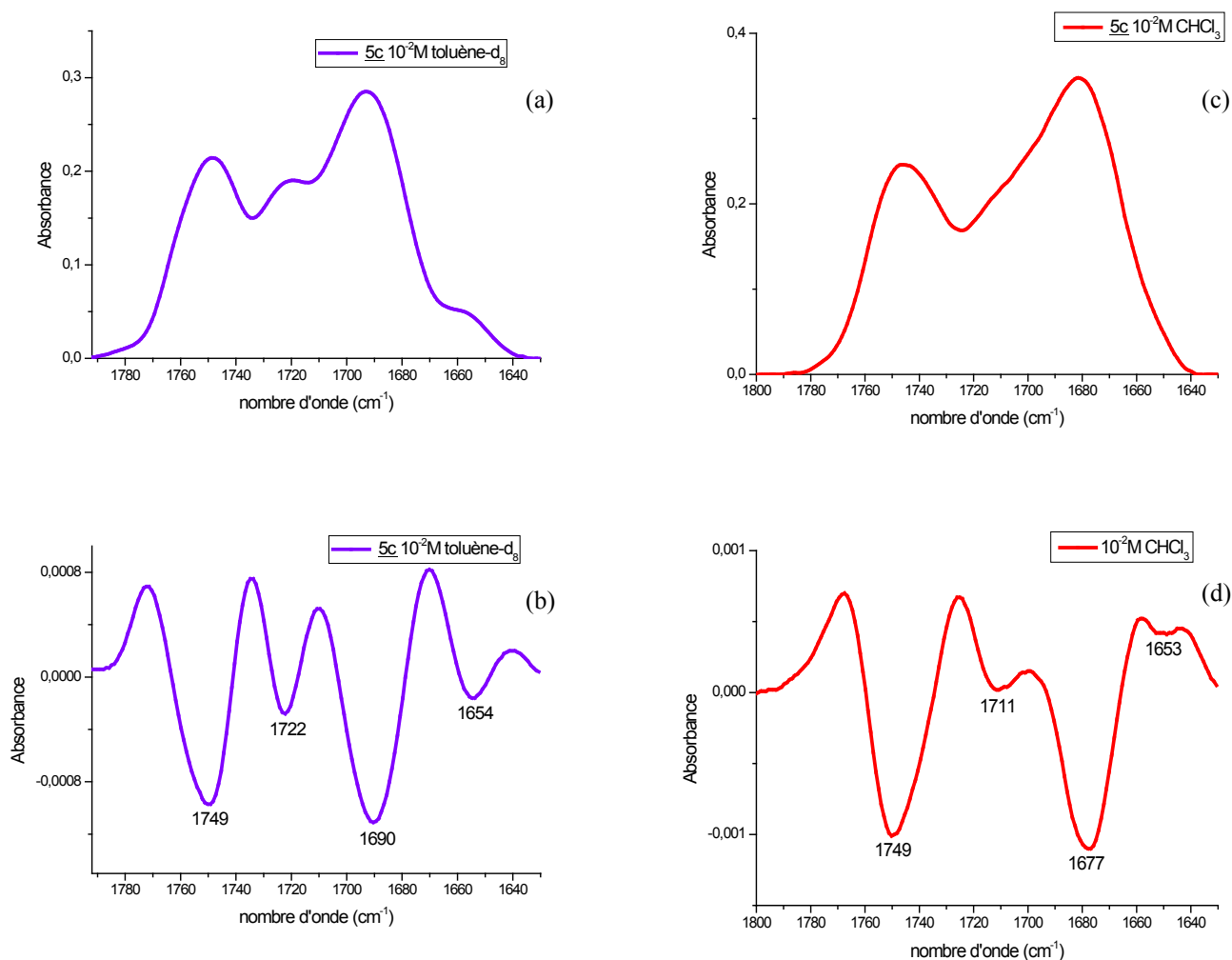


Figure 41 - Spectres IR et dérivées secondes du pseudotriptide 5c dans la zone d'élongation des liaisons C=O (toluène- d_8 / 10 mM et $CHCl_3$ / 10 mM)

Au vu de la dérivée seconde et de la largeur des pics du spectre IR dans la zone d'élongation des fonctions CO, la déconvolution s'est avérée impossible à réaliser dans le toluène- d_8 .

II.2.2 Etude de la valeur des déplacements chimiques de protons NH

Sont rassemblés dans le Tableau 10, les valeurs des déplacements chimiques des protons NH du pseudotriptide 5c.

δ NH amidique (ppm)	δ NH carbamidique (ppm)
7.33	5.37

Tableau 10 – Attribution des déplacements chimiques des protons NH du pseudotriptide 5c

La valeur des déplacements chimiques permettent d'affirmer que le proton NH carbamidique est libre par comparaison avec la valeur obtenue pour le composé modèle 22 ($\delta=5.21$ ppm). De plus, le proton NH amidique se comporte comme s'il était lié en solution car son déplacement chimique beaucoup plus élevé que celui du

proton NH carbamidique met en évidence son implication dans une telle interaction électrostatique. En effet, un proton NH engagé dans une liaison hydrogène aura tendance à être déblindé et voir son déplacement chimique situé dans les champs faibles ce qui confirme bien le caractère lié du proton NH amidique du pseudotriptide **5c**.

Nous pouvons donc en conclure que la liaison hydrogène intermoléculaire au sein du pseudotriptide **5c** se fait entre le CO du groupement Boc et le NH amidique.

II.2.3 Influence du DMSO- d_6

De façon à déterminer la force de la liaison hydrogène dans laquelle le CO du Boc et le proton NH amidique sont impliqués, une gamme de solvant a été réalisée à la concentration de 10 mM. Les déplacements chimiques des protons amides ont été mesurés en fonctions du pourcentage volumique en DMSO (de 0 à 100%). Les travaux de Lecoq menés au laboratoire ont montré qu'il était nécessaire d'aller au-delà d'un pourcentage de 10% en DMSO- d_6 pour que les protons NH libres puissent établir une liaison hydrogène avec le DMSO. Les variations des déplacements des protons NH sont reportées dans la Figure 42.

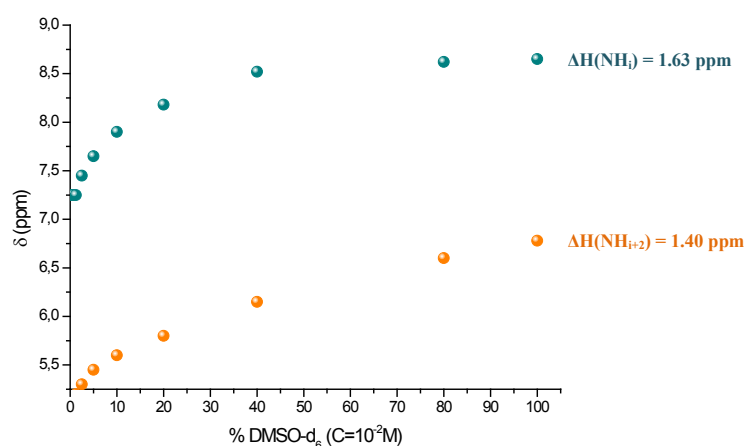


Figure 42 – Influence du DMSO- d_6 sur les déplacements chimiques des protons NH de **5c**

Ces deux déplacements subissent fortement l'augmentation de la concentration en DMSO- d_6 . Les variations de 1.63 ppm du proton NH du résidu i+2 et de 1.40 ppm du proton NH du résidu i indiquent qu'il se comporte respectivement comme s'il était libre et engagé dans une liaison hydrogène très faible.

Cette gamme de solvant permet ainsi de déterminer que la liaison intermoléculaire dans laquelle le C=O du Boc et le proton NH amidique sont impliqués à 10 mM est une interaction relativement faible.

II.2.3 Conclusions

Le comportement du pseudotriptide **5c** en solution est assez variable en fonction du solvant utilisé: les pics observés en dérivée seconde n'ont pas les mêmes nombres d'onde et les intensités sont très différentes. Nous pouvons seulement conclure sur le fait que le carbonyle du groupement Boc est impliqué dans une liaison hydrogène intermoléculaire avec le proton NH amidique dans le solvant CDCl₃ à la concentration de 10 mM. Cette faible interaction intermoléculaire disparaît à la concentration de 1 mM, où le carbonyle du Boc devient libre.

II.3 Analyse conformationnelle du pseudotriptide **18**

II.3.1 Analyse par IR du pseudotriptide **18**

L'analyse du spectre IR du composé **18** a (Figure 43) été effectuée avec le même raisonnement que celui décrit pour le pseudotriptide **5c**.

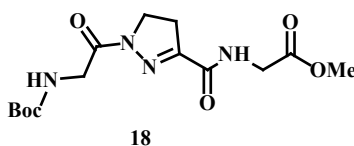


Figure 43 – Pseudotriptide **18**

Dans un premier temps, une première mesure par IR à 10 mM a été effectuée dans le DMSO-*d*₆ afin de déterminer la valeur des C=O lorsque ceux-ci ne sont pas engagés dans une liaison hydrogène. Le spectre (b) de la Figure 44 montre clairement la présence de cinq pics à 1753, 1733, 1710, 1689 et 1672 cm⁻¹.

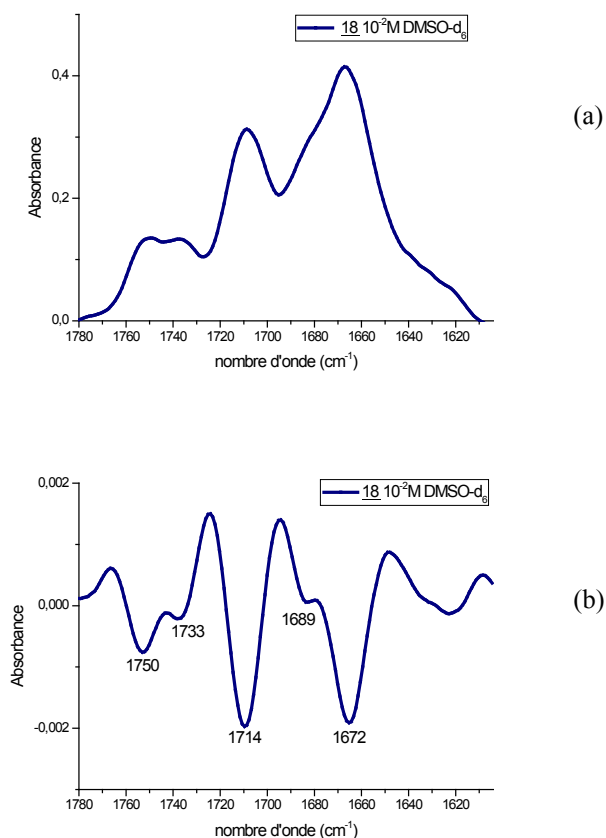


Figure 44 – Spectre IR et dérivée seconde du pseudotriptide **18 dans la zone d’élargissement des liaisons C=O (DMSO-*d*₆ / 10 mM)**

Ces différentes valeurs ont pu être attribuées facilement par comparaison avec le spectre obtenu pour le pseudotriptide **5c** dans le DMSO-*d*₆ (Tableau 11). Les pics à 1750, 1714, 1689 et 1672 cm⁻¹ correspondent aux carbonyles du pseudotriptide **18**, tandis que celui à 1733 cm⁻¹ correspond à celle de la fonction C=N.

	γ (COOMe) (cm ⁻¹)	γ (C=N) (cm ⁻¹)	γ (Boc) (cm ⁻¹)	γ (Gly- δ azaPro) (cm ⁻¹)	γ (δ azaPro-Gly) (cm ⁻¹)
Pseudopeptide 18	1750	1733	1714	1689	1672
Pseudopeptide 5c	1753	/	1712	1686	1664

Tableau 11 – Attribution des bandes C=O et C=N de **18 dans le DMSO-*d*₆**

Une seconde mesure a été effectuée dans le CHCl₃ à la concentration de 10 mM de manière à déterminer la présence de liaison hydrogène au sein du composé **18** en solution. Les spectres IR et dérivée seconde du pseudotriptide **18** dans les zones d’élargissement respectives des liaisons C=O et N-H sont représentés dans la Figure 45.

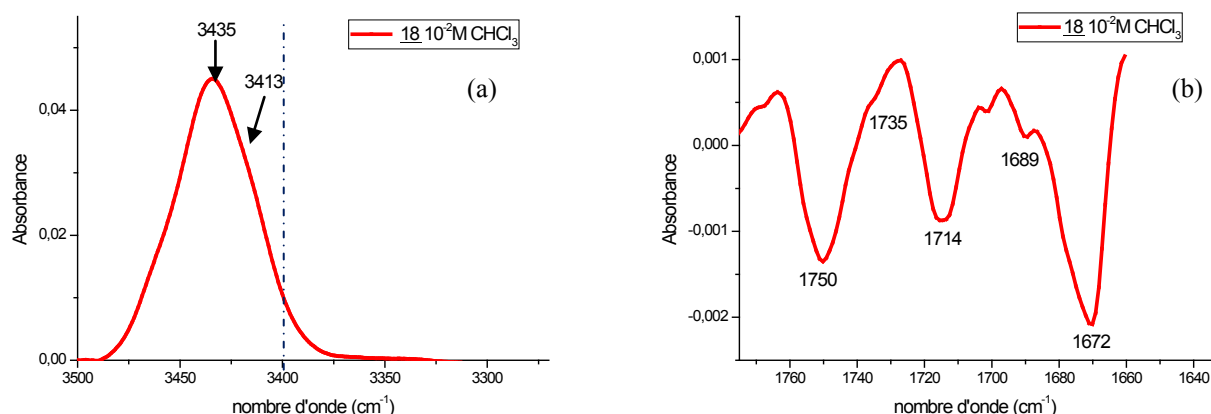


Figure 45 - Spectres IR dans la zone d'élongation des liaisons N-H et dérivée seconde dans la zone d'élongation des liaisons C=O du pseudotripeptide **18 (CHCl_3 / 10 mM)**

Le spectre (a) de la Figure 45 montre très clairement que les protons NH du pseudotripeptide **18** sont libres dans le CHCl_3 à la concentration de 10 mM. Nous pouvons même déterminer de façon certaine que la valeur de la bande du proton N-H carbamidique libre est de 3435 cm^{-1} par comparaison avec la valeur obtenue pour la bande NH du résidu i+2 du pseudotripeptide **5c**. Par déduction, la bande à 3413 cm^{-1} est assignée au proton NH amidique libre.

Avec cette attribution, nous avons pu procéder à la déconvolution des bandes C=O et C=N (Figure 46). 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 selon un modèle Gaussien.

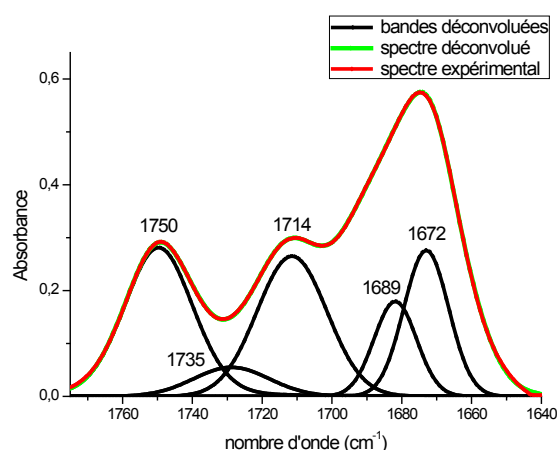


Figure 46 – Déconvolution des bandes C=O du composé **18 (CHCl_3 / 10 mM)**

Le caractère libre des bandes C=O et C=N du composé **18** dans le CHCl_3 a pu être effectuée en comparant les valeurs de ces bandes avec celles des carbonyles libres obtenus dans le $\text{DMSO}-d_6$ du composé **18**. Les bandes à 1750 et 1714 cm^{-1} correspondent respectivement aux carbonyles de l'ester méthylique et du groupement protecteur Z. Quant à celles observées à 1689 et 1672 cm^{-1} , elles peuvent être respectivement attribuées aux

fonctions C=O des liaisons peptidiques Gly- δ azaPro, et respectivement δ azaPro-Gly. Finalement, la liaison C=N a pu être identifiée avec un nombre d'onde de 1735 cm^{-1} grâce à la précédente mesure dans le DMSO- d_6 .

Ainsi les différentes bandes des fonctions CO et NH dans le CHCl_3 et le DMSO- d_6 ont pu être attribuées comme décrit dans la Figure 47. Sont représentées en bleu et rouge, les fonctions carbonyles libres respectivement dans le DMSO- d_6 et le CHCl_3 . En noir, sont décrites les valeurs des fonctions NH libres dans le CHCl_3 .

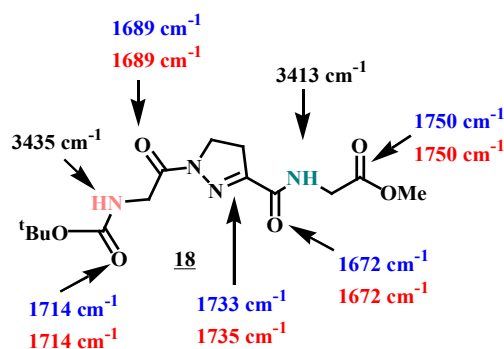


Figure 47 – Attributions des bandes des fonctions CO et NH dans le DMSO- d_6 et CHCl_3 du pseudotriptide **18**

II.3.2 Conclusions

L'IR seul nous a permis de déterminer que le pseudotriptide **18** ne formait aucune liaison hydrogène dans le CHCl_3 à une concentration de 10 mM.

II.4 Analyse conformationnelle du pseudotriptide **6c**

II.4.1 Analyse par IR des bandes NH et CO du pseudotriptide **6c**

L'analyse conformationnelle du pseudotriptide **6c** a ensuite été envisagée (Figure 48).

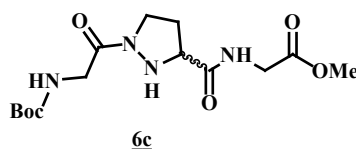


Figure 48 – Pseudotriptide **6c**

L'étude du spectre IR dans la zone d'élongation des fonctions N-H a été réalisée dans le CHCl_3 à la concentration de 10 mM (Figure 49). L'analyse de la déconvolution des bandes NH permet de mettre en évidence la présence de trois bandes au-delà de 3400 cm^{-1} correspondant à trois fonctions N-H libres à des valeurs de 3457, 3433 et 3414 cm^{-1} . De plus, nous pouvons observer une bande à 3390 cm^{-1} qui peut être assignée au proton NH hydrazidique libre. En effet Aitken *et al.*⁸⁷ ont déjà pu attribuer plusieurs valeurs de proton NH hydrazidique libre pour des valeurs comprises entre 3400 et 3350 cm^{-1} . A ce stade, nous pouvons

nous apercevoir que quatre bandes NH libres sont identifiables par analyse infrarouge. Or le pseudotriptide **6c** n'est constitué que de trois protons N-H. De plus si l'on observe la valeur des fonctions NH dont le nombre d'onde est supérieur à 3400 cm^{-1} , nous pouvons nous apercevoir que la valeur à 3414 cm^{-1} correspond à la valeur du proton NH amidique du composé **18** en comparant avec le spectre IR des bandes NH de la Figure 47. Il a été décrit dans le précédent chapitre que l'oxydation spontanée de la liaison $\text{CH}^{\alpha}\text{-NH}$ du pseudotriptide **6c** conduisait à la formation de la pyrazoline **18** en seulement 48h. Il y a donc de forte chance que l'oxydation ait déjà commencée au moment de l'analyse IR bien que celle-ci ait été effectuée juste après l'obtention du produit désiré. Le spectre IR de la Figure 49 correspond donc aux vibrations d'élongation des fonctions N-H d'un mélange de composés **6c** et **18**.

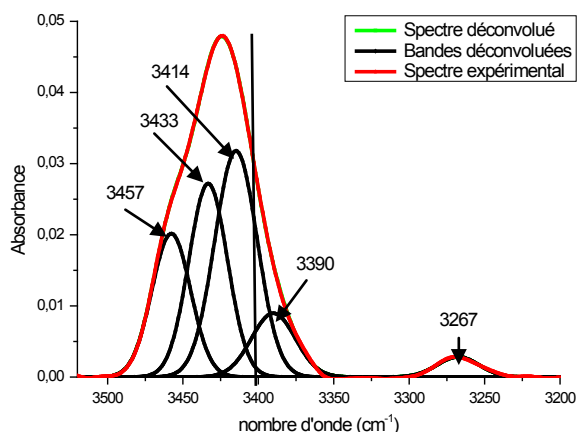
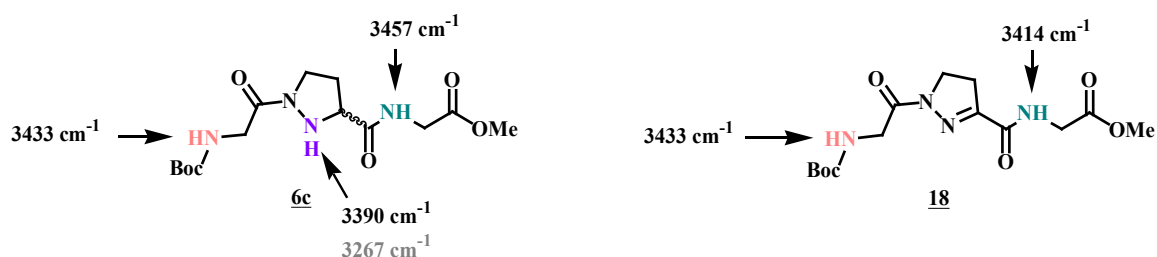


Figure 49 - Spectre IR du pseudotriptide **6c** dans la zone d'élongation des liaisons N-H (CHCl_3 / 10 mM)

Les différentes bandes correspondant aux protons NH libres peuvent tout de même être attribuées par comparaison avec les résultats obtenus lors de l'analyse IR des composés **5c** et **18** (Figure 50). Sont représentées en gris, les fonctions NH liées dans le CHCl_3 . En noir, sont décrites les valeurs des fonctions NH libres dans le CHCl_3 .



Libre			Lié
v NH carbamidique (cm^{-1})	v NH amidique (cm^{-1})	v NH hydrazidique (cm^{-1})	v NH hydrazidique (cm^{-1})
3433	3457	3414	3390
18 et 6c	6c	18	6c

Figure 50– Attribution des fonctions N-H présentes sur le spectre de la Figure 49 (CHCl_3 / 10 mM)

Par ailleurs, il est possible d'observer une bande à 3267 cm^{-1} qui correspond à une fonction N-H impliquée dans une liaison hydrogène. Cette bande semble a priori correspondre à un proton NH hydrazidique lié du fait de sa faible valeur. En corrélant ce résultat avec l'analyse des bandes NH libres, il est possible d'affirmer qu'un proton NH du pseudotriptide **6c** est à la fois libre et engagé dans une liaison hydrogène.

Bien que l'oxydation du pseudotriptide **6c** ait déjà débuté au moment de la mesure, nous avons tout de même décidé de nous intéresser aux valeurs des bandes C=O. Afin d'attribuer ces bandes plus facilement, le spectre IR du pseudotriptide **6c** a été réalisé à la concentration de 10 mM dans le DMSO- d_6 (Figure 51). La dérivée seconde dans la zone d'élongation des fonctions C=O montrent la présence de cinq pics en deça de zéro correspondant à cinq bandes. La valeur de 1735 cm^{-1} correspond au vibreur de la liaison C=N du pseudotriptide **18**: l'oxydation du lien NH-CH^a est aussi visible dans la zone d'élongation des fonctions C=O. Il n'a donc pas été possible d'obtenir un spectre où le composé **6c** était isolé compliquant ainsi la déconvolution des bandes C=O. L'analyse du spectre IR dans la zone d'élongation des fonctions C=O n'est donc pas possible pour ce composé.

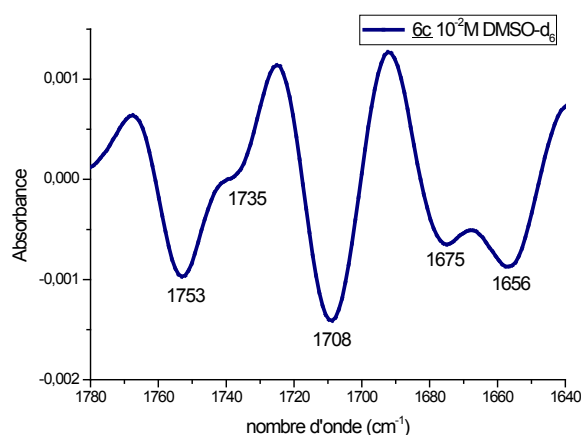


Figure 51 - Dérivée seconde du pseudotriptide **6c** dans la zone d'élongation des liaisons C=O (DMSO- d_6 / 10 mM) et attribution des bandes NH

II.4.2 Analyse par RMN : Influence de la concentration sur le pseudotriptide **6c**

Sont rassemblés dans le Tableau 12, les valeurs des déplacements chimiques des protons NH du pseudotriptide **6c**.

δ NH amidique (ppm)	δ NH carbamidique (ppm)	δ NH hydrazidique (ppm)
7.86	5.41	4.80

Tableau 12 – Attribution des déplacements chimiques des protons NH du pseudotriptide **6c**

Une gamme de concentration dans le CDCl_3 a été réalisée (Figure 52) afin de connaître la nature intra ou intermoléculaire de cette liaison hydrogène (entre les composés **18** et **6c** ou uniquement entre les molécules **6c**). L'étude de cette gamme de concentration montre très clairement que les déplacements chimiques des protons NH ne varient pas en fonction de la concentration, ce qui signifie que la liaison hydrogène est de nature

intramoléculaire. A ce stade, nous pouvons affirmer que le pseudotriptide **6c** possède une fonction N-H à la fois libre et engagée dans une liaison hydrogène intramoléculaire.

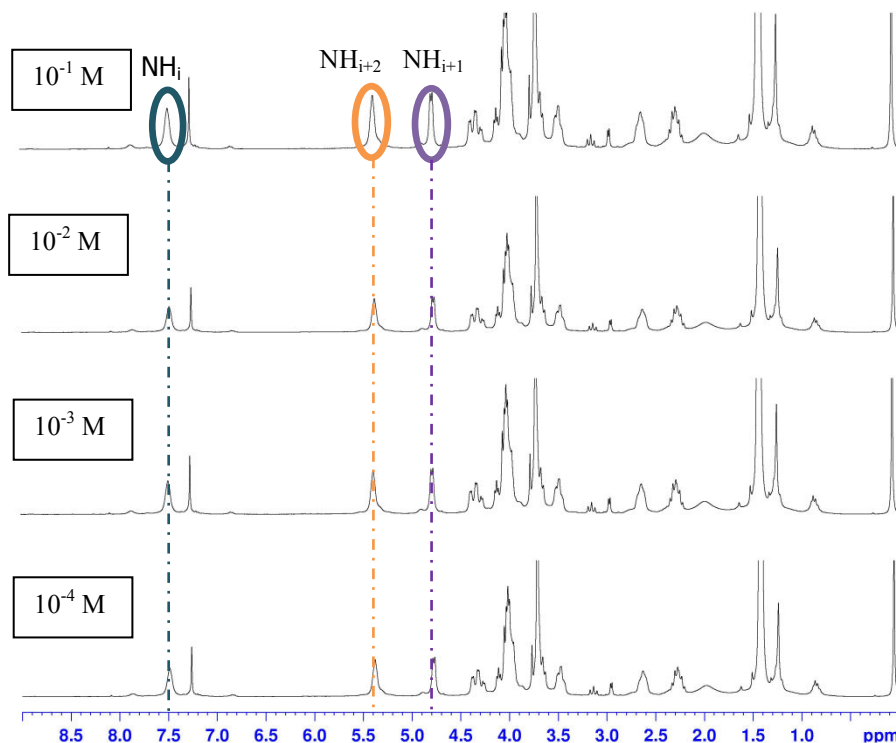


Figure 52 – Spectres RMN ^1H de **6c** à différentes concentrations (de 10^{-1} à 10^{-4} M) dans le CDCl_3

II.4.3 Influence du $\text{DMSO}-d_6$

En dernier lieu, nous avons tenu à étudier l'influence du $\text{DMSO}-d_6$ sur les déplacements chimiques protons NH du pseudotriptide **6c**. Cette série de mesure ne permettra pas de déterminer quel proton NH est lié par liaison hydrogène intramoléculaire, mais d'en déduire si la liaison formée au sein de **6c** est une interaction forte ou assez faible en comparant les différentes variations obtenues pour chaque proton NH. L'étude de la sensibilité des déplacements chimiques des protons NH en fonction de la composition du mélange ($\text{DMSO}-d_6 / \text{CDCl}_3$) par RMN est reportée dans la Figure 53. Les variations de 0.95 et 1.10 ppm des protons NH de la δ -azaproline et NH du résidu i indiquent la possibilité d'un équilibre entre une population libre ou liée par liaison hydrogène faible. En ce qui concerne le proton NH du résidu i+2, une variation de 1.48 ppm est observée lors de l'ajout de $\text{DMSO}-d_6$: ce proton se comporte comme s'il n'était pas engagé dans une liaison hydrogène.

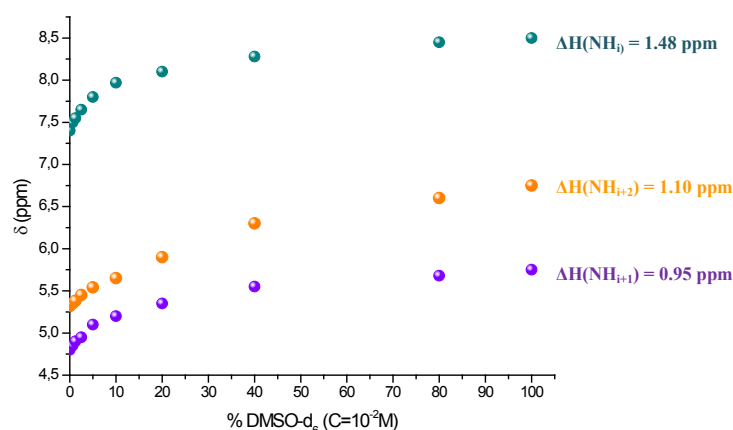


Figure 53 - Influence du DMSO-*d*₆ sur les déplacements chimiques des protons NH de **6c**

II.4.4 Conclusions

Comme pour le pseudotriptide **5c**, l'analyse conformationnelle du composé **6c** n'a pas pu être menée jusqu'au bout. Il est seulement possible d'affirmer que le composé déprotégé **6c** forme une liaison hydrogène intramoléculaire assez faible en solution dans le CHCl₃. Cette liaison impliquerait *a priori* le proton NH hydrazidique.

III. Analyses conformationnelles du peptide 27 et des pseudotriptides de type Z-Gly-δazaPro(P₂)-Gly-OMe

III.1 Analyse conformationnelle du tripeptide **27**

III.1.1 Analyse par IR des fonctions NH des composés **28** et **27**

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus par E. Humbert-Voss, nous avons choisi d'étudier la conformation du dipeptide modèle Z-Gly-Pro-OH **28** et du tripeptide modèle Z-Gly-Pro-Gly-OMe **27** (Figure 54) afin de mettre en évidence les changements conformationnels occasionnés par la présence d'un atome d'azote supplémentaire protégé.

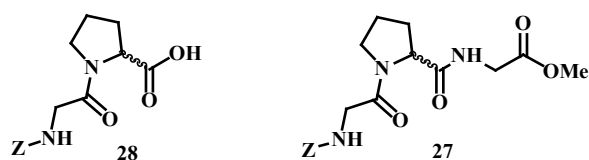


Figure 54 – Peptides **28** et **27**

De façon préliminaire nous avons analysé le spectre IR du dipeptide Z-Gly-Pro-OH **28** dans le CHCl₃ à une concentration de 10 mM afin de déterminer si ce proton est libre en solution et de pouvoir ainsi attribuer sa

valeur. Sur le spectre de la Figure 55 est représenté le spectre IR du dipeptide Z-Gly-Pro-OH **28** dans la zone d'élongation des vibrateurs N-H. Dans cette zone d'étude, il est possible de distinguer une bande, dont le nombre d'onde est de 3442 cm^{-1} , qui correspond à la bande du proton NH carbamidique libre.

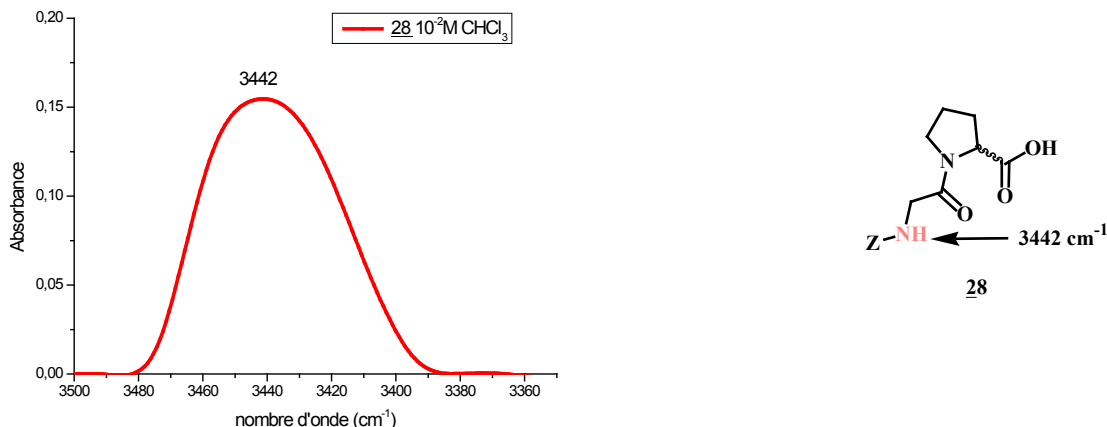


Figure 55 – Spectre IR du dipeptide Z-Gly-Pro-OH **28** dans la zone d'élongation des liaisons N-H (CHCl_3 / 10 mM) et attribution de la bande NH carbamidique

Dans un second temps, un spectre IR du tripeptide **27** a été réalisé à la concentration de 10 mM dans le CHCl_3 afin de déterminer la formation d'éventuelle liaison hydrogène en solution (Figure 56). L'étude des vibrations d'élongations des fonctions N-H permet de mettre en évidence la présence de trois bandes dont une en deçà de 3400 cm^{-1} . Le tripeptide **27** possède donc une fonction NH qui peut être à la fois libre et engagée dans une liaison hydrogène. L'attribution des bandes libres a pu être facilement réalisée grâce au travail préliminaire accompli en amont. Le nombre d'onde de 3449 cm^{-1} a pu être attribué au proton NH carbamidique, tandis que le proton NH amidique a pu être identifié à 3422 cm^{-1} . En ce qui concerne l'attribution de la bande N-H liée, il sera nécessaire de déconvoluer les bandes carbonyles et d'étudier les résultats obtenus en RMN afin de déterminer la liaison hydrogène qui se forme en solution.

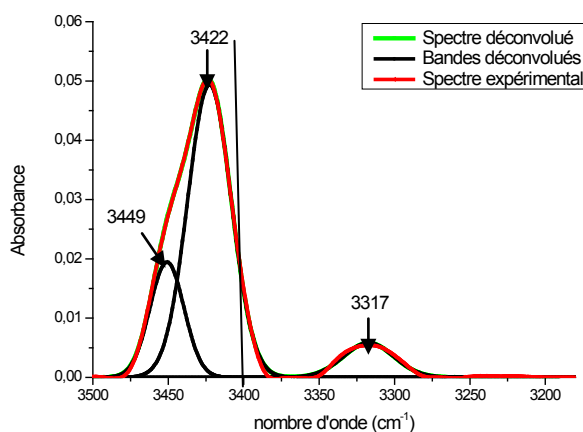


Figure 56 - Spectre IR du pseudotripeptide **27** dans la zone d'élongation des liaisons N-H (CHCl_3 / 10 mM)

III.1.2 Analyse par IR des fonctions CO des composés 28 et 27

Après avoir étudié l'éventuelle implication des protons NH dans une liaison hydrogène, nous avons pu nous pencher sur l'analyse des bandes CO dans le CHCl_3 . Avant de réaliser la déconvolution de ces fonctions, nous nous sommes intéressés à la valeur des bandes carbonyles du dipeptide 28 dans le CHCl_3 . Comme ce composé ne forme aucune liaison hydrogène en solution, il est possible de déterminer la valeur de toutes les bandes CO libres qui le constituent, en particulier celles de la protection Z et du résidu glycine qui faciliteront l'attribution de ces bandes lors de l'analyse du composé 27 (Figure 57).

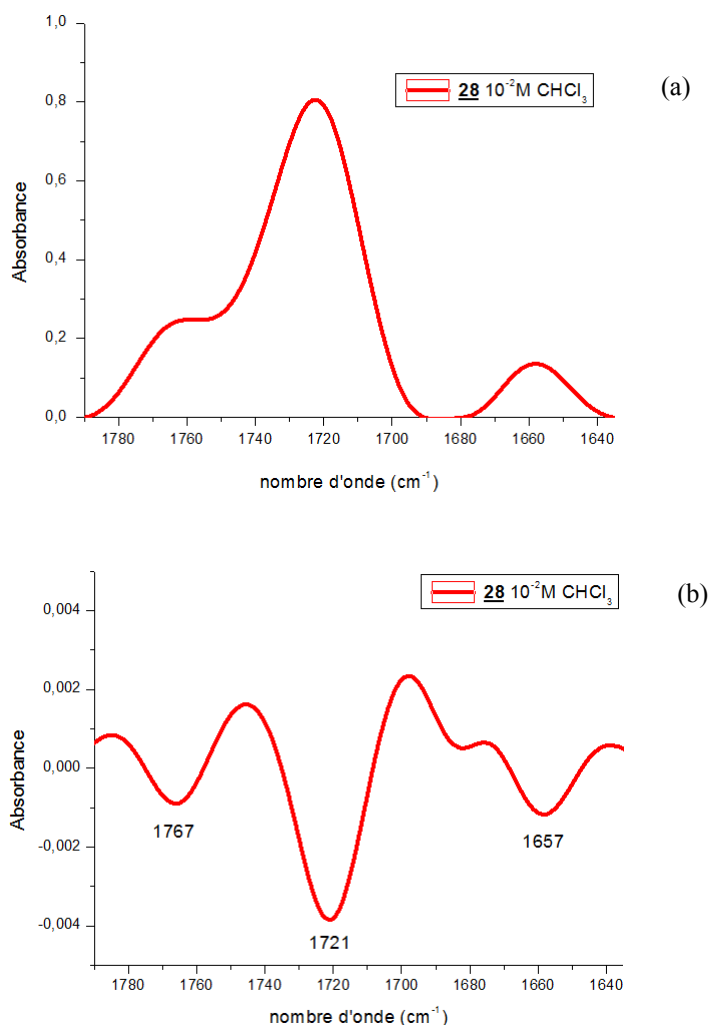


Figure 57 – Spectre IR et dérivée seconde du dipeptide 28 dans la zone d'élongation des liaisons C=O (CHCl_3 / 10 mM)

L'analyse de ce spectre a permis de déterminer que les fonctions CO libres de la protection Z et du résidu glycine ont respectivement des nombres d'onde de 1721 et 1657 cm^{-1} .

Ensuite, nous avons pu nous intéresser à l'IR des bandes CO du tripeptide 27. Dans un premier temps, une mesure dans le $\text{DMSO}-d_6$ a été effectuée de manière à avoir un ordre de grandeur de la bande CO du résidu i. Sur le spectre de la Figure 58 qui correspond aux vibrations d'élongation des fonctions CO dans le $\text{DMSO}-d_6$, on peut observer quatre bandes qui correspondent aux fonctions CO libres du composé 27.

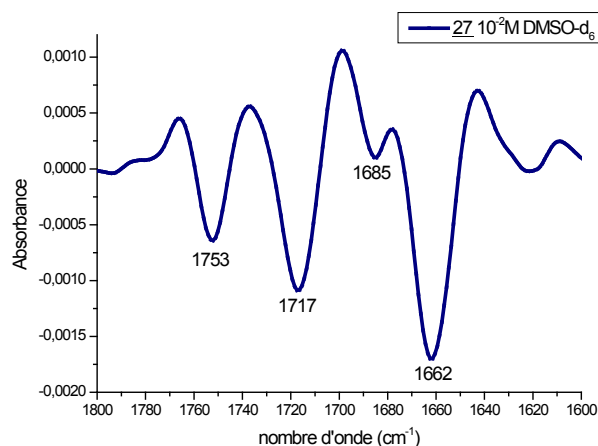


Figure 58 – Dérivée seconde du tripeptide **27** dans la zone d'élongation des liaisons C=O (DMSO- d_6 / 10 mM)

Par comparaison avec les valeurs des bandes CO du composé **28** dans le CHCl_3 , il a été possible d'attribuer les bandes de la protection Z ainsi que du CO du résidu i+2 (Tableau 13). D'après les tables IR, la valeur de 1750 cm^{-1} correspond au CO de l'ester méthylique. Par déduction, le carbonyle du résidu i a pu être identifié à 1685 cm^{-1} .

	ν (COOR) (cm^{-1})	ν (Z) (cm^{-1})	ν (Gly-Pro) (cm^{-1})		ν (Pro-Gly) (cm^{-1})
Dipeptide 28 CHCl_3	1767 (R=H) libre	1721 libre	1657 libre	/	
Tripeptide 27 DMSO- d_6	1750 (R= CH_3)	1717	1662	1685	
Tripeptide 27 CHCl_3	1749 libre (R= CH_3)	1717 libre	1656 libre	1640 lié	1683 libre

Tableau 13 – Attributions des fonctions C=O des composés **27** et **28** dans le DMSO- d_6 et/ou CHCl_3

Finalement, nous nous sommes intéressé à la déconvolution des bandes CO du tripeptide **27** dans le CHCl_3 (Figure 59). La déconvolution des bandes CO a permis de mettre en évidence la présence de cinq bandes à des valeurs de 1750, 1717, 1683, 1656 et 1640 cm^{-1} qui sont attribuées dans le Tableau 13.

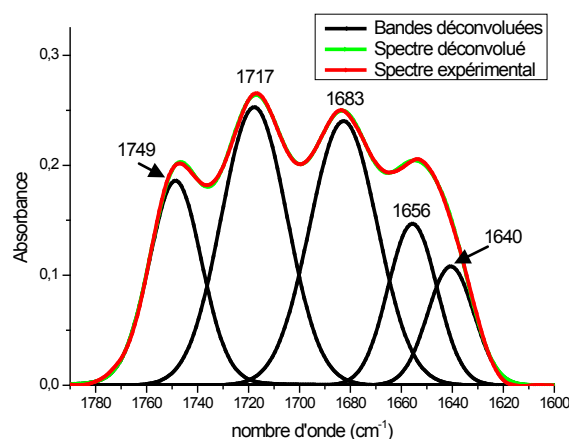


Figure 59 - Déconvolution du tripeptide 27 dans la zone d'élongation des liaisons C=O (CHCl_3 / 10 mM)

Ayant un ordre de grandeur de la valeur du vibreur CO libre du résidu i dans le $\text{DMSO}-d_6$ ainsi que la valeur des carbonyles libres du groupement Z et du résidu i+2 dans le CHCl_3 grâce à l'analyse du dipeptide 28, nous avons pu identifier les différentes bandes CO du tripeptide 27. Il a pu ainsi être mis en évidence que le carbonyle du résidu i+2 peut être à la fois libre et lié par liaison hydrogène.

III.1.3 Etude des déplacements chimiques du tripeptide 27

Sont rassemblés dans le Tableau 14, les valeurs des déplacements chimiques des protons NH du tripeptide 27.

δ NH amidique (ppm)	δ NH carbamidique (ppm)
7.26	5.85

Tableau 14 – Attribution des déplacements chimiques des protons NH du tripeptide 27

Ces valeurs de déplacements chimiques indiquent que le proton NH amidique est impliqué dans une liaison hydrogène contrairement au proton NH carbamidique qui est libre dans le CDCl_3 par comparaison avec la valeur du déplacement chimique du proton NH du dipeptide 28 qui est de 5.85 ppm. Il est donc possible d'affirmer en groupant ce résultat avec ceux obtenus par analyse IR qu'une liaison hydrogène entre le CO du résidu i+2 et le proton NH amidique se forme en solution.

III.1.4 Analyse par RMN : Influence de la concentration sur le tripeptide 27

Afin de déterminer la nature de cette liaison, nous avons cherché à déterminer si les déplacements chimiques des fonctions NH étaient influencés par une variation de concentration en CDCl_3 (Figure 60). Le proton NH amidique ne subit aucune variation de 10^{-1} à 10^{-4} M ce qui prouve que la liaison hydrogène formée est de nature intramoléculaire.

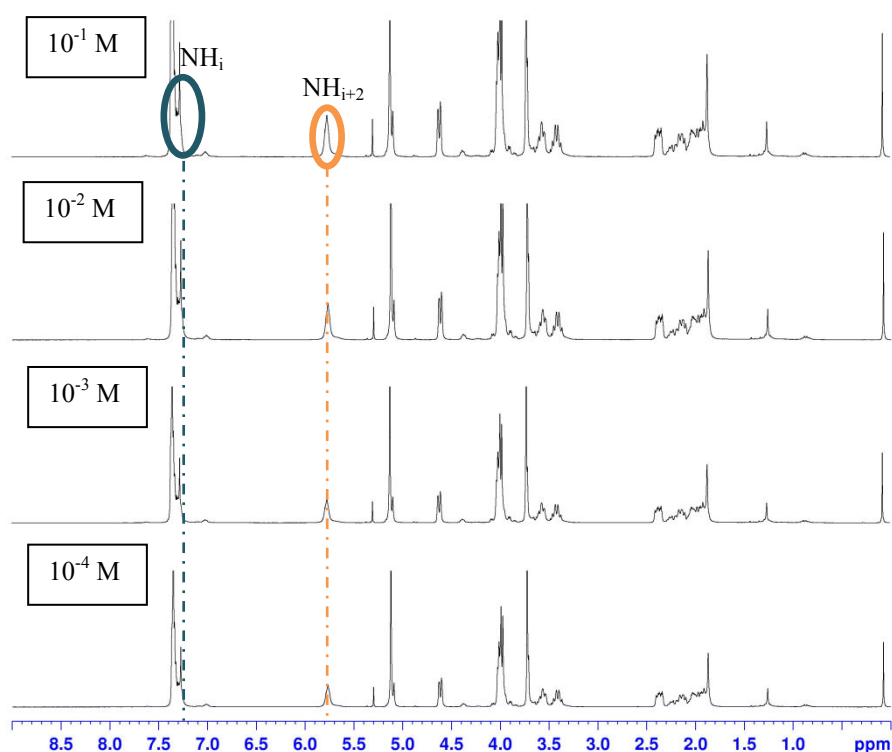


Figure 60 - Spectres RMN ^1H de **27** à différentes concentrations (de 10^{-1} à 10^{-4} M) dans le CDCl_3

Nous pouvons donc affirmer que le proton NH amidique est à la fois libre et engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire avec le carbonyle du résidu i+2 renfermant ainsi un pseudocycle en C_7 comme décrit sur la Figure 61. L'absence de dédoublement de signaux aussi bien à température ambiante qu'à 4°C nous permet d'affirmer la présence d'un unique isomère en solution : le peptide **27** est uniquement en conformation trans dans le CHCl_3 .

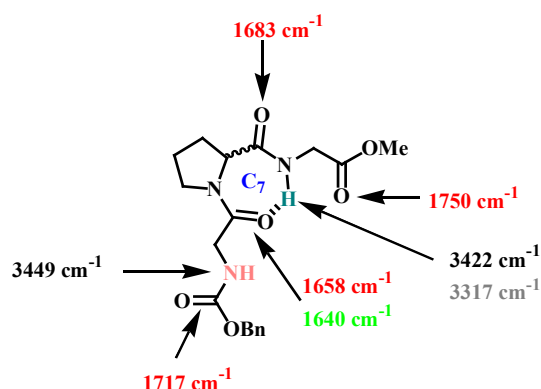


Figure 61 - Conformation du tripeptide **27** en solution et attribution des nombres d'onde des bandes NH et CO (CHCl_3 / 10 mM)

III.1.5 Expérience ROESY : Analyses des couplages dipolaires du tripeptide 27 en solution (CDCl₃ / 10 mM)

Afin de confirmer cette hypothèse, un spectre ROESY a été enregistré dans le CDCl₃ à la concentration de 10 mM (Figure 62).

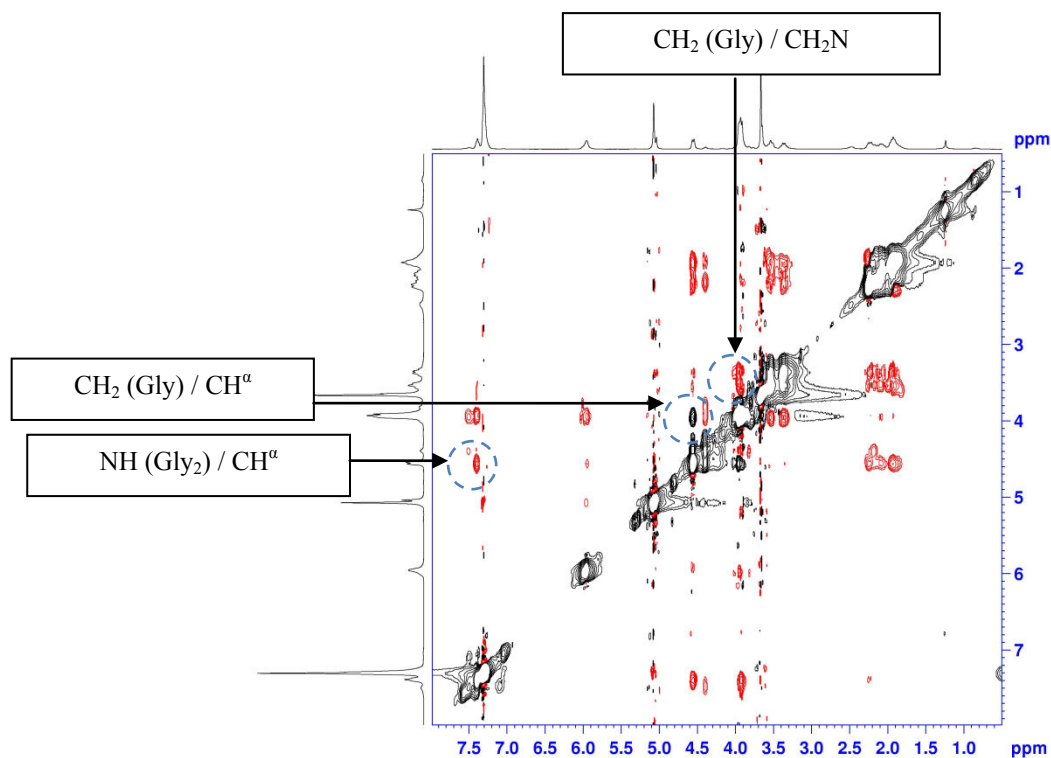


Figure 62 - Spectre ROESY du pseudotripeptide 27 (CDCl₃ / 10 mM)

Les corrélations des couples CH₂ (Gly) / CH₂N, CH₂ (Gly) / CH^α et NH (Gly₂) / CH^α ont pu être observées et sont représentées sur la Figure 63.

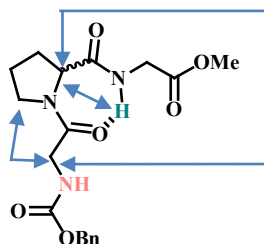


Figure 63 – Corrélations ROE observées pour le tripeptide 27 (10 mM / CDCl₃)

Ces mêmes corrélations avaient pu être notées par E. Humbert-Voss lors de l'analyse conformationnelle du pseudotripeptide Z-Gly-δazaPro(Boc)-Gly-OMe 5a qui avait montré l'existence d'un pseudocycle en C₇ formé par une liaison hydrogène entre le carbonyle du lien Gly-δazaPro et le proton NH du résidu i. Cette interprétation nous permet donc de confirmer l'hypothèse énoncée plus tôt sur la conformation du tripeptide 27 en solution car il semble que le résidu i+2 soit assez proche du cycle de la proline.

III.1.6 Influence du DMSO- d_6

Finalement, l'évolution du déplacement chimique des protons du tripeptide **27** en fonction d'une quantité croissante de DMSO- d_6 a aussi été étudiée à la concentration de 10 mM (Figure 64). Le signal du proton NH amidique varie de 1.15 ppm lors de l'ajout de DMSO- d_6 , ce qui permet d'affirmer que la liaison hydrogène à l'origine du pseudocycle en C₇ est assez faible. Quant au proton NH carbamidique, il se comporte très clairement comme libre car une différence de 1.75 ppm a été répertoriée.

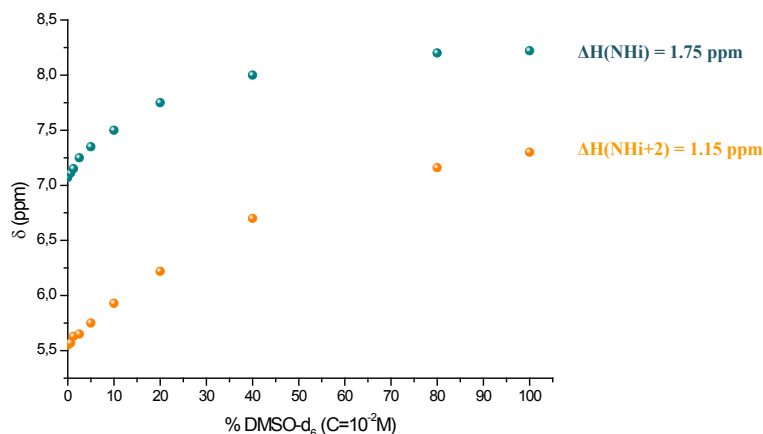


Figure 64 - Influence du DMSO- d_6 sur les déplacements chimiques des protons NH de **27**

III.1.7 Conclusions

Les analyses IR et RMN nous ont permis de mettre en évidence l'existence d'un équilibre entre l'état libre et lié avec la formation d'un pseudocycle en C₇ qui favorise la conformation *trans* du lien Gly-Pro au sein du tripeptide **27**.

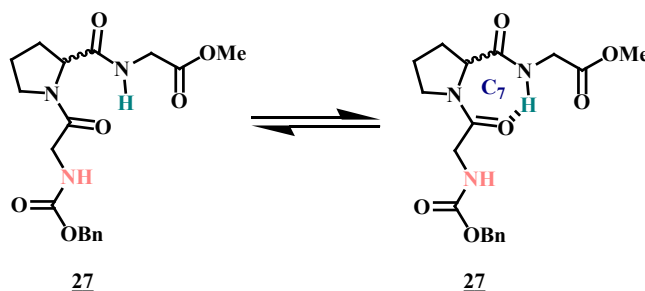


Figure 65 – Conformation adoptée par le tripeptide **27** en solution dans le CDCl₃

Cette même conformation avait pu être observée par E. Humbert-Voss lors de l'analyse conformationnelle du pseudotriptide Z-Gly- δ azaPro(Boc)-Gly-OMe en solution dans le CHCl₃. Si l'on compare la force de la liaison hydrogène formant le pseudocycle en C₇, on peut noter que cette liaison est plus forte dans le cas où un atome d'azote supplémentaire protégé est intégré dans le cycle de la proline ($\Delta H(\text{NHGly}_3) = 0.78 \text{ ppm}^{41}$ pour le composé **5a** contre 1.15 ppm pour le tripeptide **27**). Il est donc possible que la

gène stérique générée par le groupement protecteur Boc contribue à la stabilité de cette fonction hydrogène et favorise la conformation *trans*.

III.2 Analyse conformationnelle du pseudotriptide **6a**

Après avoir analysé la conformation du triptide **27** et du pseudotriptide **5a** en solution dans le CHCl₃, nous nous sommes intéressé au comportement du pseudotriptide Z-Gly-δazaPro-Gly-OMe **6a** (Figure 66) de manière à déterminer si la présence d'un atome d'azote supplémentaire déprotégé privilégie une conformation particulière.

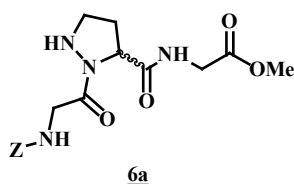


Figure 66 – Pseudotriptide **6a**

III.2.1 Etude des déplacements chimiques des protons NH du pseudotriptide **6a**

Dans un premier temps, nous avons tenu à étudier la valeur des déplacements chimiques des protons NH du pseudotriptide **6a** (Tableau 15).

δ NH amidique (ppm)	δ NH carbamidique (ppm)	δ NH hydrazidique (ppm)
7.45	5.54	4.12

Tableau 15 – Attribution des déplacements chimiques des protons NH du pseudotriptide **6a**

L'étude du déplacement chimique du proton NH amidique indique clairement que celui-ci est engagé dans une liaison hydrogène contrairement au proton NH carbamidique qui est libre en solution.

III.2.2 Influence du DMSO-*d*₆

L'influence du DMSO-*d*₆ sur les déplacements chimiques des protons NH du composé **6a** a ensuite été étudiée (Figure 67). Nous pouvons noter que le proton NH carbamidique est très sensible à l'ajout croissant de DMSO-*d*₆ (ΔH=1.8 ppm), et se comporte très clairement comme un proton non lié par liaison hydrogène. Les protons NH amidique et hydrazidique subissent tout de même l'influence du DMSO-*d*₆ avec des variations respectives de 1.15 et 1.05 ppm vers les champs faibles. Cette influence permet de mettre en évidence que si ces deux protons sont impliqués dans une liaison hydrogène, ils ne le sont que faiblement voire même en équilibre entre l'état libre et lié.

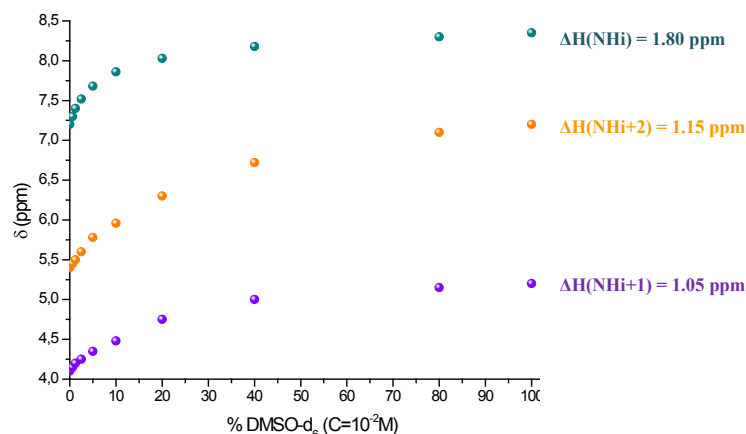


Figure 67 - Influence du DMSO- d_6 sur les déplacements chimiques des protons NH de **6a**

III.2.3 Analyse par IR des fonctions NH du pseudotripeptide **6a**

Le spectre IR de la zone d'élongation des vibrateurs des fonctions N-H, représenté sur la Figure 68, a permis d'identifier la présence des deux protons NH amidique et carbamidique dans la zone où ces protons sont libres. En effet, la valeur de 3451 cm^{-1} peut être attribuée au proton NH carbamidique, tandis que le proton amidique possède un nombre d'onde de 3425 cm^{-1} . Ces attributions ont été possibles par comparaison avec les valeurs obtenues lors de l'interprétation des protons NH par IR du tripeptide modèle **27**. Par déduction, la bande à 3348 cm^{-1} peut être assignée au proton NH hydrazidique libre. Comme énoncé en amont, un tel proton est considéré comme libre dans la zone d'élongation comprise entre 3400 et 3350 cm^{-1} . Bien que la valeur de la bande obtenue pour le pseudotripeptide étudié soit légèrement inférieure à cette limite, une différence de 2 cm^{-1} ne permet pas d'assigner un tel proton comme étant lié. Par ailleurs, il est possible d'observer la présence de deux bandes à 3314 et 3274 cm^{-1} correspondant à deux protons NH liés par liaison hydrogène. En se basant sur les résultats obtenus lors de l'étude de l'influence du DMSO- d_6 sur les déplacements chimiques des protons NH du pseudotripeptide **6a**, les bandes à 3314 et 3274 cm^{-1} peuvent être respectivement attribuées aux protons NH amidique et hydrazidique engagés dans une liaison hydrogène.

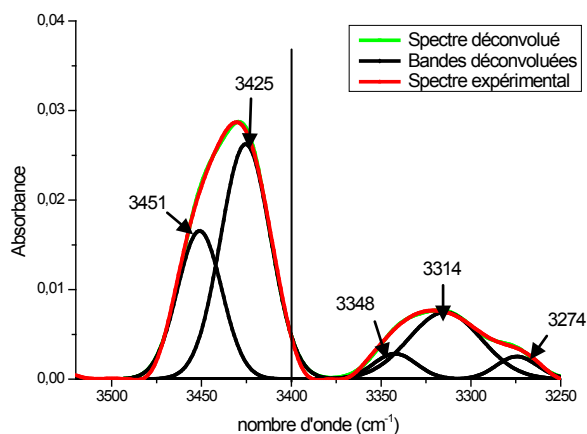


Figure 68 – Spectre IR du pseudotriptide **6a** dans la zone d'élongation des liaisons N-H (CHCl_3 / 10 mM)

III.2.4 Analyse par RMN : Influence de la concentration sur le pseudotriptide **6a** dans le CDCl_3

L'influence de la concentration sur les protons NH a été étudiée de manière à révéler si leur déplacement chimique subissait un déplacement particulier (Figure 69). Ces quatre spectres réalisés à différentes concentrations montrent très clairement que ce paramètre n'a aucun effet sur les déplacements chimiques des protons du pseudotriptide **6a**. Nous pouvons donc en conclure que les deux liaisons hydrogène au sein de **6a** sont de nature intramoléculaire.

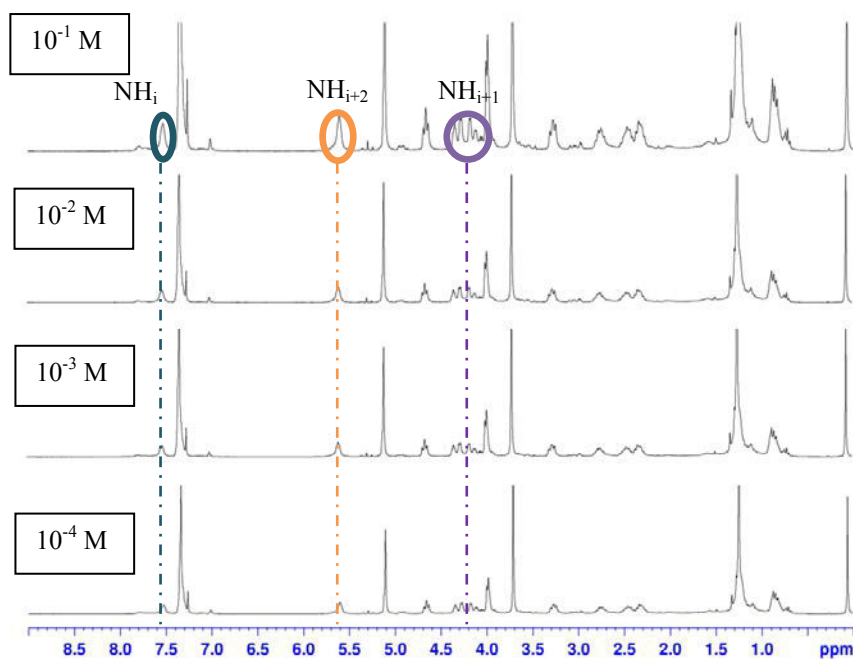


Figure 69 - Spectres RMN ^1H de **6a** à différentes concentrations (de 10^{-1} à 10^{-4} M) dans le CDCl_3

III.2.5 Analyse par IR des bandes CO du pseudotriptide **6a**

La déconvolution des bandes CO dans le CHCl_3 à la concentration de 10 mM a ensuite pu être réalisée (Figure 70). Nous avons pu noter la présence de six bandes dans la zone d'élongation des vibrateurs des fonctions C=O.

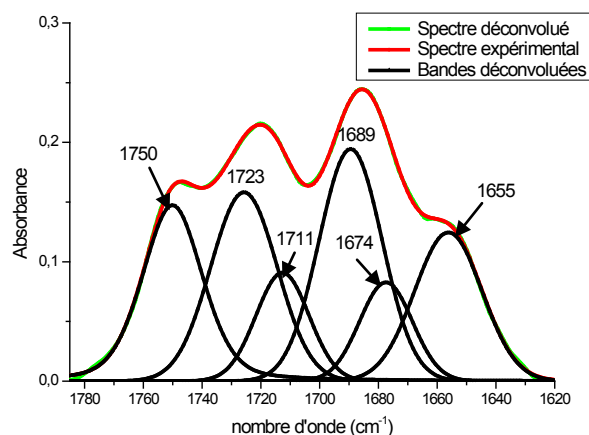


Figure 70 – Déconvolution du pseudotriptide **6a** dans la zone d'élongation des liaisons C=O (CHCl_3 / 10 mM)

De manière à faciliter l'attribution des bandes du pseudotriptide **6a**, nous nous sommes appuyé sur les résultats obtenus par E. Humbert-Voss lors de l'analyse conformationnelle du pseudotriptide Z-Gly- δ azaPro-Gly-NH₂ **6a'**. Cette étude avait pu mettre en évidence la formation d'un pseudocycle en C₁₀ due à une liaison hydrogène intramoléculaire entre le carbonyle du groupement Z et le proton NH amidique du lien δ azaPro-Gly (Figure 71).

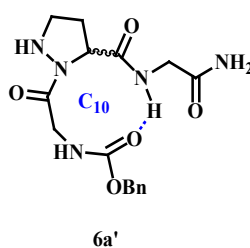


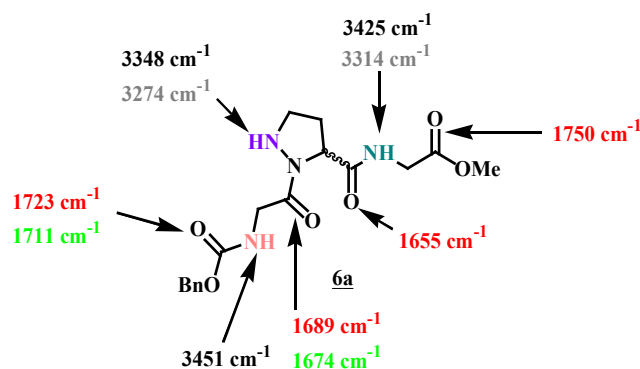
Figure 71 – Conformation privilégiée du pseudotriptide Z-Gly- δ azaPro-Gly-NH₂ **6a'** (CHCl_3 / 10 mM)

Les différentes attributions des carbonyles des pseudotriptides **6a** et **6a'** en solution dans le CHCl_3 à la concentration de 10 mM sont reportées dans le Tableau 16.

	ν (COR) (cm^{-1})	ν (Z) (cm^{-1})		ν (Gly- δ azaPro) (cm^{-1})		ν (δ azaPro-Gly) (cm^{-1})
Z-Gly- δ azaPro-Gly-NH ₂ 6a' CHCl ₃	1642 (R=NH ₂)	1723 libre	1717 lié	1685 libre		1654 libre
Z-Gly- δ azaPro-Gly-OMe 6a CHCl ₃	1750 (R=OMe)	1723 libre	1711 lié	1689 libre	1674 lié	1655 libre

Tableau 16 – Attribution des bandes C=O des pseudotriptides **6a** et Z-Gly- δ azaPro-Gly-NH₂ **6a'** (CHCl₃ / 10 mM)

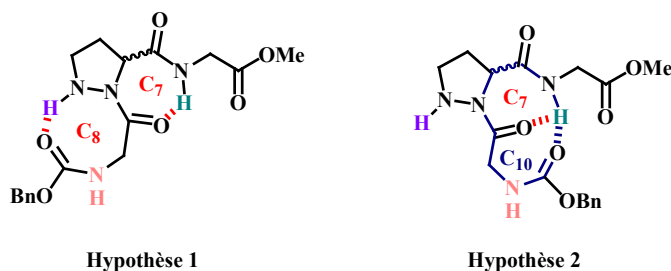
L'ensemble des attributions des fonctions NH et CO du pseudotriptide **6a** est reporté dans la Figure 72. Sont représentées en rouge et vert, les valeurs respectives des fonctions CO libres et engagées dans une liaison hydrogène dans le CHCl₃. En noir et gris, sont décrites les valeurs respectives des fonctions NH libres et liées dans le CHCl₃.

Figure 72 – Attribution des bandes CO et NH du pseudotriptide **6a** (CDCl₃ / 10 mM)

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par E. Voss-Humbert, nous avons pu mettre en évidence la formation de deux liaisons hydrogène dans lesquelles les carbonyles du groupement Z et du lien Gly- δ azaPro sont impliqués. Cependant, ces deux fonctions présentent aussi des valeurs libres à la concentration de 10 mM ce qui nous permet de conclure à un équilibre entre des populations libres et liées, résultats en accord avec ce qui avait été démontré lors de l'analyse IR dans la zone d'élongation des vibreurs des fonctions N-H.

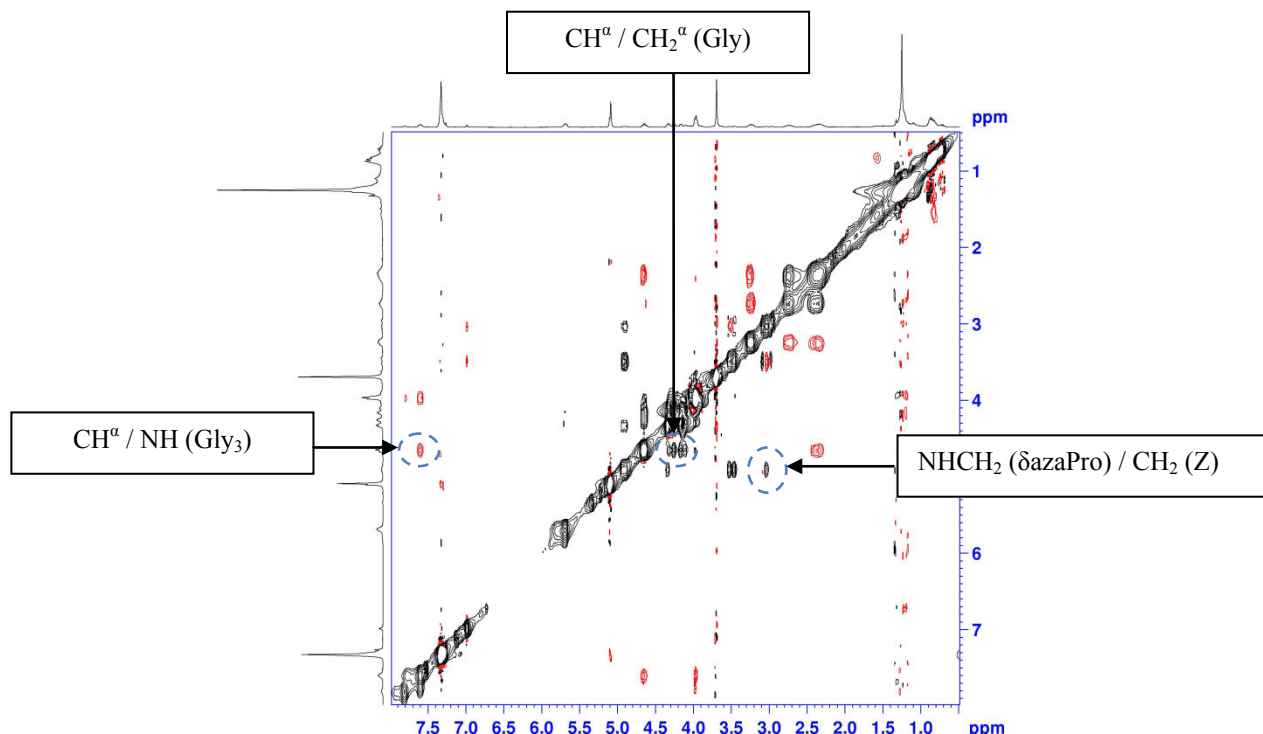
A ce stade de l'analyse, nous pouvons émettre deux hypothèses quant à la conformation privilégiée en solution dans le CHCl₃ :

- Soit le groupement carbonyle de la protection Z est lié avec le proton NH hydrazidique, et le CO du lien Gly- δ azaPro est engagé dans une liaison hydrogène avec le proton NH amidique, formant ainsi deux pseudocycles en C₈ et en C₇ qui bloqueraient la conformation *trans* du lien Gly- δ azaPro (hypothèse 1).
- Soit les groupements carbonyles de la protection Z et du résidu i+2 sont liés au proton NH amidique formant ainsi une liaison bifide par la création de pseudocycles en C₇ et C₁₀ (hypothèse 2).


 Figure 73 – Hypothèses de liaisons hydrogène au sein du pseudotriptide **6a**

III.2.6 Expérience ROESY : Analyses des couplages dipolaires du pseudotriptide **6a** en solution (CDCl₃ / 10 mM)

Afin de pouvoir trancher entre les deux hypothèses précédemment énoncées, nous nous sommes intéressé aux éventuelles corrélations ROESY dans le CDCl₃ à une concentration de 10 mM (Figure 74). Dans le cas de l'hypothèse 2, nous devrions observer une corrélation entre le couple OCH₃ / CH₂ (Z), qui est restée indétectable sur le spectre ROESY enregistré. De plus, il a été possible de noter les corrélations entre les couples CH^α / CH₂^α(Gly) et CH^α / NH(Gly₃) qui avaient aussi été observées par E. Humbert-Voss lors de l'analyse conformationnelle du pseudotriptide Z-Gly-δazaPro(Boc)-Gly-OMe qui renfermait un pseudocycle en C₇ similaire à celui décrit dans l'hypothèse 1. Par ailleurs, l'existence du pseudocycle en C₈ a pu être confirmée par la présence de la corrélation entre le couple NHCH₂ (δazaPro) / CH₂ (Z).


 Figure 74 – Spectre ROESY du pseudotriptide **6a** (CDCl₃ / 10 mM)

L'analyse de ce spectre ROESY a permis de valider l'hypothèse 1 à savoir que le pseudotriptide **6a** renfermait deux pseudocycles en C₈ et en C₇ qui privilégie la conformation *trans* du lien Gly-δazaPro.

III.2.7 Conclusions

Les analyses RMN 1D et 2D ainsi que l'IR ont permis de démontrer que le pseudotriptide **6a** adoptait une conformation particulière en solution dans le CDCl_3 . En effet, nous avons pu démontrer l'existence d'un équilibre entre les formes libre et lié pour les protons hydrazidique et amidique. Lorsque ce pseudotriptide est à l'état lié en solution, la conformation *trans* du lien Gly- δ azaPro est favorisée, ceci étant dû à la formation des pseudocycles en C₈ et C₇ décrit dans la Figure 75.

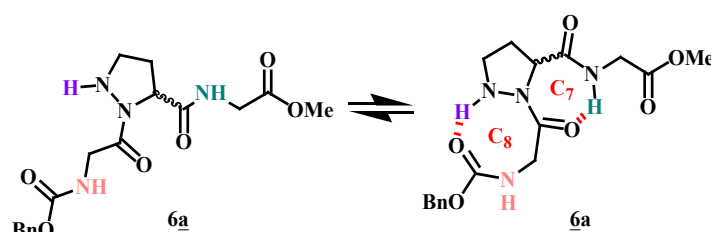


Figure 75 – Conformation adoptée par le pseudotriptide **6a** en solution dans le CDCl_3

III.3 Analyse conformationnelle du pseudotriptide **7a**

III.3.1 Influence du $\text{DMSO}-d_6$

Dans un premier, nous nous sommes intéressé à l'influence du $\text{DMSO}-d_6$ sur les déplacements chimiques des protons amidique et carbamidique. Sur la Figure 76, il est possible d'observer que le proton carbamidique se comporte très clairement comme s'il était libre en solution. En effet, une différence de 1.72 ppm vers les champs faibles peut être notée. En ce qui concerne le proton amidique, il est possible de noter un écart de 0.8 ppm qui peut laisser penser à un équilibre entre des populations libre et lié.

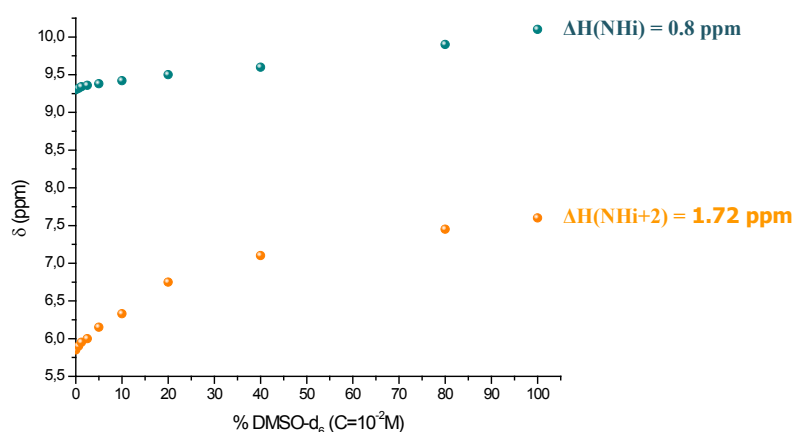


Figure 76 - Influence du $\text{DMSO}-d_6$ sur les déplacements chimiques des protons NH de **7a**

III.3.2 Etude du déplacement chimique des protons NH des composés **29** et **7a**

De manière à valider le caractère non lié du proton NH carbamidique du pseudotriptide **7a**, le déplacement chimique de ce proton a été comparé à celui de son composé modèle **29** (Figure 77).

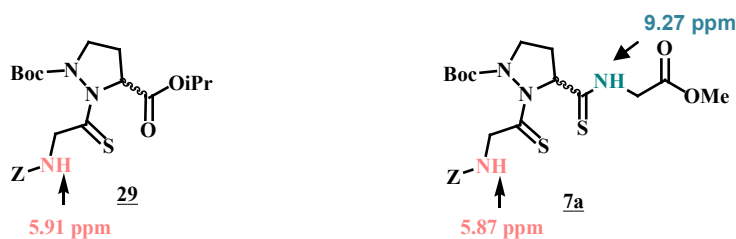


Figure 77 – Etude du déplacement chimique des protons NH carbamidiques des composés **29** et **7a**

L'écart entre ces deux protons est de 0.04 ppm ce qui signifie que leur comportement en solution est similaire. De plus, l'analyse par IR du composé **29**, a permis de mettre en évidence le caractère non lié de ce proton dans le CHCl_3 . Cette étude des déplacements chimiques permet de valider l'hypothèse émise en amont à savoir que le proton NH carbamidique ne forme pas de liaison hydrogène en solution dans le CHCl_3 . De plus, la valeur du déplacement chimique du proton NH amidique indique clairement que celui-ci est engagé dans une liaison hydrogène. Ces résultats sont donc bien en accord avec ceux énoncés lors de l'étude de l'influence du $\text{DMSO}-d_6$.

III.3.3 Analyse par IR des fonctions NH du pseudotriptide **7a**

Afin de confirmer l'hypothèse de formation d'une liaison hydrogène impliquant le proton NH amidique, un spectre IR dans le CHCl_3 a été enregistré à la concentration de 10 mM. Sur la Figure 78, il est possible d'observer la présence d'une bande au-delà de 3400 cm^{-1} correspondant au proton NH carbamidique libre. De plus, deux pics sont identifiables en deça de 3400 cm^{-1} et peuvent être attribués au proton NH amidique lié et au thiocarbonyle du lien $\delta\text{azaPro-Phe}$. En effet les tables IR indiquent que les thiocarbonyles de type $\text{R}_1\text{R}_2\text{N-CS}$ (avec R_1 et $\text{R}_2 \neq \text{H}$) présentent une bande aux alentours de 3400 cm^{-1} à l'état solide. Dans notre cas, il a donc été impossible d'attribuer de façon sûre les pics observés à 3363 et 3283 cm^{-1} .

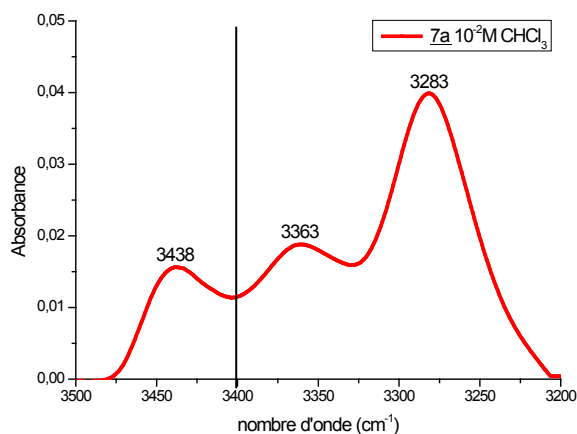


Figure 78 - Spectre IR du pseudotriptide 7a dans la zone d'élongation des liaisons N-H (CHCl_3 / 10 mM)

III.3.4 Analyse par RMN : Influence de la concentration sur le pseudotriptide 7a dans le CDCl_3

Afin de déterminer la nature de la liaison hydrogène dans laquelle le proton NH amidique est impliqué, l'influence de la concentration en CDCl_3 sur ce proton a été étudiée (Figure 79). Aucune variation de déplacement chimique n'a pu être détectée ce qui nous permet d'affirmer que le proton NH amidique est engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire.

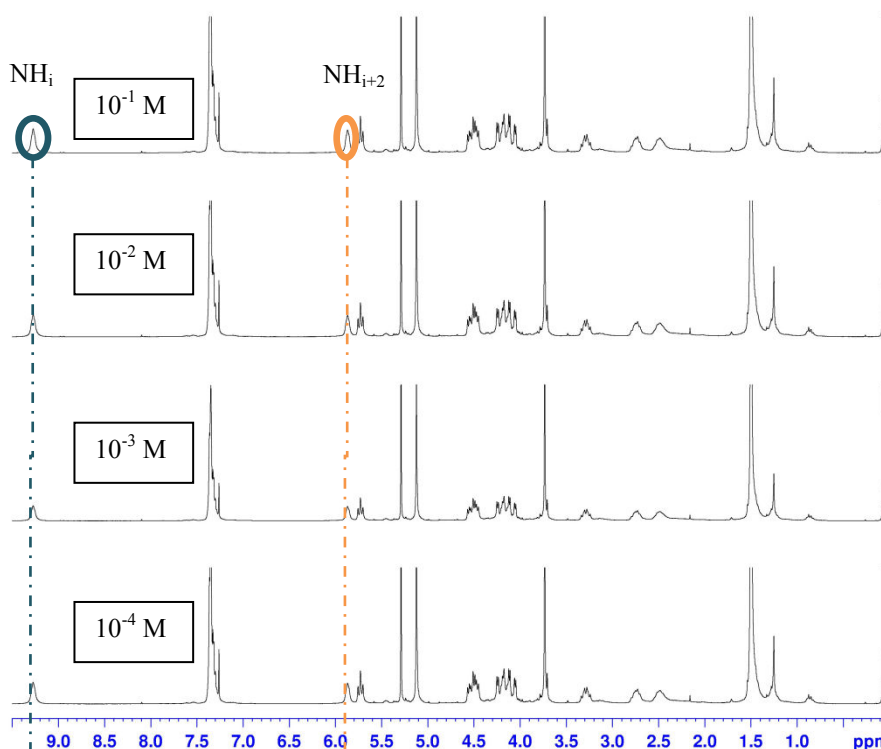


Figure 79 - Spectres RMN ^1H de 7a à différentes concentrations (de 10^{-1} à 10^{-4} M) dans le CDCl_3

III.3.5 Analyse par IR des fonctions CO du pseudotriptide **7a**

Nous nous sommes ensuite tout naturellement intéressé à la déconvolution des bandes CO dans le CHCl_3 à la concentration de 10 mM (Figure 81). L'attribution des différentes bandes observées a pu être réalisée assez facilement par comparaison avec les valeurs des CO libres obtenues par E. Voss-Humbert lors de l'analyse du pseudotriptide Z-Gly- δ azaPro(Boc)-Gly-OMe **5a** dans le CHCl_3 (Figure 80).

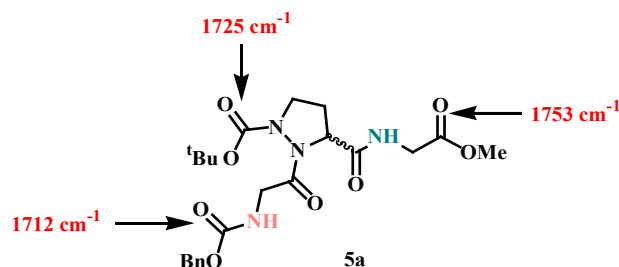


Figure 80 – Attribution des bandes CO libres des de l'ester méthylique et des protections Boc et Z du pseudotriptide **5a**

La bande à 1750 cm^{-1} correspond au carbonyle de l'ester méthylique non engagé dans une liaison hydrogène. Les bandes à 1726 et 1712 cm^{-1} peuvent être respectivement attribuées aux carbonyles des groupements protecteurs Z et Boc lorsque ceux-ci sont libres.

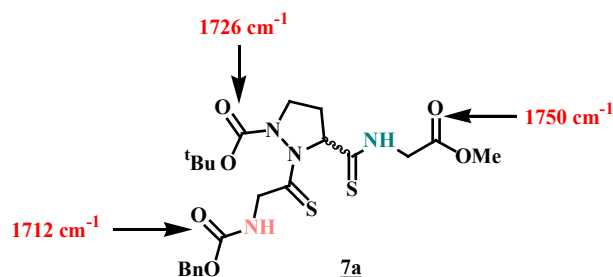
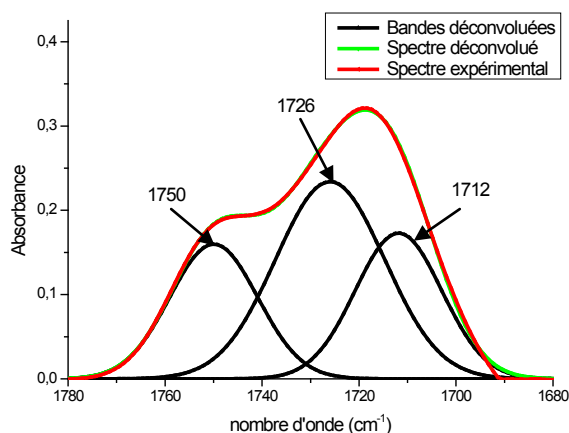


Figure 81 - Déconvolution du pseudotriptide **7a** dans la zone d'élargissement des liaisons C=O (CHCl_3 / 10 mM) et attribution des bandes CO du pseudotriptide **7a** (CHCl_3 / 10 mM)

La déconvolution des bandes CO a permis de mettre en évidence que toutes ces fonctions étaient libres dans le CHCl_3 à la concentration de 10 mM : le proton NH amidique est donc impliqué dans une liaison hydrogène avec une fonction thiocarbonyle. Malheureusement, l'étude des bandes thiocarbonyles n'a pas pu être menée aussi bien dans le $\text{DMSO}-d_6$ que le CHCl_3 car la vibration d'élargissement de la fonction C=S du lien Gly- δ azaPro est observée au niveau de l'empreinte spectrale de ces deux solvants. L'analyse par IR de ce composé a aussi été tentée dans le méthanol mais malheureusement le pseudotriptide s'est complètement dégradé dans ce type de solvant.

Bien que l'analyse par IR des bandes C=S aurait facilité la détermination de la conformation du pseudotriptide **7a** en solution, il est possible de mener à terme cette analyse. En effet, le proton NH amidique

ne peut se lier qu'au thiocarbonyle du lien Gly- δ azaPro. Afin de confirmer cette hypothèse, l'analyse des couplages dipolaires du pseudotriptide **7a** a été réalisée.

III.3.6 Expérience ROESY : Analyses des couplages dipolaires du pseudotriptide **7a** (CDCl₃ / 10 mM)

Un spectre ROESY du pseudotriptide **7a** a été enregistré dans le CDCl₃ et est représenté sur la Figure 82.

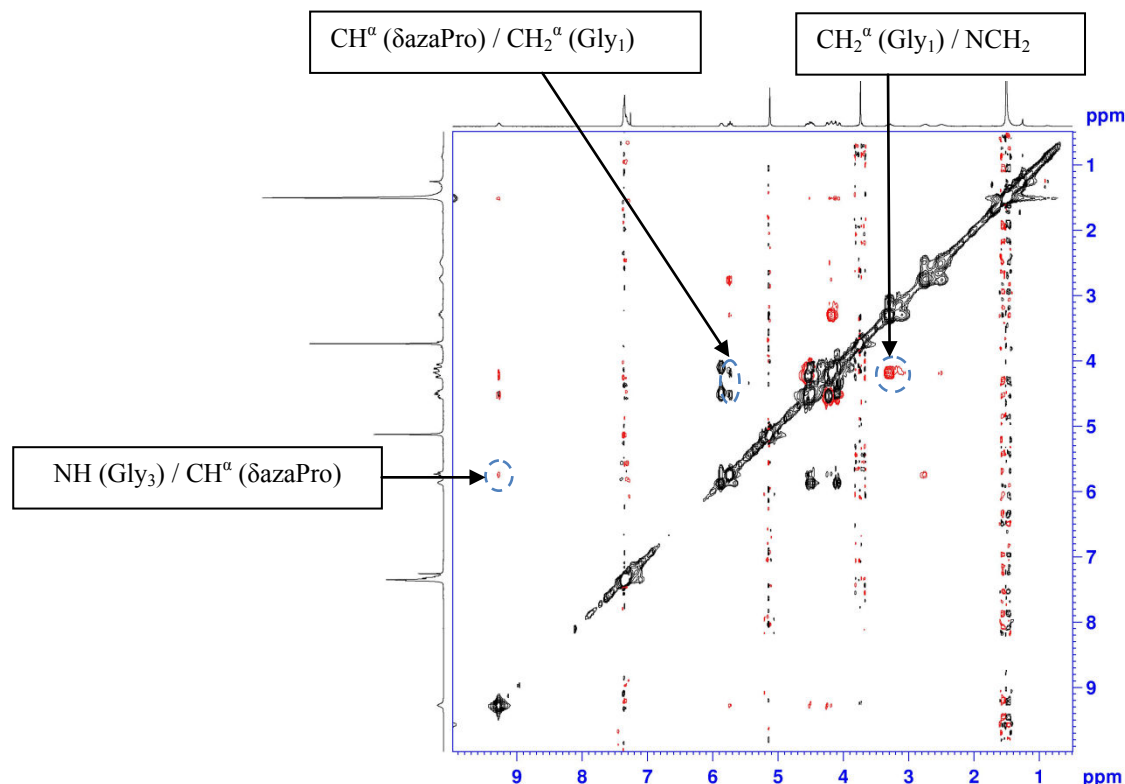


Figure 82 – Spectre ROESY du pseudotriptide **7a** (CDCl₃ / 10 mM)

Après analyse de cette carte ROESY, il est possible de noter les corrélations ROE des couples NH(Gly₃) / CH ^{α} (δ azaPro), CH₂ ^{α} (Gly₁) / CH ^{α} (δ azaPro) et CH₂ ^{α} (Gly₁) / NCH₂.

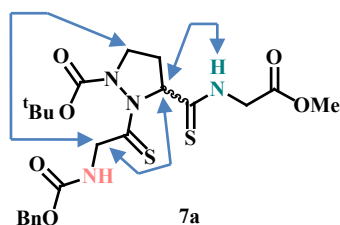


Figure 83 – Corrélations ROE observées pour le pseudotriptide **7a** (CDCl₃ / 10 mM)

Cette étude permet de confirmer la présence d'un pseudocycle en C₇ formé par une liaison hydrogène entre le thiocarbonyle du lien Gly- δ azaPro et le proton NH amidique car ces mêmes corrélations avaient été observées lors de l'analyse conformationnelle du composé **5a** qui renferme aussi un pseudocycle en C₇.

III.3.7 Conclusions

L'analyse conformationnelle a permis de mettre en évidence la formation d'un pseudocycle en C₇ dans lequel le NH amidique et le thiocarbonyle du lien Gly- δ azaPro sont liés par une liaison hydrogène intramoléculaire.

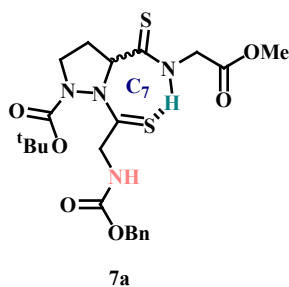


Figure 84 – Conformation du pseudotripeptide **7a** en solution dans le CDCl₃

Contrairement au cas du pseudotripeptide **5a** où un équilibre entre les formes libre et lié avait pu être observé, seule la forme liée est observable pour le pseudotripeptide **7a**. De plus, nous pouvons aussi comparer la force de cette liaison hydrogène au sein de ces deux composés : la liaison hydrogène est un peu plus faible dans le cas où le thiocarbonyle est engagé dans une liaison hydrogène ($\Delta H(\text{NH})=0.80$ ppm contre 0.72 ppm pour le composé **5a**). Ce résultat était prévisible car l'atome de soufre est beaucoup moins électronégatif que l'atome d'oxygène.

IV. Analyses conformationnelles des pseudotripeptides de type Z-Ala- δ azaPro(P₂)-Phe-OMe

Les analyses conformationnelles des pseudotripeptides **5b** et **6b** (Figure 85) ont été menées de manière analogue à celles des pseudotripeptides **5c** et **6c**. Dans un premier temps, l'étude IR du pseudodipeptide **9b** a été réalisée de manière à faciliter l'interprétation du spectre infrarouge de la zone des vibreurs des fonctions C=O des pseudotripeptides **5c** et **6c**.

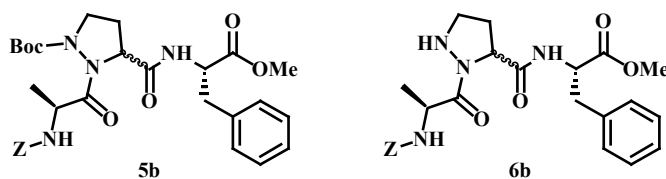


Figure 85 – Pseudotripeptides **5b** et **6b**

IV.1 Analyse par IR des fonctions NH et CO du pseudodipeptide **9b**

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressé à l'IR des fonctions NH du composé modèle **9b** dans le CHCl_3 . Sur le spectre (a) de la Figure 86, il est possible de voir une bande NH à 3432 cm^{-1} qui peut être attribuée à la fonction NH carbamidique libre du composé **9b**. Ce résultat permet de conclure sur le fait qu'aucune liaison hydrogène ne se forme au sein de ce composé modèle ce qui signifie que toutes les fonctions CO sont libres dans le CHCl_3 .

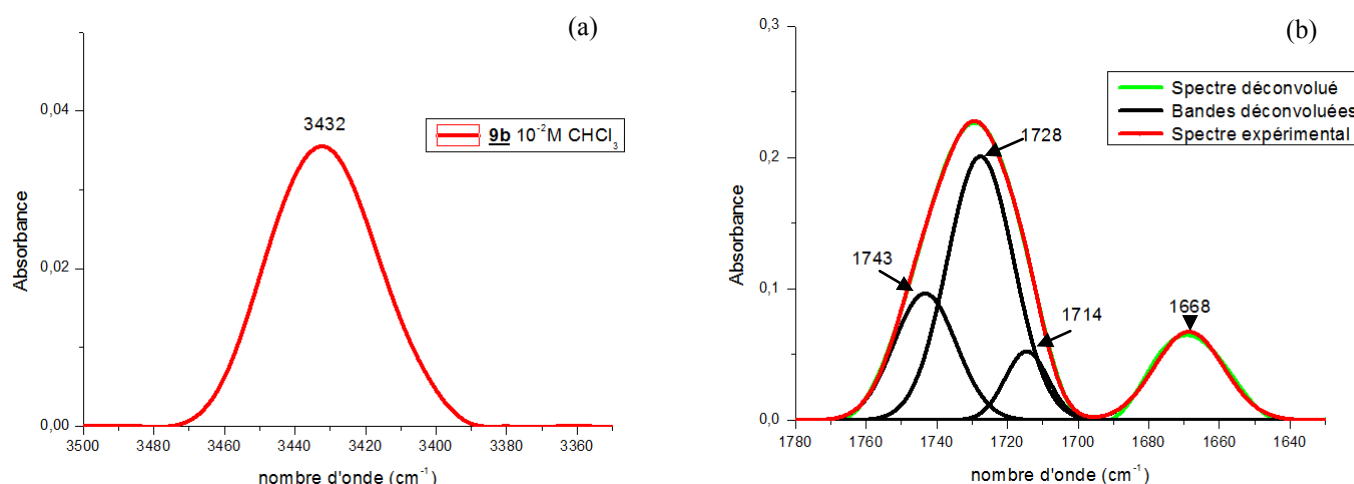


Figure 86 – Déconvolutions du pseudodipeptide **9b** dans la zone d'élongation des fonctions NH et C=O (CHCl_3 / 10 mM)

Sur le spectre (b) de la Figure 86, il est possible d'observer quatre bandes correspondant aux fonctions CO libres du composé **9b**. L'attribution de ces différentes bandes est reportée dans la Figure 87.

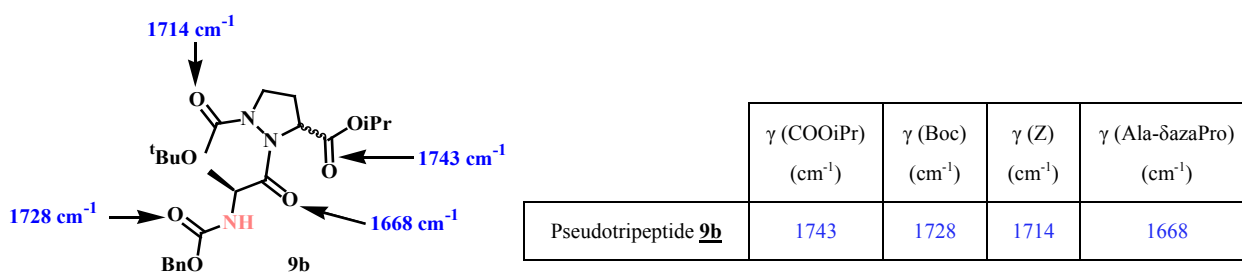


Figure 87 – Attribution des fonctions C=O du pseudodipeptide **9b** dans le CHCl_3

Les bandes à 1728 et 1714 cm^{-1} correspondent aux carbonyles des groupements protecteurs Boc et Z. Celle observée à 1668 cm^{-1} a pu être attribuée à la fonction C=O de la liaison peptidique Ala- δ azaPro. Connaissant la valeur des carbonyles libres qui composent la molécule référence **9b**, nous allons pouvoir étudier la conformation des pseudotriptides **5b** et **6b** dans le CHCl_3 .

IV.2 Analyse conformationnelle du pseudotriptide **5b**

IV.2.1 Analyse par IR des fonctions NH du pseudotriptide **5b**

Un premier spectre IR du pseudotriptide **5b** a été enregistré à la concentration de 10 mM dans le CHCl_3 (Figure 88). L'étude de la zone des vibreurs des fonctions N-H montre clairement la présence d'une bande en deça de 3400 cm^{-1} correspondant à une fonction N-H engagée dans une liaison hydrogène. Par comparaison avec l'étude des fonctions NH du composé modèle **9b**, il a été possible d'attribuer la bande à 3437 cm^{-1} au proton NH carbamidique libre. Par déduction, la bande à 3414 cm^{-1} peut être assignée au proton NH amidique libre. Cette première analyse nous permet de conclure quant à l'existence d'un équilibre entre l'état libre et lié d'une fonction NH du pseudotriptide **5b**.

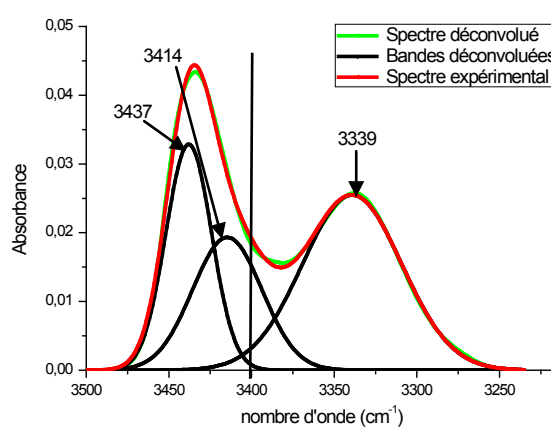


Figure 88 – Spectre IR du pseudotriptide **5b** dans la zone d'élongation des liaisons N-H (CHCl_3 / 10 mM)

IV.2.2 Etude des déplacements chimiques des protons NH du pseudotriptide **5b**

Sont rassemblées dans le Tableau 17, les valeurs des déplacements chimiques des protons NH du pseudotriptide **5b**.

δ NH amidique (ppm)	δ NH carbamidique (ppm)
7.58	5.35

Tableau 17 – Attribution des déplacements chimiques des protons NH du pseudotriptide **5b**

Ces valeurs de déplacements chimiques permettent de déterminer que le proton NH amidique est certainement lié par liaison hydrogène du fait de la valeur de son déplacement chimique, contrairement au proton NH carbamidique qui est libre en solution par comparaison avec la valeur du déplacement chimique du proton NH libre du composé référence **9b** qui est de 5.67 ppm.

IV.2.3 Analyse par RMN : Influence de la concentration sur le pseudotriptide **5b** dans le CDCl_3

Afin de déterminer la nature intra ou intermoléculaire de cette liaison hydrogène, la RMN ^1H du composé a été étudiée dans le CDCl_3 pour des concentrations allant de 10^{-1} M à 10^{-4} M (Figure 89). Le proton NH du résidu phénylalanine du pseudotriptide **5b** ne subit pas l'influence de la concentration en CDCl_3 ce qui nous permet d'affirmer que la liaison hydrogène dans laquelle il est engagé est intramoléculaire.

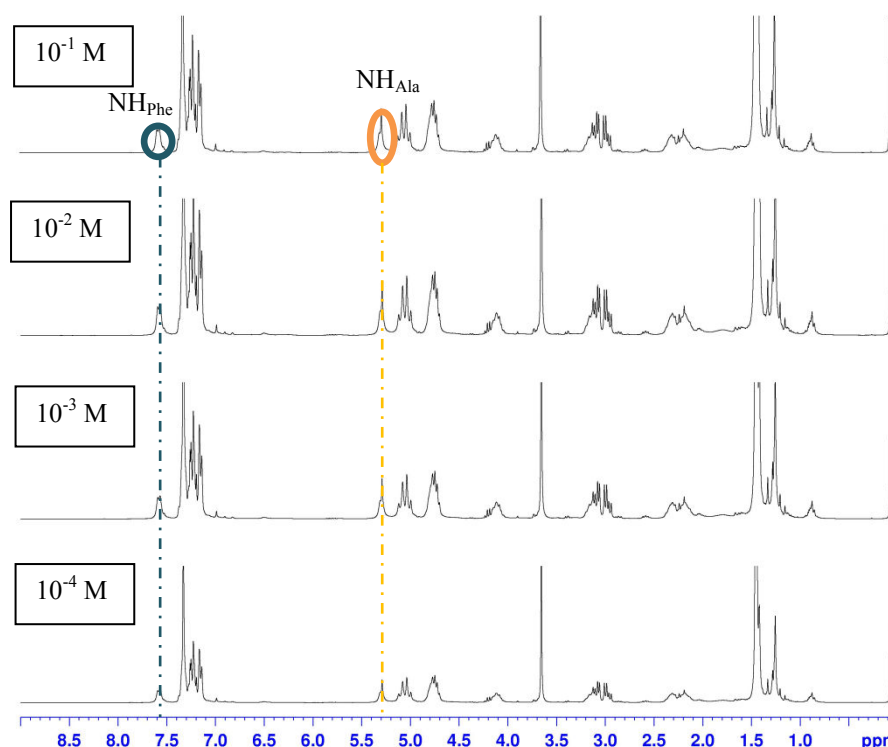


Figure 89 – Spectres RMN ^1H de **5b** à différentes concentrations (de 10^{-1} à 10^{-4} M) dans le CDCl_3

IV.2.3 Influence du $\text{DMSO}-d_6$

Ensuite, l'influence du $\text{DMSO}-d_6$ sur les déplacements chimiques des protons NH du composé **5b** a été étudiée (Figure 90). Le proton NH de la phénylalanine varie de 0.54 ppm en fonction de la concentration en $\text{DMSO}-d_6$. Cette faible variation signifie que le proton NH amidique de la molécule **5b** a de forte chance d'être engagé dans une liaison hydrogène. En ce qui concerne le proton NH carbamidique, une variation de 2.5 ppm est observée vers les champs faibles. Cette forte variation montre très clairement que ce proton n'est pas engagé dans une liaison hydrogène. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de l'étude de la valeur des déplacements chimiques des protons NH du pseudotriptide **5b**.

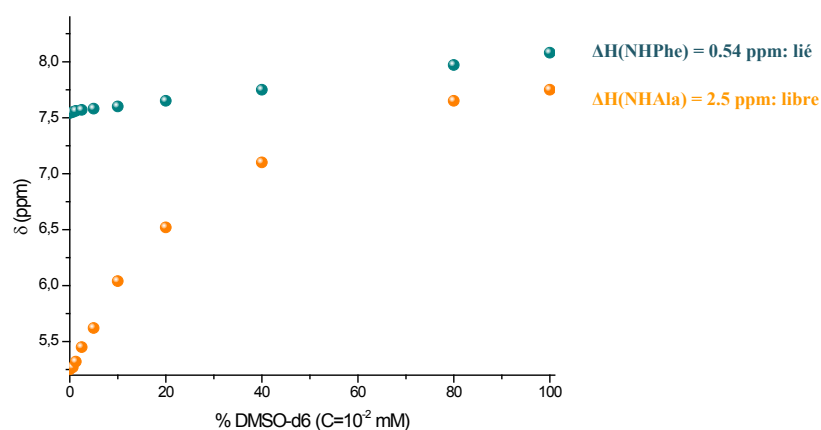


Figure 90 - Influence du DMSO- d_6 sur les déplacements chimiques des protons NH de **5b**

IV.2.4 Analyse par IR des fonctions CO du pseudotriptide **5b**

Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'IR des fonctions C=O du pseudotriptide **5b**. Une première mesure a été effectuée dans le DMSO- d_6 afin d'avoir un ordre de grandeur de la valeur de la bande CO du résidu i+1 libre (spectre (a), Figure 91).

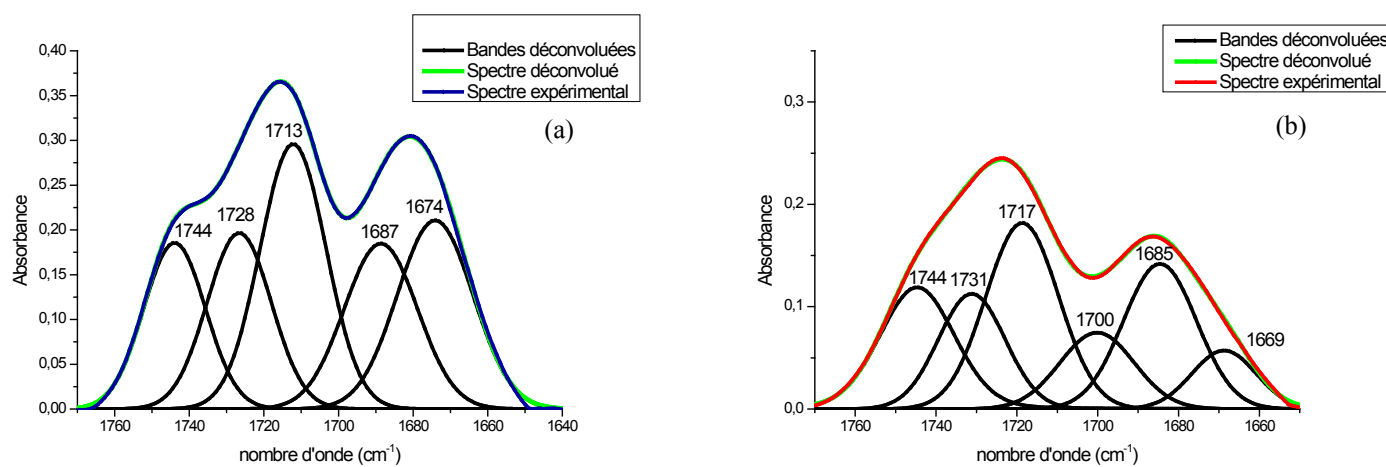


Figure 91 - Déconvolution du pseudodipeptide **5b** dans la zone d'élongation des liaisons C=O (DMSO- d_6 (a) et CHCl₃ (b) / 10 mM)

Les valeurs des bandes CO des groupements Boc et Z ainsi que du résidu i+2 ont pu facilement être attribuées par comparaison avec l'étude préliminaire menée sur le composé modèle **9b** (Tableau 18).

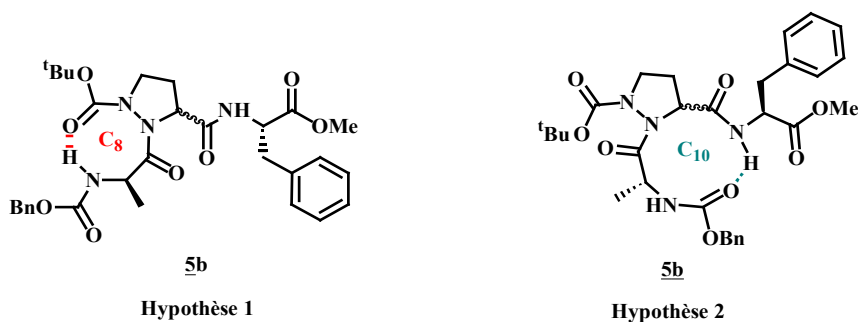
	ν (COOMe) (cm ⁻¹)	ν (Z) (cm ⁻¹)		ν (Boc) (cm ⁻¹)	ν (δ azaPro-Phe) (cm ⁻¹)	ν (Ala- δ azaPro) (cm ⁻¹)
Composé modèle 9b CHCl ₃	1743	1728		1714	/	1668
Pseudotripeptide 5b DMSO- <i>d</i> ₆	1744	1728		1713	1687	1674
Pseudotripeptide 5b CHCl ₃	1744 libre	1731 libre	1700 lié	1717 libre	1685 libre	1669 libre

 Tableau 18 – Attribution des fonctions C=O du pseudotriptide **5b** dans le DMSO-*d*₆ et CHCl₃ (10 mM)

La déconvolution des bandes carbonyles du pseudotriptide **5b** dans le CHCl₃, représentée sur le spectre (b) de la Figure 91, montrent six bandes dont cinq qui correspondent aux valeurs des carbonyles libres et une liée (γ = 1700 cm⁻¹).

Deux hypothèses peuvent être émises de manière à attribuer la bande à 1700 cm⁻¹ :

- Soit le CO du Boc est lié au NH carbamidique par liaison hydrogène, renfermant ainsi un pseudocycle en C₈.
- Soit le carbonyle de la protection Z est lié par liaison hydrogène au proton NH amidique en formant un pseudocycle en C₁₀ (Figure 92).


 Figure 92 – Hypothèses de conformation du pseudotriptide **5b** en solution

Or, il a été démontré, en amont, que le proton NH carbamidique se comportait très clairement comme non lié en solution (Figure 90). La bande à 1700 cm⁻¹ peut alors être attribuée au carbonyle du groupement Z lorsque celui-ci est engagé dans une liaison hydrogène avec le proton NH amidique. Cette hypothèse est en accord avec les précédentes observations car le proton NH du résidu phénylalanine se comporte comme s'il était lié lorsqu'il subit l'influence du DMSO-*d*₆. L'ensemble des valeurs des bandes carbonyles et des fonctions N-H est regroupé dans la Figure 93. Sont représentées en rouge et vert, les valeurs respectives des fonctions CO libres et engagée dans une liaison hydrogène dans le CHCl₃. En noir et gris, sont décrites les valeurs respectives des fonctions NH libres et lié dans le CHCl₃.

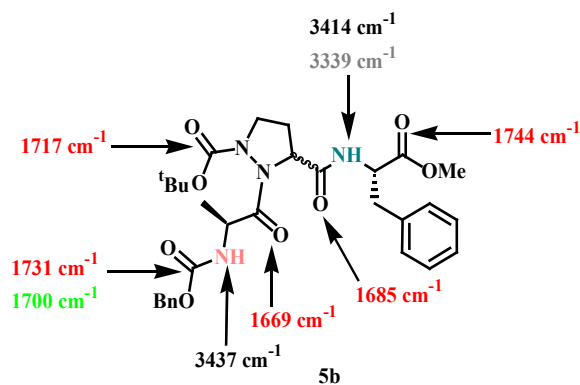


Figure 93 – Attribution des bandes carbonyles du pseudotriptide **5b** (CHCl₃ / 10 mM)

Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse d'une conformation privilégiée du composé **5b** en solution dictée par la formation d'un pseudocycle à 10 atomes favorisant la conformation *cis* du lien Ala-δazaPro (Figure 94).

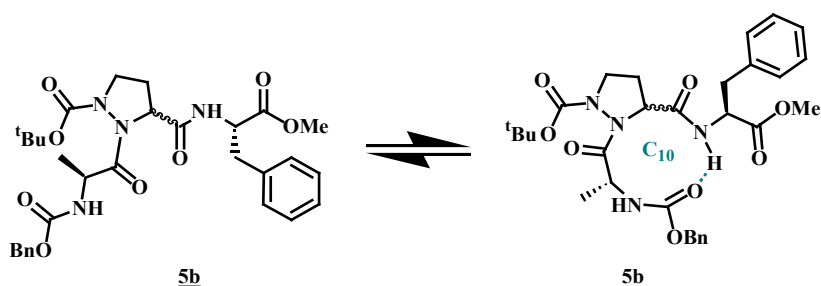


Figure 94 – Hypothèse de conformation du pseudotriptide **5b** dans le CHCl₃ à 10 mM

IV.2.5 Expérience ROESY : Analyses de couplages dipolaires du pseudotriptide **5b** en solution (CDCl₃ / 10 mM)

Cette hypothèse est confirmée par une étude des corrélations ROE par spectroscopie RMN à deux dimensions. Une carte ROESY a permis de déterminer les interactions à moyenne distance qui s'établissent au sein du pseudotriptide **5b** (Figure 95).

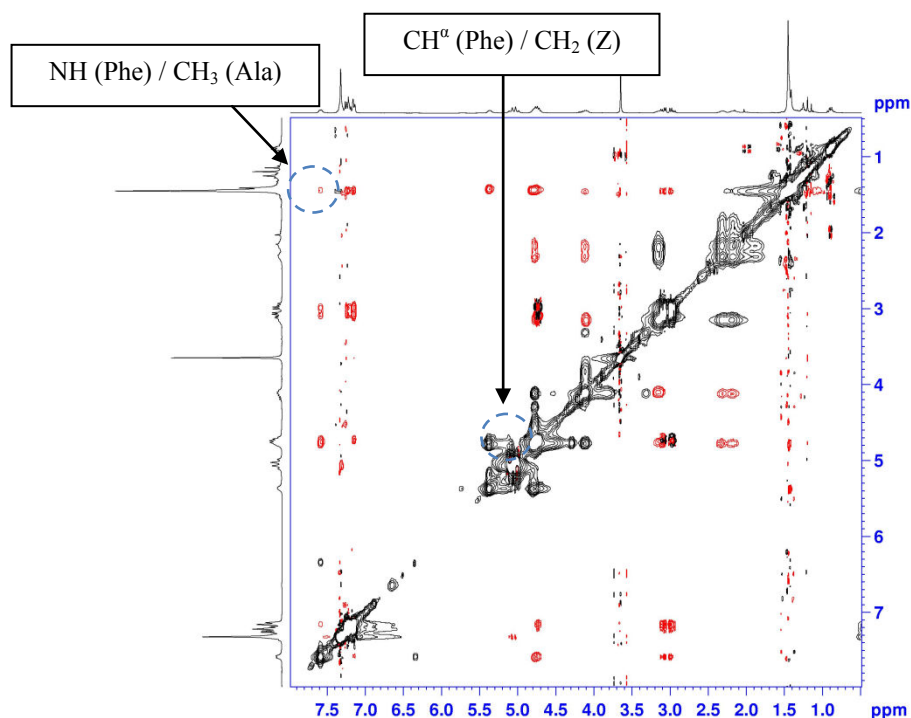


Figure 95 - Spectre ROESY du pseudotriptide **5b** (10 mM / CDCl₃)

Les corrélations ROE observées pour les couples NH (Phe) / CH₃(Ala) et CH^α (Phe) / CH₂ (Z) montrent que les résidus phénylalanine et alanine sont assez proches (Figure 96). Cette interprétation confirme bien la présence d'une liaison hydrogène entre le CO du groupement Z et le proton NH du résidu phénylalanine.

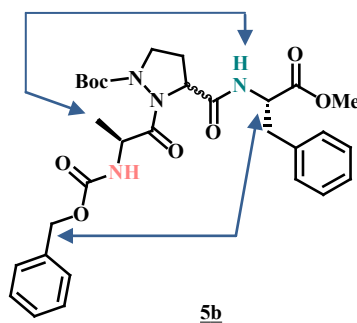
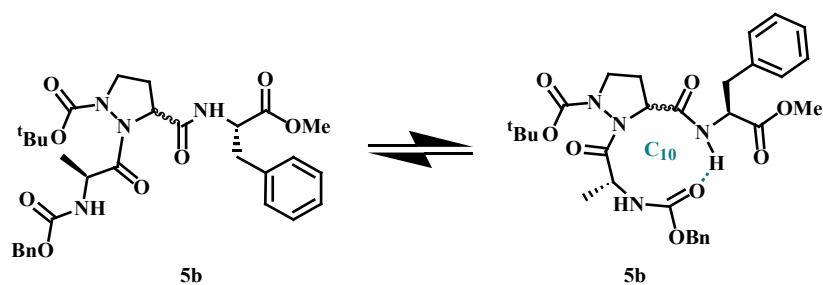


Figure 96 – Corrélations ROE observées pour le pseudotriptide **5b** (10 mM / CDCl₃)

IV.2.6 Conclusions

Aucun dédoublement de signaux n'a pu être observé aussi bien à basse température qu'à température ambiante, ce qui signifie que le composé **5b** existe sous une seule conformation en solution dans le CHCl₃ à la concentration de 10 mM. Les analyses par infrarouge et RMN à une et deux dimensions nous ont permis de conclure que la liaison peptidique du lien Ala-δazaPro du pseudotriptide **5b** est majoritairement en conformation *cis* par formation d'un pseudocycle en C₁₀ où le carbonyle du groupement Boc est lié par une liaison hydrogène modérément forte avec le proton NH du résidu phénylalanine (Figure 97).

Figure 97 - Conformation du pseudotripeptide **5b** dans le CHCl₃ à 10 mM

Ce résultat est à comparer avec l'étude conformationnelle menée sur le composé **5a** où un pseudocycle en C₇ entre le carbonyle du lien peptidique δazaPro-Gly et le proton NH carbamidique avait pu être identifié, favorisant ainsi la conformation *trans*. Cette conformation est favorisée par rapport au pseudocycle en C₇ dont la formation au sein du pseudotripeptide **5b** reste difficile à cause de la gêne stérique engendrée par le groupement Boc et la chaîne latérale de l'alanine. Nous pouvons déterminer que l'encombrement stérique de l'acide aminé en amont de la proline favorisera d'autant plus la conformation *cis* que celui-ci est important. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse annoncée en amont de ce chapitre et prouve ainsi qu'un substrat de type Suc-Ala-Ala-δazaPro-Phe-*p*-NA, où l'atome d'azote supplémentaire de la δ-azaproline est protégé par un groupement très encombré, pourrait constituer un composé efficace dans la mesure de l'activité enzymatique des PPIases du fait de la conformation privilégiée du lien Ala-δazaPro.

IV.3 Analyse conformationnelle du pseudotripeptide **6b**

IV.3.1 Etude des déplacements chimiques des protons NH du pseudotripeptide **6b**

Sont rassemblés dans le Tableau 19, les valeurs des déplacements chimiques des protons NH du pseudotripeptide **6b**.

δ NH amidique (ppm)	δ NH carbamidique (ppm)	δ NH hydrazidique (ppm)
7.10	5.61	4.00

Tableau 19 – Attribution des déplacements chimiques des protons NH du pseudotripeptide **6b**

Le déplacement chimique du proton NH amidique indique clairement que celui-ci est engagé dans une liaison hydrogène. Quant au proton NH carbamidique, son déplacement chimique de 5.61 ppm montre clairement que celui-ci est libre en solution par comparaison avec celui du composé modèle **9b** qui est de 5.67 ppm.

IV.3.2 Influence du DMSO-*d*₆

L'implication des protons NH du pseudotripeptide **6b** dans une liaison hydrogène intramoléculaire a ensuite été analysée par l'étude de l'influence du DMSO-*d*₆ sur les déplacements chimiques de ces protons (Figure 98). Nous pouvons remarquer que le proton NH hydrazidique est très peu sensible à l'ajout de DMSO-*d*₆

car son déplacement chimique ne varie que de 0.07 ppm démontrant ainsi son implication dans une liaison hydrogène assez forte. Le proton NH du résidu phénylalanine subit une variation de 1.29 ppm ce qui peut correspondre à une faible implication dans une liaison hydrogène, voire à un équilibre entre l'état libre et lié. En ce qui concerne le proton NH carbamidique, un déplacement de 2.15 ppm vers les champs faibles permet de conclure qu'il se comporte comme s'il était totalement libre en solution. Ces différentes observations sont donc en accord avec les résultats obtenus lors de l'étude des déplacements chimiques des protons NH du pseudotriptide **5b**.

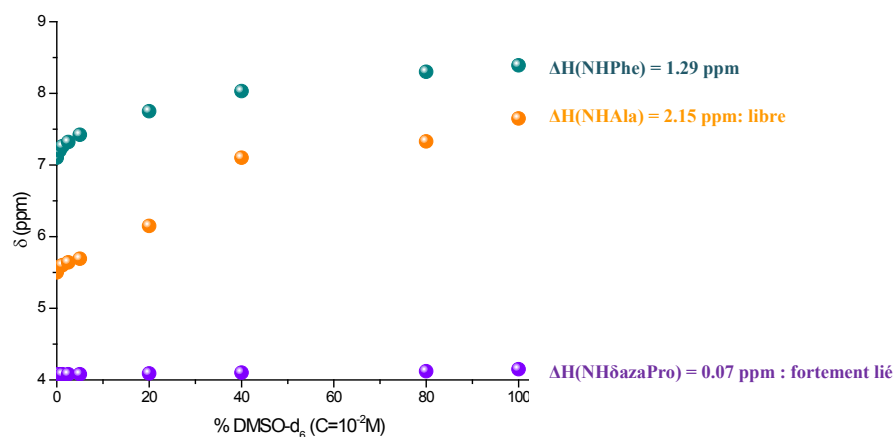


Figure 98 - Influence du DMSO-*d*₆ sur les déplacements chimiques des protons NH de **6b**

IV.3.2 Analyse par IR des fonctions NH du pseudotriptide **6b**

Un spectre IR du pseudotriptide **6b** a été réalisé dans le CHCl₃ à la concentration de 10 mM. L'analyse des bandes NH a tout d'abord été effectuée afin de déterminer la présence de liaison hydrogène (Figure 99).

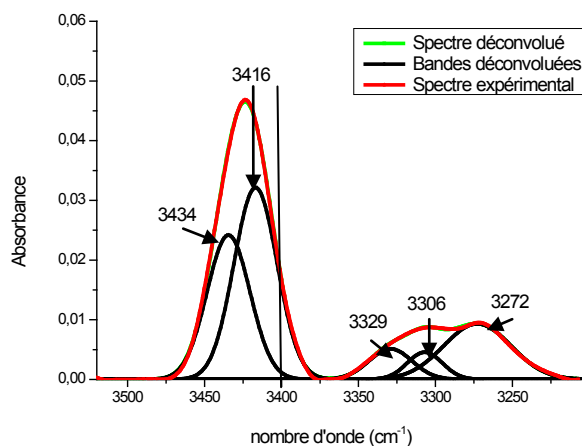


Figure 99 – Spectre IR du pseudotriptide **6b** dans la zone d'élongation des liaisons N-H (CHCl₃ / 10 mM)

Sur le spectre de la Figure 99, on peut observer la présence de deux bandes au-delà de 3400 cm^{-1} correspondant aux protons NH carbamidique (3434 cm^{-1}) et amidique (3416 cm^{-1}) libres du pseudotripeptide **6b**. Ces deux bandes ont pu être facilement attribuées par comparaison avec les valeurs des protons NH libres des pseudo-peptides **9b** et **5b**.

Les protons NH hydrazidiques libres possèdent un nombre d'onde inférieur à la valeur de 3400 cm^{-1} et supérieur à 3350 cm^{-1} . Or la déconvolution ne laisse apparaître aucune bande dans cette gamme spectrale ce qui signifie que le proton NH hydrazique est toujours impliqué dans une liaison hydrogène.

La présence de trois bandes en deçà de 3350 cm^{-1} permet de mettre en évidence que trois liaisons hydrogène se forment en solution à la concentration de 10 mM. Cette première analyse nous permet d'affirmer qu'il existe un équilibre entre les formes libre et lié pour au moins un des deux protons NH carbamidique ou amidique et que le proton NH hydrazidique est impliqué de façon permanente dans une liaison hydrogène.

IV.3.3 Analyse par RMN : Influence de la concentration sur le pseudotripeptide **6b** dans le CDCl_3

De manière à déterminer la nature de ces liaisons hydrogène, nous avons étudié l'influence de la concentration en CDCl_3 sur les déplacements chimiques des protons NH (Figure 100). L'analyse de ces spectres RMN du proton montre clairement que les protons NH du pseudotripeptide **6b** ne subissent pas l'influence de la concentration en CDCl_3 : les liaisons hydrogène au sein de ce composé sont donc intramoléculaires.

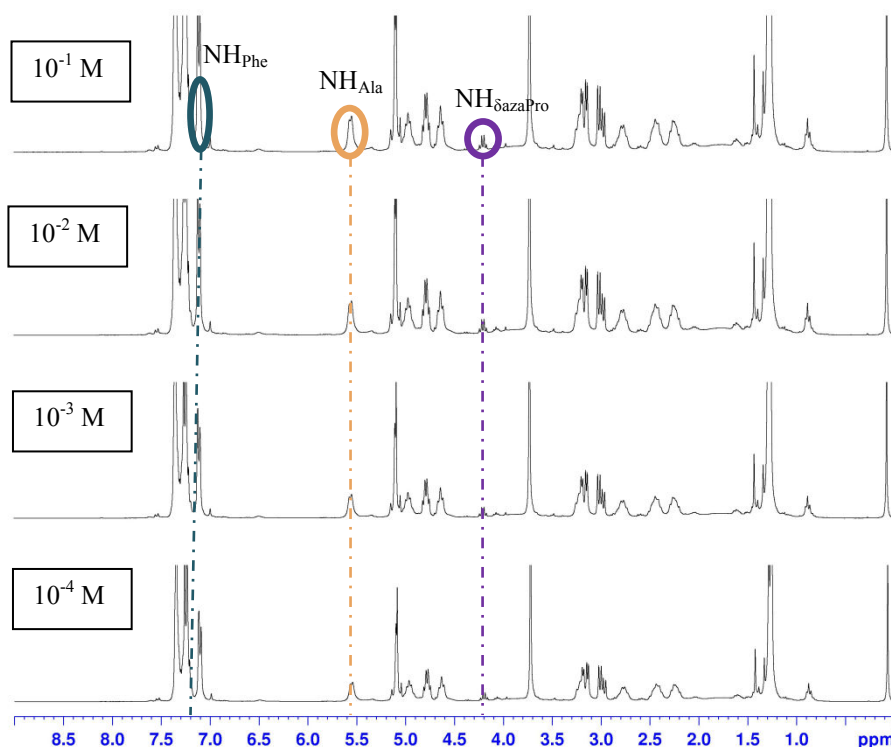


Figure 100 – Gamme de concentration du pseudotripeptide **6b** dans CDCl_3

IV.3.4 Analyse par IR des bandes CO du pseudotriptide **6b**

Afin de pouvoir identifier les carbonyles impliqués dans les liaisons hydrogène, nous nous sommes penché sur l'IR des fonctions CO. Une première étude dans le DMSO- d_6 à la concentration de 10 mM a été effectuée de manière à déterminer la valeur de ces différentes bandes libres. La dérivée seconde du spectre IR du pseudotriptide **6b** est représentée dans la Figure 101.

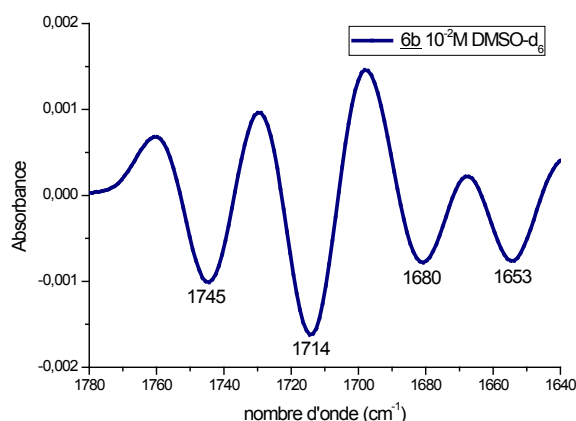


Figure 101 – Dérivée seconde du pseudotriptide **6b dans la zone d'élongation des liaisons C=O (DMSO- d_6 / 10 mM)**

Comme il a été annoncé en amont de ce chapitre, le DMSO- d_6 est un solvant qui présente la particularité de rompre toute liaison hydrogène intra ou intermoléculaire. Cependant, le pouvoir de ce solvant présente certaines limites car dans le cas d'une liaison hydrogène très forte, celui-ci est incapable de briser ce lien. Dans le cas du pseudotriptide **6b**, la rupture de la liaison hydrogène dans laquelle le proton NH hydrazidique est impliquée a été impossible car l'influence du DMSO- d_6 sur le déplacement chimique de ce proton avait précédemment permis de mettre en évidence la présence d'une liaison très forte avec une différence de 0.07 ppm vers les champs forts. En effet, nous avons pu conforter cette hypothèse en nous intéressant à l'étude de la dérivée seconde dans la zone d'élongation des fonctions C=O. Le carbonyle du groupement Z lié présente une bande à 1714 cm^{-1} . L'attribution des autres bandes a pu se faire assez aisément et est reportée dans le Tableau 20. La bande à 1745 cm^{-1} correspond au vibreur CO de l'ester méthylique. Les carbonyles amidiques des liens Ala- δ azaPro et δ azaPro-Phe possèdent des vibrations d'élongations de 1653 et, respectivement 1680 cm^{-1} .

Connaissant la valeur de ces bandes CO libres, nous avons pu réaliser la déconvolution des bandes carbonyles dans le CHCl_3 (Figure 102).

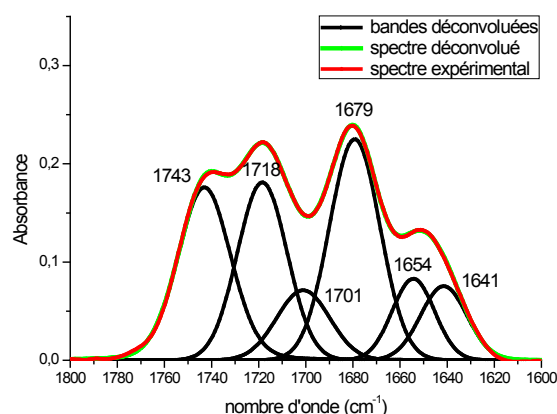


Figure 102 - Déconvolution du pseudotriptide 6b dans la zone d'élongation des liaisons C=O (CHCl₃ / 10 mM)

En comparant les différentes valeurs obtenues dans le DMSO-*d*₆, les six bandes obtenues lors de la déconvolution dans le CHCl₃ ont pu être facilement attribuées et sont reportées dans le Tableau 20.

	γ (COOMe) (cm ⁻¹)	γ (Z) (cm ⁻¹)		γ (δ azaPro-Phe) (cm ⁻¹)	γ (Ala- δ azaPro) (cm ⁻¹)	
Pseudotriptide 6b DMSO- <i>d</i> ₆	1745 libre	1714 lié		1680 libre	1653 libre	
Pseudotriptide 6b CHCl ₃	1743 libre	1718 lié	1701 lié	1679 libre	1654 libre	1641 lié

Tableau 20 – Attribution des bandes CO du pseudotriptide 6b (DMSO-*d*₆ / 10 mM et CHCl₃ / 10 mM)

L'ensemble des attributions des fonctions carbonyles et NH est reporté dans la Figure 103. Sont représentées en rouge et vert, les valeurs respectives des fonctions CO libres et engagé dans une liaison hydrogène dans le CHCl₃. En noir et gris, sont décrites les valeurs respectives des fonctions NH libres et lié dans le CHCl₃.

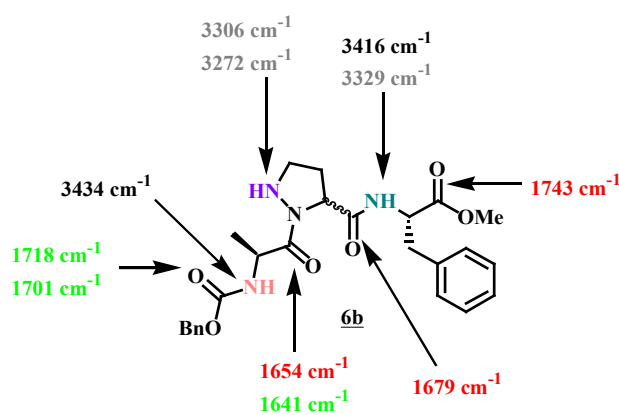


Figure 103–Attribution des bandes CO et NH du pseudotriptide 6b (CDCl₃ / 10 mM)

A partir de cette attribution, nous pouvons en déduire que le carbonyle du lien peptidique Ala- δ azaPro est à la fois libre et engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire. De plus, il a pu être démontré que le carbonyle carbamidique est impliqué dans deux liaisons hydrogène intramoléculaires.

Analyses	Conclusions
Influence du DMSO- d_6	NH (δ azaPro) : liaison hydrogène forte NH (Phe) : équilibre libre / lié
Déconvolution des bandes NH	NH (δ azaPro) : liaison hydrogène + 2 liaisons hydrogène supplémentaires
Déconvolution des bandes CO	CO (Ala) : équilibre libre / lié CO (Z) : impliqué dans deux liaisons hydrogène

Tableau 21 – Ensemble des conclusions obtenus pour le pseudotriptide **6b** lors des analyses IR et ^1H RMN

En recoupant ces résultats avec ceux obtenus lors de la déconvolution des bandes NH ainsi que ceux lors de l'étude de l'influence du DMSO- d_6 (Tableau 21), nous avons pu établir l'existence d'un équilibre décrit dans la Figure 104.

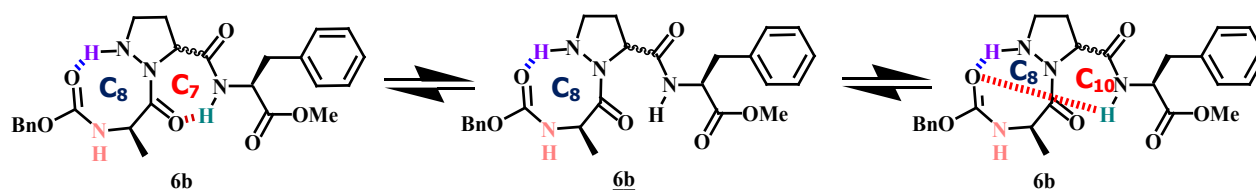


Figure 104 – Hypothèses de liaisons hydrogène au sein du pseudotriptide **6b**

Le proton NH hydrazidique est toujours engagé dans une liaison hydrogène avec le carbonyle carbamidique. En ce qui concerne le proton NH du résidu phénylalanine, il existe un équilibre entre les formes libre et liée : celui-ci peut être à la fois lié au carbonyle du lien Ala- δ azaPro ainsi qu'au CO du groupement Z formant ainsi une liaison bifide.

IV.3.5 Conclusions

Quelque que soit la forme présente en solution, la conformation *trans* est toujours favorisée. Bien que la conformation privilégiée ne soit pas celle désirée, nous avons pu mettre en évidence que le pseudotriptide **5b** favorise la conformation *cis* par formation d'un pseudocycle en C₁₀. Ce résultat permet de conforter l'hypothèse que la présence du groupement Boc induit une gêne stérique avec la chaîne alkyle de l'alanine favorisant la formation d'un pseudocycle en C₁₀. Nous pouvons donc conclure que la présence d'un groupement encombrant sur l'azote δ constitue un facteur important pour favoriser la conformation *cis* du lien X-azaPro.

V. Conclusions

L'analyse conformationnelle des différents composés a pu mettre en évidence une structuration particulière des pseudopeptides étudiés due à la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires décrits dans la Figure 105.

*Note : Tous les composés présentent un équilibre entre les formes libre et liée en solution excepté le pseudotriptide **7a** dont la liaison hydrogène intramoléculaire persiste ainsi que le composé **6b** dont le pseudocycle en C₈ est toujours présent.*

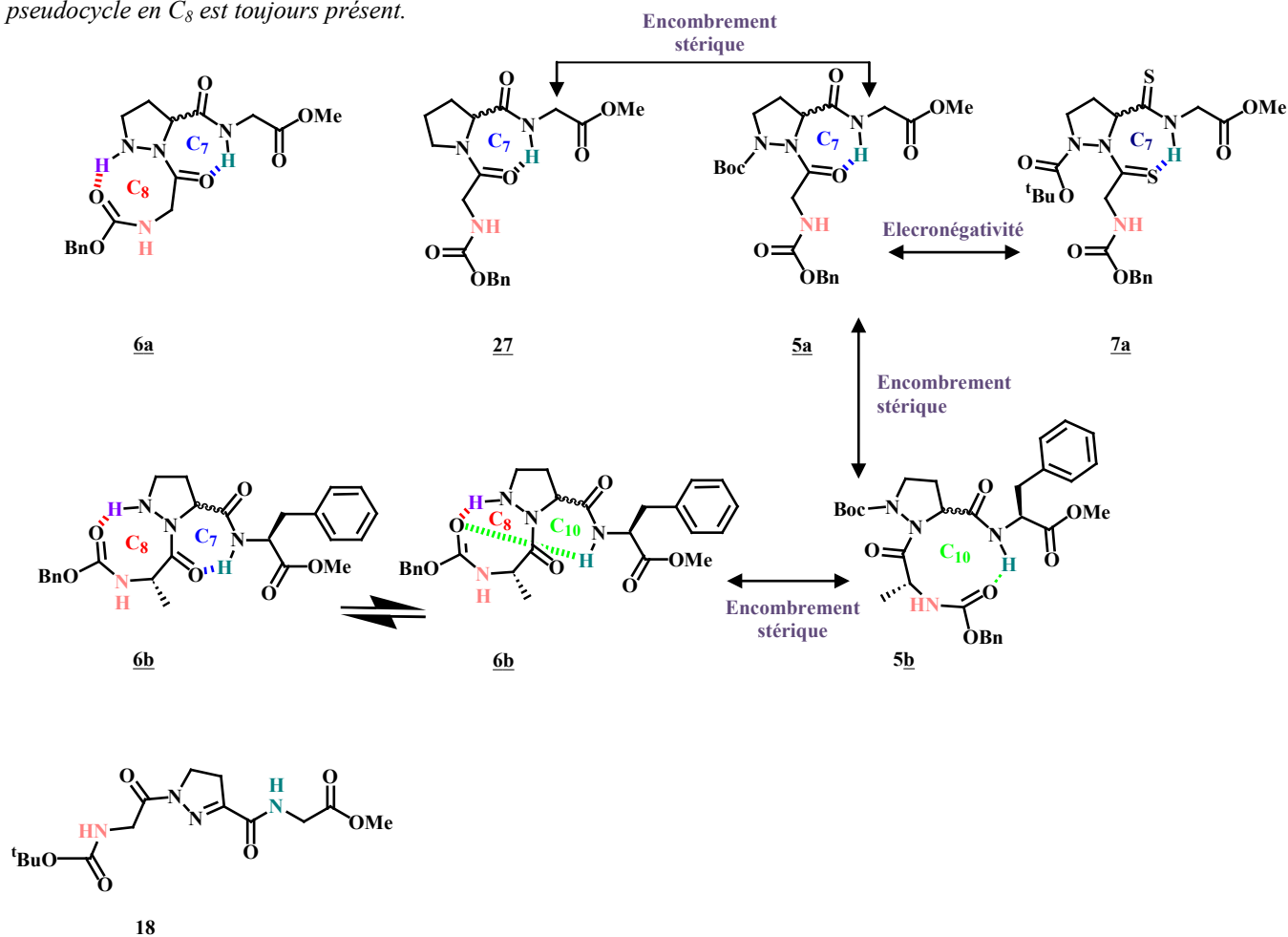


Figure 105– Conformation à l'état lié des composés en solution (CDCl₃ / 10 mM)

L'étude conformationnelle de la pyrazoline **18** a mis en avant l'absence de liaisons hydrogène intramoléculaires ceci étant dû à la présence du lien C=N qui contraint fortement le cycle pyrazolique.

Les composés **27** et **5a** sont capables de former, en solution, un pseudocycle en C₇ qui favorise la conformation *trans* du lien Gly-(δaza)Pro. La force de cette liaison hydrogène est plus prononcée dans le cas du pseudotriptide **5a**. En effet, l'encombrement stérique généré en position δ par l'atome d'azote protégé comparé au méthylène de la proline permet au résidu glycine i+2 une plus grande proximité avec le cycle de la δ-azaproline.

Une étude comparative des composés **7a** et **5a** permet de mettre en évidence qu'une liaison hydrogène est d'autant plus forte que l'hétéroatome impliqué est électro-négatif. Cependant, bien que le composé **5a** décrive un

équilibre libre / lié en solution, le pseudotripeptide **7a** est exclusivement sous sa forme liée avec la formation d'un pseudocycle en C₇.

Le pseudotripeptide **6b** possède une liaison hydrogène intramoléculaire très forte impliquant le proton NH hydrazidique avec le CO du groupement Z contrairement au composé **6a** qui présente un équilibre entre les formes libre et liée pour ce même pseudocycle. De plus, un équilibre particulier a pu être noté avec l'implication d'une partie de la population du proton NH amidique dans une liaison hydrogène avec soit le carbonyle du lien Ala- δ azaPo (de manière analogue au composé **5a**), ou soit le CO du groupement Z. Ce pseudocycle en C₁₀ est certainement favorisé par une éventuelle interaction entre le cycle de la δ -azaproline et le noyau aromatique de la phénylalanine.

Finalement, une comparaison entre les pseudotripeptides **5a** et **5b** met en évidence l'influence de la chaîne latérale de l'acide aminé en amont de la proline : l'encombrement stérique généré par la chaîne alkyle du résidu alanine favorise la conformation *cis* du lien Ala- δ azaPro par formation d'un pseudocycle en C₁₀ tandis que la conformation *trans* est majoritaire dans le cas du composé **5a**. Il en est de même lors de la comparaison entre les pseudotripeptides **5b** et **6b** : la protection de l'atome d'azote supplémentaire de la δ -azaproline par le groupement Boc très encombré favorise la conformation *cis* alors que la *trans* est majoritaire dans le cas où le proton NH hydrazidique est libre. Ces deux études comparatives permettent de mettre en évidence que l'encombrement stérique généré entre la chaîne latérale de l'acide aminé en amont de la proline et le groupement protecteur Boc de l'atome d'azote supplémentaire de la δ -azaproline est un moyen de favoriser la forme *cis*. Cette observation permet de conclure qu'un substrat de type Suc-Ala-Ala- δ azaPro(Boc)-Phe-*p*-NA portant un groupement encombrant sur l'atome d'azote en position δ de la δ -azaproline pourrait être utilisable dans les tests de mesure de l'activité enzymatique des PPIases.

Chapitre II : Incorporation de la δ -azaproline dans des pseudopeptides en vue d'applications biologiques

I Introduction

La seconde partie de ce manuscrit est dédiée à l'élaboration de nouveaux substrats, contenant la δ -azaproline, capable de mesurer l'activité enzymatique des PPIases. Comme énoncé en amont, un substrat de type Suc-Ala-X-Pro-*p*-NA (où X est un acide aminé) est capable de mesurer l'activité catalytique de telles enzymes. Cependant, cette mesure est assez limitée du fait que 10% de la liaison X-Pro soit en conformation *cis*.

L'équipe de Fischer a pu déterminer le taux de conformation *cis* au sein de pseudopeptides de type Ac-Ala-X-Pro-Ala-Lys-NH₂ (Tableau 22).⁸⁸

X	Taux d'isomère <i>cis</i> (%)
Gly	13.7
Ala	7.7
Leu	12.0
Glu	9.0
Phe	23.0
Thr	9.4
Tyr	24.0

Mesuré à 23°C (20 mM tampon phosphate de sodium)

Tableau 22 – Taux de conformation *cis* du lien peptidique X-Pro au sein de pseudopeptides

Cette étude a permis de mettre en avant l'influence de la chaîne latérale en amont de la proline sur la conformation du lien X-Pro. Le taux de conformation *cis* le plus important a été rencontré dans le cas d'un résidu phénylalanine. Cependant, les mesures d'isomérisation *cis* / *trans* ont montré une très faible vitesse dans le cas de cet acide aminé tandis que des résidus avec une petite chaîne latérale comme la glycine ou l'alanine permettent une isomérisation plus rapide du lien X-Pro. Ce résultat a donc dirigé plusieurs équipes de recherches sur des substrats contenant un résidu en amont de la proline dont l'encombrement stérique est assez faible.

Cette même équipe a aussi pu mettre en évidence que l'utilisation de substrat contenant un motif Ser(PO₃H₂)-Pro était capable de mesurer l'activité enzymatique de Pin1 (enzyme essentielle à la progression du cycle cellulaire).¹⁵ Des mesures du ratio *k*_{cat}/*K*_m (où *k*_{cat} est le nombre de molécules de substrats fixés par un site actif par seconde et *K*_m la constante de Michaelis) ont permis de déterminer le substrat le plus efficace dans la mesure de l'activité des PPIases (Tableau 23).

Substrat	<i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Ser(PO ₃ H ₂)-Pro	Pas de catalyse
Ser(PO ₃ H ₂)-Pro-Arg	38
Ala-Ser(PO ₃ H ₂)-Pro	100
Ala-Ser(PO ₃ H ₂)-Pro-Arg	270
Ser(PO ₃ H ₂)-Pro-Arg- <i>p</i> -NA	950
Ac-Ala-Ala-Ser(PO ₃ H ₂)-Pro-Arg- <i>p</i> -NA	9500

Tableau 23 – Mesure du ratio *K*_{cat}/*K*_m de l'enzyme Pin1 pour différents substrats

Plus ce *ratio* est élevé, plus l'isomérisation de la forme *cis* vers la forme *trans* est efficace. Il a pu ainsi être mis en avant que la présence de trois acides aminés sont nécessaires à l'obtention d'une mesure de l'activité catalytique où l'élongation côté *N*-terminale du motif Ser(PO₃H₂)-Pro est plus favorable qu'à celle côté *C*-terminale. Le meilleur résultat a pu être observé dans le cas où le substrat est constitué de 5 acides aminés et pour lequel le résidu Ser(PO₃H₂) est au centre de ce composé.

En parallèle, l'équipe de Mutter a mis en évidence qu'un substrat de type Suc-Val- Ψ Pro-Phe-*p*-NA, où Ψ Pro est un résidu proline modifiée dont le carbone en position γ a été remplacé par un hétéroatome et dont le carbone en position δ a été substitué par un ou plusieurs groupements, est capable de mesurer l'activité enzymatique de certaines PPIases.^{89,90}

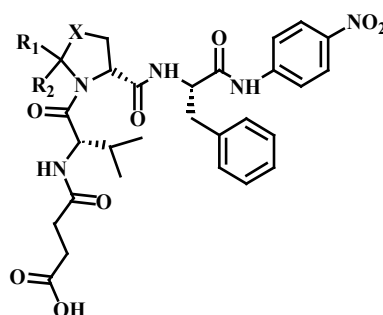


Figure 106 – Structure du substrat Suc-Val- Ψ Pro-Phe-*p*-NA

Différents substrats ont été testés afin de déterminer le taux de conformation *cis* du lien Val- Ψ Pro et sont reportés dans le Tableau 24.

Substrat	X	R ₁	R ₂	% <i>cis</i>		
				H ₂ O	DMSO	CDCl ₃
1 S	O	<i>p</i> -methoxyphényle	H	37	41	55
2 S	S	<i>p</i> -methoxyphényle	H	37	34	42
3	O	CH ₃	CH ₃	85	95	90
4	S	CH ₃	CH ₃	99	100	100

Tableau 24 – Substrats étudiés pour la mesure de l'activité catalytique des PPIases

Cette étude a permis de mettre en évidence que la conformation *cis* est d'autant plus favorisée que le groupement greffé en position δ du cycle de la proline est encombré.

Par ailleurs, l'équipe de Marshall a pu étudier la conformation de substrat contenant une α -azaproline pour lesquels la conformation du lien X- α azaPro a été déterminée. Le lien Pro- α azaPro du synthon Ac-Ala-Pro- α azaPro(S,S)-Ala-NHMe est majoritairement en conformation *cis* par formation d'un coude β de type VIa.⁹¹ Lorsque l'acide aminé en amont de la proline a été remplacé par une alanine, un coude β de type VIb a pu être détecté favorisant ainsi la conformation *cis* du lien Ala- α azaPro (Tableau 25). Ici encore, la présence du résidu alanine en amont de la proline est favorable à la conformation *cis* du lien Ala-Pro.

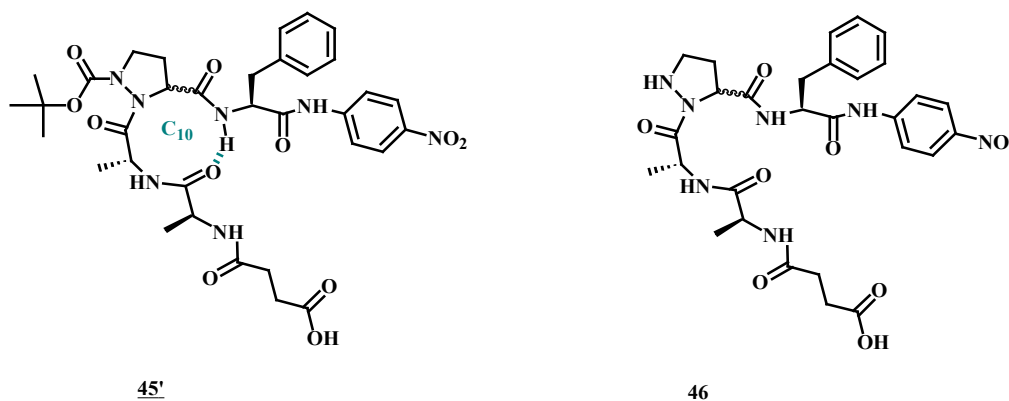
X	Coude β	Taux de conformation <i>cis</i> (%)
Pro	Type VIa	54.7
Ala	Type VIb	77.8

Tableau 25 – Taux de conformation *cis* de pseudopeptides de type Ac-Ala-X- α zaPro(S,S)-Ala-NHMe

En regroupant ces différents résultats avec ceux obtenus lors de l'analyse conformationnelle du pseudotriptide **5b**, il a été possible d'en déduire qu'un substrat serait majoritairement en conformation *cis* si :

- Un groupement encombré occupe la position δ du cycle de la proline
- Un atome d'azote est substitué au sein du cycle de la proline
- L'acide aminé en amont de la proline est un résidu alanine.

Nous nous sommes penché vers l'intermédiaire Suc-Ala-Ala- δ zaPro(Boc)-Phe-*p*-NA qui répond au cahier des charges précisément énoncé. Un tel substrat serait *a priori* capable de favoriser la conformation *cis* par formation d'un pseudocycle en C₁₀ entre le proton NH et le carbonyl du résidu i+2 (substrat **45'**) comme décrit dans la Figure 107.

Figure 107 – Conformation possible des substrats **46** et **45'**

Par ailleurs la conformation du synthon Suc-Ala-Ala- δ zaPro-Phe-*p*-NA **46** sera elle aussi étudiée de manière à le comparer à celle du composé **45'**. La synthèse de tels synthons a été tentée selon plusieurs voies de synthèse qui sont décrites dans la suite de ce chapitre.

II Synthèse par fragment (C-terminale vers N-terminale) des composés **45'** et **46**

II.1 Rétrosynthèse des synthons **45'** et **46**

En synthèse peptidique ou pseudopeptidique, il est important de protéger les fonctions acide et amine des acides aminés afin d'éviter toutes réactions parasites. De ce fait, l'extrémité C-terminale et l'atome d'azote supplémentaire de la δ -azaproline du synthon **46** doivent être respectivement protégés par un groupement benzyl et Boc (Schéma 30) ce qui oriente la synthèse du composé Bzl-Suc-Ala-Ala- δ zaPro(Boc)-Phe-*p*-NA **45** par

fragment. En effet, ce composé pourrait alors être obtenu par couplage peptidique des composés Bzl-Suc-Ala-Ala-OH (**36**) et H- δ azaPro(Boc)-Phe-*p*-NA (**44**). L'atome d'azote natif de la δ -azaproline du composé **43** devra être à son tour protégé avec le groupement protecteur Z, pour les mêmes raisons que celles énoncées précédemment. Le pseudopeptide **43** peut alors être vu comme le produit d'un couplage entre la δ -azaproline dont l'extrémité C-terminale est déprotégée (**2**) et le composé H-Phe-*p*-NA (**42**).

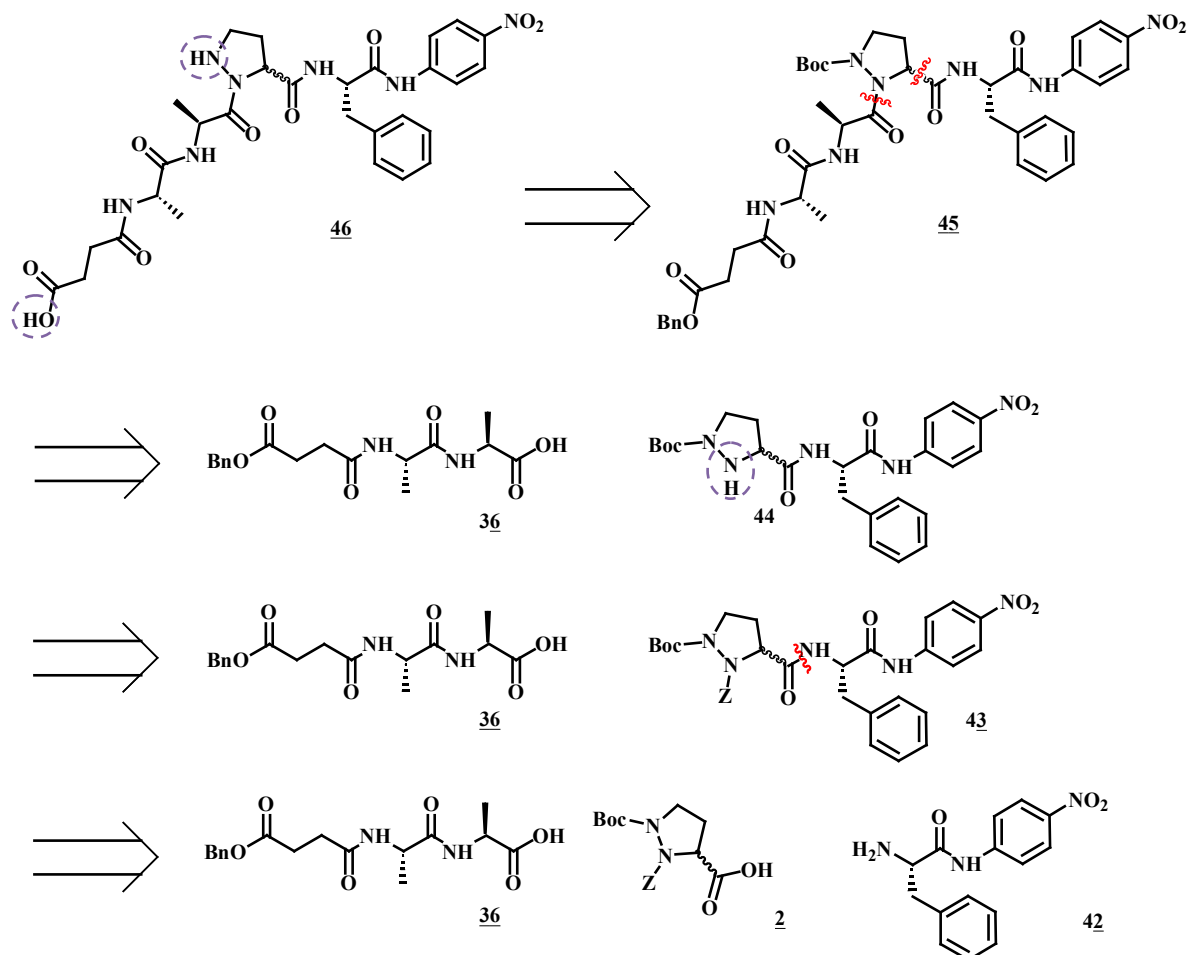


Schéma 30 – Rétrosynthèse du synthon Suc-Ala-Ala- δ azaPro-Phe-*p*-NA **46**

En premier lieu, les fragments **36**, **2** et **42** devront être synthétisés afin de générer les synthons **45'** et **46** en un minimum d'étapes. Le pseudopeptide **45** pourra être ensuite obtenu par couplage peptidique entre la δ -azaproline déprotégée **2** et le fragment **42** (Schéma 31). Après une déprotection de l'atome d'azote N^ε de la δ -azaproline, un couplage peptidique avec le fragment **36** suivi d'une ou plusieurs étapes de déprotections permettront alors de générer respectivement les synthons **45'** et **46**.

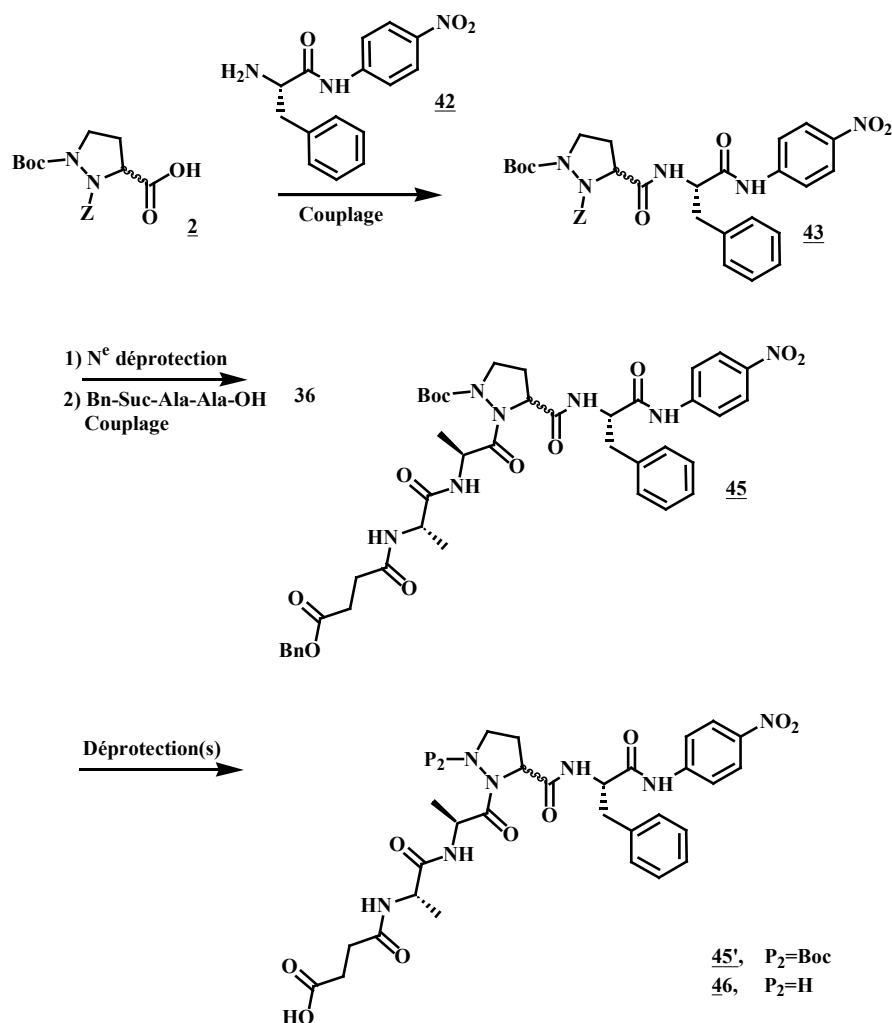


Schéma 31 – Voie de synthèse envisagée pour les synthons 45' et 46

II.2 Synthèse du fragment 36

Afin d'obtenir le composé 36, une voie de synthèse consistant en un couplage peptidique entre le monobenzyl succinate et le dipeptide H-Ala-Ala-OP₁, suivi d'une déprotection de l'extrémité C-terminale a été envisagée (Schéma 32).

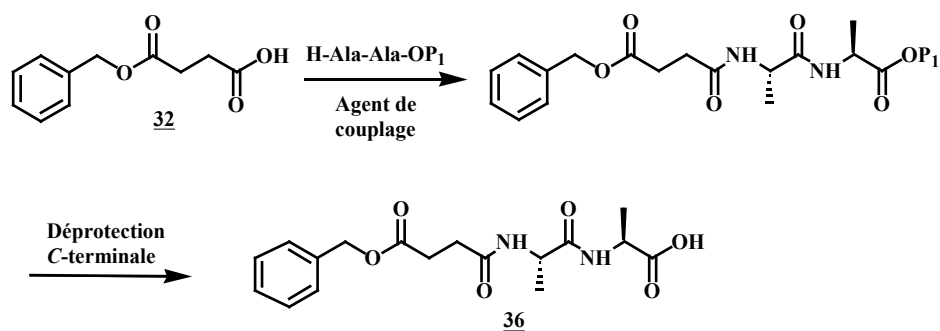


Schéma 32 – Voie de synthèse envisagée pour le fragment 36

Le monobenzyl succinate et le dipeptide H-Ala-Ala-OP₁ n'étant pas commerciaux, ceux-ci ont tout d'abord été synthétisés.

II.2.1 Synthèse du monobenzyl succinate

II.2.1.1 A partir du composé commercial : monométhyl succinate

La première voie de synthèse du monobenzyl succinate envisagée consistait en une réaction d'estérification du monométhyl succinate par l'alcool benzylique, suivie d'une déprotection sélective de l'ester méthylique en milieu basique (Schéma 33).

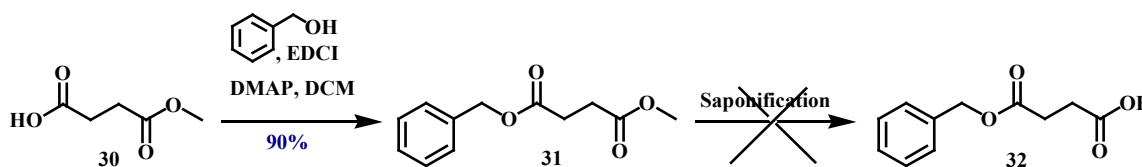


Schéma 33 – Synthèse du monobenzyl succinate à partir du monométhyl succinate

Bien que l'estérification du monométhyl succinate ait conduit au composé **31** avec un très bon rendement de 90%, les différentes tentatives de saponification sélective de l'ester méthylique n'ont jamais conduit à la formation du composé **32**. Afin de déterminer les meilleures conditions d'hydrolyse de la fonction ester méthylique, une étude systématique a été effectuée, utilisant les conditions décrites dans la littérature,^{92,93} visant à faire varier la nature de la base, le solvant et les protocoles d'extraction.

L'utilisation de bases comme les hydroxydes de sodium, lithium et potassium, en quantité stoechiométrique ou en large excès (2 à 25 équivalents), sous agitation à température ambiante pendant 24h dans différents milieux réactionnels (CH₃CN, THF, H₂O, alcools) a conduit dans chaque cas à la génération d'alcool benzylique.

La saponification sélective du diester **31** touche uniquement la fonction ester benzylique (Schéma 34), même dans le cas où les bases étaient utilisées en large excès.

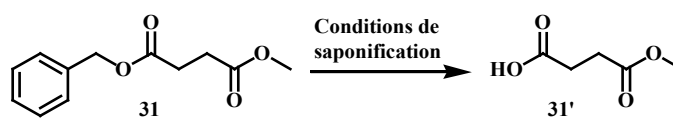


Schéma 34 – Hydrolyse sélective de l'ester benzylique du diester **31**

Cette hydrolyse sélective peut s'expliquer en se penchant sur les valeurs des pK_a des couples (PhOH/PhCO⁻) et (MeOH/MeO⁻), qui sont respectivement de 15,40 et 15,54, pour lesquelles une très légère différence peut être remarquée. Le fait que le nucléofuge soit d'autant meilleur que le pK_a de la base conjuguée soit faible pourrait en partie expliquer la sélectivité de cette réaction d'hydrolyse. Afin de s'affranchir de ces problèmes d'hydrolyse sélective, une autre voie de synthèse par ouverture de l'anhydride succinique par l'alcool benzylique a été envisagée.

II.2.1.2 A partir de l'anhydride succinique

L'ouverture de l'anhydride succinique par l'alcool benzylique, en présence d'une quantité catalytique de DMAP, à température ambiante dans le dichlorométhane,⁹⁴ a permis d'obtenir le monobenzyl succinate après 15h de réaction avec un rendement de 60% (Schéma 35). De même, l'ouverture de l'anhydride succinique par l'alcool benzylique a été tentée en présence d'une quantité catalytique de DMAP à reflux dans le THF.⁹⁵ Après un temps d'agitation de 15h, le composé **32** a été généré avec un rendement de 47%. La méthode employant l'utilisation de dichlorométhane comme solvant a été retenue du fait de sa facilité de mise en œuvre et de son efficacité (Schéma 35).

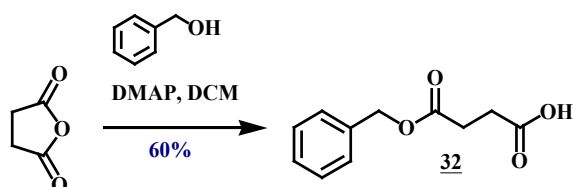


Schéma 35 – Synthèse du monobenzyl ester à partir de l'anhydride succinique

II.2.2 Synthèse du dipeptide H-Ala-Ala-OP₁

II.2.2.1 Choix du groupement protecteur P₁ du dipeptide H-Ala-Ala-OP₁

Les composés monobenzyl succinate et H-Ala-Ala-OP₁ ayant été synthétisés en parallèle, le choix du groupement P₁ s'était tout d'abord orienté vers un méthyle. Malheureusement, des problèmes d'orthogonalité entre les groupes protecteurs Me et Bn similaires à ceux rencontrés lors de l'obtention du monobenzylsuccinate ont aussi été observés au cours de la déprotection de l'extrémité C-terminale du composé Bzl-Suc-Ala-Ala-OMe (Schéma 36).

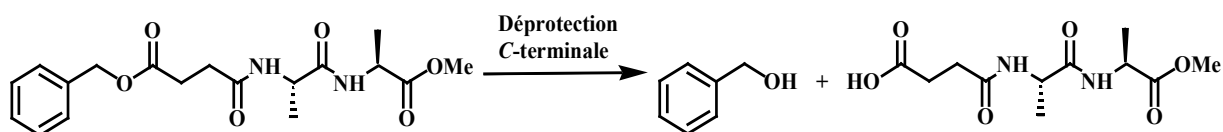


Schéma 36 – Essais de déprotection de l'extrémité C-terminale du composé Bn-Suc-Ala-Ala-OMe

Le choix du groupement protecteur de l'extrémité C-terminale du dipeptide H-Ala-Ala-OP₁ s'est dans un second temps porté vers le groupement *tert*-butyl. En effet, ce groupement protecteur présente l'avantage d'être orthogonal au groupement benzyl,⁹⁶ et peut être déprotégé sélectivement lors de la dernière étape de synthèse du fragment **36** (Schéma 32).

II.2.2.2 Couplage peptidique des résidus Z-Ala-OH et HCl.H-Ala-O^tBu et déprotection de l'extrémité N-terminale

Le dipeptide Z-Ala-Ala-O^tBu a pu être généré par couplage peptidique entre les acides aminés commerciaux Z-Ala-OH et HCl.H-Ala-O^tBu avec un rendement de 78% en utilisant le BOP⁹⁷ comme agent de couplage, contre 69% en présence d'EDCI. Une hydrogénation catalytique en présence de Pd/C (20%) dans le méthanol a permis de déprotéger sélectivement l'extrémité N-terminale du dipeptide Z-Ala-Ala-O^tBu avec un rendement quantitatif (Schéma 37).

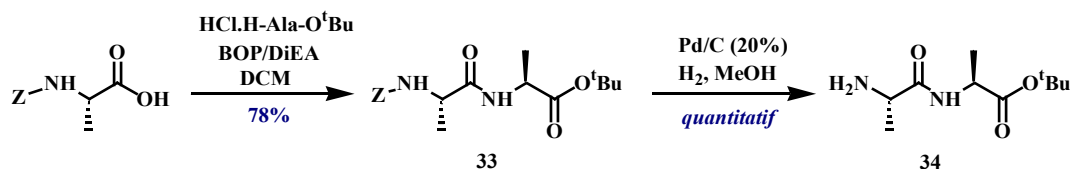


Schéma 37 – Synthèse de H-Ala-Ala-O^tBu 34

II.2.3 Couplage entre le monobenzyl succinate et H-Ala-Ala-O^tBu / Déprotection C-terminale

Afin de coupler le monobenzyl succinate et le dipeptide H-Ala-Ala-O^tBu (Schéma 38), l'EDCI et le BOP ont été utilisés, permettant de former le composé 35 en 24h avec des rendements respectifs de 86% et 100%. La méthode utilisant le BOP comme agent de couplage a donc été retenue.

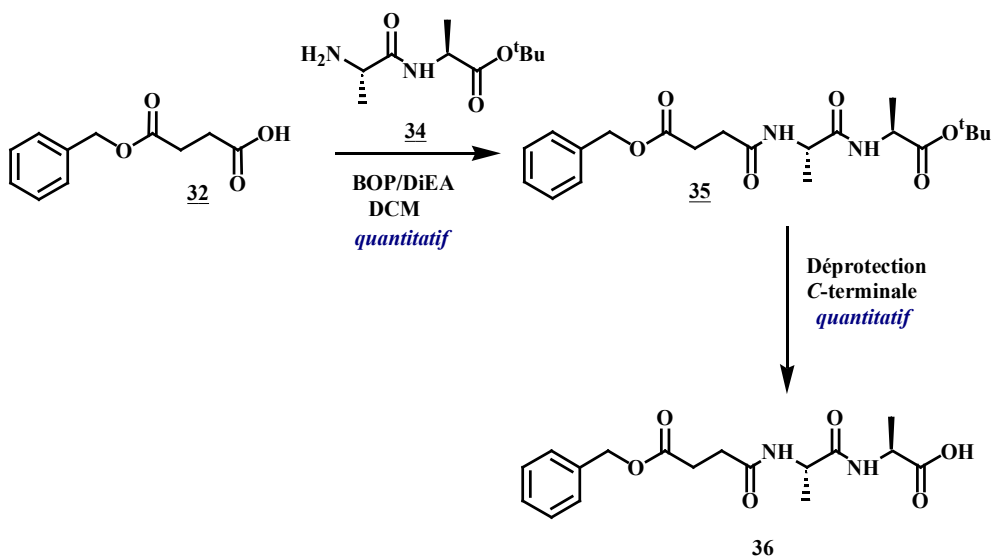


Schéma 38 – Synthèse du composé 36 par couplage entre le monobenzyl succinate et H-Ala-Ala-O^tBu / Déprotection C-terminale

La déprotection de l'extrémité C-terminale a été réalisée dans différentes conditions qui sont consignées dans le Tableau 26.

Essais	Conditions	T (°C)	t (h)	Rdt (%)
1	I ₂ /CH ₃ CN/H ₂ O	75°C	15	100 ^a
2	TFA/DCM (4/6)	TA	1	100
3	AcOH/iPrOH/H ₂ O	98°C	24	100

a : non reproductible

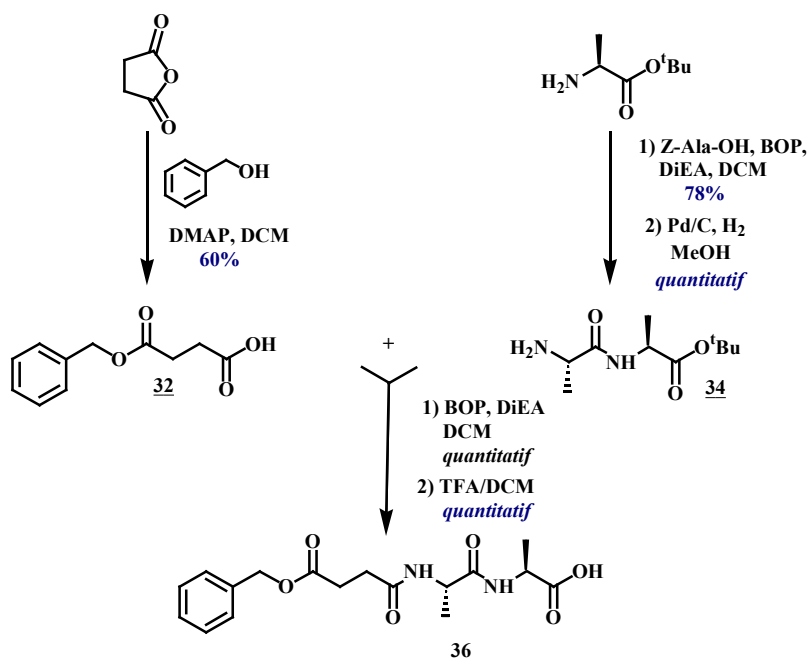
Tableau 26 – Conditions de déprotection de l'extrémité C-terminale de Bzl-Suc-Ala-Ala-O^tBu **35**

L'hydrolyse d'un ester *tert*-butylique dans l'acétonitrile est possible par utilisation d'un mélange d'iode à 30% dans l'eau pendant 4-5h à reflux.⁹⁸ Cette condition de déprotection a été testée afin de déprotéger l'extrémité C-terminale du composé Bzl-Suc-Ala-Ala-O^tBu et a permis d'obtenir le fragment **36** avec un rendement quantitatif. Malheureusement cette réaction s'est avérée non reproductible même après plusieurs essais à différentes températures, où dans chaque cas le produit de départ fût récupéré.

La méthode classique utilisant l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane en proportion 40:60,⁹⁹ suivie d'un lavage à l'hydrogénocarbonate de sodium a généré le fragment **36** avec un rendement quantitatif (Essai 2).

L'utilisation d'un mélange AcOH/iPrOH/H₂O en proportion 4:4:1 permet de déprotéger sélectivement et quantitativement un ester *tert*-butylique avec un temps d'agitation de 24h à 98°C,¹⁰⁰ ce qui a bien été le cas du départ du groupement ^tBu du composé **35** (Essai 3).

II.2.4 Conclusions

Schéma 39 – Synthèse du fragment **36**

La synthèse du fragment **36** a pu être réalisée avec succès après 5 étapes et avec un bon rendement global de 47% (Schéma 39), à partir de composés commerciaux comme l'anhydride succinique et l'alcool benzylique, et des acides aminés protégés Z-Ala-OH et HCl.H-Ala-O^tBu.

II.3 Synthèse du fragment **2**

La synthèse de ce fragment a été décrite dans le chapitre I (partie A) de ce manuscrit. Pour rappel, le fragment **2** a pu être synthétisé en 7 étapes et avec un rendement global de 59% (Schéma 40).

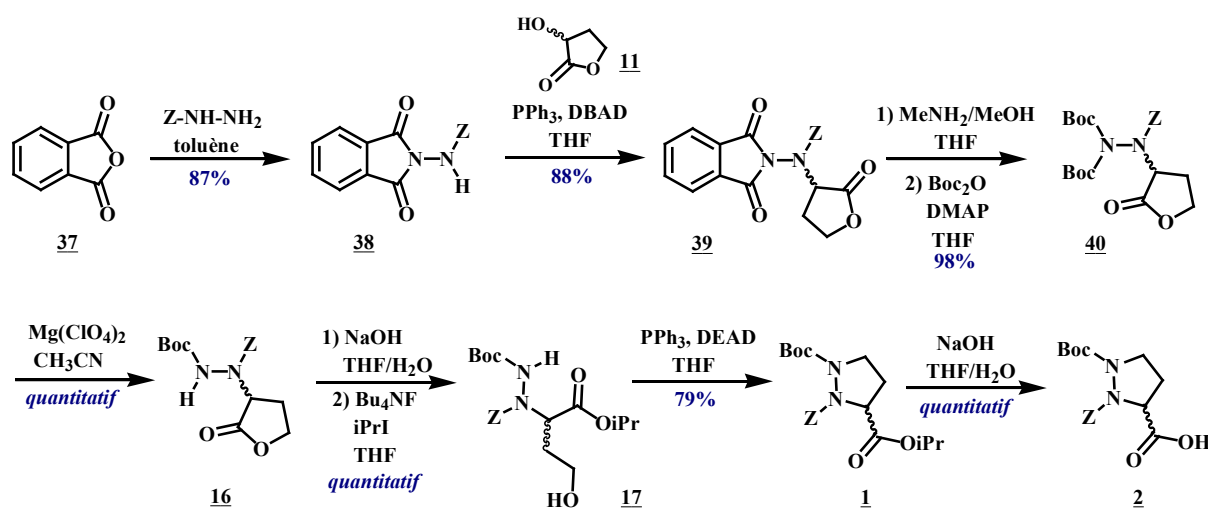


Schéma 40 – Synthèse du fragment **2**

II.4 Synthèse du fragment **42**

La synthèse du fragment **42** a été envisagée par couplage entre l'acide aminé commercial Boc-Phe-OH et la *p*-nitroaniline, suivie d'une déprotection de l'extrémité *N*-terminale du composé **41** en milieu acide (Schéma 41).

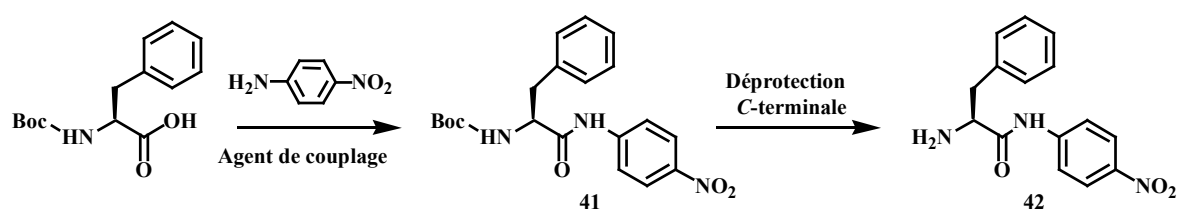


Schéma 41 – Voie de synthèse du fragment **42**

Il a été décrit par l'équipe de Nikoulin¹⁰¹ que le composé Boc-Phe-*p*-NA pouvait être obtenu avec un bon rendement de 69% par couplage peptidique entre l'acide aminé protégé Boc-Phe-OH et la *p*-nitroaniline avec la méthode EDCI/HOBt/DCM à température ambiante en une nuit. Malheureusement, cet agent de couplage n'a pas permis d'obtenir le composé désiré, et ce même en chauffant le milieu réactionnel à 35°C et pour des temps

d'agitation allant jusqu'à 5 jours. L'agent de couplage HATU, qui est d'ordinaire utilisé pour des couplages peptidiques stériquement encombrés, a aussi été utilisé avec la technologie micro-ondes (90°C, 50 à 70W, 3x5 min). Malheureusement, les produits de départ Boc-Phe-OH et la *p*-nitroaniline ne réagissent pas non plus dans ces conditions.

D'après l'équipe de Tesser,¹⁰² le caractère peu nucléophile de la *p*-nitroaniline rend les méthodes classiques de couplages peptidiques inefficaces. L'utilisation des méthodes de couplages DCC, DCC/HOBt et des anhydrides mixtes permettent d'atteindre, pour certains acides aminés dont l'extrémité *N*-terminale est protégée, des rendements d'au plus 30%. Cependant, l'activation de la fonction acide d'un acide aminé par l'oxychlorure de phosphoryle dans la pyridine à basse température permet de générer un anhydride mixte *in situ* qui peut être aminolysé par la *p*-nitroaniline (Schéma 42) à -15°C en seulement 15-30 minutes. La pyridine, qui est une base faible, est un solvant de choix car elle permet de catalyser l'attaque nucléophile et de protéger les groupements protecteurs sensibles aux attaques acides (comme le groupement protecteur Boc) d'une éventuelle réaction d'hydrolyse.

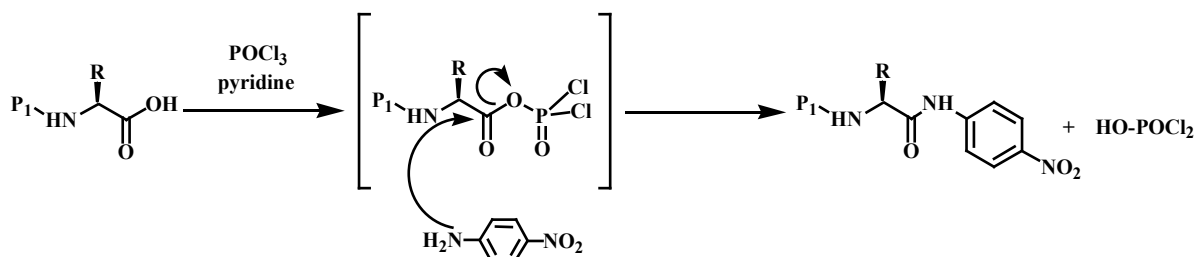


Schéma 42 – Mécanisme de couplage d'un acide aminé activé par POCl_3 et de la *p*-nitroaniline (P_1 : groupe protecteur)

Après activation de l'acide aminé Boc-Phe-OH par l'oxychlorure de phosphoryle à -15°C, l'anhydride mixte généré a pu être couplé à la *p*-nitroaniline pour générer le composé Boc-Phe-*p*-NA avec un bon rendement de 84% en seulement 15 minutes (Schéma 43). La liaison *p*-nitroanilide étant stable en milieu acide, la partie *N*-terminale a ensuite été libérée quantitativement de son groupement protecteur Boc au moyen d'acide trifluoroacétique (TFA) en proportion 40:60 dans le dichlorométhane, suivi d'un lavage à l'hydrogencarbonate de sodium.

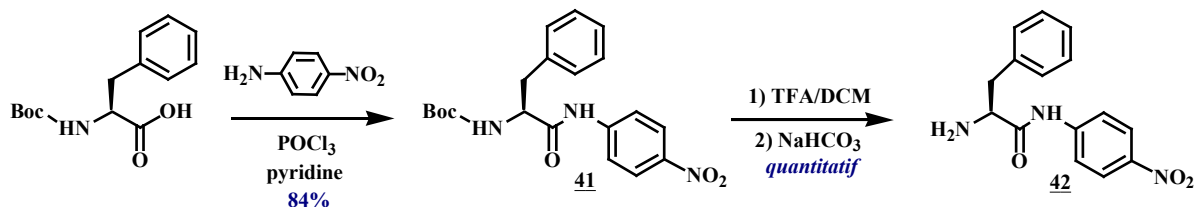


Schéma 43 – Voie de synthèse du fragment 42

Avec cette voie de synthèse, le fragment 42 a pu être synthétisé avec succès en deux étapes, à partir de la *p*-nitroaniline et de l'acide aminé commercial Boc-Phe-OH, avec un très bon rendement global de 84%.

II.5 Synthèse du fragment 44

Le fragment 44 peut être obtenu par couplage peptidique entre les fragments 2 et 42 précédemment obtenus, suivi d'une déprotection du groupement protecteur Z de la δ -azaproline (Schéma 44).

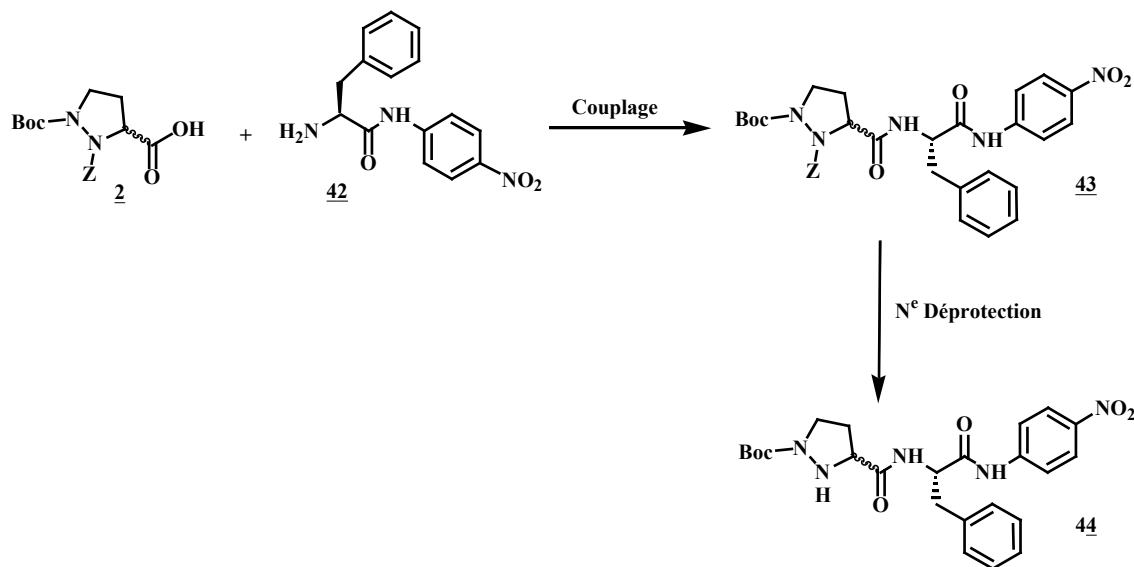


Schéma 44 – Voie de synthèse du fragment 44

II.5.1 Couplage entre les fragments 2 et 42

Une étude systématique a été menée de manière à définir les conditions optimales d'obtention du composé 43 et sont consignées dans le Tableau 27.

Essais	Conditions de couplage	T (°C)	t	Rdt (%)
1	EDCI/HOBt/TEA/DCM	TA	24h	13
2	PyBOP/TEA/DCM	TA	24h	25
3	BOP/TEA/DCM	TA	24h	30
4	POCl ₃ /pyridine	-10°C	15 min	69

Tableau 27 – Conditions de couplage des fragments 2 et 42

Les agents de couplage EDCI, PyBOP et BOP ont tout d'abord été utilisés et ont permis de générer le composé 43 avec des rendements respectifs de 13, 25 et 30%. Pour ces trois méthodes de couplages, la purification par colonne chromatographique s'est avérée assez fastidieuse du fait de la présence d'une impureté non identifiable et difficile à séparer du produit désiré. De plus, les faibles rendements de cette réaction de couplage peuvent s'expliquer par la présence du groupement électroattracteur -NO₂ qui désactive l'amine de la phénylalanine.

En effet, un couplage peptidique entre la δ -azaproline **2** et H-Phe-OMe.HCl permet de générer le pseudodipeptide Z- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe **3b** avec un très bon rendement de 81% après 24h d'agitation à température ambiante (Schéma 45).

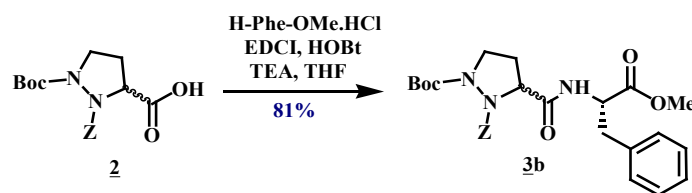


Schéma 45 – Couplage entre la δ -azaproline **2** et H-Phe-OMe.HCl

Ce résultat prouve bien le caractère désactivant du groupement $-\text{NO}_2$ sur la réaction de couplage peptidique entre la δ -azaproline **2** et H-Phe-*p*-NA **42**. Ces deux observations nous ont donc poussé à utiliser le POCl_3 comme agent de couplage dans les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe II.3 de ce chapitre afin d'obtenir le composé **43** avec un bon rendement de 69% (Schéma 46). En plus d'être rapide, cette méthode de couplage nous a permis de s'affranchir de toute purification par colonne chromatographique.

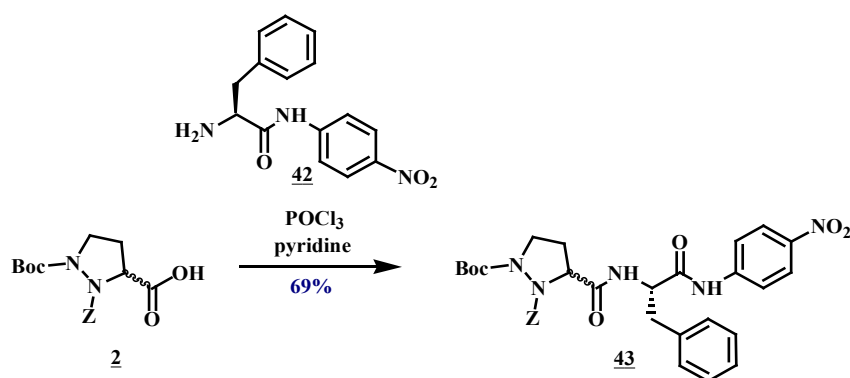


Schéma 46 – Couplage peptidique entre les fragments **2** et **42**

II.5.2 Déprotection du groupement protecteur Z du pseudotripeptide **43**

Afin de pouvoir coupler les fragments **36** et **44**, il est nécessaire de cliver sélectivement le groupement Z du pseudopeptide **43** (Schéma 47).

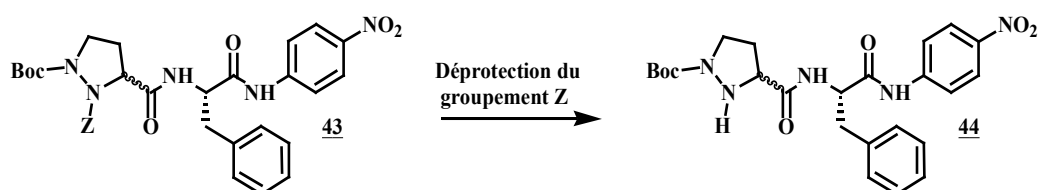


Schéma 47 – Déprotection du groupement Z du pseudopeptide **43**

Plusieurs conditions de déprotection ont été testées afin de conduire au produit désiré : dérivés palladiés, conditions acides et basiques, transprotections suivie d'une déprotection... Ces différentes méthodes sont exposées dans les paragraphes suivants.

II.5.2.1 Méthodes classiques

II.5.2.1.1 Avec les dérivés palladiés

La déprotection du groupement protecteur Z a tout d'abord été tentée en présence de dérivés palladiés (Schéma 48).

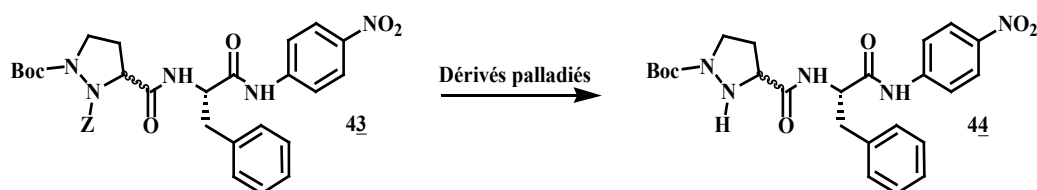


Schéma 48 – Déprotection du groupement Z du pseudopeptide à l'aide de dérivés palladiés

Bien que les groupements Z et NO_2 -aromatique soient assez sensibles à ce type de conditions, nous pensions toutefois pouvoir jouer sur les paramètres réactionnels afin de favoriser la déprotection du groupement protecteur Z (Tableau 28).

Essais	Conditions	T	P	Commentaires
1a-b	Pd/C (10% ou 20%), H_2 , MeOH	TA	/	a
2	$\text{Pd}(\text{OH})_2$ (20%), H_2 , MeOH	50°C	/	a
3	Graphite, $\text{NH}_2\text{-NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, EtOH	80°C	/	a
4a-b	Pd/C (5%), HCOONH_4 , <i>i</i> PrOH	75°C	30 ou 50W	b
5	Pd/C (10%), 1,4-cyclohexadiène, EtOH abs.	TA	/	b
6	Pd/C (10%), 1,4-cyclohexadiène, EtOH 96%.	TA	/	b

a : réduction NO_2 , b : récupération du produit de départ

Tableau 28 – Conditions de déprotection du groupement protecteur Z du composé 43 en présence de dérivés palladiés

Les dérivés palladiés comme Pd/C et $\text{Pd}(\text{OH})_2$ ont été utilisés dans des solvants comme l'éthanol ou le méthanol, sous courant d'hydrogène à température ambiante pendant 24h afin de déprotéger l'azote natif de la δ -azaproline (Essais 1a-b et 2). Ces différents essais se sont soldés par des échecs car l'utilisation de ces dérivés palladiés dans de telles conditions a réduit exclusivement le groupement $-\text{NO}_2$ pour conduire à la formation du composé 47 (Schéma 49).

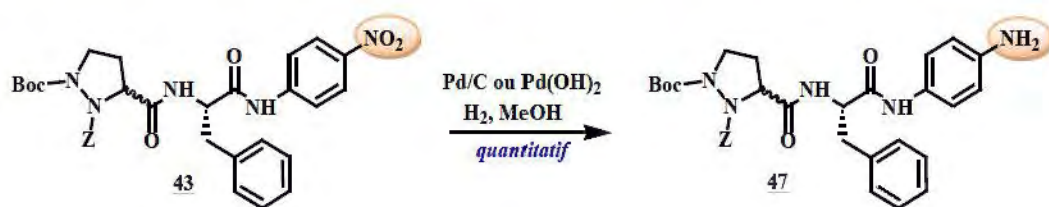


Schéma 49 – Réduction du groupement -NO_2 du pseudopeptide **43** en présence des dérivés palladiés Pd/C et Pd(OH)₂

Nous nous sommes donc penché sur des hydrogénations par transfert en espérant pouvoir couper le groupement Z avant de réduire le groupement -NO_2 . L'utilisation de graphite et d'hydrazine comme générateur d'hydrogène *in situ* dans l'éthanol¹⁰³ a aussi conduit à la formation du composé **47** (Essai 3).

La déprotection du groupement protecteur Z a ensuite été tentée avec l'assistance des micro-ondes en présence de Pd/C (5%) et de formiate d'ammonium, comme donneur d'hydrogène, dans l'isopropanol¹⁰⁴ (Essais 4a-b). Au cours de ces tentatives, aucune réaction n'a été observée même lorsque le milieu réactionnel a été soumis à de nombreux cycles aux micro-ondes (avec une puissance allant de 30 à 50W) suivis d'une agitation de 24h à température ambiante. L'absence de réaction peut s'expliquer par le fait que la cinétique de réaction est très lente dans un solvant comme l'isopropanol.¹⁰⁵

A ce stade, nous nous sommes penché sur des conditions intermédiaires entre celles précédemment utilisées, c'est-à-dire assez douces pour ne pas réduire le groupement -NO_2 , mais assez fortes pour que la cinétique de réaction ne soit pas bloquée. Les paramètres réactionnels à modifier étaient le réactif donneur d'hydrogène et le solvant de réaction. Les transferts d'hydrogène étant plus rapides dans des solvants comme l'acide acétique ou l'éthanol,¹⁰⁵ nous nous sommes tourné vers l'éthanol comme solvant. Le choix du donneur d'hydrogène s'est orienté vers le 1,4-cyclohexadiène connu pour être plus efficace que le formiate d'ammonium.¹⁰⁵ Une hydrogénation par transfert en présence de Pd/C (10%) et de 1,4-cyclohexadiène dans l'éthanol absolu a donc été testée (Essai 5). Malheureusement, le produit de départ **43** n'a pas non plus réagi dans ces conditions. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'éthanol absolu contient des traces de plomb et de benzène qui sont capables, dans certains cas, d'empoisonner les hydrogénations catalytiques. Afin de s'assurer que le solvant précédemment utilisé ne soit pas un frein à la faisabilité de la réaction, une déprotection du groupement Z a été tentée dans l'éthanol à 96% (Essai 6), les autres paramètres réactionnels restant inchangés. Dans ce cas, le produit de départ a été récupéré dans son intégralité même après 2 jours d'agitation à température ambiante.

Au vu de ces résultats infructueux, nous avons décidé de changer de méthode de déprotection du groupement protecteur Z en utilisant des conditions acides.

II.5.2.1.2 En milieu acide

Une autre méthode classique de déprotection du groupement protecteur Z emploie une solution de bromure d'hydrogène dans l'acide acétique pendant plusieurs heures d'agitation à température ambiante. Cette méthode a permis à l'équipe de Sacchetti de déprotéger à 95% la fonction Z du composé **48** en 36h¹⁰⁶ (Schéma 50).

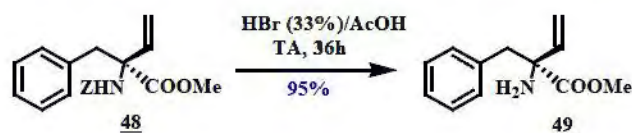


Schéma 50 – Déprotection d'un groupement Z à partir de HBr/AcOH

Dans notre cas, l'utilisation d'une solution de HBr à 33% dans l'acide acétique à température ambiante pendant 24h (Essai 1) a permis de générer le composé **50** pour lequel les groupements protecteurs Z et Boc ont été déprotégés (Schéma 51). De plus, l'oxydation de la liaison NH-CH α du cycle de la δ -azaproline a été observée dans de telles conditions.

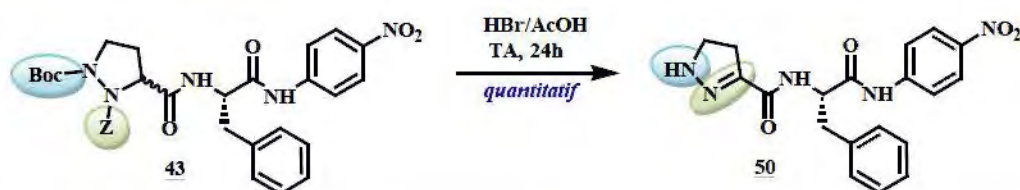


Schéma 51 – Déprotection des groupements protecteurs Boc et Z du pseudopeptide **43** par HBr/AcOH pendant 24h

Au vu de ce résultat, une étude systématique a été réalisée de manière à trouver des conditions de réaction permettant de déprotéger sélectivement le groupement protecteur Z sans cliver le lien *tert*-butyl carbamidique. Pour cela, le composé **43** a été soumis à une solution de HBr dans l'acide acétique en milieu plus dilué (concentration en HBr comprise entre 0,01 et 0,3g/L), à température ambiante, pour des temps d'agitation plus courts (2h) ; puis à plus basse température (5°C).

Malheureusement, ces essais n'ont pas été fructueux car à chaque fois la déprotection non désirée du groupement protecteur Boc a été observée sans aucun effet sur le groupement Z (Schéma 52).

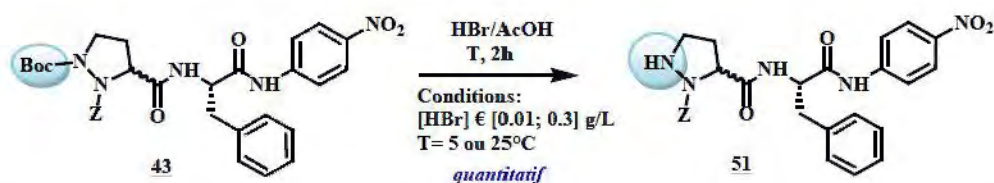


Schéma 52 – Déprotection du groupement protecteur Boc du pseudopeptide **43** par HBr/AcOH pendant 2h

Cette étude met en évidence que, dans ce cas, la cinétique de déprotection du groupement protecteur Z du pseudopeptide **43** est beaucoup plus lente que celle du Boc, et que l'accessibilité de l'acide au carbonyle du lien carbamidique du groupement Z est limitée par encombrement stérique.

II.5.2.2 Alternatives : changement de groupes protecteurs

II.5.2.2.1 Transprotection du groupement Boc en Fmoc

La méthode HBr/AcOH inefficace pour déprotéger sélectivement le groupement Z a amené à l'utilisation d'un autre groupement protecteur sur l'azote supplémentaire N $^{\delta}$ de la δ -azaproline du composé **51**. Un groupement Fmoc, stable en milieu acide, permettrait ainsi, la déprotection sélective du groupement protecteur Z

en présence d'une solution de bromure d'hydrogène dans l'acide acétique à température ambiante avec un temps d'agitation de 24h (Schéma 53), comme il a pu être observé lors du premier essai décrit dans le paragraphe précédent de ce chapitre.

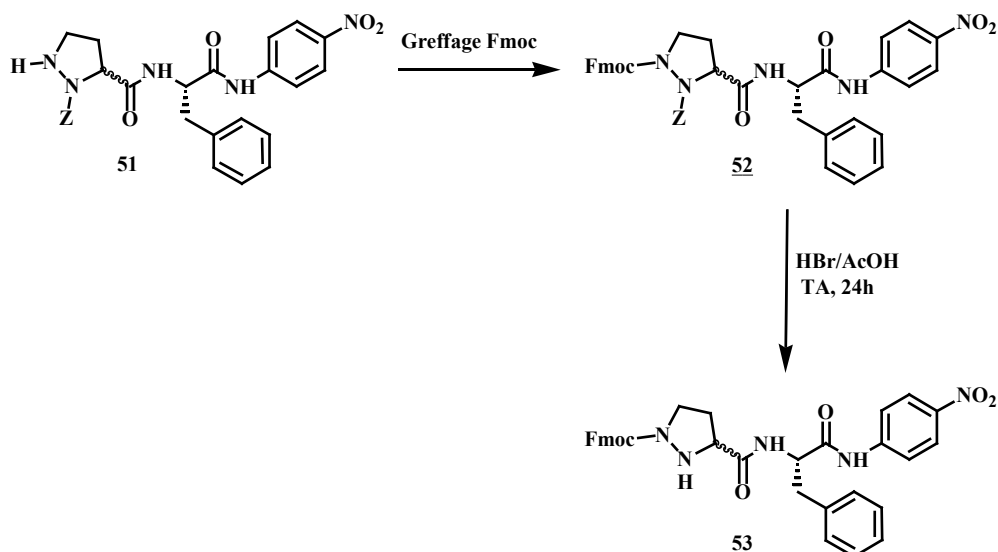


Schéma 53 – Greffage du groupement protecteur Fmoc sur la δ -azaproline / Déprotection sélective du groupement protecteur Z

Malgré plusieurs tentatives, il a été impossible de greffer le groupement Fmoc sur l'azote supplémentaire N⁶ de la δ -azaproline aussi bien à partir du composé Fmoc-Cl que Fmoc-OSu. Dans ces deux cas, le pseudopeptide **51** ne réagit pas dans les conditions utilisées, et ce probablement du fait de l'encombrement stérique généré par les motifs aromatiques des groupements protecteurs Z et Fmoc.

Ces différents résultats nous ont poussé à nous tourner vers une autre méthode qui consiste en une transprotection du groupement Z en un autre groupement protecteur P₁ peu encombré, suivie d'une déprotection sélective de P₁ avec des conditions orthogonales vis-à-vis des groupements Boc et -NO₂ (Schéma 54).

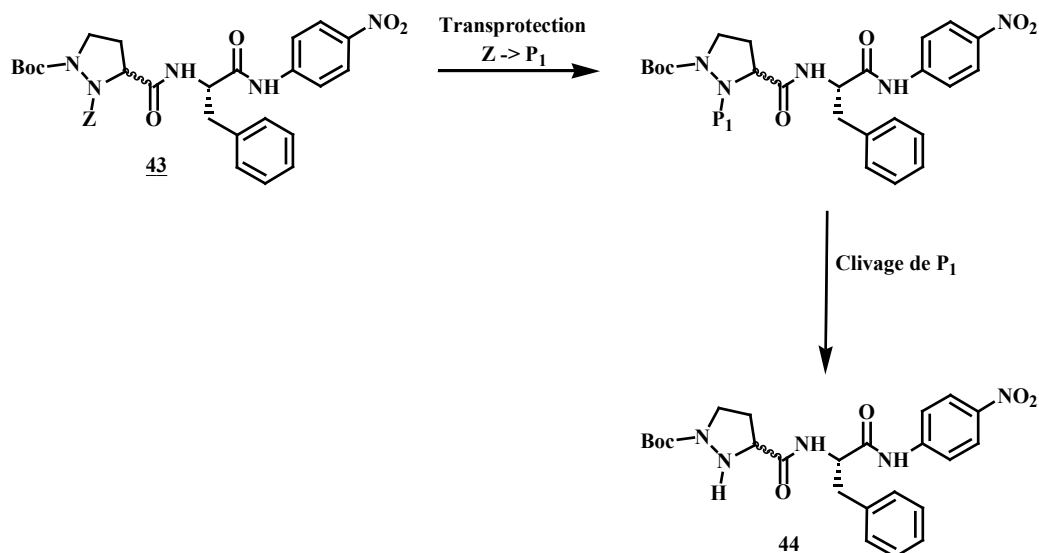


Schéma 54 – Transprotection Z->P₁ suivie d'une hydrolyse sélective de P₁

II.5.2.2 Transprotection/déprotection *via* le groupement Teoc

Le choix du groupement protecteur P₁ s'est porté vers un Teoc (Me₃SiCH₂CH₂OCO) qui présente l'avantage de pouvoir être déprotégé à l'aide de composé fluoré (Schéma 55), condition pour laquelle les groupements -NO₂ et Boc restent stables.

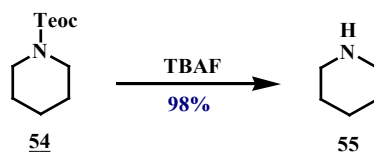


Schéma 55 – Déprotection du groupement Teoc en présence de TBAF

Le chloroformate de triméthylsilyléthyle (Teoc-Cl) peut être obtenu avec des rendements compris entre 75 et 85% à partir de triméthylsilyléthanol et de triphosgène en présence d'une base comme la triéthylamine¹⁰⁷ dans un solvant comme le dichlorométhane après 6 heures d'agitation à température ambiante (Schéma 56). Il est à noter que le chloroformate de triméthylsilyléthyle est un composé très instable et doit être engagé dans une réaction de transprotection juste après sa formation.

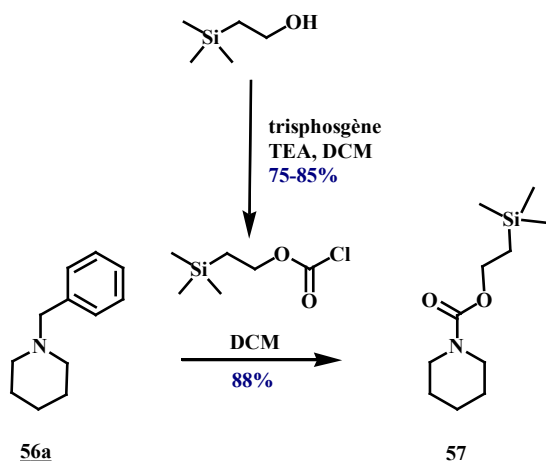


Schéma 56 – Transprotection du groupement Z en Teoc suivie d'une déprotection en milieu basique

Le composé Teoc-Cl peut être utilisé afin de déalkyler les amines tertiaires selon le mécanisme décrit dans le Schéma 57.

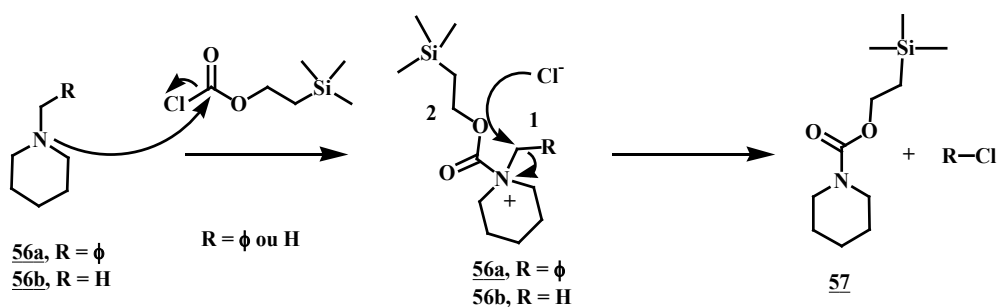


Schéma 57 – Mécanisme de transprotection d'un groupement Bn en Teoc

Il a été noté par l'équipe de Campbell que l'ion chlorure attaquait majoritairement le site électrophile 1 dans le cas d'une débenzylation ($R=\phi$).¹⁰⁸ Tandis que lors d'une déméthylation ($R=H$), l'ion chlorure est capable d'attaquer aussi bien le site électrophile 2 que le 1 car ce dernier est beaucoup moins électrophile que celui du composé **56a**. Cette faible électrophilie abaisserait le rendement de transprotection à 58%.

Dans notre cas, nous pensons la transprotection du groupement Z en Teoc possible selon le mécanisme décrit dans le Schéma 58.

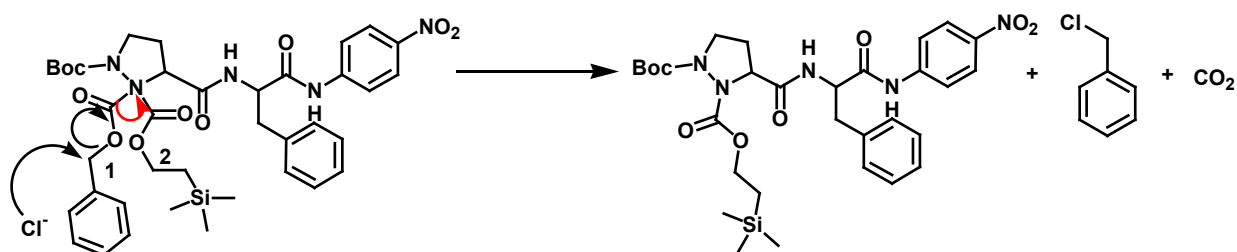


Schéma 58 – Eventuel mécanisme de transprotection d'un groupement Z en Teoc

L'ion chlorure attaquerait majoritairement le site 1 car celui-ci est plus électrophile que celui du composé **56a**. L'amine serait alors libérée de son groupement Z par formation de chlorure de benzyle et de dioxyde de carbone.

Des essais de transprotection ont été effectués sur le composé Z- δ azaPro(Boc)-Phe-*p*-NA à l'aide du chloroformate de trimethylsilylthyle dans le THF ou le dichlorométhane sous agitation à température ambiante pendant 24h. Pour ces différents essais, l'analyse par ^1H RMN montre que le groupement Z protège toujours l'azote natif de la δ -azaproline. Ceci peut nous amener à en conclure que le composé Teoc-Cl ne peut pas se greffer sur l'azote natif de la δ -azaproline à cause de l'encombrement stérique généré par les groupements protecteurs Boc et Z.

Les différentes méthodes de déprotection employées jusqu'ici n'ont pas permis de déprotéger le groupement Z à cause de problèmes d'orthogonalité ou de gêne stérique. Face à ces résultats, nous avons décidé de revoir les étapes précédentes dans la voie de synthèse et de changer certains groupements protecteurs des atomes d'azotes natif et supplémentaire de la δ -azaproline. Ces différentes tentatives sont reportées dans le paragraphe II.5.3 de ce chapitre. Par ailleurs, plusieurs méthodes assez exotiques ont été utilisées afin de déprotéger le pseudopeptide **43** de son groupement Z en milieu basique.

II.5.2.2.3 En milieu basique

Suite à ces différents changements de groupement protecteur qui se sont révélés infructueux, le groupement protecteur Z du pseudopeptide **43** a tenté d'être réduit à l'aide de conditions basiques douces (Schéma 59).

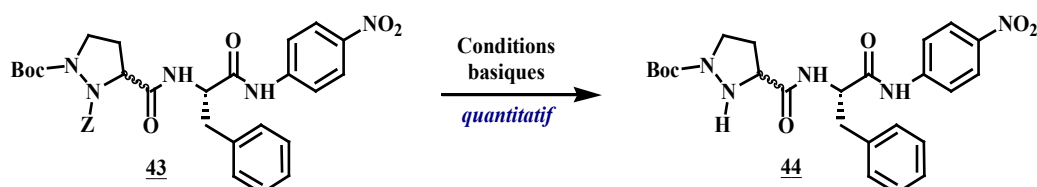


Schéma 59 – Déprotection du groupement Z du pseudopeptide **43** à l'aide de conditions basiques

II.5.2.3.1 Par utilisation du réactif de Lawesson et de la base K_3PO_4

Au cours d'une réaction de thiocarbonylation en présence du réactif de Lawesson et de la base K_3PO_4 ,⁷⁶ la fonction Z du pseudotripeptide Z- δ azaPro(Boc-Gly)-Gly-OMe a pu être clivée de façon inattendue (Schéma 60). Cette déprotection réalisée à l'aide de la technologie micro-ondes est présentée dans le paragraphe III.4 du chapitre I, partie A de ce manuscrit.

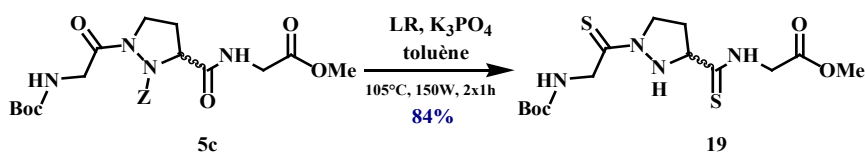


Schéma 60 – Déprotection du groupement Z du pseudotriptide **5c** en présence du réactif de Lawesson et de la base K_3PO_4

Nous avons donc essayé d'utiliser ce résultat inattendu afin de déprotéger le groupement protecteur Z du composé Z- δ azaPro(Boc)-Phe-*p*-NA **43** dans les mêmes conditions. Cela permettrait, en effet, à la fois de déprotéger l'azote natif de la δ -azaproline et d'effectuer la thiocarbonylation des carbonyles impliqués dans les liaisons amidiques δ azaPro-Phe et Phe-*p*-NA (Schéma 61). Une réaction inverse de carbonylation en présence du dérivé téluré $\text{Ar}_2\text{TeO}^{109}$ permettrait alors de générer le fragment **44**.

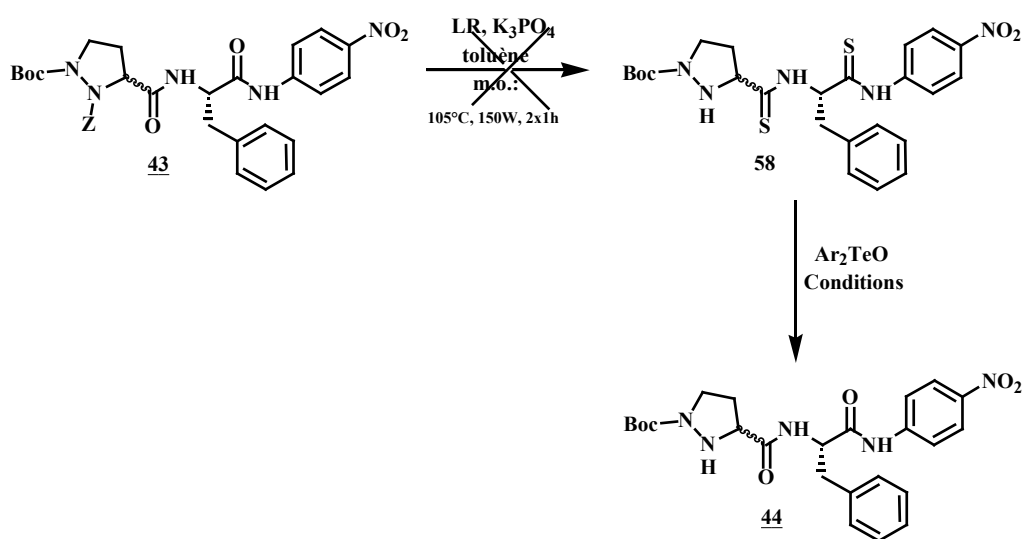


Schéma 61 – Voie de synthèse du fragment **44** à l'aide du réactif de Lawesson

Le clivage de la fonction Z du composé **43** a été tenté dans les mêmes conditions utilisant les micro-ondes que celles utilisées pour le pseudotriptide **5c** (105°C, 150W, 2x1h). Malheureusement, le produit de départ **43** ne réagit pas dans ces conditions : le groupement Z reste toujours présent sur l'atome d'azote natif de la δ -azaproline et les liaisons amidiques n'ont pas été transformées. Il est possible que la chaîne latérale de la phénylalanine ainsi que le groupement Z encombrant suffisamment l'accès aux carbonyles des liaisons amidiques δ azaPro-Phe et Phe-*p*-NA, rendant alors la réaction impossible à mettre en oeuvre.

II.5.2.3.2 A partir de bases classiques

Pour la première tentative de déprotection du groupement protecteur Z en milieu basique, le pseudotriptide **43** a été mis en présence d'une solution de NaOH (2.5M) dans un mélange dioxane/ H_2O (10:3) à 50°C pour un temps d'agitation de 24h¹¹⁰ (Schéma 62).

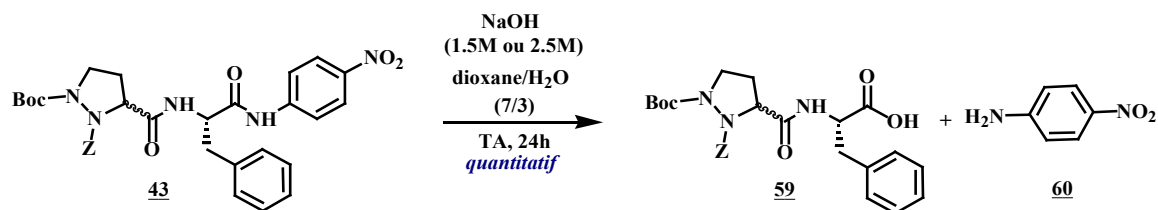


Schéma 62 – Tentative de déprotection du groupement Z du pseudopeptide **43** à l'aide conditions basiques

Au cours de cette réaction, le clivage de la liaison Phe-*p*-NA a été observé. Pensant que les conditions étaient trop agressives, la molarité de la solution d'hydroxyde de sodium a été abaissée à 1.5M et la réaction réalisée à température ambiante. Ce deuxième essai s'est aussi soldé par un échec car la libération de la *p*-nitroaniline a aussi pu être observée.

Il a été répertorié que certaines bases étaient capables de cliver un lien amidique de façon inhabituelle (Schéma 63).¹¹¹ En effet, lorsque la rotation du lien amidique est possible, la résonance amidique diminue ce qui rend cette liaison plus sensible au clivage par des bases, et expliquerait cet échec.

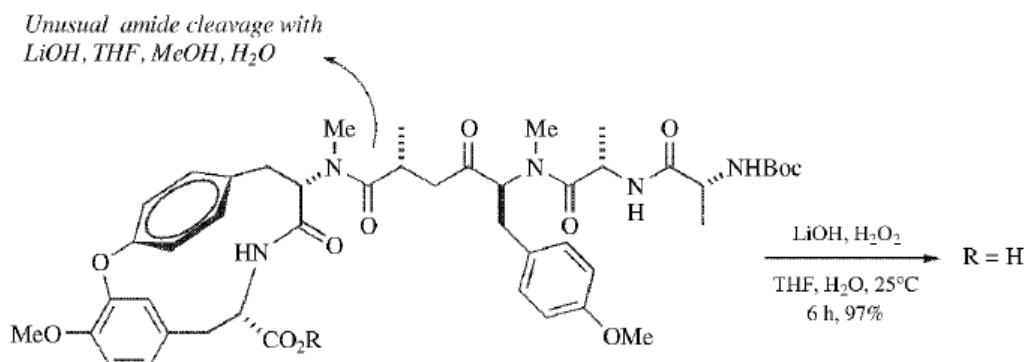


Schéma 63 – Clivage d'un lien amidique en présence de LiOH

L'hydroxyde de lithium a ensuite été sélectionné comme base. En effet, lors d'une tentative de déprotection de l'extrémité C-terminale du pseudodipeptide Z- δ azaPro(Boc)-Gly-OMe **3a** en présence d'hydroxyde de lithium dans le milieu THF/MeOH (3:2), le groupement protecteur Z avait pu être éliminé de façon inattendue (Schéma 64).

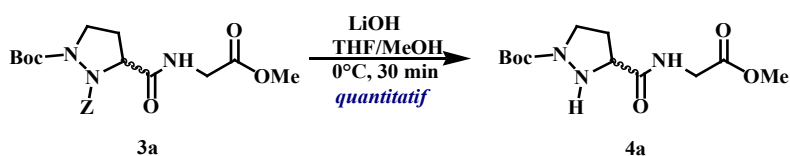


Schéma 64 - Déprotection de l'extrémité C-terminale du pseudodipeptide **3a** en présence d'hydroxyde de lithium

Le pseudopeptide **43** a précisément été mis dans ces conditions sous agitation à 0°C pendant 30 minutes. Malheureusement, le composé isolé après traitement n'était pas le pseudopeptide **44** mais le composé **61** (Schéma 65).

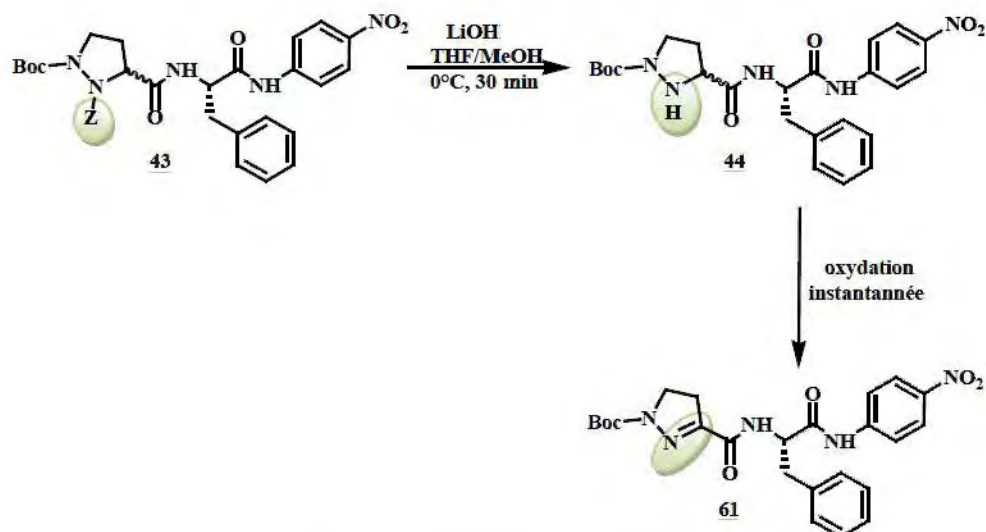


Schéma 65 – Oxydation de la liaison $\text{NH}^{\text{e}}\text{-CH}^{\text{a}}$ du pseudopeptide **44**

Le pseudotripeptide **43** a donc bien été déprotégé de son groupement protecteur Z, mais une oxydation quasi-instantanée de la liaison $\text{NH}^{\text{e}}\text{-CH}^{\text{a}}$ génère la pyrazoline **61** non désirée. 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^{a} sont observés en RMN ^1H et ^{13}C .

Cette oxydation spontanée a déjà pu être notée par trois équipes. L'équipe de Tiecco¹¹² observe la formation de trois composés, chacun isolable, lorsque des *N*-allylhydrazines sont mises en présence de sulfate de phénylsélényle. Deux d'entre eux s'avèrent être une pyrazolidine et une pyrazoline. La deuxième équipe, celle de Paulmier,¹¹³ a repris ces travaux et constate la formation exclusive de pyrazoline (Schéma 66).

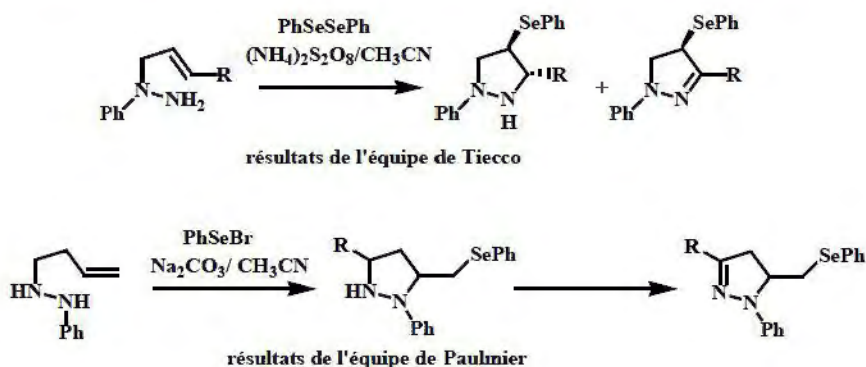


Schéma 66 – Formation de pyrazolines à partir de pyrazolidines

Au sein du laboratoire, la formation de pyrazolines **8a** et **8b** non désirées⁴¹ a déjà pu être observée (Schéma 67). Ces composés seraient issus de l'oxydation spontanée des dipeptides **4a** et **4b** qui débute après quelques heures à température ambiante et qui est totale en 48 heures.

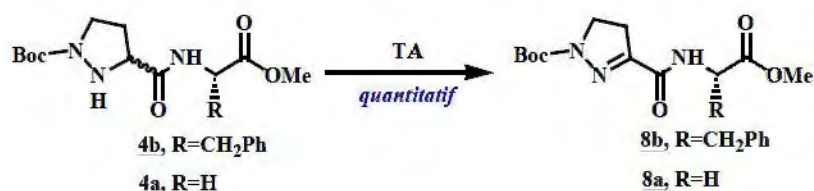


Schéma 67 – Oxydation spontanée des δ -azaprolines en pyrazolines **8a** et **8b**

Dans le cas des pyrazolines **8b** et **8a**, les tentatives de réduction de la 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 et pressions élevées (obtenues à l'aide d'un générateur à dihydrogène), ou dans des conditions de déprotection de groupements Z assistées par micro-ondes.⁴¹ La réduction de la liaison N=C est alors parue impossible à mettre en œuvre, c'est pourquoi la voie de synthèse du synthon **46** a été modifiée (voir paragraphe III de ce chapitre). En parallèle des changements de groupements protecteurs de la δ -azaprolidine **1** avaient été tentés et sont présentés dans le paragraphe suivant.

II.5.3 Changement de groupements protecteurs de la δ -azaprolidine **1**

II.5.3.1 Transprotection du groupement Z en P₁

Comme énoncé en amont, des changements de groupements protecteurs de la δ -azaprolidine ont été envisagés de manière à pallier les problèmes d'orthogonalité lors de la déprotection du groupement Z du pseudopeptide **43** (Schéma 68).

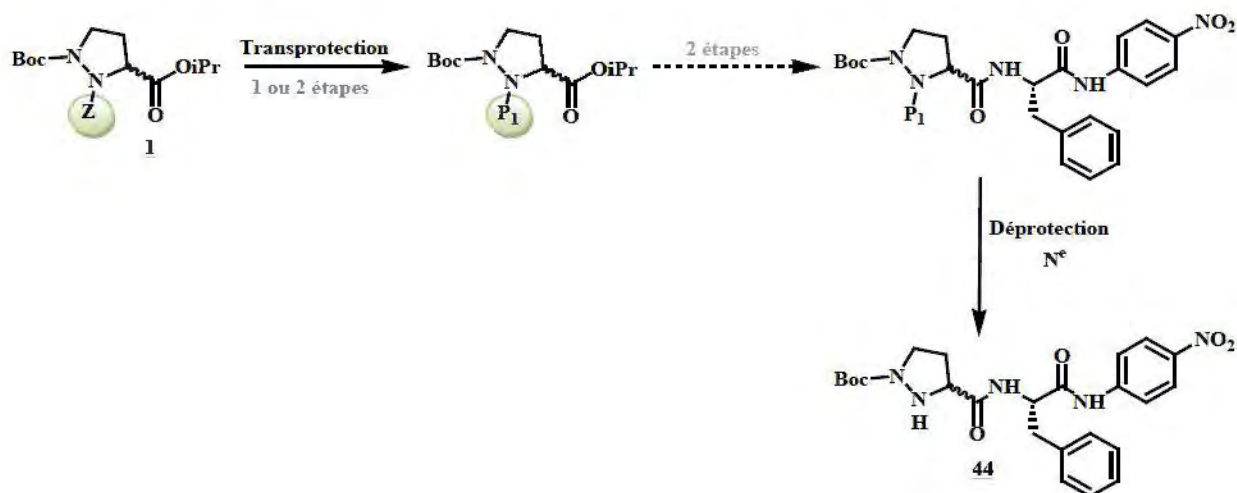


Schéma 68 – Voie de synthèse du fragment **44** par changement de groupement protecteur sur la δ -azaprolidine **1**

Afin de bien choisir le groupement P₁, il faut s'assurer de sa stabilité en milieu basique (condition de déprotection de l'extrémité C-terminale de la δ -azaprolidine) et de son potentiel clivage dans des conditions telles que les groupements Boc et -NO₂ restent stables. Le choix du groupement P₁ s'est d'abord orienté vers un groupement Preoc (Me₂C=CHCH₂OCO) qui respecte le cahier des charges précédemment énoncé, c'est-à-dire stable en milieu basique et hydrolysable en présence d'iode dans un mélange DCM/H₂O.¹¹⁴ Cette méthode de

protection d'amine emploie le composé $\text{PreocOC}_6\text{H}_4p\text{-NO}_2$ en présence d'une quantité catalytique de DMAP sous agitation à température ambiante pendant 24h.¹¹⁴ L'équipe de Vattel a montré que le greffage du groupement Preoc sur l'ester benzylique de la proline **62** avait pu être réalisé avec un bon rendement de 90% (Schéma 69). A l'inverse, le clivage de cette fonction en présence d'iode et de zinc permet de régénérer l'ester de la proline **62** avec un rendement de 70%.

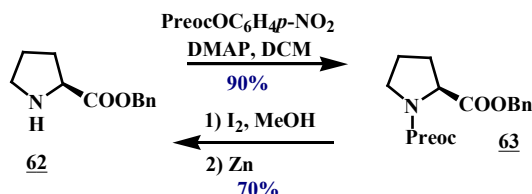


Schéma 69 – Greffage et déprotection du groupement Preoc

Différentes conditions ont été testées afin de protéger l'atome d'azote N^ϵ de la δ -azaproline avec le groupement Preoc. Dans le cas où le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 24h, aucune réaction entre les réactifs n'a été observée ce qui a laissé place à la formation de la pyrazoline **65** en quantité non négligeable (Schéma 70).

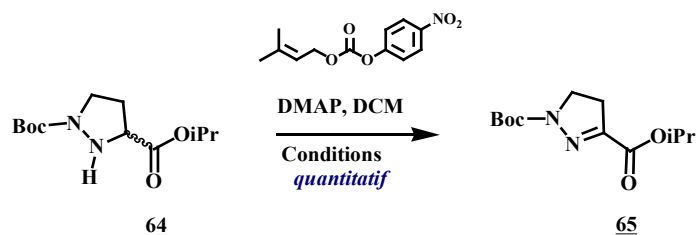


Schéma 70 – Tentative de greffage du groupement Preoc sur l'azote N^ϵ de la δ -azaproline

Une nouvelle tentative de protection par assistance micro-ondes a été réalisée visant à augmenter progressivement la température (50 à 75°C) et la puissance (50 à 75W) avec l'assistance des micro-ondes. Dans ce cas, aucune évolution notable n'a pu être observée par suivi chromatographique sur couche mince. Après extraction et purification par colonne chromatographique, les fractions récupérées mettaient en évidence l'oxydation de la liaison $\text{CH}^\alpha\text{-NH}$ de la δ -azaproline avec l'assistance micro-ondes.

Face à ces résultats, le choix du groupement P_1 s'est orienté vers un groupement Fmoc qui peut être déprotégé en présence de pipéridine dans le dichlorométhane, condition pour laquelle les groupements Boc et -NO_2 restent stables. La transprotection du groupement Z en Fmoc du résidu Z-Phe-OMe a déjà été décrite par l'équipe de Dzubeck. Une hydrogénation catalytique en présence du poison de catalyseur 2,2'-bipyridyl et du composé Fmoc-OSu dans le méthanol (Schéma 71) sous agitation à température ambiante pendant 15h¹¹⁵ permet de générer le résidu Fmoc-Phe-OMe avec un bon rendement de 88%. De plus, les conditions sont sans conséquence sur les esters ainsi que les amines protégées par un groupement Boc.

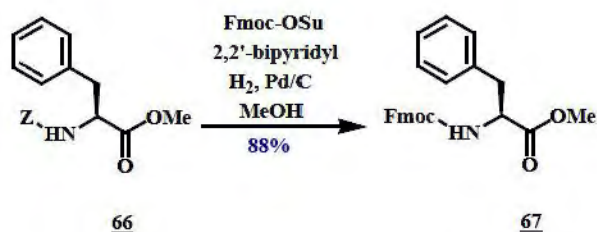
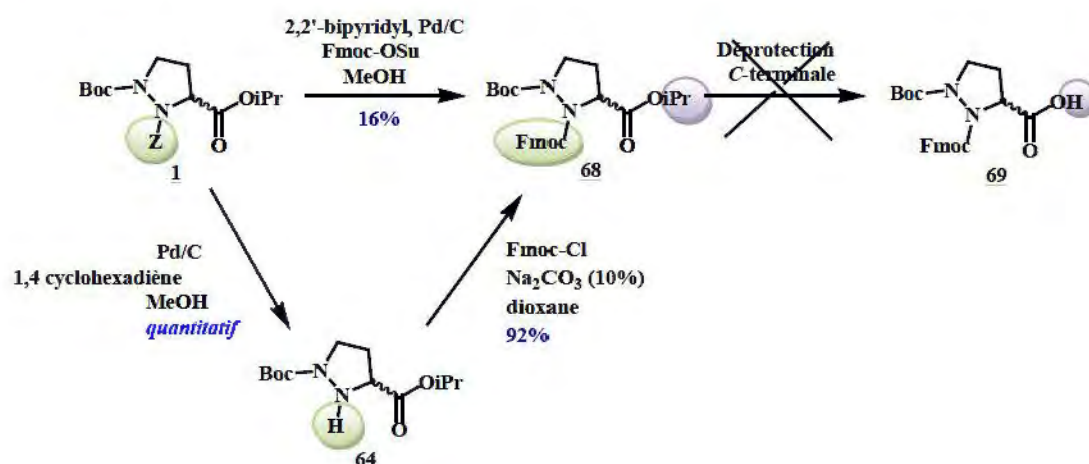


Schéma 71 – Conditions de transprotection d'un groupement Z en Fmoc

Dans notre cas, cette transprotection permet de générer la δ -azaproline avec un très faible rendement de 16% (Schéma 72).


Schéma 72 – Transprotection du groupement Z en Fmoc et déprotection de l'extrémité C-terminale de la δ -azaproline

En effectuant la transprotection en deux étapes, le groupement Z a été réduit quantitativement par hydrogénolyse en présence d'une quantité catalytique de Pd/C et de 1,4-cyclohexadiène avec assistance des micro-ondes. Le groupement Fmoc a pu ensuite être introduit sur l'azote natif de la δ -azaproline en présence de Fmoc-Cl et d'une solution de Na_2CO_3 (10%) dans le dioxane avec un très bon rendement de 92%.

Le groupement Fmoc étant fragile donc labile en milieu basique, il fallait définir des conditions de saponification adaptées. Pour cela, une étude systématique s'appuyant sur des méthodes décrites dans la littérature,^{116,117,118} et visant à faire varier différentes conditions (base, solvant, temps de réaction) a été réalisée.

Essais	Base	Solvant	Conditions	Rdt (%)
1a	NaOH	THF/H ₂ O (1:1)	TA, 5h	^a
1b	NaOH	CaCl ₂ (0.7M) iPrOH/H ₂ O (7:3)	TA, 1 nuit	^a
2	LiOH	CaCl ₂ (0.7M) iPrOH/H ₂ O (7:3)	TA, 1 nuit	^b

a : dégradation du produit de départ, b : libération du Fmoc

Tableau 29 – Tentatives d'hydrolyse de l'ester **68**

L'utilisation de la base NaOH dans le mélange THF/H₂O (1:1) sous agitation à température ambiante pendant 5h a complètement dégradé le produit. Cette même base a été réutilisée dans des conditions plus douces

en présence d'une solution de CaCl_2 (0.8M) dans le mélange iPrOH/ H_2O (7:3) sous agitation à température ambiante pendant une nuit et a aussi conduit à la dégradation de la δ -azaproline **68**. L'emploi de l'hydroxyde de lithium en présence d'une solution de CaCl_2 (0.8M) dans un mélange iPrOH/ H_2O (7:3)¹¹⁹ a, quant à lui, clivé le groupement Fmoc générant ainsi la pyrazoline **65**.

Afin de comprendre ces résultats, une étude systématique a été réalisée à partir de l'acide aminé Fmoc-Ala-OiPr par variation du temps d'agitation en présence d'hydroxyde de sodium et d'une solution de chlorure de calcium (0.8M) dans le mélange iPrOH/ H_2O (7/3) (Tableau 30).

Essai	T	t (h)	Rdt (%)
1	TA	3.5	/ ^a
2	TA	5	16% ^b
3	TA	24	7 ^c

a: clivage de l'ester isopropylique et libération du Fmoc, b: une partie du produit de départ n'a pas réagi, c: il ne reste plus de produit de départ

Tableau 30 – Déprotection de l'extrémité C-terminale de Fmoc-Ala-OiPr

Ces différents essais ont mis en évidence que le clivage de l'ester isopropylique en présence d'un groupement Fmoc est une réaction non reproductible car les rendements obtenus sont complètement aléatoires par rapport au temps d'agitation.

A ce stade, il nous a semblé judicieux d'utiliser un groupement P_2 différent de iPr sur le carbone terminal de la δ -azaproline, tout en conservant le groupement Fmoc sur l'azote N^{e} , de manière à s'affranchir des problèmes d'orthogonalité (Figure 108).

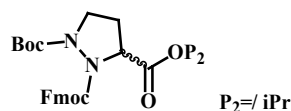


Figure 108 – Fmoc- δ azaPro(Boc)- OP_2

II.5.3.2 Transestérification iPr en P_2 et transprotection du Z en Fmoc

La déprotection de l'extrémité C-terminale de la δ -azaproline **68** ne pouvant pas être réalisée de façon sélective en présence d'un groupement Fmoc, une transestérification a été envisagée de manière à former le composé Z- δ azaPro(Boc)- OP_2 . Le groupement Z de la δ -azaproline serait ensuite transprotégé en groupement Fmoc avant de pouvoir déprotéger l'extrémité C-terminale conduisant à la formation de δ -azaproline **69** (Schéma 66).

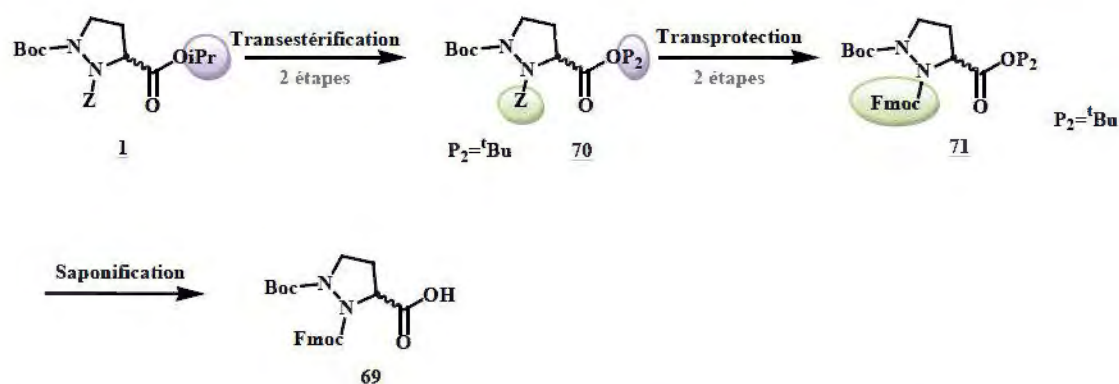


Schéma 73 – Transestérification de la δ -azaprolidine suivie d'une transprotection du groupement Z en Fmoc

La protection P_2 doit être orthogonale aux groupements Z, Fmoc et Boc, c'est pourquoi le *tert*-butyl semblait être un groupement de choix car il présente l'avantage de pouvoir être déprotégé sélectivement selon deux méthodes.

La première emploie une solution d'iode dans le mélange $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ à reflux pendant 5h⁹⁸ et permet d'hydrolyser sélectivement les esters *tert*-butyliques de composés comportant un groupement Boc⁹⁸ ou Fmoc.⁹⁶ Cette méthode a été décrite par l'équipe de Yadav sur le résidu Boc-Pro-O^tBu et a permis de déprotéger l'extrémité C-terminale avec un bon rendement de 92% (Schéma 74).

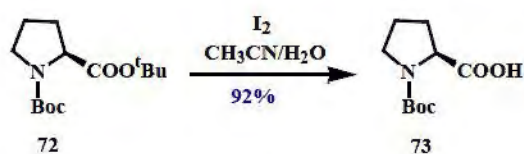


Schéma 74 – Hydrolyse d'ester *tert*-butylique par l'iode en présence d'un groupement Boc

La seconde méthode permet d'hydrolyser sélectivement la fonction ester *tert*-butylique d'un composé comportant une amine tertiaire protégée par un Boc en présence de ^tBuOK dans le THF sous agitation pendant 30 minutes à 0°C.¹²⁰ Le composé **74** a aussi pu être déprotégé quantitativement par l'équipe de Husson (Schéma 75). De plus, il a été répertorié que le groupement Fmoc serait stable en présence de ^tBuOK.⁹⁶



Schéma 75 – Hydrolyse d'ester *tert*-butylique en présence de *tert*-butoxyde de potassium

L'étape d'estérification de la δ -azaprolidine **2** a tout d'abord été réalisée en présence de ^tBuOH et de DCC dans le dichlorométhane¹²¹ afin de générer le composé **70** avec un rendement de 47% (Schéma 76).

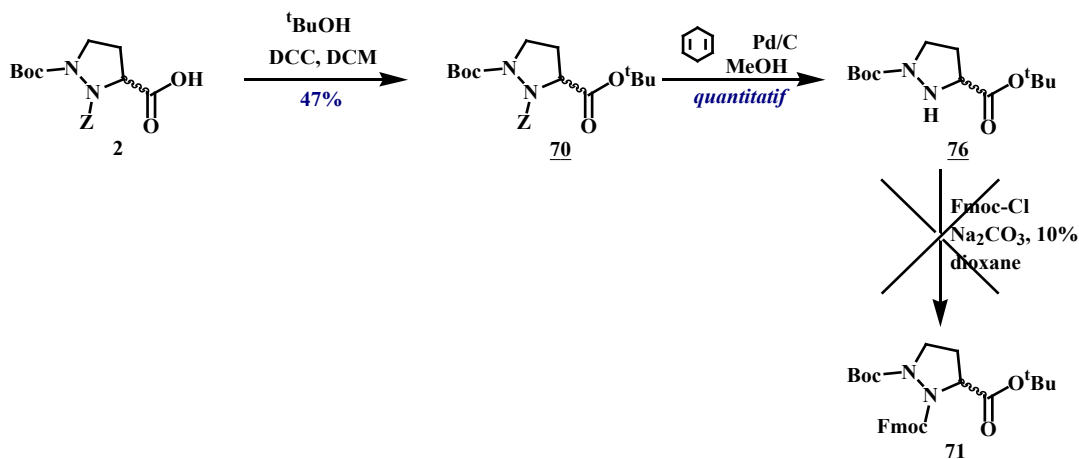


Schéma 76 – Tentatives de transestérification de la δ -azaproline suivie d'une transprotection du groupement Z en Fmoc

L'atome d'azote N^c du composé **70** a pu être libéré quantitativement de son groupement Z afin de pouvoir y greffer le groupement Fmoc en présence de Fmoc-Cl et d'une solution de Na₂CO₃ (10%) dans le dioxane. Cette étape de protection a été réalisée sous agitation à température ambiante pendant 24h ou par assistance micro-ondes avec une augmentation progressive de la puissance (50 à 75W) et de la température (75 à 100°C).

Dans chaque cas, le groupement Fmoc n'a pas pu être greffé sur l'azote natif de la δ -azaproline générant, avec l'assistance micro-ondes, la δ -azaproline oxydée **77** (Schéma 77).

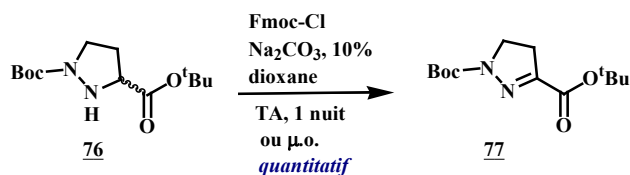


Schéma 77 – Formation de la pyrazoline **77** à partir de la proline **76**

L'encombrement généré par les groupements Boc et ^tBu ne permet pas l'accès du composé Fmoc-Cl à l'atome d'azote natif de la δ -azaproline **76**. L'encombrement stérique et l'orthogonalité des groupements protecteurs restent toujours un problème, et ce malgré les différentes méthodes envisagées.

II.5.4 Conclusions

Les changements de groupements protecteurs envisagés sur la δ -azaproline n'ont pas mené au résultat escompté (Schéma 78).

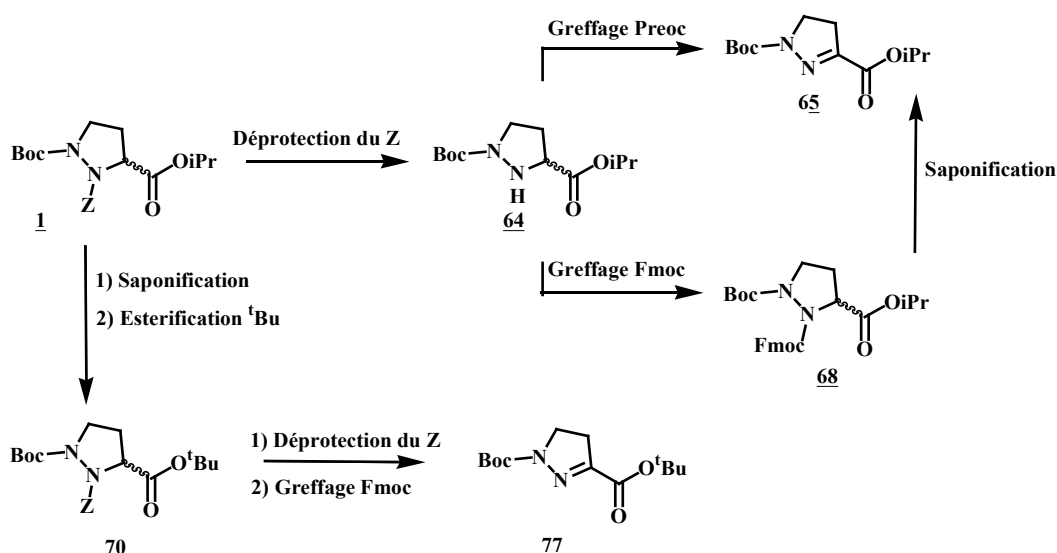


Schéma 78 – Récapitulatif des tentatives de changement de groupements protecteurs de la δ -azaproline

En effet, des problèmes d'encombrement stérique avec le groupement Boc n'ont pas permis de greffer le groupement Preoc sur la δ -azaproline **64**. Ce même problème d'encombrement stérique a aussi été rencontré lors du greffage du groupement Fmoc sur la δ -azaproline **76** où les groupements Boc et t Bu bloquent l'accès à la fonction NH^e . De plus, l'ester isopropylique du composé **68** n'a pas pu être hydrolysé sélectivement à cause d'un problème d'orthogonalité avec le groupement Fmoc.

Les différents résultats obtenus lors de la déprotection du groupement Z du composé **43** n'ont pas permis de parvenir au produit désiré. L'ensemble des résultats obtenus sont recensés dans le Schéma 79.

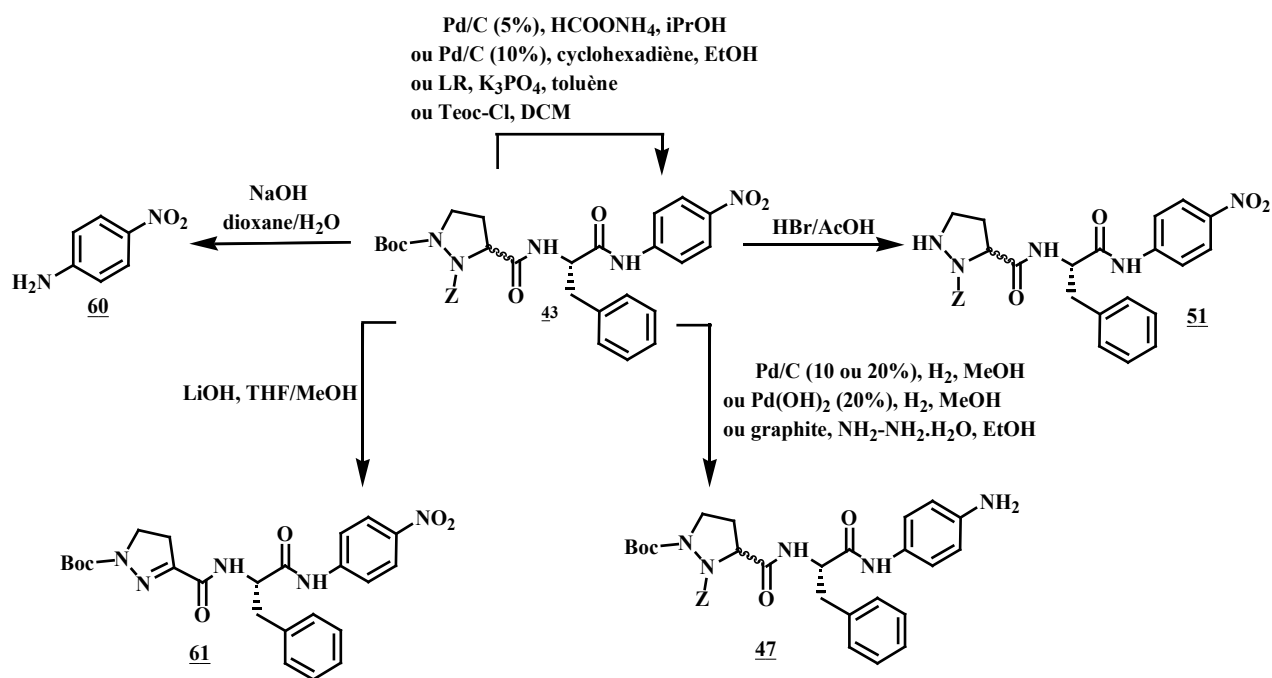


Schéma 79 – Récapitulatif des tentatives de déprotection du groupement Z du pseudopeptide **43**

Plusieurs réactions inattendues ont pu être observées lors des tentatives de clivage de la fonction Z du pseudo-peptide **43**. Certaines méthodes utilisant des dérivés palladiés ont réduit le groupement $-\text{NO}_2$ conduisant ainsi au composé **47**, d'autres sont restées sans effet. L'utilisation de bromure d'hydrogène dans l'acide acétique a déprotégé quantitativement le groupement Boc et celle d'hydroxyde de sodium a clivé la liaison Phe-*p*-NA, tandis que l'hydroxyde de lithium a favorisé l'oxydation de la liaison $\text{CH}^\alpha\text{-NH}$ afin de former la pyrazoline **61**.

Ces essais infructueux nous ont poussé à modifier la voie de synthèse de manière à s'affranchir des problèmes d'orthogonalité entre le groupement Z et les groupements Boc et $-\text{NO}_2$. Ainsi la synthèse des synthons **45'** et **46** a été envisagée de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale.

III Synthèse par fragment (N-terminale vers C-terminale)

III.1 Rétrosynthèse du synthon **46** (N-terminale vers C-terminale)

La réduction instantanée de la liaison de $\text{NH}^\epsilon\text{-CH}^\alpha$ du pseudo-peptide **44** a en partie bloqué la voie de synthèse décrite dans la partie II de ce chapitre. Afin de pallier à cela, une synthèse par fragment de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale a été envisagée (Schéma 80).

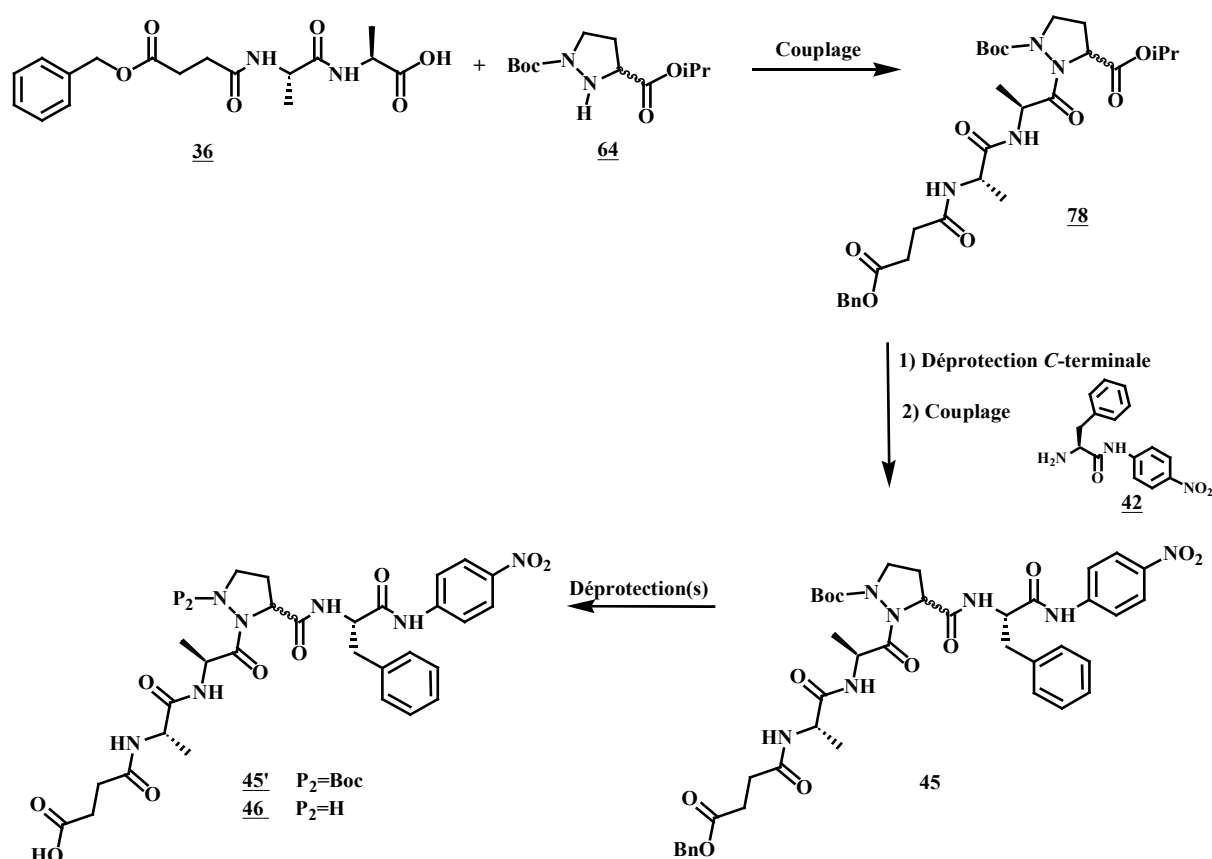


Schéma 80 – Synthèse par fragment de l'extrémité N-terminale vers C-terminale

L'idée a été de coupler le fragment **36** avec la δ -azaproline déprotégée **64** afin de générer le pseudopeptide **78**. Bien que l'oxydation de la δ -azaproline **64** soit possible, celle-ci ne débute qu'après quelques heures à température ambiante jusqu'à être totale en 48h. Afin de minimiser cette réaction d'oxydation secondaire, la réaction de couplage peptidique avec le fragment **36** devrait avoir directement lieu après la déprotection du groupement Z de la δ -azaproline **1**.

La déprotection de l'extrémité C-terminale du composé **78** permettra alors de générer le pseudopeptide Bzl-Suc-Ala-Ala- δ azaPro(Boc)-OH **78'** qui sera ensuite couplé avec le fragment **42**. Les groupements benzyl et/ou Boc du pseudopeptide **45** seront finalement clivés de manière à obtenir les synthons **45'** et **46**.

III.2 Synthèse de Bzl-Suc-Ala-Ala- δ azaPro(Boc)-OiPr **78**

III.2.1 Synthèse de Bzl-Suc-Ala-Ala- δ azaPro(Boc)-OiPr par fragment

En premier lieu, le groupement protecteur Z de la δ -azaproline **1** a été réduit quantitativement avec l'assistance des micro-ondes et à l'aide de 1,4-cyclohexadiène en présence de Pd/C (Schéma 81), générant du dihydrogène *in situ*.

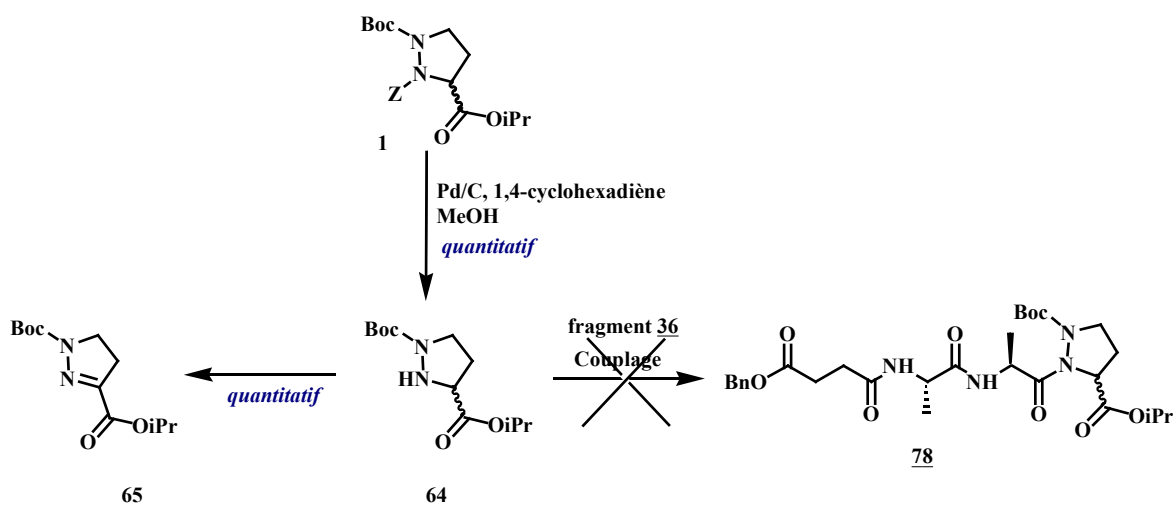


Schéma 81 – Tentative de formation du composé Bzl-Suc-Ala-Ala- δ azaPro(Boc)-OiPr **78** par fragment

Les couplages peptidiques avec le fragment **36** en présence de PyBop sous agitation à température ambiante, et à l'aide d'HATU avec l'assistance micro-ondes ont été tentés. Malheureusement, la réaction de couplage peptidique n'a pas eu lieu dans ces deux cas. Les produits de départ ont été majoritairement récupérés dans le cas où le PyBOP avait été utilisé comme agent de couplage, et la formation quantitative de la pyrazoline **65** a été observée lors de l'utilisation d'HATU. Ces résultats nous permettent de mettre en évidence que le groupement protecteur Boc désactive fortement l'atome d'azote natif de la δ -azaproline du fait de son caractère électroattracteur et de son encombrement stérique, si bien que la réaction d'oxydation est largement favorisée dans le cas de l'assistance micro-ondes. La faible réactivité de l'atome d'azote natif de la δ -azaproline

a orienté nos recherches vers une synthèse pas à pas, en espérant que la réaction de couplage soit favorisée par rapport à la réaction parasite d'oxydation de la liaison $\text{NH}^{\epsilon}\text{-CH}^{\alpha}$.

III.2.2 Synthèse de Bzl-Suc-Ala-Ala- δ azaPro(Boc)-OiPr pas à pas

III.2.2.1 Couplage entre la δ -azaproline **64** et Z-Ala-Ala-OH

Le dipeptide commercial Z-Ala-Ala-OH a été utilisé en vue d'un couplage avec la δ -azaproline **64** (Schéma 82).

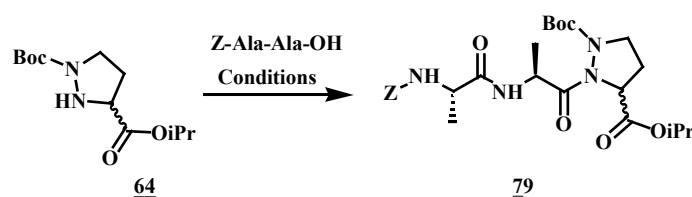


Schéma 82 – Couplage entre la δ -azaproline **64** et Z-Ala-Ala-OH

Une étude systématique a été réalisée, à partir de l'agent de couplage HATU dans la DMF, visant à faire varier les conditions expérimentales : base, temps de réaction, température et puissance. L'emploi de bases comme la triéthylamine ou la diisopropyléthylamine sous agitation à température ambiante ou à l'aide de l'assistance micro-ondes (50W, 75°C) n'a pas permis de générer le pseudotripeptide **79**. Pour ces différents essais, le pseudotripeptide **79** n'a pas pu être obtenu du fait de la faible réactivité de l'atome d'azote natif de la δ -azaproline et de la réaction d'oxydation parasite de la liaison $\text{NH}^{\epsilon}\text{-CH}^{\alpha}$.

Suite à ces essais infructueux, nous avons tout de même tenu à trouver des conditions permettant de coupler la δ -azaproline **64** et le dipeptide Z-Ala-Ala-OH. Pour cela, une étude systématique à partir de la proline commerciale H-Pro-OMe a été réalisée visant à faire varier les méthodes de couplages, la température, le temps d'agitation et la puissance (Tableau 31).

Essai	Conditions de couplage	P (W)	T (°C)	T	Rdt (%)
1	EDCI/HOBt/TEA/DMF	/	TA	7h	^a
2	HATU/TEA/DMF	20	75	3x5min	^a
		40		3x5min	
		60		3x5min	
		80		3x5min	
3	POCl ₃ /pyridine	/	-10	15min	^a
4	1- Fluorure de cyanuryle 2- NaHCO ₃ /H ₂ O/DCM	/	TA	24h	^a

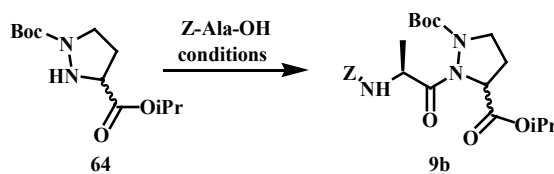
a: récupération des produits de départ

Tableau 31 - Etude systématique du couplage entre H-Pro-OMe et le dipeptide Z-Ala-Ala-OH

Les agents de couplages EDCI et HATU n'ont pas permis de générer le tripeptide désiré, et ce même après de nombreux cycles avec l'assistance des micro-ondes. Les activations par un fluorure ou chlorure d'acyle se sont aussi soldées par un échec. Cela met donc en évidence la faible réactivité de la fonction amine de la proline, qui est d'autant plus faible dans le cas de la δ -azaproline **64**. Le couplage entre le dipeptide Z-Ala-Ala-OH et l'amine **64** s'avérant alors impossible, les résidus alanine seront incorporés un par un sur la δ -azaproline.

III.2.2.2 Couplage entre la δ -azaproline **47** et Z-AA-OH

Dans un premier temps, le résidu Z-Ala-OH a tenté d'être couplé à la δ -azaproline **64** (Schéma 83).

**Schéma 83 – Couplage entre la δ -azaproline **64** et Z-Ala-OH**

Afin de coupler la δ -azaproline **64** et Z-Ala-OH, les deux agents de couplages EDCI et HATU ont été utilisés (Tableau 32).

Essais	Conditions de couplage	P (W)	T (°C)	t	Rdt (%)
1	EDCI/HOBt/TEA/DMF	/	TA	7h	^a
2	HBTU/TEA/DMF	50	75	7x5 min	8
3a	HATU/TEA/DMF	50	75	7x5min	19
3b	HATU/TEA/DMF	/	TA	3 nuits	9
4	Collidine, DCM	/	TA	1 nuit	19

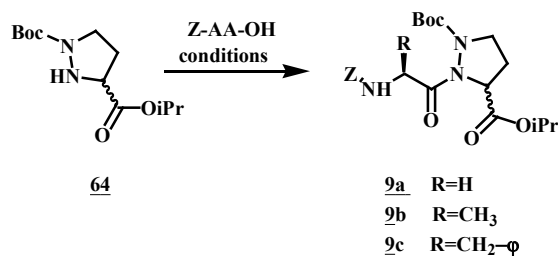
a : récupération des produits de départ

Tableau 32 – Couplage entre la δ -azaprolidine **64** et Z-Ala-OH

L'utilisation d'EDCI comme agent de couplage n'a pas pu générer le pseudodipeptide désiré : les produits de départ ont été récupérés dans leur intégralité. L'assistance par les micro-ondes en présence d'HBTU ou HATU a permis d'obtenir le composé **9b** avec de faibles rendements respectifs de 8 et 19%, le produit secondaire étant la pyrazoline **65**.

Etant donné que l'oxydation de la liaison $\text{NH}^{\delta}\text{-CH}^{\alpha}$ est favorisée par l'assistance des micro-ondes, le couplage peptidique a été effectué à plus basse température afin de limiter la cinétique de la réaction secondaire. L'utilisation d'HATU à température ambiante a permis d'obtenir le pseudodipeptide **9b**, avec un faible rendement de 9%. Un dernier couplage réalisé à partir de 1-chloro-*N,N*-2-triméthyl-1-propen-1-amine et de collidine a permis d'isoler le pseudodipeptide désiré avec un faible rendement de 19%.⁵⁷

Pour comprendre ces faibles rendements, d'autres couplages peptidiques ont été réalisés de manière à étudier la réactivité de l'azote natif de la δ -azaprolidine et l'influence de l'encombrement stérique généré par la chaîne latérale du résidu Z-AA-OH (Schéma 84).

Schéma 84 – Couplages entre les acides aminés Z-AA-OH et la δ -azaprolidine **64**

Pour cela, les acides aminés Z-Phe-OH et Z-Gly-OH ont été engagés dans un couplage peptidique avec la δ -azaprolidine **64** selon les conditions décrites dans le Tableau 33.

R : chaîne latérale	Conditions de couplage	P (W)	T (°C)	T	Rdt (%)
H	HATU/TEA/DMF	50	75	3x5min	35 ^a
CH ₃	HATU/TEA/DMF	50	75	7x5min	16 ^a
CH ₂ -φ	HATU/TEA/DMF	50	75	7x5min	^{a,b}

a : formation de la pyrazoline **44**, b : produit désiré + impuretés inséparablesTableau 33 – Etude de la réactivité de l'azote N^δ de la δ -azaprolidine **64**

Cette étude nous a permis de constater que le rendement est d'autant plus faible que la chaîne latérale R est encombrée: cette réaction de couplage est donc limitée par l'encombrement stérique. De plus, la pyrazoline **65** a pu être identifiée en quantité non négligeable dans chacun de ces couplages, limitant ainsi les rendements de réaction.

Ce faible rendement de couplage dû à la réaction d'oxydation de la liaison $\text{NH}^\epsilon\text{-CH}^\alpha$ de la δ -azaproline **64** nous a finalement poussé à abandonner la voie de synthèse par fragment de l'extrémité *N*-terminale vers l'extrémité *C*-terminale et de repenser la voie de synthèse.

III.3 Conclusions et perspectives

Lors de la synthèse de l'extrémité *N*-terminale vers *C*-terminale, le problème majeur a été l'incorporation du résidu alanine sur l'azote natif de la δ -azaproline. Afin de pallier ce problème, celui-ci devra être introduit avant l'étape de cyclisation par Mitsunobu intramoléculaire qui conduira alors à la formation du pseudodipeptide **9b** (Schéma 85) comme nous l'avons déjà présenté dans le chapitre I (partie A) de ce manuscrit.

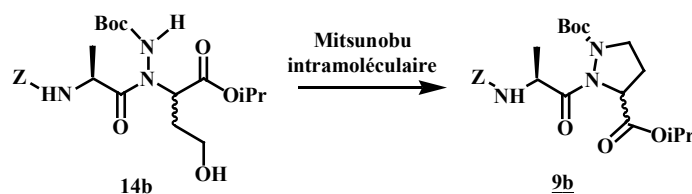


Schéma 85 – Introduction du résidu alanine Z-Ala-OH dans la δ -azaproline avant cyclisation par Mitsunobu intramoléculaire

Ainsi, nous pourrions nous affranchir des problèmes d'orthogonalité lors de la déprotection du groupement Z du pseudopeptide **9b** ainsi que la faible réactivité de l'azote N^ϵ de la δ -azaproline.

IV Synthèse du synthon 46 avec introduction du résidu Z-Ala-OH avant la réaction de Mitsunobu intramoléculaire

Comme énoncé en amont, une nouvelle voie de synthèse a été envisagée de manière à produire le synthon **46** (Schéma 87). Dans un premier temps, le pseudodipeptide **9b** sera synthétisé selon la méthode décrite dans le chapitre I, partie A de ce manuscrit (Schéma 86).

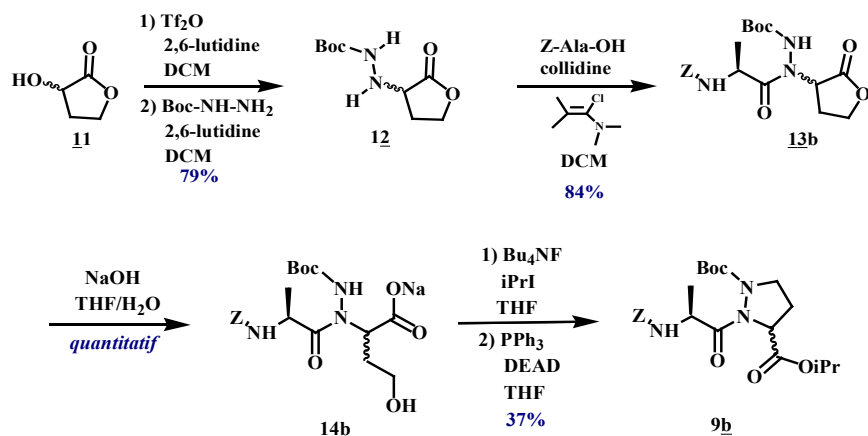


Schéma 86 – Synthèse du pseudotripeptide **9b**

L'extrémité N^ε-terminale serait ensuite déprotégée de son groupement protecteur Z afin d'engager le composé généré dans un couplage peptidique avec le résidu alanine Z-Ala-OH. Le clivage de la protection Z du pseudotripeptide **79** suivi d'un couplage peptidique avec le mono *tert*-butyl succinate permettrait d'obtenir le composé **80**. La déprotection de l'extrémité C-terminale pseudopeptide du **80** permettrait de libérer l'acide qui sera ensuite couplé avec le fragment **42** (H-Phe-*p*-NA). Le groupement *tert*-butyl serait finalement clivé de manière à obtenir le synthon **45'** soit en présence d'iode dans un mélange acétonitrile/eau,⁹⁸ soit par utilisation de la base ^tBuOK dans le THF.⁹⁶ Le groupement Boc serait finalement éliminé en présence d'acide trifluoroacétique dans le DCM suivi d'un lavage à l'hydrogénocarbonate de sodium afin de former le substrat **46**.

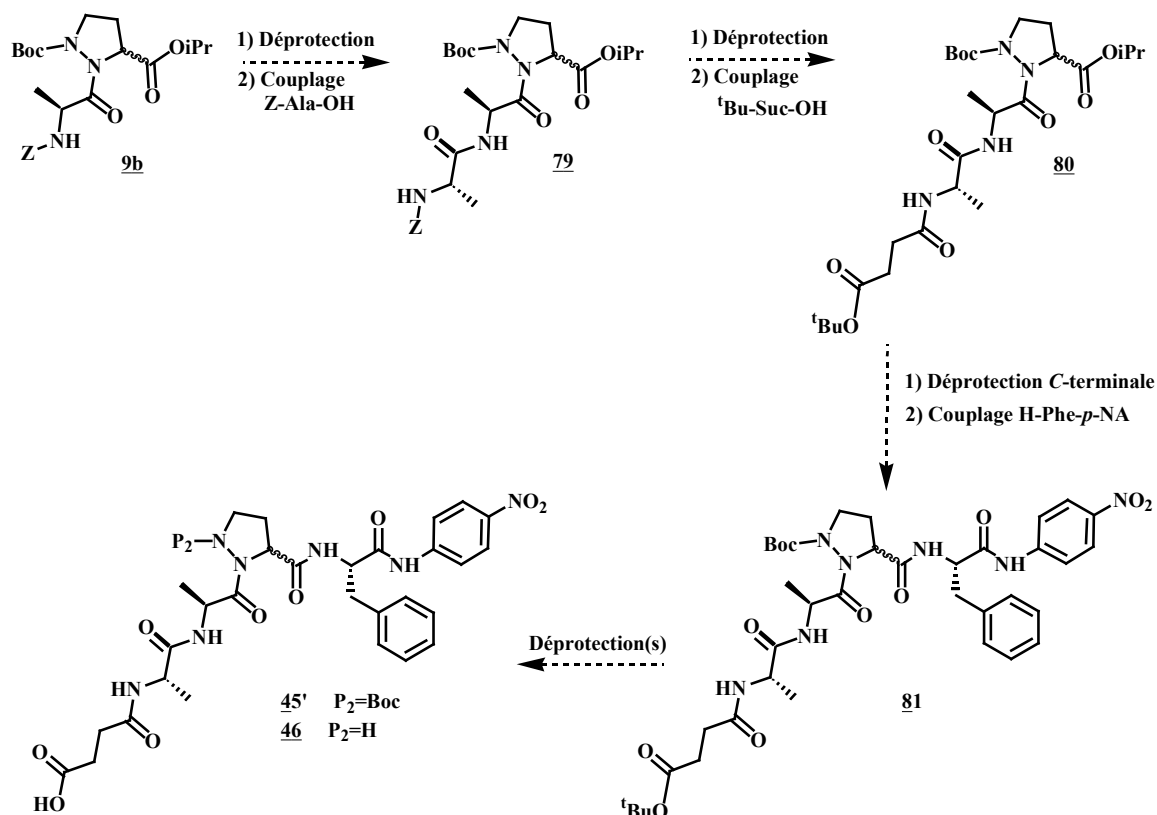


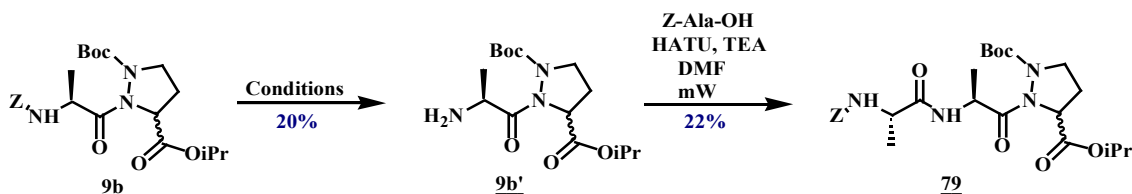
Schéma 87 – Voie de synthèse envisagée pour les synthons **45'** et **46** par introduction du résidu Z-Ala-OH avant ouverture de la lactone

La protection Z du pseudodipeptide Z-Ala- δ azaPro(Boc)-OiPr **9b** a tout d'abord été clivée avec l'assistance des micro-ondes en présence de 1,4-cyclohexadiène et catalysée par du palladium sur charbon. L'amine **9b'** a ainsi pu être générée avec un très faible rendement de 20%. Les tentatives de déprotection de l'atome d'azote natif de la δ -azaproline sont répertoriées dans le Tableau 34.

Essais	Conditions	T	P (W)	T	Rdt (%)
1	Pd/C (10%), H ₂ , MeOH	TA	/	/	/
2	Pd/C (10%), 1,4-cyclohexadiène, MeOH	100°C	150	10x5 min	20
3	Pd(OH) ₂ , H ₂ , MeOH	50°C	/	/	/

Tableau 34 – Conditions de clivage du groupement Z du pseudodipeptide **10b**

La déprotection de la fonction Z s'est avérée assez difficile. En effet, l'emploi de palladium sur charbon à température ambiante ou d'hydroxyde de palladium avec l'assistance d'un générateur d'hydrogène n'ont pas permis de cliver une telle fonction. Seul l'emploi de palladium sur charbon avec l'assistance des micro-ondes a déprotégé partiellement le groupement Z avec un faible rendement de 20%. De plus, le rendement indiqué dans le Tableau 34 a été le meilleur obtenu. Durant d'autres essais utilisant les mêmes conditions, le rendement a été plus faible voire nul. Cette non reproductibilité de déprotection d'un groupement Z a déjà été notée par l'équipe d'Aitken¹²² sur un composé comprenant un motif hydrazino.

Schéma 88 – Synthèse du pseudotriptide Z-Ala-Ala- δ azaPro(Boc)-OiPr **79**

Malgré le faible rendement, l'amine **9b'** a pu être couplée avec le résidu Z-Ala-OH avec un faible rendement de 22% (Schéma 88). Face à ces faibles rendements de déprotection et de couplage et la non reproductibilité de la déprotection conduisant à l'amine **9b'**, nous avons décidé d'introduire le fragment ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH avant la cyclisation par réaction de Mitsunobu intramoléculaire.

V Synthèse du synthon **46** avec introduction du fragment ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH **82** avant la réaction de Mitsunobu intramoléculaire

Afin de s'affranchir du problème de déprotection de l'extrémité N-terminale du pseudodipeptide Z-Ala- δ azaPro(Boc)-OiPr **9b**, le fragment ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH **82** a choisi d'être intégré sur l'hydrazinolactone **12**. Le pseudopeptide **80** pourra alors être généré après ouverture de la lactone, suivie d'une étape d'estérification et de réaction de Mitsunobu intramoléculaire (Schéma 89). La suite du schéma réactionnel est la même que celle décrite dans le Schéma 87.

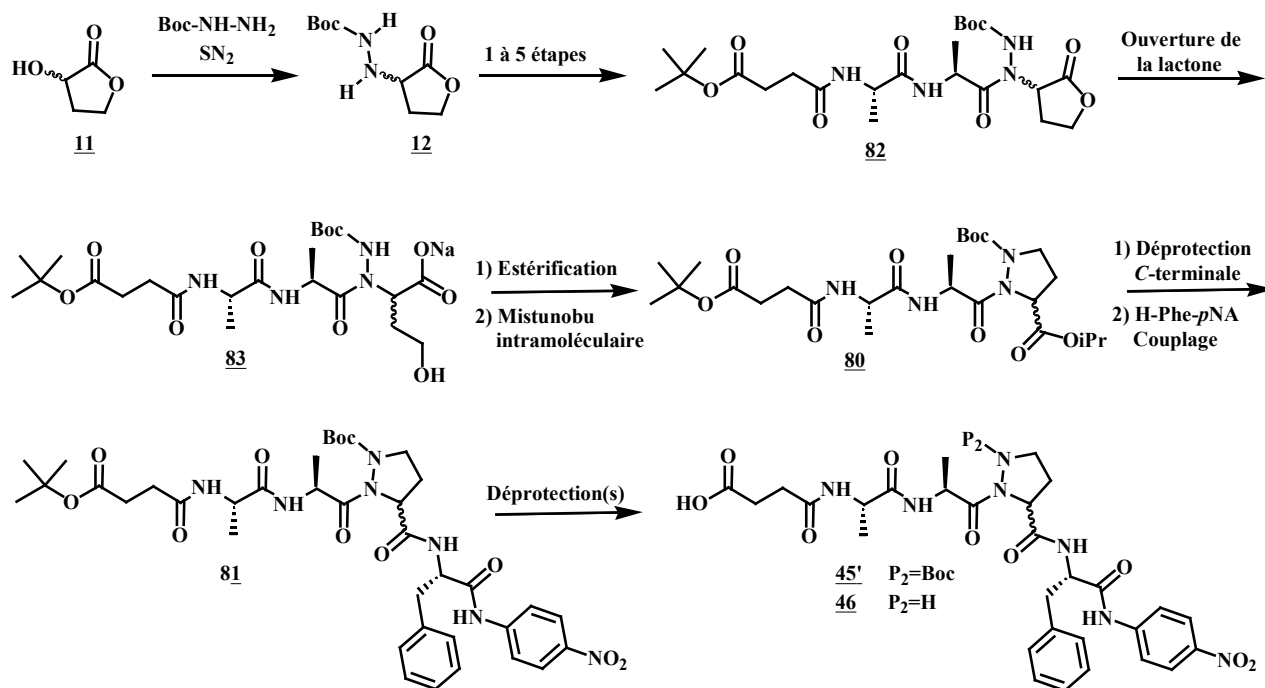


Schéma 89 – Schéma de synthèse du synthon 46

V.1 Synthèse de l'hydrazinolactone 82

V.1.1 Synthèse pas à pas de l'hydrazinolactone 82

Le fragment ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH 88 a tout d'abord tenté d'être couplé à l'hydrazinolactone 13b selon une synthèse « pas à pas » (Schéma 90).

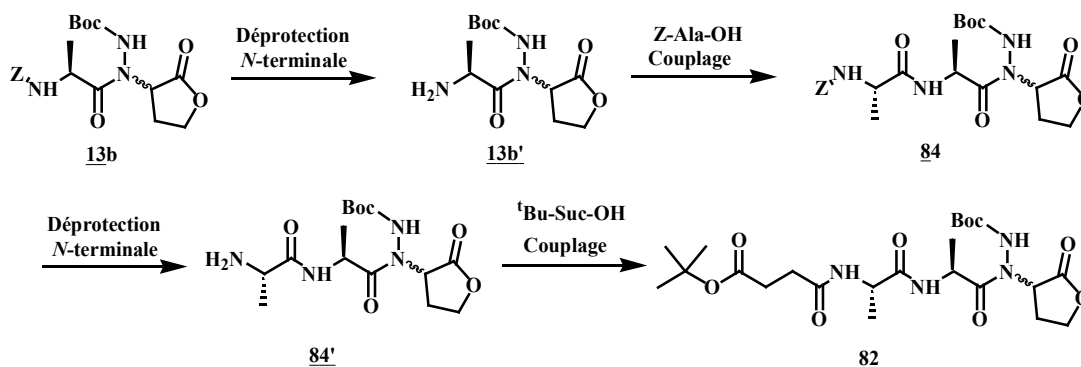


Schéma 90 – Schéma de synthèse de l'hydrazinolactone 82

Le clivage du groupement Z de l'hydrazinolactone 13b a été tenté en présence de dérivés palladiés (Tableau 35).

Essais	Conditions	T	P (W)	T	Rdt (%)
1	Pd/C (10%), H ₂ , MeOH	TA	/	1 nuit	/ ^a
2	Pd/C (10%), 1,4-cyclohexadiène, MeOH	100°C	150	10x5 min	/ ^a
3	Pd(OH) ₂ , H ₂ , MeOH	50°C	/	/	/ ^a
4	HBr/AcOH	TA	/	2h	/ ^b

a : récupération du produit de départ b : dégradation du produit de départ

Tableau 35 – Conditions de clivage du groupement Z de l'hydrazinolactone 13b

L'utilisation de palladium sur charbon sous courant d'hydrogène ou en présence de 1,4-cyclohexadiène avec l'assistance des micro-ondes n'ont pas permis de cliver le groupement Z (Essais 1 et 2). L'hydroxyde de palladium a été employé avec un générateur d'hydrogène mais cette tentative s'est malheureusement soldée par un échec (Essai 3).

L'hydrazinolactone 13b a aussi été traitée par une solution de bromure d'hydrogène dans l'acide acétique mais cette technique a complètement dégradé le produit de départ.

Afin de contourner ce problème de déprotection, la formation du pseudopeptide 82 s'est dirigée vers une synthèse par fragment où le composé ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH 88 serait couplé directement à l'hydrazinolactone 12 (Schéma 91).

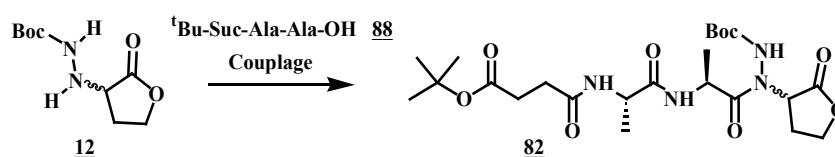
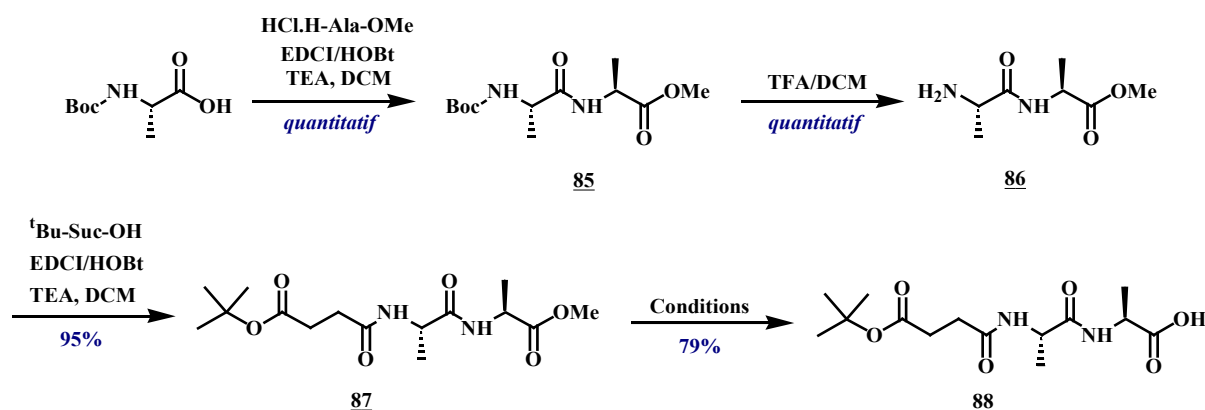


Schéma 91 – Couplage entre ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH 88 et l'hydrazinolactone 12

V.1.2 Synthèse par fragment de l'hydrazinolactone 82

Dans un premier temps, nous nous sommes penché sur la synthèse du fragment ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH 88. Afin d'y parvenir, nous nous sommes orienté vers la voie de synthèse décrite dans le Schéma 92.

Schéma 92 – Voie de synthèse du fragment ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH **88**

Dans un premier temps, les acides aminés commerciaux Boc-Ala-OH et H-Ala-OMe.HCl ont été engagés dans un couplage peptidique en présence d'EDCI afin de générer quantitativement le dipeptide protégé Boc-Ala-Ala-OMe **85**. La partie C-terminale a été quantitativement libérée de son groupement protecteur Boc au moyen d'acide trifluoroacétique en proportion 40:60 dans le dichlorométhane. L'amine générée a alors été couplée avec le *tert*-butyl succinate afin de former le composé **87** avec un très bon rendement de 95%.

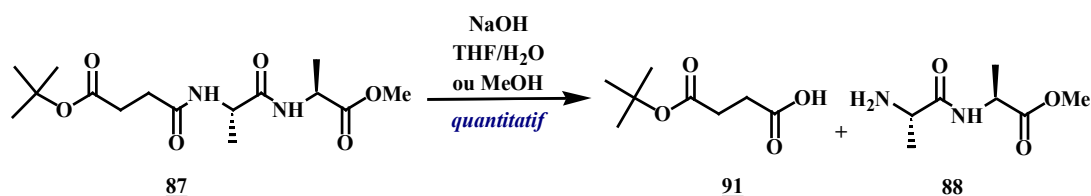
La déprotection de l'extrémité C-terminale s'est avérée un peu plus délicate. Plusieurs conditions ont été utilisées et sont reportées dans le Tableau 36.

Essais	Base	Solvant	T (°C)	T (h)	Rdt
1	NaOH (1N)	THF/H ₂ O (1:1)	TA	15h	/ ^a
2	NaOH (1N)	MeOH	TA	15h	/ ^a
3	NaOH (1N)	CaCl ₂ (0.8M) iPrOH/H ₂ O (7:3)	TA	2h	79%

a : Libération de ^tBu-Suc-OH

Tableau 36 – Conditions de saponification du composé ^tBu-Suc-Ala-Ala-OMe **87**

L'utilisation d'hydroxyde de sodium dans des milieux réactionnels comme le méthanol ou un mélange équimolaire d'eau et de tétrahydrofur a clivé la liaison Suc-Ala (Schéma 93).

Schéma 93 – Tentatives de déprotection de l'extrémité C-terminale de ^tBu-Suc-Ala-Ala-OMe **87**

A l'aide de conditions basiques plus douces, le composé ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH **88** a pu être obtenu avec un rendement de 79% (Schéma 94).

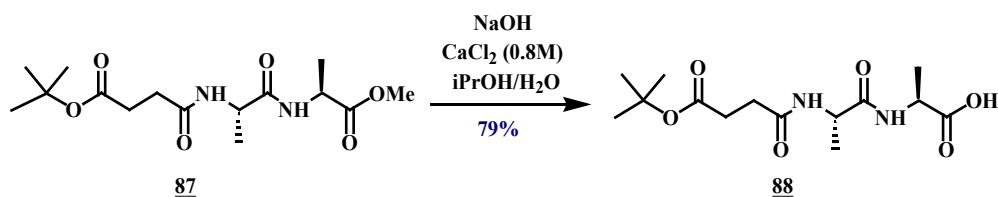


Schéma 94 - Déprotection de l'extrémité C-terminale de ^tBu-Suc-Ala-Ala-OMe **87**

Par cette voie de synthèse, le composé ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH **88** a pu être obtenu en quatre étapes et avec un bon rendement global de 67%.

L'acide carboxylique généré **88** a ensuite été engagé dans un couplage avec la lactone **12** en présence de 1-chloro-*N,N*-2-triméthyl-1-propen-1-amine et de collidine. L'hydrazinolactone désirée a été obtenue avec un faible rendement de 23%.

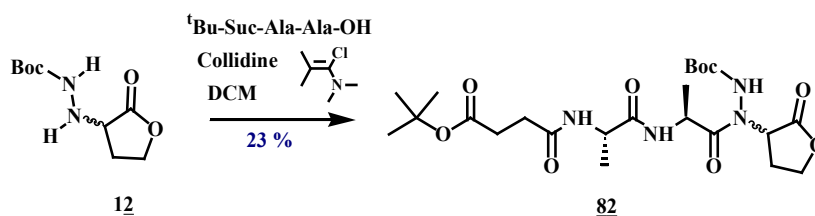


Schéma 95 – Couplage entre l'hydrazinolactone **12** et ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH **88**

Cette réaction de couplage n'a été réalisable qu'une seule fois. La non reproductibilité de cette réaction est certainement due à la température à laquelle le milieu réactionnel est soumis. En effet, le produit désiré a pu être généré lorsque le milieu réactionnel a été mis sous agitation pendant une nuit à 20°C. Les autres tentatives de couplage ont été réalisées pour des températures comprises entre 30 et 35°C. Afin de parvenir à un rendement optimal, une étude systématique visant à faire varier la température devrait être réalisée.

V.2 Conclusions

Bien que les synthons **45'** et **46** n'aient pas pu être obtenus avec les différentes voies de synthèse testées, le dernier schéma réactionnel proposé semble être tout de même favorable à l'obtention du produit désiré. Pour cela, des essais de couplages entre l'hydrazinolactone **12** et l'acide ^tBu-Suc-Ala-Ala-OH **88** devraient être tentés à différentes températures car ce paramètre semble avoir un effet important sur la faisabilité de la réaction.

VI. Conclusions

Plusieurs voies de synthèse (Tableau 37) ont été testées afin de générer les synthons **45'** et **46** (Figure 109).

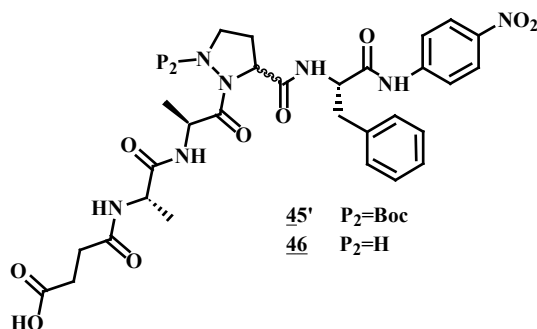


Figure 109 – Synthons **45** et **46**

- D'abord, une synthèse par fragment a été envisagée consistant à coupler, de l'extrémité C-terminale vers N-terminale, les composés **42**, **2** et **36**. Ce schéma réactionnel s'est avéré infructueux du fait de problème d'orthogonalité entre les groupements Z, Boc et -NO₂ qui n'ont pas permis de déprotéger l'azote natif de la δ -azaproline du composé **43**. (Voie 1)
- Une synthèse par fragment de l'extrémité N-terminale vers C-terminale a ensuite été envisagée mais la génération quantitative de la pyrazoline **65** a été un frein à la faisabilité de cette nouvelle voie (Voie 2)
- Des changements de groupes protecteurs sur la δ -azaproline **1** ont aussi été réalisés mais les pyrazolines **77** et **65** ont été formées quantitativement bloquant ainsi cette nouvelle voie de synthèse (Voie 3).
- Finalement, la formation des synthons **45'** et **46** a été envisagée *via* la formation de l'hydrazinolactone **82** (Voie 4). Malheureusement, le couplage menant à cette lactone s'est avéré non reproductible mais cette voie de synthèse semble tout de même prometteuse.

Voie	Schéma de synthèse	Problèmes rencontrés
1	<chem>BocN1CC[C@H](C(=O)O)N1</chem> (2) + <chem>H2N-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2</chem> (42) $\xrightarrow{\text{Couplage}}$ <chem>BocN1CC[C@H](C(=O)NH-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2)N1</chem> (43) <chem>BnO-CO-CH2-CH(NHMe)-CO-CH(NHMe)-CO-CH2OH</chem> (36) + <chem>BocN1CC[C@H](C(=O)NH-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2)N1</chem> (43) $\xrightarrow{\text{Déprotections + Couplage}}$ <chem>BnO-CO-CH2-CH(NHMe)-CO-CH(NHMe)-CO-CH2-NH-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2</chem> (45', $P_2 = \text{Boc}$) <chem>BnO-CO-CH2-CH(NHMe)-CO-CH(NHMe)-CO-CH2-NH-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2</chem> (45', $P_2 = \text{Boc}$) $\xrightarrow{\text{Déprotection}}$ <chem>HOOC-CH2-CH(NHMe)-CO-CH(NHMe)-CO-CH2-NH-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2</chem> (46, $P_2 = \text{H}$)	<chem>BocN1CC[C@H](C(=O)NH-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2)N1</chem> (43, $P_2 = \text{Z}$) $\not\rightarrow$ <chem>BocN1CC[C@H](C(=O)NH-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2)N1</chem> (44, $P_2 = \text{H}$)
2	<chem>BocN1CC[C@H](C(=O)O)N1</chem> (2) + <chem>H2N-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2</chem> (42) $\xrightarrow{\text{Couplage}}$ <chem>BocN1CC[C@H](C(=O)NH-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2)N1</chem> (43) <chem>BnO-CO-CH2-CH(NHMe)-CO-CH(NHMe)-CO-CH2OH</chem> (36) + <chem>BocN1CC[C@H](C(=O)NH-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2)N1</chem> (43) $\xrightarrow{\text{Déprotections + Couplage}}$ <chem>BnO-CO-CH2-CH(NHMe)-CO-CH(NHMe)-CO-CH2-NH-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2</chem> (45', $P_2 = \text{Boc}$) <chem>BnO-CO-CH2-CH(NHMe)-CO-CH(NHMe)-CO-CH2-NH-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2</chem> (45', $P_2 = \text{Boc}$) $\xrightarrow{\text{Déprotection}}$ <chem>HOOC-CH2-CH(NHMe)-CO-CH(NHMe)-CO-CH2-NH-CH(Ph)-C(=O)-NH-Ph-NO2</chem> (46, $P_2 = \text{H}$)	<chem>BocN1CC[C@H](C(=O)O)N1</chem> (64) $\xrightarrow{\text{Bzl-Suc-Ala-Ala-OH 36 Couplage}}$ <chem>BocN1CC[C@H](C(=O)O)N1</chem> (65)

3	$\text{Boc-N-Pyrrolidine-2-COOH}$ ($P_2' = \text{Fmoc ou Preoc}$) + $\text{H}_2\text{N-CH(Ph)-CO-NH-Ph-NO}_2$ (42) $\xrightarrow{\text{Couplage}}$ $\text{Boc-N-Pyrrolidine-2-CO-CH(Ph)-NH-CO-NH-Ph-NO}_2$ ($P_2' = \text{Fmoc ou Preoc}$) $\text{BnO-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CO-CH(CH}_3\text{)-NH-CO-CH}_2\text{-COOH}$ (36) $\xrightarrow{\text{Déprotection + Couplage}}$ $\text{BnO-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CO-CH(CH}_3\text{)-NH-CO-CH}_2\text{-CO-CH(CH}_3\text{)-NH-CO-N-Pyrrolidine-2-CO-CH(Ph)-NH-CO-NH-Ph-NO}_2$ ($P_2 = \text{Boc}$) (45') 45' ($P_2 = \text{Boc}$) $\xrightarrow{\text{Déprotection}}$ $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CO-CH(CH}_3\text{)-NH-CO-CH}_2\text{-CO-CH(CH}_3\text{)-NH-CO-N-Pyrrolidine-2-CO-CH(Ph)-NH-CO-NH-Ph-NO}_2$ ($P_2 = \text{H}$) (46)	Formation des pyrazolines 77 et 65 $\text{Boc-N-Pyrrolidine-2-CO-O'Bu}$ (77) and $\text{Boc-N-Pyrrolidine-2-CO-OiPr}$ (65)
4	$\text{BocNHNH}_2 \rightleftharpoons \text{Intermediate 82}$ $\text{Intermediate 82} \rightleftharpoons \text{Intermediate 80} \rightleftharpoons \text{46 (P}_2 = \text{H)}$ $\text{45' (P}_2 = \text{Boc)}$ $\xrightarrow{\text{Couplage}}$ $\text{46 (P}_2 = \text{H)}$	Non reproductibilité de la réaction conduisant à 82 mais voie de synthèse à poursuivre

Tableau 37 – Voies de synthèse envisagées afin d'obtenir les synthons **45'** et **46**

Bien que l'hydrazinolactone **82** n'ait été obtenue qu'une seule fois, cette dernière voie de synthèse semble assez prometteuse. En effet, la synthèse du pseudotriptide Z-Ala- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe **5b** a permis de mettre en évidence que la construction d'un tel composé de l'extrémité *N*-terminale vers *C*-terminale était tout à fait possible et avec un bon rendement (voir chapitre I, partie A). Afin de mener à bien ce projet, la suite de cette synthèse pourrait être envisagée comme décrite sur le Schéma 96.

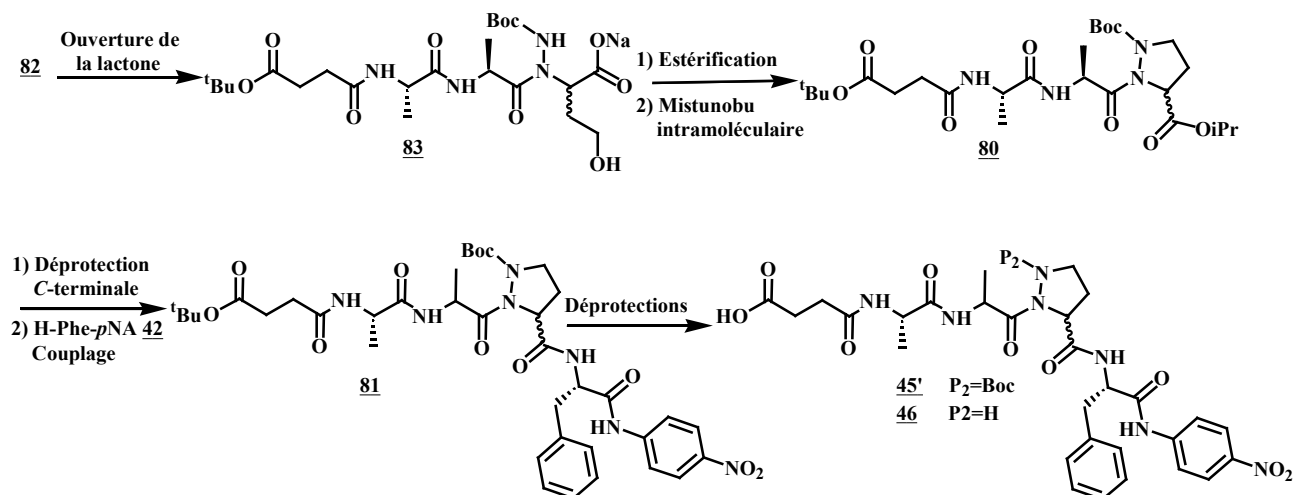


Schéma 96 – Fin de la synthèse conduisant aux synthons **45'** et **46**

De manière analogue à la synthèse du pseudotriptide **5b**, le cycle de la lactone pourrait être ouvert en utilisant des conditions basiques douces afin de ne pas cliver le lien Suc-Ala comme observé au paragraphe V.1.2 de ce chapitre. Une étape d'estérification en présence d'iodure d'isopropyle suivie d'une réaction de Mitsunobu intramoléculaire permettrait de générer le pseudopeptide **80**. Finalement, le composé **81** pourrait être obtenu par déprotection de l'extrémité *C*-terminale du composé **80**, suivi d'un couplage peptidique avec le fragment **42**. L'ester *tert*-butylique pourrait être sélectivement clivé en présence d'iode dans un mélange eau/acétonitrile afin de former le substrat **45'**. Finalement, une déprotection en présence d'acide trifluoroacétique permettrait alors de générer le synthon **46**.

Conclusions générales et perspectives

Ce travail de thèse a été consacré à l'incorporation de la δ -azaproline dans des pseudopeptides en vue d'analyses conformationnelles et d'applications biologiques.

Dans un premier temps, la δ -azaproline a été incorporée dans des pseudotripeptides en vue d'analyses conformationnelles. Ces travaux ont permis d'étudier la réactivité de l'atome d'azote supplémentaire de cet analogue et de la comparer à celle de l'atome d'azote natif. Il en ressort que la fonctionnalisation de l'atome d'azote supplémentaire de la δ -azaproline est beaucoup plus facile à mettre en œuvre que celle de l'atome d'azote natif. En effet, pour ce dernier, la gêne stérique engendrée par la protection Boc et l'oxydation spontanée de la liaison NH-CH ^{α} défavorise considérablement l'accès à cet atome d'azote limitant ainsi la réaction de couplage peptidique.

Par ailleurs, la synthèse des pseudotripeptides Z-Ala- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe **5b** et Z-Gly- δ azaPro(Boc)-Gly-OMe **5a** a pu être améliorée en diminuant nettement le nombre d'étapes. La formation d'un pseudodipeptide de type Z-AA- δ azaPro(Boc)-OiPr *via* une réaction de Mitsunobu intramoléculaire permet de s'affranchir du problème d'oxydation de la liaison CH ^{α} -NH qui conduit à la formation d'une pyrazoline. Ainsi les pseudotripeptides **5a** et **5b** ont pu être respectivement obtenus en seulement six étapes avec des rendements respectifs de 10 et 17% contre 29 et 10% avec la précédente méthode. Bien que le composé **5a** soit obtenu avec un rendement beaucoup plus faible, le nombre d'étapes a été diminué de quatre réactions. Concernant le pseudotripeptide **5b**, cette méthode montre un très grand intérêt de part sa rapidité à mettre en œuvre et l'amélioration du rendement global.

Par ailleurs, il a été possible de cliver la protection Boc des pseudotripeptides Z-Gly- δ azaPro(Boc)-Gly-OMe **5a** et Z-Ala- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe **5b** permettant ainsi de libérer l'atome d'azote supplémentaire de la δ -azaproline.

La thiocarbonylation sélective des carbonyles impliqués dans des liaisons peptidiques des composés Z-Gly- δ azaPro(Boc)-Gly-OMe **5a** et Z- δ azaPro(Boc-Gly)-Gly-OMe **5c** a été possible en présence du réactif de Lawesson permettant ainsi de générer des liens thioamide et *N*-aminothioamide.

Des études conformationnelles RMN et IR réalisées sur les pseudotripeptides synthétisés ont permis de mettre en évidence l'influence de l'encombrement stérique généré par le groupement Boc et la chaîne latérale du résidu i+2 (Ala). Ainsi, l'analyse du composé **5a** montre que lorsqu'un résidu glycine se trouve en amont de la δ -azaproline, la conformation *trans* est favorisée. Le remplacement de la glycine par un résidu alanine favorise la conformation *cis* par formation d'un pseudocycle en C₁₀ (Figure 110).

Conclusion générale

Dans le cas où l'atome d'azote supplémentaire de la δ -azaproline est libre, la formation d'un pseudocycle en C₇ entre le carbonyle du résidu i+2 et le proton NH amidique favorise la conformation *trans* quelque soit l'acide aminé en amont de la δ -azaproline.

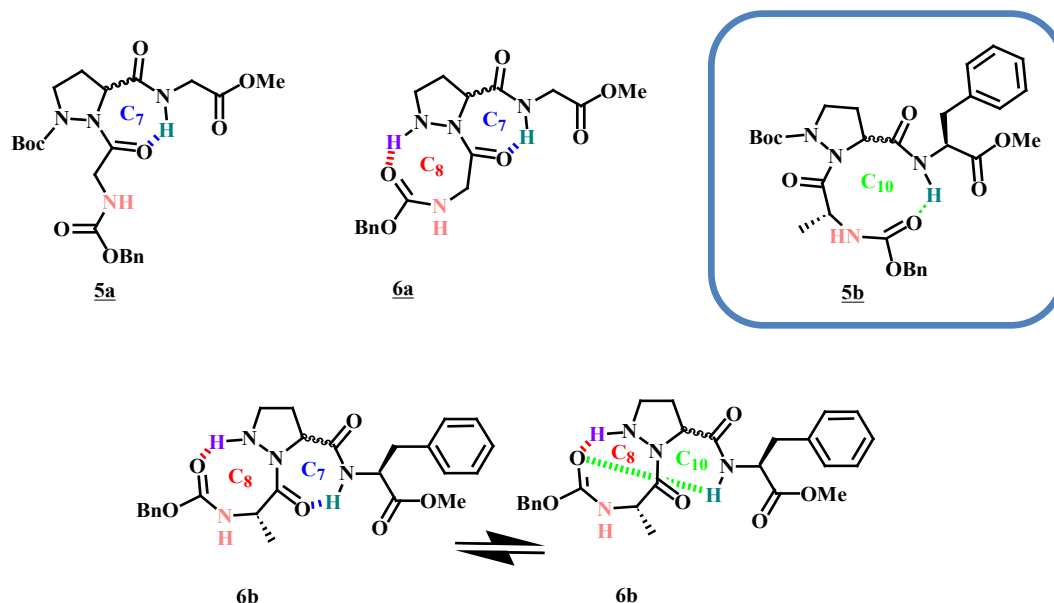


Figure 110 – Conformation des pseudotriptides Z-Ala- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe **5b**, Z-Ala- δ azaPro-Phe-OMe **6b**, Z-Gly- δ azaPro(Boc)-Gly-OMe **5a** et Z-Gly- δ azaPro-Gly-OMe **6a**

Ces différents résultats préliminaires nous incite à penser que le substrat idéal pour mesurer l'activité enzymatique de la PPIase devrait contenir le motif Ala- δ azaPro(Boc) qui adopte une conformation *cis*. et pourrait donc correspondre au substrat **45'** (Figure 111)

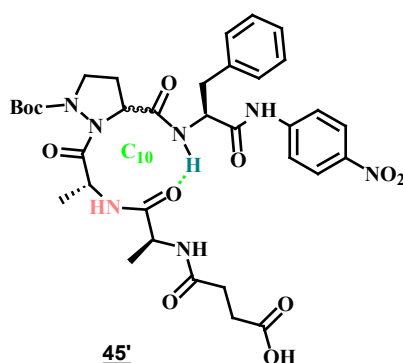


Figure 111 – Conformation possible du substrat Suc-Ala-Ala- δ azaPro(Boc)-Phe-*p*-NA **45'**

La seconde partie de ce manuscrit a donc été dédiée à la synthèse du substrat Suc-Ala-Ala- δ azaPro(Boc)-Phe-*p*-NA **45'** (Figure 111), capables de mesurer l'activité enzymatique des PPIases. Une première voie de synthèse par fragment a tout d'abord été étudiée : l'élongation de la chaîne peptidique de l'extrémité C-terminale vers N-terminale n'a pas pu être menée à terme à cause de problèmes d'orthogonalité entre la protection Z et les groupements Z et -NO₂.

Une deuxième voie de synthèse par fragment et par élongation du *N*-terminal vers le *C*-terminal a ensuite été testée. Cette tentative a montré que l'oxydation spontanée de la liaison NH-CH^α de la δ-azaproline et la gêne stérique provoquée entre le groupement Boc et le fragment Bn-Suc-Ala-Ala-OH ont été un frein à la faisabilité de cette voie de synthèse.

Afin de pallier au problème d'orthogonalité entre groupements protecteurs rencontré lors de la première voie de synthèse et de s'affranchir de l'oxydation en pyrazoline observée lors de la seconde, plusieurs méthodes de transprotections ont été testées de manière à changer la protection de l'atome d'azote natif de la δ-azaproline. Malheureusement, la formation de pyrazolines lors d'étapes de protection ou déprotection n'a pas permis d'intégrer cet analogue de la proline au sein de pseudopeptides car l'encombrement stérique généré par le Boc bloque l'accès à l'atome d'azote natif à protéger.

Finalement, une dernière voie de synthèse, qui reste à finaliser, a néanmoins permis de former l'hydrazinolactone **82**. Le travail accompli en amont sur la synthèse du pseudotripeptide **5b** nous permet d'émettre l'hypothèse qu'après plusieurs étapes consistant en une ouverture de la lactone, suivies d'une estérification et d'une réaction de Mitsunobu intramoléculaire, le pseudopeptide ¹Bu-Suc-Ala-Ala-δazaPro(Boc)-OiPr **80** pourrait être généré (Schéma 97). Une déprotection de l'extrémité *C*-terminale suivie d'un couplage peptidique avec le composé H-Phe-*p*-NA **42** et d'une étape de déprotection permettraient de générer le synthons **45'** susceptible d'être utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique des PPIases.

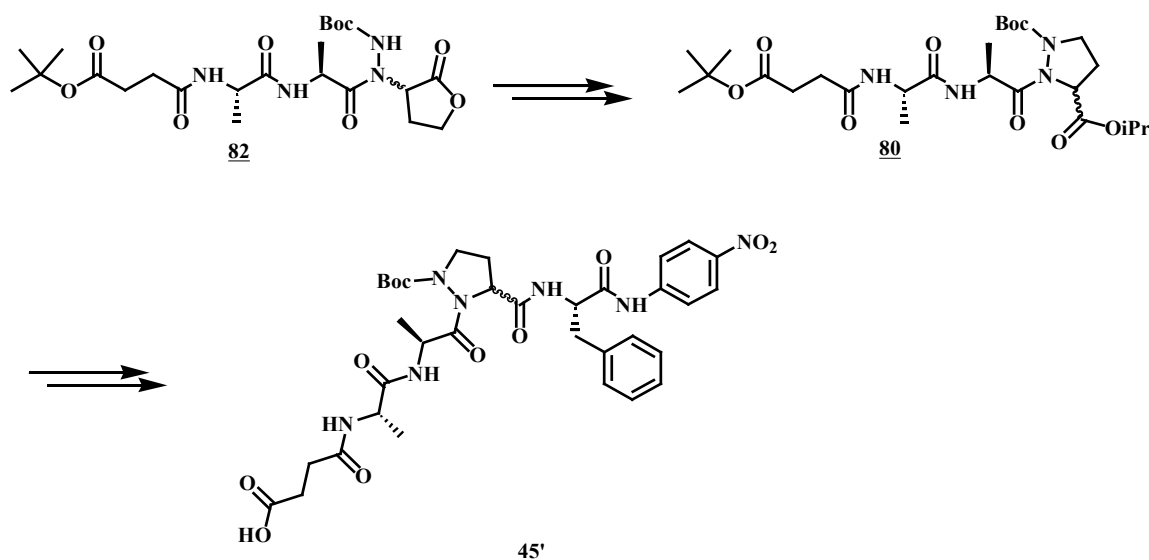


Schéma 97 – Voie de synthèse envisagée pour le synthon Suc-Ala-Ala-δazaPro(Boc)-Phe-*p*-NA **45'**

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 microwave 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 μm). All yields have been calculated from pure isolated products.

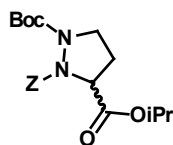
^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a spectrometer operating at 300 MHz, in deuterated chloroform (CDCl_3) or deuterated dimethylsulfoxide ($\text{DMSO}-d_6$). Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) and are referenced to the residual solvent signal for deuterated DMSO or 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.

Infrared spectra were recorded on a BRUKER TENSOR 27 spectrometer equipped with a thermostated cell compartment and a liquid nitrogen cooled MCT detector over 128 scans. The samples were analyzed in a 500 μm optic path length CAF_2 cell and the resolution of spectra is 2 cm^{-1} .

Electron spray ionization mass spectra (ESI-MS) were recorded on a BRUKER MicroTof-Q HR spectrometer at the "Service Commun de Spectrométrie de Masse" of Faculté des Sciences de et Techniques, Université de Lorraine, France. HRMS spectra were obtained in ESI method.

The uncorrected melting points were obtained on a hot-stage apparatus (Köfler-bank) previously standardized thanks to known melting points of pure products.

Z- δ azaPro(Boc)-OiPr (1)



$C_{20}H_{28}N_2O_6$

$M=392.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil; 78%

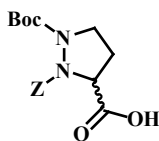
Under nitrogen and at 0°C, to a stirred solution of **17** (649 mg, 1.58 mmol, 1eq.) and PPh_3 (632 mg, 2.37 mmol, 1.5 eq.) in dry THF (25 mL) was added in one portion diethylazodicarboxylate (415 mg, 2.37 mmol, 1.5 eq.). The resulting solution was stirred at room temperature overnight and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc as eluant to give δ -azaproline **1** (489 mg, 79%) as an oil.

1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.36-7.29 (m, 5H, H_{arom}), 5.26-5.11 (m, 2H, OCH_2), 4.99 (br t, 1H, $J=5.7 \text{ Hz}$, $CH(CH_3)_2$), 4.70 (br s, 1H, NCH), 4.05 (br s, 1H, NCH_2), 3.19 (br d, 1H, $J=7.8 \text{ Hz}$, NCH_2), 2.31-2.21 (m, 2H, $CHCH_2$), 1.40 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.21-1.18 (m, 6H, $CH(CH_3)_2$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 170.7 (CO), 156.9 (2 CO), 136.6 (C), 129.1 (2 CH), 128.8 (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), 28.7 (3 CH_3), 22.3 (2 CH_3).

ESI calculated for $C_{20}H_{28}N_2NaO_6$ $[M + Na]^+$ $m/z = 415.1840$, found 415.1840.

Rf (PE/EtOAc : 70/30) = 0.59.

Z- δ azaPro(Boc)-OH (2) $C_{17}H_{22}N_2O_6$ $M=350.14 \text{ g.mol}^{-1}$

clear oil; 100%

To a solution of **1** (657 mg, 0.91 mmol, 1 eq.) in THF/H₂O (1:1) (50 mL) was added, at 0°C, a solution of NaOH 1M (1.82 mL, 1.82 mmol, 2 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. Water (20mL) was added and the mixture was extracted with cyclohexane (50mL). A solution of HCl 1M was added until pH=2 and the aqueous layer was extracted with EtOAc (4×40 mL). The organic layers were combined, dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give carboxylic acid **2** (386 mg, 100%) as a clear oil.

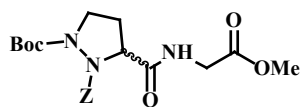
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.35-7.32 (m, 5H, H_{arom}), 6.57 (br s, 1H, CO₂H), 5.31-5.12 (m, 2H, OCH₂), 4.77 (t, 1H, J=7.2 Hz, CHCH₂), 4.10 (t, 1H, J=7.2 Hz, NCH₂), 3.24-3.15 (m, 1H, NCH₂), 2.45-2.29 (m, 2H, CHCH₂), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.7 (CO), 157.7 (CO), 156.7 (CO), 136.3 (C), 129.3 (2 CH), 129.2 (2 CH), 128.7 (CH), 84.6 (C), 69.6 (OCH₂), 60.9 (NCH), 48.9 (NCH₂), 31.7 (CH₂), 28.6 (3 CH₃).

ESI calculated for C₁₇H₂₂N₂NaO₆ [M + Na]⁺ m/z = 373.1370, found 373.1350.

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

Z- δ azaPro(Boc)-Gly-OMe (3a)



$C_{20}H_{27}N_3O_7$

$M=421.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil ; 93%

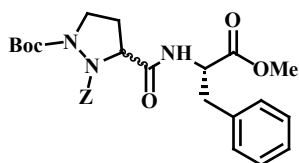
To a solution of **2** (245 mg, 0.7 mmol) in THF (20 mL) were added: triethylamine (0.29 mL, 2.1 mmol, 3 eq.), HCl.H-Gly-OMe (105 mg, 0.84 mmol, 1.2 eq.) and HOBt (113 mg, 0.84 mmol, 1.2 eq.) and at 0°C EDC (130 mg, 0.84 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred for 24 h. The solvent was removed under *vaccum*. 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 pseudodipeptide **3a** (273 mg, 93%) as an oil.

1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.77 (s, 1H, NH), 7.35-7.33 (m, 5H, H_{arom}), 5.32-5.14 (m, 2H, OCH_2), 4.76 (dd, 1H, $J=6.3$ Hz $J=8.5$ Hz, $CHCH_2$), 4.17-4.08 (m, 1H, $NHCH_2$), 4.02-3.96 (m, 1H, NCH_2), 3.87-3.80 (m, 1H, $NHCH_2$), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 3.31-3.22 (m, 1H, NCH_2), 2.58-2.47 (m, 1H, CH_2CH), 2.35 (td, 1H, $J=6.4$ Hz $J=8.1$ Hz, CH_2CH), 1.46 (s, 9H, $(CH_3)_3$).

^{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).

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.

Z- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe (3b) $C_{27}H_{33}N_3O_7$ $M=511.22 \text{ g.mol}^{-1}$

oil ; 86%

To a solution of **2** (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.), 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 **3b** (338 mg, 86%) as an oil.

(R,S)-Z- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe (3b')

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, $CHCH_{2c}$), 4.62-4.45 (m, 1H, $CHCH_{2b}$), 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 $CHCH_{2d}$), 2.91-2.75 (m, 1H, $CHCH_{2d}$), 2.47-2.10 (m, 1H, $CHCH_{2a}$), 2.05-1.75 (m, 1H, $CHCH_{2a}$), 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 $C_{27}H_{33}N_3NaO_7$ $[M + Na]^+$ $m/z = 534.221$, found 534.2199.

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

(S,S)-Z- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe (3b'')

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 $CHCH_{2c}$), 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 $CHCH_{2d}$), 2.92-2.70 (m, 1H, $CHCH_{2d}$), 2.55-2.18 (m, 2H, $CHCH_{2a}$), 1.52-1.30 (m, 9H, $C(CH_3)_3$).

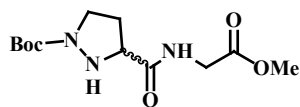
^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 172.1 (CO), 171.4 (2 CO), 158.5 (CO), 136.8 (C), 136.2 (C), 129.8 (CH), 129.7 (CH), 129.1 (4 CH), 129.0 (CH), 128.9 (CH), 128.5 (CH), 127.5 (CH), 83.6 (C), 69.1 (OCH_2), 62.2 (CH), 54.6 (CH), 52.8 (OCH_3), 48.2 (NCH_2), 38.3 (CH_2), 32.6 (CH_2), 28.8 (3 CH_3).

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

Experimental part

ESI calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{NaO}_7$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z = 534.221$, found 534.2199.

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

H- δ azaPro(Boc)-Gly-OMe (4a) $C_{12}H_{21}N_3O_5$ $M=287.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil ; 100%

A 10 mL CEM microwave process tube was charged with **3a** (75 mg, 0.18 mmol), palladium on charcoal (8 mg, 10 %), and dry methanol (5 mL). 1,4-Cyclohexadiene (0.1 mL, 1.08 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 **4a** (52 mg, 100%) as an oil.

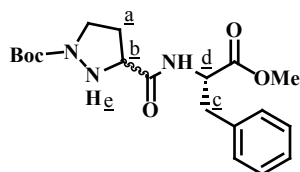
^1H NMR (CDCl_3) δ 8.10 (br s, 1H, NH), 4.55 (br s, 1H, NH), 4.40 (br d, 1H, $J=6 \text{ Hz}$, CHCH₂), 4.02-3.85 (m, 3H, NHCH₂ and NCH₂), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.27 (td, 1H, $J=4.8 \text{ Hz}$, $J=10.5 \text{ Hz}$, NCH₂), 2.57 -2.47 (m, 1H, CHCH₂), 2.32-2.20 (m, 1H, CHCH₂), 1.44 (s, 9H, (CH₃)₃).

^{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 $C_{12}H_{21}N_3NaO_5$ $[M + Na]^+$ $m/z = 310.1373$, found 310.1378 .

Rf (PE/EtOAc: 20/80) = 0.11.

H- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe (**4b**)



$C_{19}H_{27}N_3O_5$

$M=377.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil ; 100%

Deprotection with dihydrogen:

To a solution of **3b** (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 **4b** (256 mg, 100%) as an oil.

Deprotection under microwave radiations:

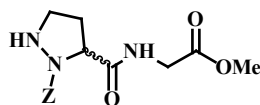
A 5 mL CEM microwave process tube was charged with **3b** (101 mg, 0.20 mmol), palladium on charcoal (10 mg, 10 %), and dry methanol (1 mL). 1,4-Cyclohexadiene (0.11 mL, 1.20 mmol, 6 eq.) was added and the tube was capped. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 100°C for 5 min. The reaction mixture was filtered through a celite pad and concentrated under *vacuum* to give pseudodipeptide **4b** (75 mg, 100%) as an oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8.02 (br s, 1H, NH_e), 7.43-6.92 (m, 5H, H_{arom}), 4.71-4.58 (m, 1H, CHCH_{2c}), 4.58-4.31 (m, 1H, $\text{CHCH}_{2c'}$), 3.83-3.62 (m, 1H, CHCH_{2b}), 3.62-3.49 (m, 3H, OCH_3), 3.49-3.10 (m, 2H, NCH_2), 3.10-2.69 (m, 2H, CHCH_{2d}), 2.44-2.01 (m, 2H, CHCH_{2a}), 1.49-1.29 (m, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3) 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 (OCH_3 and OCH_3'), 45.2 (NCH_2), 37.9 and 37.4 (CH_2 and CH_2'), 31.1 (CH_2), 27.6 (3 CH_3).

ESI calculated for $C_{19}H_{27}N_3O_5$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z = 400.1843$, found 400.1856.

Rf (PE/EtOAc : 30/70) = 0.34.

Z- δ azaPro-Gly-OMe (4c)C₁₅H₁₉N₃O₅M=321.13 g.mol⁻¹

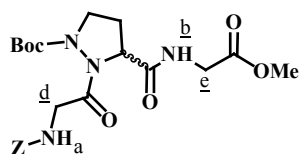
oil ; 100%

To a solution of **3a** (150 mg, 0.36 mmol) in DCM (12.24 mL) was added, at 0°C, TFA (2.16 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 h and concentrated under *vacuum*. The residue was diluted in water (20 mL) and basified until pH=10 by saturated aqueous Na₂CO₃ and extracted with EtOAc (8×30 mL). The organic layers were combined, dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give pseudotripeptide **4c** (112 mg, 97%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.45 (br s, 1H, NNH), 7.39-7.30 (m, 5H, *H*_{arom}), 7.05 (br s, 1H, NH), 5.27-5.18 (m, 2H, OCH₂), 4.55 (t, 1H, J=7.8 Hz, CHCH₂), 4.03-3.98 (m, 2H, NHCH₂), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.28 (br s, 1H, NHCH₂), 2.94-2.85 (m, 1H, NHCH₂), 2.44-2.39 (m, 2H, CHCH₂).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.0 (CO), 170.6 (CO), 157.6 (CO), 136.6 (C), 129.2 (2 CH), 129.1 (CH), 128.9 (2 CH), 68.7 (OCH₂), 61.7 (CH), 53.0 (OCH₃), 48.7 (NHCH₂), 40.5 (CH₂), 32.9 (CH₂).

Rf (PE/EtOAc : 40/60) = 0.17.

Z-Gly- δ azaPro(Boc)-Gly-OMe (5a) $C_{22}H_{30}N_4O_8$ $M=478.20 \text{ g.mol}^{-1}$

oil ; 80%

Starting from 4a

Z-Gly-OH (123 mg, 0.59 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in DMF (10 mL), and treated with triethylamine (0.18 mL, 1.47 mmol, 3 eq.) and HATU (224 mg, 0.59 mmol, 1.2 eq.) for 1 minute. Then a solution of **4a** (140 mg, 0.49 mmol, 1 eq.) in DMF (5 mL) was added. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 75°C (5×5 min). The solution was partitioned between EtOAc (80 mL) and HCl 1M (30 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 1M (2×30 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2×20 mL) and brine (2×20 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (40/60) as eluant to give pseudotriptide **5a** (187 mg, 80%) as an oil.

Starting from 10a

10a (134 mg, 0.33 mmol, 1 eq.) was dissolved in DMF (20 mL) and treated with triethylamine (0.37 mL, 0.99 mmol, 3 eq.) and HATU (152 mg, 0.40 mmol, 1.2 eq.) for 1 minute, and then a solution of H-Gly-OMe.HCl (50 mg, 0.40 mmol, 1.2 eq.) in DMF (5 mL) was added. The mixture was heated under microwaves radiations (50W, 75°C) during 2x30 min. The solution was partitioned between EtOAc (50 mL) and HCl 1M (20 mL). The organic layer was washed successively with portions of HCl 1M (2×20 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2×20 mL) and brine (2×20 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (20/80) as eluant to give pseudotriptides **5a** (105 mg, 67%) as an oil.

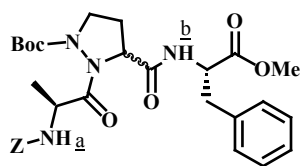
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.52 (br s, 1H, NH_b), 7.32 (br s, 5H, H_{arom}), 5.56 (br s, 1H, NH_a), 5.09 (br s, 2H, OCH₂), 4.82 (br s, 1H, CHCH₂), 4.29 (d, 1H, J=15.3 Hz, CH_{2d}), 4.06 (br s, 3H, CH_{2d}, NCH₂ and CH_{2e}), 3.84 (d, 1H, J=17.4 Hz, CH_{2e}), 3.68 (m, 3H, OCH₃), 3.12 (br s, 1H, NCH₂), 2.41 (br d, 1H, J=7.2 Hz, CHCH₂), 2.35 (br d, 1H, J=6.6 Hz, CHCH₂), 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.8 (CO), 170.6 (CO), 170.1 (CO), 157.8 (CO), 156.9 (CO), 136.9 (C), 129.0 (2 CH), 128.6 (CH), 128.5 (2 CH), 84.8 (C), 67.5 (OCH₂), 60.0 (CH), 52.7 (OCH₃), 52.7 (NCH₂), 42.9 (CH₂), 41.6 (CH₂), 30.3 (CH₂), 28.5 (3 CH₃).

IR (CHCl₃, 10 mM) γ (cm⁻¹) 3433, 3348 (NH), 1753, 1725, 1712, 1692, 1689, 1678 (C=O).

ESI calculated for C₂₂H₃₀N₄O₈ [M + Na]⁺ m/z = 501.1956, found 501.1976.

Rf (PE/EtOAc : 40/60) = 0.27.

Z-Ala- δ azaPro(Boc)-Phe-OMe (5b) $C_{30}H_{38}N_4O_8$ $M=582.27 \text{ g.mol}^{-1}$

oil ; 60%

Starting from 4b

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 (10 mL). 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 MgSO_4 , filtered and concentrated under *vacuum* without heating to give Z-Ala-F (720 mg, 100%).

To a stirred solution of **4b** (777 mg, 2.06 mmol, 1 eq.) and NaHCO_3 (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 successively with solutions of HCl 1M (3×50 mL), saturated aqueous NaHCO_3 (3×50 mL) and brine (3×50 mL), dried with MgSO_4 , filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of cyclohexane/EtOAc as eluant to give pseudotripeptides **5b** (324 mg, 27%) as oil.

Starting from 10b

10b (332 mg, 0.79 mmol, 1 eq.) was dissolved in DMF (20 mL) and treated with triethylamine (0.88 mL, 2.37 mmol, 3 eq.) and HATU (361 mg, 0.95 mmol, 1.2 eq.) for 1 minute, and then a solution of H-Phe-OMe.HCl (205 mg, 0.95 mmol, 1.2 eq.) in DMF (5 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature overnight. The solution was partitioned between EtOAc (50 mL) and HCl 1M (20 mL). The organic layer was washed successively with portions of HCl 1M (2×20 mL), saturated aqueous NaHCO_3 (2×20 mL) and brine (2×20 mL), dried with MgSO_4 , filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (40/60) as eluant to give pseudotripeptides **5b** (276 mg, 60%) as an oil.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.58 (d, 1H, $J=6.9$ Hz, NH_b), 7.32-7.13 (m, 10H, H_{arom}), 5.35 (d, 1H, $J=6.6$ Hz, NH_a), 5.11-4.98 (m, 2H, OCH_2), 4.76-4.69 (m, 3H, CHCH_3 , NH_bCH and CHCH_2), 4.20-4.08 (m, 1H, NCH_2), 3.65 (s, 3H, OCH_3), 3.15-2.93 (m, 3H, NCH_2 and $\text{CH}_2\text{-}\phi$), 2.32-2.30 (m, 1H, CHCH_2), 2.17-2.15 (m, 1H, CHCH_2), 1.45-1.41 (m, 12H, $(\text{CH}_3)_3$ and CHCH_3).

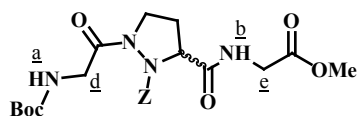
Experimental part

¹³C NMR (CDCl₃) δ 178.0 (CO), 172.1 (CO), 169.8 (CO), 158.2 (CO), 156.4 (CO), 136.8 (2 C), 129.9 (CH), 129.1 (2 CH), 129.0 (2 CH), 128.8 (2 CH), 128.6 (2 CH), 127.5 (CH), 84.3 (C), 67.5 (OCH₂), 60.3 (CH), 54.3 (CH), 52.8 (OCH₃), 49.9 (NCH₂), 47.6 (CH), 38.8 (CH₂), 29.6 (CH₂), 28.6 (3 CH₃), 18.7 (CH₃).

ESI calculated for C₃₀H₃₈N₄NaO₈ [M + Na]⁺ m/z 605.2582, found 605.2585.

IR (DMSO-*d*₆, 10 mM) ν(cm⁻¹) 1744, 1726, 1712, 1688, 1674 (C=O).

R_f (PE/EtOAc : 40/60) = 0.50.

Z- δ azaPro(Boc-Gly)-Gly-OMe (5c) $C_{22}H_{30}N_4O_8$ $M=478.21 \text{ g.mol}^{-1}$

oil ; 95%

Boc-Gly-OH (534 mg, 3.07 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in DMF (30 mL) and treated with triethylamine (0.94 mL, 7.68 mmol, 3 eq.) and HATU (1.167 g, 3.07 mmol, 1.2 eq.) for 1 minute, and then a solution of **4c** (823 mg, 2.56 mmol, 1 eq.) in DMF (5 mL) was added. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 75°C (10×5 min). The solution was partitioned between EtOAc (100 mL) and HCl 1M (50 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 1M (2×50 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2×50 mL) and brine (2×50 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (20/80) as eluant to give pseudotripeptide **5c** (1.163 g, 95%) as an oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.33 (m, 6H, H_{arom} and NH_b), 5.37 (br s, 1H, NH_a), 5.26- 5.15 (m, 2H, OCH_2), 4.84 (dd, 1H, $J=4.5 \text{ Hz } J=8.4 \text{ Hz}$, $CHCH_2$), 4.22-3.90 (m, 4H, CH_{2d} and CH_{2e}), 3.69 (br s, 1H, NCH_2), 3.66 (s, 3H, OCH_3), 3.16 (br s, 1H, NCH_2), 2.47 (br s, 1H, $CHCH_2$), 2.31 (br s, 1H, $CHCH_2$), 1.37 (s, 9H, $C(CH_3)_3$).

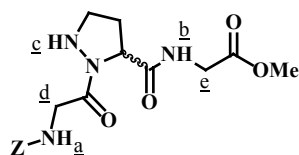
¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.9 (CO), 170.4 (2 CO), 158.6 (CO), 156.8 (CO), 135.3 (C), 129.4 (3 CH), 128.9 (2 CH), 80.6 (C), 70.3 (OCH_2), 63.4 (CH), 52.9 (OCH_3), 44.7 (NCH_2), 42.6 (CH_2), 41.9 (CH_2), 29.5 (CH_2), 28.9 (3 CH_3).

IR (DMSO-*d*₆, 10 mM) $\gamma(\text{cm}^{-1})$ 1753, 1736, 1712, 1686, 1664 (C=O).

ESI calculated for $C_{22}H_{30}N_4NaO_8$ $[M+Na]^+$ $m/z=501.1956$ found 501.1958.

Rf (PE/EtOAc : 20/80) = 0.28.

Z-Gly- δ azaPro-Gly-OMe (6a)



$C_{17}H_{22}N_4O_6$

$M=378.15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil ; 97%

To a solution of **5a** (79 mg, 0.21 mmol) in DCM (1.31 mL) was added, at 0°C, TFA (0.87 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 h and concentrated under *vacuum*. The residue was diluted in water (20 mL) and basified until pH=10 by saturated aqueous Na_2CO_3 and extracted with EtOAc (8×20 mL). The organic layers were combined, dried with MgSO_4 , filtered and concentrated under *vacuum* to give pseudotripeptides **6a** (77 mg, 97%) as an oil.

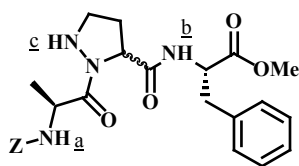
^1H NMR (CDCl_3) δ 7.45 (br s, 1H, NH_b), 7.34-7.31 (m, 5H, H_{arom}), 5.54 (br s, 1H, NH_a), 5.11 (br s, 2H, OCH_2), 4.67 (t, 1H, $J=7.8 \text{ Hz}$, CHCH_2), 4.36-4.12 (m, 3H, CH_{2d} and NH_c), 4.00 (d, 2H, $J=5.7 \text{ Hz}$, CH_{2e}), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.29 (br t, 1H, $J=8.1 \text{ Hz}$, NH_cCH_2), 2.76 (br t, 1H, $J=7.2 \text{ Hz}$, NH_cCH_2), 2.51-2.48 (m, 1H, CH_2CH), 2.36-2.27 (m, 1H, CH_2CH).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.9 (CO), 171.3 (CO), 170.7 (CO), 157.1 (CO), 137.1 (C), 129.1 (2 CH), 128.7 (CH), 128.6 (2 CH), 68.1 (OCH_2), 59.7 (CH), 52.9 (OCH_3), 48.9 (NHCH_2), 43.8 (CH_2), 41.9 (CH_2), 31.1 (CH_2).

IR ($\text{DMSO}-d_6$, 10 mM) $\gamma(\text{cm}^{-1})$ 1753, 1719, 1689, 1668 (C=O).

ESI calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=379.1612$ found 379.1623.

Rf (PE/EtOAc : 30/ 70) = 0.03.

Z-Ala- δ azaPro-Phe-OMe (6b) $C_{25}H_{30}N_4O_6$ $M=482.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil ; 100%

5b (150 mg, 0.26 mmol) was stirred in 20/80 trifluoroacetic acid TFA/DCM (10 mL) under nitrogen at room temperature for 4h. The volatiles were removed in a rotary evaporator. The crude was stirred with saturated aqueous Na_2CO_3 (15 mL) for 1h. The product was extracted with DCM (2x25 mL) and the combined organic layers were successively washed with water (25 mL) and brine (25 mL). The organic layers were dried with MgSO_4 , filtered and concentrated under *vacuum* to give **6b** (125 mg, 100%) as an oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.33-7.20 (m, 10H, H_{arom}), 7.10 (d, 1H, $J=6.3 \text{ Hz}$, NH_b), 5.61 (d, 1H, $J=7.2 \text{ Hz}$, NH_a), 5.28-5.07 (m, 2H, OCH_2), 4.96 (br t, 1H, $J=6.9 \text{ Hz}$, CHCH_3), 4.77 (q, 1H, $J=4.7 \text{ Hz}$, $J=12.9 \text{ Hz}$, NH_bCH), 4.63 (t, 1H, $J=7.2 \text{ Hz}$, CHCH_2), 4.00 (br d, 1H, $J=9.0 \text{ Hz}$, NH_c), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 3.18-3.11 (m, 2H, NH_cCH_2 and NH_bCH_2), 2.99 (dd, 1H, $J=7.5 \text{ Hz}$, $J=14.1 \text{ Hz}$, NH_bCH_2), 2.76 (br t, 1H, $J=9.6 \text{ Hz}$, NH_cCH_2), 2.40-2.37 (m, 1H, CHCH_2), 2.27-2.23 (m, 1H, CHCH_2), 1.27 (d, 3H, $J=8.1 \text{ Hz}$, CHCH_3).

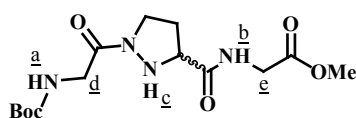
^{13}C NMR (CDCl_3) δ 175.6 (CO), 172.3 (CO), 170.7 (CO), 156.2 (CO), 137.1 (C), 136.6 (C), 129.8 (2 CH), 129.1 (2 CH), 128.7 (2 CH), 128.6 (2 CH), 127.7 (2 CH), 67.3 (OCH_2), 59.5 (CH), 54.3 (CH), 53.0 (OCH_3), 48.9 (NHCH_2), 48.6 (CH), 38.4 (CH_2), 30.9 (CH_2), 19.9 (CH_3).

ESI calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z=481.2082$ found 481.2072.

IR ($\text{DMSO}-d_6$, 10 mM) ν (cm^{-1}) 1745, 1714, 1680, 1653 (C=O).

Rf (PE/EtOAc : 40/60) = 0.28.

H-δazaPro(Boc-Gly)-Gly-OMe (6c)



$C_{14}H_{24}N_4O_6$

$M=344.17 \text{ g.mol}^{-1}$

oil ; 100%

A 10 mL CEM microwave process tube was charged with **5c** (75 mg, 0.18 mmol), palladium on charcoal (8 mg, 10 %), and dry methanol (5 mL). 1,4-Cyclohexadiene (0.1 mL, 1.08 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 **6c** (52 mg, 100%) as an oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.86 (br s, 1H, NH_b), 5.41 (br s, 1H, NH_a), 4.80 (br s, 1H, NH_c), 4.39-4.27 (m, 1H, CH_{2d}), 4.12-4.04 (m, 4H, CH_{2d} , CH_{2e} and CHCH_2), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 3.49 (br d, 2H, $J=3.6 \text{ Hz}$, NCH_2), 2.62 (br s, 1H, CHCH_2), 2.31-2.27 (m, 1H, CHCH_2), 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

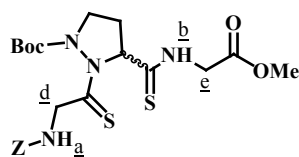
^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.5 (CO), 170.7 (CO), 169.6 (CO), 156.9 (CO), 80.4 (C), 61.9 (CH), 53.0 (OCH_3), 44.7 (NCH_2), 43.1 (CH_2), 41.8 (CH_2), 30.4 (CH_2), 28.9 (3 CH_3).

ESI calculated for $C_{14}H_{24}N_4NaO_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z=479.2136$ found 479.2147.

IR ($\text{DMSO}-d_6$, 10 mM) $\gamma(\text{cm}^{-1})$ 1753, 1708, 1675, 1656 (C=O).

Rf (PE/EtOAc : 20/80) = 0.27

2-(2-Benzyloxycarbonylamino-thioacetyl)-3-(methoxycarbonylmethyl-thiocarbamoyl)-pyrazolidine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (7a)



$$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2$$

$$M=510.16 \text{ g.mol}^{-1}$$

brown oil ; 63%

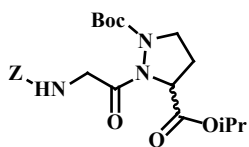
To a solution of **5a** (150 mg, 0.31 mmol, 1 eq.) in dry toluene (20 mL), was added K_3PO_4 (398 mg, 1.88 mmol, 6 eq.) and Lawesson's reagent (303 mg, 0.75 mmol, 2.42 eq.). The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 105°C (2×60 min). The solution was partitioned between CHCl_3 (50 mL) and HCl 0.5M (20 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 0.5M (20 mL), saturated aqueous NaHCO_3 (2×20 mL), dried with MgSO_4 , filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (75/25) as eluant to give **7a** (100 mg, 63%) as an oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 9.27 (br s, 1H, NH_b), 7.36-7.30 (m, 5H, H_{arom}), 5.87 (br s, 1H, NH_a), 5.73 (t, 1H, $J=8.1$ Hz, CHCH_2), 5.12 (s, 2H, OCH_2), 4.57-4.45 (m, 2H, CH_{2d} and CH_{2e}), 4.25-4.18 (m, 1H, NCH_2), 4.14-4.11 (m, 1H, CH_{2d}), 4.06-4.04 (m, 1H, CH_{2e}), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.34-3.24 (dd, 1H, $J=10.8$ Hz $J=18.1$ Hz, NCH_2), 2.74 (br s, 1H, CHCH_2), 2.48 (br s, 1H, CHCH_2), 1.50 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 201.7 (CS), 199.8 (CS), 168.8 (CO), 157.6 (CO), 156.8 (CO), 137.1 (C), 129.2 (2 CH), 128.8 (CH), 128.7 (2 CH), 86.1 (C), 72.4 (CH), 67.6 (OCH_2), 53.1 (OCH_3), 49.8 (NCH_2), 48.7 (CH_2), 47.2 (CH_2), 34.0 (CH_2), 28.6 (3 CH_3).

ESI calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{NaO}_6\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z=533.1499$ found 533.1514.

Rf (PE/EtOAc : 75/25) = 0.19.

Z-Gly- δ azaPro(Boc)-OiPr (9a) $C_{22}H_{31}N_3O_7$ $M=449.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil; 35%

Peptidic coupling with HATU

Z-Gly-OH (73 mg, 0.35 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in DMF (3 mL) and treated with TEA (0.32 mL, 0.87 mmol, 3 eq.) and HATU (133 mg, 0.35 mmol, 1.2 eq.) for 1 min, and then a solution of **64** (75 mg, 0.29 mmol, 1 eq) in DMF (2 mL) was added. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 75°C (5x5 min) and stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was partitioned between EtOAc (80 mL) and HCl 1N (30 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 1N (2x30 mL), saturated aqueous NaHCO_3 (2x20 mL) and brine (2x20 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 **9a** (46 mg, 35%) as an oil.

Intramolecular Mistunobu reaction

To a stirred solution of carboxylate **14a** (296 mg, 0.67 mmol, 1 eq.) in THF (10 mL) was added tetrabutylammonium fluoride (0.8 mL, 0.80 mmol, 1.2 eq.) and isopropyl iodide (0.08 mL, 0.80 mmol, 1.2 eq.) at 0°C. The mixture was stirred for 8h at this temperature, and then allowed to warm to room temperature and stirred overnight. The reaction mixture concentrated under *vacuum* and the residue was partitioned between EtOAc (50 mL) and Na_2SO_4 1N (25 mL). The organic layer was washed with portions of 1N aqueous Na_2SO_4 (2x25 mL), saturated aqueous NaHCO_3 (3x25 mL) and brine (3x25 mL), dried with MgSO_4 , filtered and concentrated under *vacuum*.

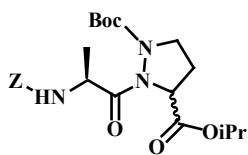
The residue was dissolved in dry THF (10mL) and triphenylphosphine (253 mg, 1.00 mmol, 1.5 eq.) was added. Under nitrogen, diethyl azodicarboxylate (0.12 mL, 1.00 mmol, 1.5 eq.) was added in one portion with stirring at 0°C. The resulting solution was stirred at room temperature overnight and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of petroleum ether and ethyl acetate (70/30) to give pseudodipeptide **9a** (145 mg, 0.31 mmol, 20%) as an oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.36 (m, 5H, H_{arom}), 5.44 (br s, 1H, NH), 5.14 (br s, 2H, OCH_2) 5.07-4.99 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) 4.88 (t, 1H, $J=6.0$ Hz, CHCH_2), 4.29-4.16 (m, 2H, NHCH_2), 4.10 (br d, 1H, $J=3.6$ Hz, NCH_2), 3.11 (br d, 1H, $J=11.1$ Hz, NCH_2), 2.37-2.23 (m, 2H, CHCH_2), 1.52 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.27 (br s, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 170.2 (2 CO), 156.2 (2 CO), 137.1 (C), 129.2 (3 CH), 128.7 (2 CH), 83.9 (C), 70.0 (CH), 67.6 (OCH_2), 58.4 (CH), 47.8 (NCH_2), 43.0 (CH_2), 30.3 (CH_2), 28.7 (3 CH_3), 22.3 (2 CH_3).

ESI calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 450.2235$, found 450.2232.

Rf (PE/EtOAc : 75/25) = 0.19.

Z-Ala- δ azaPro(Boc)-OiPr (9b) $C_{22}H_{33}N_3O_7$ $M=463.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil; 37%

Peptidic coupling with HBTU and microwaves

Z-Ala-OH (96 mg, 0.43 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in DMF (3 mL) and treated with TEA (0.14 mL, 1.08 mmol, 3 eq.) and HBTU (163 mg, 0.43 mmol, 1.2 eq.) for 1 min, and then the solution of activated amino acid was added to a solution of **64** (93 mg, 0.36 mmol, 1 eq) in DMF (2 mL). The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 75°C, 50W for 7x5 min and stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was partitioned between EtOAc (50 mL) and HCl 1N (20 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 1N (2x20 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2x20 mL) and brine (2x20 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (80/20) as eluant to give **9b** (14 mg, 8%) as an oil.

Peptidic coupling with HATU and microwaves

Z-Ala-OH (72 mg, 0.32 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in DMF (3 mL) and treated with TEA (0.11 mL, 0.81 mmol, 3 eq.) and HATU (123 mg, 0.32 mmol, 1.2 eq.) for 1 min, and then the solution of activated amino acid was added to a solution of **64** (70 mg, 0.27 mmol, 1 eq) in DMF (2 mL). The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 75°C, 50W for 5x5 min and stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was partitioned between EtOAc (50 mL) and HCl 1N (20 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 1N (2x20 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2x20 mL) and brine (2x20 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (80/20) as eluant to give **9b** (20 mg, 16%) as an oil.

Peptidic coupling with HATU

Z-Ala-OH (83 mg, 0.37 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in DMF (10 mL) and treated with TEA (0.12 mL, 0.93 mmol, 3 eq.) and HATU (141 mg, 0.37 mmol, 1.2 eq.) for 1 min, and then the solution of activated amino acid was added to a solution of **64** (80 mg, 0.31 mmol, 1 eq) in DMF (5 mL). The mixture was stirred at room temperature during 3 days. The reaction mixture was partitioned between EtOAc (50 mL) and HCl 1N (20 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 1N (2x20 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2x20 mL) and brine (2x20 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (80/20) as eluant to give **9b** (13 mg, 9%) as an oil.

Peptidic coupling with 1-chloro-N,N-2-trimethyl-1-propen-1-amine

Experimental part

To a stirred solution of Z-Ala-OH (161 mg, 0.72 mmol, 2 eq.) in dry DCM (10 mL) was added 1-chloro-*N,N*,2-trimethyl-1-propen-1-amine (0.1 mL, 0.72 mmol, 2 eq.) at 0°C. The mixture was stirred for 20 min at this temperature, and then cooled to -20°C. **64** (93 mg, 0.36 mmol, 1 eq.) in DCM (20 mL) was added, followed by 2,4,6-collidine (0.07 mL, 1.44 mmol, 2 eq.). The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred overnight, then diluted with EtOAc (30 mL) and washed successively with HCl 1 M (3x10 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2x10 mL) and brine (2x10 mL), dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (70/30) to give **9b** (32 mg, 19%) as an oil.

Intramolecular Mistunobu reaction

To a stirred solution of carboxylate **14b** (673 mg, 1.40 mmol, 1 eq.) in THF (10 mL) was added tetrabutylammonium fluoride (1.68 mL, 1.68 mmol, 1.2 eq.) and isopropyl iodide (0.17 mL, 1.68 mmol, 1.2 eq.) at 0°C. The mixture was stirred for 1h at this temperature, and then allowed to warm to room temperature and stirred overnight. The reaction mixture concentrated under *vacuum* and the residue was partitioned between EtOAc (100 mL) and Na₂SO₄ 1N (30 mL). The organic layer was washed with portions of 1N aqueous Na₂SO₄ (2x30 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (3x30 mL) and brine (3x30 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*.

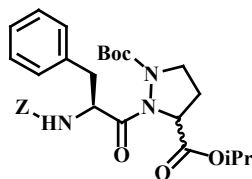
The residue was dissolved in dry THF (10 mL) and triphenylphosphine (550 mg, 2.10 mmol, 1.5 eq.) was added. Under nitrogen, diethyl azodicarboxylate (0.25 mL, 2.10 mmol, 1.5 eq.) was added in one portion with stirring at 0°C. The resulting solution was stirred at room temperature overnight and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of petroleum ether and ethyl acetate (70/30) to give pseudodipeptide **9b** (240 mg, 37%) as an oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.34-7.33 (m, 5H, *H*_{arom}), 5.67 (br s, 1H, *NH*), 5.14-4.97 (m, 3H, CH₂O and CH(CH₃)₂), 4.85 (br d, 1H, J=6.3 Hz, CHCH₃), 4.73 (br d, 1H, J=6.9 Hz, CHCH₂), 4.30-4.25 (m, 1H, CH₂N), 3.03 (br d, 1H, J=8.7 Hz, CH₂N), 2.39-2.33 (m, 1H, CH₂CH), 2.23 (br d, 1H, J=6.6 Hz, CH₂CH), 1.44 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.38-1.23 (9H, m, CH₃CH and (CH₃)₂CH).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 147.1 (CO), 170.1 (CO), 157.3 (CO), 155.8 (CO), 137.2 (C), 129.1 (3 CH), 128.6 (2 CH), 83.4 (C), 69.9 (CH), 58.7 (CH), 48.8 (CH), 47.5 (CH₂N), 30.3 (CH₂), 28.4 (3 CH₃), 22.3 (2 CH₃), 19.6 (CH₃).

ESI calculated for C₂₃H₃₃N₃NaO₇ [M + Na]⁺ *m/z* = 486.2211, found 486.2205.

R_f (PE/EtOAc: 80/20) = 0.26.

Z-Phe- δ azaPro(Boc)-OiPr (9c) $C_{29}H_{37}N_3O_7$ $M=539.25 \text{ g.mol}^{-1}$

oil;

Z-Phe-OH (96 mg, 0.32 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in DMF (3 mL) and treated with TEA (0.11 mL, 0.81 mmol, 3 eq.) and HATU (123 mg, 0.32 mmol, 1.2 eq.) for 1 min, and then a solution of **64** (70 mg, 0.27 mmol, 1 eq) in DMF (2 mL) was added. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 75°C (5x5 min) and stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was partitioned between EtOAc (80 mL) and HCl 1N (30 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 1N (2×30 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2×20 mL) and brine (2×20 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give pseudodipeptide **9c** and impurities as an oil.

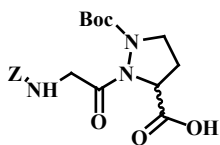
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.30-6.84 (m, 10H, H_{arom}), 5.50-5.27 (d, 1H, $J=8.0 \text{ Hz}$, NH), 5.15-4.63 (m, 3H, OCH_2 and $CH(CH_3)_2$), 4.62-4.31 (m, 1H, $CHCH_2a$), 4.91-3.81 (m, 1H, $CHCH_2c$), 3.61-3.22 (m, 2H, NCH_2), 3.19-2.77 (m, 2H, $CHCH_2b$), 2.48-1.91 (m, 2H, $CHCH_2d$), 1.52-1.28 (m, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.28-1.10 (m, 6H, $CH(CH_3)_2$).

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 (OCH_2), 60.0 (CH), 55.2 (CH), 46.0 (NCH_2), 31.0 (CH_2), 29.5 (CH_2), 28.5 (3 CH_3), 22.1 (2 CH_3).

ESI calculated for $C_{29}H_{37}N_3NaO_7$ $[M + Na]^+$ $m/z = 562.2524$, found 562.2513.

Rf (PE/EtOAc : 80/20) = 0.24.

Z-Gly- δ azaPro(Boc)-OH (10a)



C₁₉H₂₅N₃O₇

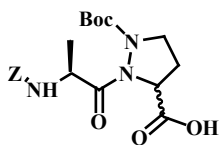
M=407.17 g.mol⁻¹

oil ; 100%

To a solution of **9a** (145 mg, 0.33 mmol, 1 eq.) in THF/H₂O (1:1) (20 mL) was added, at 0°C, a solution of NaOH 1M (0.66 mL, 0.66 mmol, 2 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. Water (20mL) was added and the mixture was extracted with cyclohexane (50mL). A solution of HCl 1M was added until pH=2 and the aqueous layer was extracted with EtOAc (4×40 mL). The organic layers were combined, dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give carboxylic acid **10a** (134 mg, 100%) as a clear oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.33-7.26 (m, 5H, *H*_{arom}), 5.58 (br s, 1H, *NH*), 5.10 (br s, 2H, *OCH*₂), 4.85-4.82 (m, 1H, *CHCH*₂), 4.21-4.14 (m, 4H, *NCH*₂, *NHCH*₂ and *OH*), 3.11-3.07 (m, 1H, *NCH*₂), 2.37-2.31 (m, 2H, *CHCH*₂), 1.45 (s, 9H, *OCH*₃).

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

Z-Ala- δ azaPro(Boc)-OH (10b)C₂₀H₂₇N₃O₇M=421.18 g.mol⁻¹

oil ; 100%

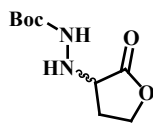
To a solution of **9b** (100 mg, 0.22 mmol, 1 eq.) in THF/H₂O (1:1) (20 mL) was added, at 0°C, a solution of NaOH 1M (0.44 mL, 0.44 mmol, 2 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. Water (20mL) was added and the mixture was extracted with cyclohexane (50mL). A solution of HCl 1M was added until pH=2 and the aqueous layer was extracted with EtOAc (4×40 mL). The organic layers were combined, dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give carboxylic acid **10b** (92 mg, 100%) as a clear oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.75 (s, 1H, OH), 7.31 (m, 5H, *H*_{arom}), 5.44 (d, 1H, J=5.4 Hz, NH), 5.07-4.97 (m, 2H, OCH₂), 4.87-4.78 (m, 2H, CHCH₃ and CHCH₂), 4.16 (td, 1H, J=7.2 Hz, J=14.8 Hz, NCH₂), 3.19 (br d, 1H, J=8.7 Hz, NCH₂), 2.35 (br s, 2H, CHCH₂), 1.40 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.26 (d, 3H, J=7.2 Hz, CHCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.2 (2 CO), 158.4 (2 CO), 137.2 (C), 129.2 (2 CH), 128.9 (CH), 128.7 (2 CH), 85.2 (C), 67.7 (OCH₂), 59.8 (CH), 49.7 (NCH₂), 47.5 (CH), 29.2 (CH₂), 28.5 (3 CH₃), 19.7 (CH₃).

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

N'-(2-Oxo-tetrahydro-furan-3-yl)-hydrazinecarboxylic acid tert-butyl ester (12)



$C_9H_{16}N_2O_4$

$M=216.16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil ; 79%

A solution of α -hydroxy- γ -butyrolactone (0.77 mL, 9.80 mmol, 1 eq.) in dry DCM (25 mL) was treated with 2,6-lutidine (1.86 mL, 15.70 mmol, 1.6 eq.) and Tf_2O (2.27 mL, 13.7 mmol, 1.4 eq.) successively at 0°C, and after stirring for 1h at this temperature, tert-butyl carbazate (2.59 g, 19.6 mmol, 2 eq.) in DCM (20 mL) was added, followed by 2,6-lutidine (1.86 mL, 15.70 mmol, 1.6 eq.). The reaction mixture was refluxed overnight, and then quenched with 1M HCl (30 mL) at room temperature. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layer was washed with brine (25 mL) and dried over $MgSO_4$, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of DCM/MeOH (95/05) to give **12** (1.673 g, 79%) as an oil.

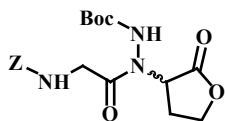
1H NMR ($CDCl_3$) δ 6.57 (s, 1H, NH), 4.45 (br s, 1H, NH), 4.33 (t, 1H, J=9.3 Hz, CH_2O), 4.15 (t, 1H, J=9.3 Hz, CH_2O), 3.90 (br s, 1H, $CHCH_2$), 2.40 (br s, 1H, $CHCH_2$), 2.18 (m, 1H, $CHCH_2$), 1.38 (s, 9H, $(CH_3)_3$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 176.4 (CO), 157.3 (CO), 81.6 (C), 66.4 (OCH_2), 58.6 (CH), 28.9 (3 CH_3), 28.3 (CH_2).

ESI calculated for $C_9H_{16}N_2NaO_4$ $[M + Na]^+$ $m/z = 239.1002$, found 239.1006.

Rf (DCM/MeOH: 95/05) = 0.46.

N'-(2-Benzoyloxycarbonylamino-acetyl)-N'-(2-oxo-tetrahydro-furan-3-yl)-hydrazinecarboxylic acid *tert*-butyl ester (13a)


 $C_{19}H_{25}N_3O_7$
 $M=407.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

oil ; 82%

To a stirred solution of Z-Gly-OH (1.510 g, 7.32 mmol, 2 eq.) in dry DCM (30 mL) was added 1-chloro-*N,N*,2-trimethyl-1-propen-1-amine (0.95 mL, 7.32 mmol, 2 eq.) at 0°C. The mixture was stirred for 20 min at this temperature, and then cooled to -20°C. **12** (791 mg, 3.66 mmol, 1 eq.) in DCM (20 mL) was added, followed by 2,4,6-collidine (0.75 mL, 14.64 mmol, 2 eq.). The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred overnight, then diluted with EtOAc (100 mL) and washed successively with HCl 1 M (3x30 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2x30 mL) and brine (2x30 mL), dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (40/60) to give **13a** (1.222 g, 82%) as an oil.

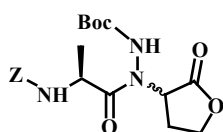
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.59 (s, 1H, NNH), 7.31-2.27 (m, 5H, *H*_{arom}), 5.70 (br s, 1H, NH), 5.50 (br s, 1H, CHCH₂), 5.07 (br s, 2H, OCH₂), 4.34 (br s, 2H, OCH₂ and NCH₂), 4.17 (dd, 1H, J=8.7 Hz, J=16.3 Hz, OCH₂), 3.92 (br s, 1H, NCH₂), 2.46 (br s, 2H, CH₂CH), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 173.9 (CO), 172.8 (CO), 157.0 (CO), 155.1 (CO) 137.0 (C), 128.9 (3 CH), 128.5 (2 CH), 83.3 (C), 67.4 (OCH₂), 66.6 (OCH₂), 56.1 (CH), 42.8 (NCH₂), 28.6 (3 CH₃), 26.1 (CH₂).

ESI calculated for C₁₉H₂₅N₃NaO₇ [M + Na]⁺ *m/z* = 430.1585, found 430.1586.

R_f (PE/EtOAc: 40/60) = 0.39.

N'-(2-Benzylloxycarbonylamino-propionyl)-N'-(2-oxo-tetrahydro-furan-3-yl)-hydrazinecarboxylic acid tert-butyl ester (13b)



$C_{20}H_{27}N_3O_7$

$M=421.18 \text{ g.mol}^{-1}$

oil ; 79%

To a stirred solution of Z-Ala-OH (1.508 g, 6.76 mmol, 2 eq.) in dry DCM (30 mL) was added 1-chloro-*N,N*,2-trimethyl-1-propen-1-amine (0.88 mL, 6.76 mmol, 2 eq.) at 0°C. The mixture was stirred for 20 min at this temperature, and then cooled to -20°C. **12** (730 mg, 3.38 mmol, 1 eq.) in DCM (20 mL) was added, followed by 2,4,6-collidine (0.69 mL, 13.52 mmol, 2 eq.). The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred overnight, then diluted with EtOAc (50 mL) and washed successively with HCl 1 M (3x30 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2x30 mL) and brine (2x30 mL), dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (60/40) to give **13b** (1.123 g, 79%) as an oil.

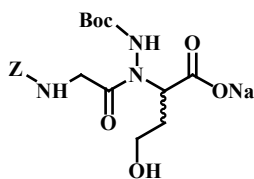
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.84 (s, 1H, NNH), 7.29 (br s, 5H, *H*_{arom}), 5.71 (d, 1H, J=6.3 Hz, NH), 5.47 (br s, 1H, CHCH₂), 5.10-5.00 (m, 2H, OCH₂), 4.75 (br s, 1H, CHCH₃), 4.37 (br s, 1H, OCH₂), 4.19 (dd, 1H, J=8.7 Hz, J=16.6 Hz, OCH₂), 2.50 (br s, 2H, CH₂CH), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.30 (d, 3H, J=6.6 Hz, CH₃CH).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 173.8 (CO), 173.3 (CO), 156.3 (CO), 155.5 (CO), 136.9 (C), 129.1 (2 CH), 128.7 (3 CH), 83.3 (C), 67.6 (OCH₂), 66.7 (OCH₂), 48.8 (CH), 46.9 (CH), 28.7 (3 CH₃), 26.8 (CH₂), 18.8 (CH₃).

ESI calculated for C₂₀H₂₇N₃NaO₇ [M + Na]⁺ *m/z* = 444.1741, found 444.1752.

R_f (PE/EtOAc: 60/40) = 0.32.

Sodium 2-[N-(2-Benzyloxycarbonylamino-acetyl)-N'-tert-butoxycarbonyl-hydrazino]-4-hydroxy-butyrates (14a)



$$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{NaO}_8$$

$$M=447.16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

white solid ; 100%

To a stirred solution of **13a** (274 mg, 0.67 mmol, 1 eq.) in a mixture of THF/H₂O (20 mL, 1:1) was added at room temperature 1 M aqueous solution of NaOH (0.67 mL, 0.67 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight and concentrated in vacuo. The resultant white solid was suspended in toluene and concentrated to remove trace of water to give sodium carboxylate salt **14a** (296 mg, 0.67 mmol) as a white solid.

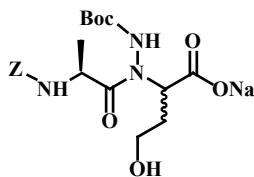
¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.35-7.30 (m, 6H, *H*_{arom} and NNH), 5.38 (br s, 1H, NH), 5.02 (s, 2H, OCH₂), 4.64 (br s, 2H, OH and CHCH₂), 4.03-3.89 (m, 1H, NCH₂), 3.70-3.65 (m, 1H, NCH₂), 3.47-3.45 (m, 2H, OCH₂), 1.84-1.80 (m, 1H, CH₂CH), 1.60 (br s, 1H, CH₂CH), 1.41 (s, 9H, (CH₃)₃).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 173.3 (CO), 170.8 (CO), 156.4 (CO), 155.5 (CO), 137.1 (C), 128.3 (2 CH), 127.7 (CH), 127.6 (2 CH), 80.1 (C), 65.2 (OCH₂), 59.5 (OCH₂), 58.4 (CH), 41.6 (NCH₂), 32.9 (CH₂), 27.8 (3 CH₃).

ESI calculated for C₁₉H₂₇N₃NaO₈ [M + H]⁺ *m/z* = 448.1690, found 448.1701.

R_f (PE/EtOAc: 60/40) = 0.00.

Sodium 2-[N-(2-Benzyloxycarbonylamino-propionyl)-N'-tert-butoxycarbonyl-hydrazino]-4-hydroxy-butyrate (14b)



$C_{20}H_{28}N_3NaO_8$

$M=461.18 \text{ g.mol}^{-1}$

white solid ; 100%

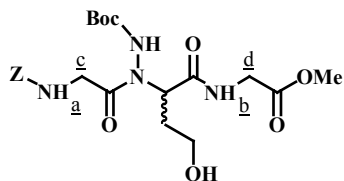
To a stirred solution of **13b** (1.714 g, 4.07 mmol, 1 eq.) in a mixture of THF/H₂O (100 mL, 1:1) was added at room temperature 1 M aqueous solution of NaOH (4.07 mL, 4.07 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight and concentrated in vacuo. The resultant white solid was suspended in toluene and concentrated to remove trace of water to give sodium carboxylate salt **14b** (1.876 g, 100%) as a white solid.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.50 (br s, 1H, NH), 7.36-7.32 (m, 5H, H_{arom}), 5.15 (br s, 1H, NH), 5.07-4.95 (m, 2H, CH₂O), 4.78-4.62 (m, 1H, CHCH₂), 4.49-4.43 (m, 2H, OH and CHCH₃), 3.48 (br s, 2H, CH₂O), 1.91-1.84 (m, 1H, CH₂CH), 1.64-1.60 (m, 1H, CH₂CH), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.19 (d, 3H, J=6.9 Hz, CH₃CH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 174.6 (CO), 173.9 (CO), 155.7 (CO), 155.5 (CO), 137.1 (C), 128.3 (2CH), 127.8 (CH), 127.7 (2 CH), 80.0 (C), 65.2 (CH₂O), 59.4 (CH₂O), 47.1 (CH), 46.3 (CH), 32.6 (CH₂), 27.8 (3 CH₃), 17.5 (CH₃).

R_f (PE/EtOAc: 60/40) = 0.00.

{2-[N-(2-Benzyloxycarbonylamino-acetyl)-N'-tert-butoxycarbonyl-hydrazino]-4-hydroxy-butyrylamino}-acetic acid methyl ester (15a')



$$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_9$$

$$M=496.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

oil ; 57%

To a stirred solution of **13a** (300 mg, 0.74 mmol, 1 eq.) in THF (10 mL) was added at room temperature HCl.H-Gly-OMe (138 mg, 1.11 mmol, 1.5 eq.) and sodium 2-ethylhexanoate (307 mg, 1.85 mmol, 2.5 eq.). The reaction was heated at reflux for 76h. The mixture was filtrated and concentrated under *vacuum*. The residue was dissolved in EtOAc (50 mL) and the solution was washed successively with HCl 1M (3x20 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2x20 mL) and brine (2x20 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with EtOAc as eluant to give compound **15a'** (210 mg, 57%) as a clear oil.

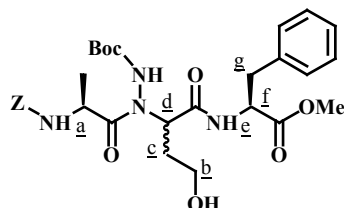
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.70 (s, 1H, NNH), 7.34 (br s, 5H, *H*_{arom}), 6.44 (br s, 1H, NH_b), 5.57 (br s, 1H, NH_a), 5.11 (br s, 2H, OCH₂), 4.39-4.36 (m, 1H, OCH₂), 4.26-4.27 (m, 1H, OCH₂), 4.12-3.91 (m, 5H, OH, NCH_{2c} and NCH_{2d}), 4.73 (s, 3H, OCH₃), 3.55-3.54 (m, 1H, CHCH₂), 2.09-2.07 (m, 1H, CHCH₂), 1.96-1.94 (m, 1H, CHCH₂), 1.41 (s, 9H, OCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 173.5 (CO), 171.0 (CO), 170.6 (CO), 157.4 (CO), 157.3 (CO), 136.9 (C), 129.2 (2 CH), 128.9 (CH), 128.8 (2 CH), 81.7 (C), 67.8 (CH₂), 63.8 (CH), 63.3 (CH₂), 53.0 (OCH₃), 43.7 (CH₂), 41.4 (CH₂), 30.3 (CH₂), 28.9 (3 CH₃).

ESI calculated for C₂₂H₃₂N₄NaO₉ [M + Na]⁺ m/z = 519.2061, found 519.2076.

R_f (EtOAc) = 0.46.

2-{2-[N-(2-Benzyloxycarbonylamino-propionyl)-N'-tert-butoxycarbonyl-hydrazino]-4-hydroxy-butyrylamino}-3-phenyl-propionic acid methyl ester (15b'**)**



$C_{30}H_{40}N_4O_9$

$M=600.28 \text{ g.mol}^{-1}$

clear oil ; 60%

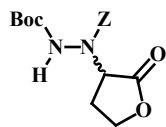
To a stirred solution of **13b** (300 mg, 0.71 mmol, 1 eq.) in THF (10 mL) was added at room temperature HCl.H-Phe-OMe (229 mg, 1.06 mmol, 1.5 eq.) and sodium 2-ethylhexanoate (296 mg, 1.78 mmol, 2.5 eq.). The reaction was heated at reflux for 76h. The mixture was filtrated and concentrated under *vacuum*. The residue was dissolved in EtOAc (50 mL) and the solution was washed successively with HCl 1M (3x20 mL), saturated aqueous NaHCO_3 (2x20 mL) and brine (2x20 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (40/60) as eluant to give compound **15b'** (257 mg, 60%) as a clear oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.60 (s, 1H, NNH), 7.35-7.31 (m, 5H, H_{arom}), 7.18-7.15 (m, 5H, H_{arom}), 6.37 (br s, 1H, NH_e), 5.48 (d, 1H, $J=6.0 \text{ Hz}$, NH_a), 5.16-5.05 (m, 2H, OCH_2), 4.89-4.79 (m, 1H, CH_f), 4.38-4.28 (m, 3H, CHCH_3 , OCH_{2b} and OH), 4.13-4.09 (m, 1H, OCH_{2b}), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.49 (t, 1H, $J=7.5 \text{ Hz}$, CH_d), 3.33-3.18 (m, 1H, CH_{2g}), 3.09-3.00 (m, 1H, CH_{2g}), 1.78-1.73 (m, 2H, CH_{2c}), 1.42 (m, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ and CH_3CH).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 173.3 (CO), 172.8 (CO), 172.4 (CO), 157.1 (CO), 156.5 (CO), 136.9 (C), 136.8 (C), 129.8 (CH), 129.3 (CH), 129.2 (2 CH), 128.8 (2 CH), 127.9 (2 CH), 127.9 (CH), 127.7 (CH), 81.6 (C), 67.6 (OCH_2), 64.2 (CH), 63.6 (CH), 62.9 (OCH_2), 53.5 (CH), 54.0 (OCH_3), 38.5 (CH_2), 30.7 (CH_2), 28.9 (3 CH_3), 18.8 (CH_3).

ESI calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{NaO}_9$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z = 623.2687$, found 623.2659.

Rf (PE/EtOAc: 40/60) = 0.26.

α -[N^{α} -(Benzyloxycarbonyl)- N^{β} -(*tert*-butyloxycarbonyl)hydrazino]- γ -butyrolactone (16)C₁₇H₂₂N₂O₆M=350.14 g.mol⁻¹

white solid; 100%

To a solution of **40** (1.3 g, 2.88 mmol, 1 eq.) in CH₃CN (50 mL) was added Mg(ClO₄)₂ (145 mg, 0.67 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 **16** (1.0 g, 100%) as a white solid.

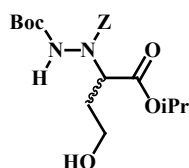
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.32 (br s, 5H, *H*_{arom}), 6.86 (br s, 1H, NH), 5.23-5.09 (m, 3H, OCH₂ and CHCH₂), 4.39 (br d, 1H, J=7.5 Hz, OCH₂), 4.23 (br d, 1H, J=6.9 Hz, OCH₂), 2.50 (br d, 2H, J=8.7 Hz, CHCH₂), 1.36-1.33 (m, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 174.0 (CO), 156.0 (2 CO), 135.8 (C), 128.9 (2 CH), 128.7 (CH), 128.4 (2 CH), 82.4 (C), 69.1 (OCH₂), 66.4 (OCH₂), 58.4 (CH), 29.1 (3 CH₃), 26.2 (CH₂).

ESI calculated for C₁₇H₂₂N₂NaO₆ [M + Na]⁺ *m/z* = 373.1370, found 373.1370.

R_f (PE/EtOAc : 70/30) = 0.36.

isoPropyl-2-[N^α-(Benzyloxycarbonyl)-N^β-(tert-butyloxycarbonyl)-hydrazino]-4-hydroxy-butanoate (17)



C₂₀H₃₀N₂O₇
 M=410 g.mol⁻¹
 oil; 100%

To a solution of **16** (821 mg, 2.34 mmol, 1 eq.) in THF/H₂O (30 mL, 1:1) was added a solution of NaOH 1M (2.34 mL, 2.34 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. THF (10 mL), tetrabutylammonium fluoride 1M in THF (2.84 mL, 2.82 mmol, 1.2 eq.) and *isopropyl* iodide (0.29 mL, 2.82 mmol, 1.2 eq.) were added. The solution was heated at 30°C for 76 h. The reaction mixture was cooled and concentrated. The residue was partitioned between EtOAc (100 mL) and Na₂SO₄ 1N (50 mL). The organic layer was washed with portions of 1N aqueous Na₂SO₄ (2×50 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (3×50 mL) and brine (3×50 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give ester **17** (959 mg, 100%) as an oil.

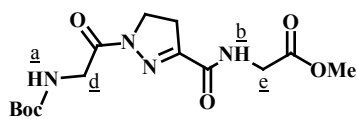
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.33 (br s, 5H, *H*_{arom}), 6.71 (s, 1H, NH), 5.29-5.12 (m, 3H, OCH₂ and CHCH₂), 5.02 (br s, 1H, CH(CH₃)₂), 4.26 (br s, 1H, OH), 3.94 (br s, 1H, OCH₂), 3.77 (br t, 1H, J=6.0 Hz, OCH₂), 2.19 (br d, 1H, J=10.2 Hz, CHCH₂), 2.01 (br s, 1H, CHCH₂), 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.25 (d, 6H, J=6.6 Hz, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 170.8 (CO), 156.4 (CO), 155.4 (CO), 135.7 (C), 128.3 (CH), 128.0 (CH), 127.6 (CH), 127.2 (CH), 126.7 (CH), 82.7 (C), 69.3 (CH), 68.3 (OCH₂), 60.6 (CH), 59.0 (OCH₂), 31.2 (CH₂), 27.8 (3 CH₃), 21.5 (2 CH₃).

ESI calculated for C₂₀H₃₁N₂O₇ [M + H]⁺ *m/z* = 411.2126, found 411.2098.

Rf (PE/EtOAc : 70/30) = 0.40.

**{[1-(2-tert-Butoxycarbonylamino-acetyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazole-3-carbonyl]-amino}-
acetic acid methyl ester (**18**)**


 $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6$
 $M=342.15 \text{ g.mol}^{-1}$

clear oil ; 100%

The pseudotriptide **6c** (52 mg, 0.15 mmol), after several days at room temperature, transform in pyrazoline **18** (51 mg, 100%) as an oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.17 (br s, 1H, NH_b), 5.30 (br s, 1H, NH_a), 4.29 (d, 2H, $J=4.5 \text{ Hz}$, CH_{2d}), 4.13 (d, 2H, $J=5.7 \text{ Hz}$, CH_{2e}), 4.03 (t, 2H, $J=10.5 \text{ Hz}$, NCH_2), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.14 (t, 2H, $J=10.5 \text{ Hz}$, CNCH_2), 1.45 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$).

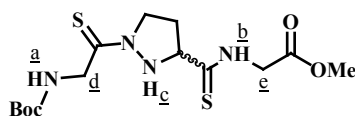
^{13}C NMR (CDCl_3) δ 170.3 (CO), 168.6 (CO), 161.4 (CO), 156.6 (CO), 153.0 (CN), 80.6 (C), 53.2 (OCH_3), 46.0 (NCH_2), 43.5 (CH_2), 41.6 (CH_2), 31.3 (CNCH_2), 29.0 (3 CH_3).

IR ($\text{DMSO}-d_6$, 10 mM) $\gamma(\text{cm}^{-1})$ 1753, 1738, 1710, 1683, 1665 (C=O).

ESI calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{NaO}_6$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $m/z = 365.1432$, found 365.1406.

Rf (PE/EtOAc : 20/80)=0.28.

{[1-(2-tert-Butoxycarbonylamino-thioacetyl)-pyrazolidine-3-carbothioyl]-amino}-acetic acid methyl ester (19**)**



$C_{14}H_{24}N_4O_4S_2$

$M=376.12 \text{ g.mol}^{-1}$

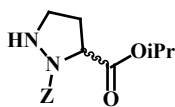
brown oil ; 84%

To a solution of **5c** (63 mg, 0.13 mmol, 1 eq.) in dry toluene (5 mL) was added K_3PO_4 (165 mg, 0.78 mmol, 6 eq.) and Lawesson's reagent (127 mg, 0.31 mmol, 2.42 eq.). The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 105°C (2×60 min). The solution was partitioned between $CHCl_3$ (50 mL) and HCl 0.5M (20 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 0.5M (20 mL), saturated aqueous $NaHCO_3$ (2×20 mL), dried with $MgSO_4$, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of hexane/EtOAc (75/25) as eluant to give **19** (41 mg, 84%) as an oil.

1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.36 (d, 1H, NH_c), 5.59 (br s, 1H, NH_a), 4.72 (dd, 1H, $J=8.4 \text{ Hz}$ $J=15 \text{ Hz}$, $CHCH_2$), 4.68 (br s, 1H, NH_c), 4.65-4.62 (m, 1H, CH_{2e}), 4.60-4.53 (m, 2H, CH_{2d} and NCH_2), 4.49-4.47 (m, 1H, CH_{2d}), 4.30 (dd, 1H, $J=3.0 \text{ Hz}$ $J=18.3 \text{ Hz}$, CH_{2d}), 3.93 (m, 1H, NCH_2), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 2.93-2.80 (m, 1H, $CHCH_2$), 2.39-2.26 (m, 1H, $CHCH_2$), 1.45 (s, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 200.9 (CS), 200.5 (CS), 166.3 (CO), 160.1 (CO), 80.5 (C), 70.8 (CH), 56.3 (OCH_3), 52.0 (NCH_2), 48.8 (CH_2), 43.5 (CH_2), 30.4 (CH_2), 29.1 (3 CH_3).

Rf (hexane/EtOAc : 75/25) = 0.25.

Z- δ azaPro(Boc-Gly)-OiPr (21)C₁₅H₂₀N₂O₄M=292.14 g.mol⁻¹

Oil ; 100%

To a solution of **1** (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 crude was stirred with saturated aqueous Na₂CO₃ (15 mL) for 1h. The product was extracted with DCM (2x25 mL) and the organic layers were successively washed with water (25 mL) and brine (25 mL). The organic layers were dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give **21** (117 mg, 100%) as an oil.

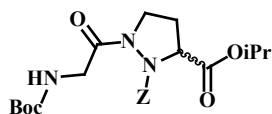
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.85 (br s, 1H, NH), 7.39-7.05 (m, 5H, H_{arom}), 5.20-4.98 (m, 2H, OCH₂), 4.98-4.78 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 4.55-4.32 (m, 1H, CHCH₂), 3.50-3.15 (m, 2H, NCH₂), 2.76-2.40 (m, 1H, CHCH₂), 2.25-2.00 (m, 1H, CHCH₂), 1.30-0.95 (m, 6H, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 170.7 (CO), 154.4 (CO), 135.7 (C), 129.1 (2 CH), 129.1 (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+H]⁺ m/z = 293.1496, found 293.1643.

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

Z- δ azaPro(Boc-Gly)-OiPr (22)



$C_{22}H_{31}N_3O_7$

$M=449.22 \text{ g.mol}^{-1}$

Pale yellow oil ; 65%

Boc-Gly-OH (303 mg, 1.73 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in DMF (15 mL) and treated with triethylamine (0.56 mL, 4.32 mmol, 3 eq.) and HATU (658 mg, 1.73 mmol, 1.2 eq.) for 1 minute, and then a solution of **21** (585 mg, 1.44 mmol, 1 eq.) in DMF (15 mL) was added. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 75°C (7×5 min). The solution was partitioned between EtOAc (50 mL) and HCl 1M (20 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 1M (2×20 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2×20 mL) and brine (2×20 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (70/30) as eluant to give pseudotripeptides **22** (1.163 g, 95%) as pale yellow oil.

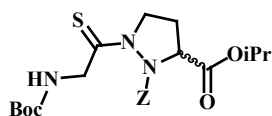
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.35 (br s, 5H, H_{arom}), 5.21 (br s, 3H, NH and OCH₂), 5.05-4.97 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 4.88 (dd, 1H, J=3.9 Hz, J=8.8 Hz, CHCH₂), 4.47-4.41 (m, 1H, CH₂NH), 4.24 (br d, 1H, J=13.8 Hz, CH₂N), 4.18-4.05 (m, 1H, CH₂NH), 3.15 (dd, 1H, J=8.4 Hz, J=17.7 Hz, CH₂N), 2.41-2.35 (m, 1H, CH₂CH), 2.27-2.16 (m, 1H, CH₂CH), 1.44 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.23-1.20 (m, 6H, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 173.5 (CO), 170.2 (CO), 157.6 (CO), 156.2 (CO), 135.6 (C), 129.4 (3 CH), 128.9 (2 CH), 80.0 (C), 70.6 (CH), 70.0 (OCH₂), 61.2 (CH), 44.5 (NCH₂), 43.0 (NHCH₂), 30.5 (CH₂), 29.0 (3 CH₃), 22.2 (2 CH₃).

IR (DMSO-*d*₆, 10 mM) ν (cm⁻¹) 1749, 1737, 1712, 1688 (C=O).

R_f (PE/EtOAc : 70/30) = 0.27.

2-(2-tert-Butoxycarbonylamino-thioacetyl)-pyrazolidine-1,5-dicarboxylic acid 1-benzyl ester 5-isopropyl ester (23)



C₂₂H₃₁N₃O₆S

M=465.19 g.mol⁻¹

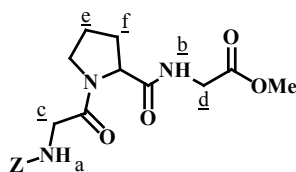
Yellow oil ; 64%

To a solution of **22** (200 mg, 0.44 mmol, 1 eq.) in dry toluene (20 mL) was added K₃PO₄ (570 mg, 2.64 mmol, 6 eq.) and Lawesson's reagent (430 mg, 1.06 mmol, 2.42 eq.). The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 105°C (2×60 min). The solution was partitioned between DCM (50 mL) and HCl 0.5M (20 mL). The organic layer was washed with portions of HCl 0.5M (20 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (2×20 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of PE/EtOAc (70/30) as eluant to give **23** (134 mg, 64%) as a yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.35 (m, 5H, *H*_{arom}), 5.76 (br s, 1H, NH), 5.24-5.18 (m, 2H, OCH₂), 5.03-4.98 (m, 2H, CHCH₂ and CH(CH₃)₂), 4.59-4.49 (m, 3H, NHCH₂ and NCH₂), 4.21-4.13 (m, 1H, NCH₂), 2.42-2.36 (m, 2H, CHCH₂), 1.45 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.23 (d, 6H, J=6.3 Hz, CH(CH₃)₂).

R_f (PE/EtOAc : 70/30) = 0.54.

Z-Gly-Pro-Gly-OMe (27)



$C_{18}H_{23}N_3O_6$

$M=377.16 \text{ g.mol}^{-1}$

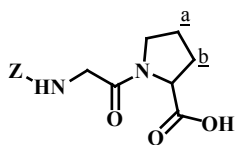
Clear oil; 34%

To a solution of **28** (844 mg, 2.76 mmol, 1 eq.) in DCM (50 mL) were added: triethylamine (3.1 mL, 8.28 mmol, 3 eq.), HCl.H-Gly-OMe (414 mg, 3.31 mmol, 1.2 eq.) and HOBt (447 mg, 3.31 mmol, 1.2 eq.) and at 0°C EDC (513 mg, 3.31 mmol, 1.2 eq.) was added. The mixture was stirred for 24 h at room temperature. The solvent was removed under *vacuum*. The residue was dissolved in EtOAc (80 mL) and the solution was washed successively with HCl 1M (3×30 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (3×30 mL) and brine (1×30 mL). The organic layer was dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum*. The residue was chromatographed on silica gel with a mixture of EtOAc/EtOH (20/1) as eluant to give tripeptide **27** (356 mg, 34%) as a clear oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.31-7.26 (m, 6H, H_{arom} and NH_b), 5.85 (br s, 1H, NH_a), 5.08-5.05 (m, 2H, OCH_2), 4.57 (br d, 1H, $J=7.5 \text{ Hz}$, $CHCH_2$), 3.96-3.93 (m, 4H, CH_{2c} and CH_{2d}), 3.68 (s, 3H, OCH_3), 3.56-3.51 (m, 1H, NCH_2), 3.41-3.33 (m, 1H, NCH_2), 2.30-1.86 (m, 4H, CH_{2e} and CH_{2f}).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.6 (CO), 170.7 (CO), 169.1 (CO), 137.0 (C), 129.2 (2 CH), 128.8 (CH), 128.7 (2 CH), 67.7 (OCH_2), 60.6 (CH), 53.0 (OCH_3), 47.0 (NCH_2), 44.1 ($NHCH_2$), 41.9 ($NHCH_2$), 30.4 (CH_2), 28.0 (CH_2), 25.5 (CH_2).

R_f (EtOAc/EtOH : 20/1) = 0.29.

Z-Gly-Pro-OH (28)C₁₅H₁₈N₂O₅M=306.12 g.mol⁻¹

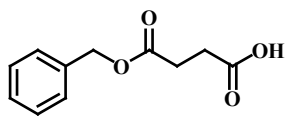
White solid; 80%

To a stirred solution of sodium bicarbonate 10% (10 mL) was added H-Pro-OH (500 mg, 4.34 mmol, 1 eq.). Then a solution of Z-Gly-OSu (1.33 g, 4.34 mmol, 1eq.) in 1,4-dioxane (10 mL) was added. After letting the reaction proceed at room temperature for 3h, most of the solvent was removed under pressure and the residue was acidified to pH 2 with HCl 7M. The solution was extracted with DCM (3x30 mL). The combined organic layers were washed with brine (3x30 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give dipeptide **28** (1.065 g, 80%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃) δ 9.19 (s, 1H, OH), 7.30 (br s, 5H, *H*_{arom}), 6.19 (br s, 0.5H, NH), 5.85 (t, 0.5H, J=4.8 Hz, NH), 5.08 (br s, 2H, OCH₂), 4.47-4.45 (m, 1H, CHCH₂), 4.02-3.86 (m, 2H, NHCH₂), 3.48-3.47 (m, 1H, NCH₂), 3.38-3.36 (m, 1H, NCH₂), 2.18-1.78 (m, 4H, CH₂a and CH₂b).

Rf (EtOAc/EtOH : 20/1) =0 (corresponding to carboxylate).

Succinic Acid Monobenzyl Ester (**32**)



$C_{11}H_{12}O_4$

$M=208.07 \text{ g.mol}^{-1}$

white solid ; 60%

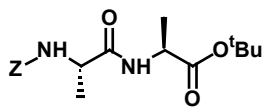
A mixture of succinic anhydride (1.00 g, 10.0 mmol, 1 eq.), benzyl alcohol (0.86 mL, 8.60 mmol, 0.86 eq.) and DMAP (1.02 g, 10.0 mmol, 1 eq.) in DCM (30 mL) was stirred at room temperature for 18h. After this time, a solution of 5% Na_2CO_3 (30 mL) was poured into the reaction mixture and the layers separated. The aqueous layer was acidified with HCl 1 M and extracted with EtOAc (3x100 mL). The EtOAc layer was washed with brine (3x150 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under *vacuum* to give succinic acid monobenzylester **32** (1.247 g, 60%) as a white solid.

1H NMR ($CDCl_3$) δ 10.9 (s, 1H, OH), 7.42-7.38 (m, 5H, H_{arom}), 5.18 (s, 2H, OCH_2), 2.77-2.65 (m, 4H, OCH_2).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 178.9 (CO), 172.6 (CO), 138.9 (C), 129.2 (2 CH), 128.9 (CH), 128.8 (2 CH), 67.3 (CH_2), 29.6 (CH_2).

ESI calculated for $C_{11}H_{12}NaO_4$ $[M+Na]^+$ $m/z=231.0628$ found 231.0630.

Rf (DCM/MeOH : 10/1) = 0.83.

Z-Ala-Ala-O^tBu (33)C₁₈H₂₆N₂O₅M=350.18 g.mol⁻¹

white solid ; 78%

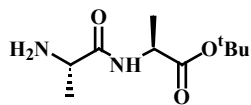
To a solution of Z-Ala-OH (1.16 g, 5 mmol, 1eq.) and HCl.H-Ala-O^tBu (0.91 g, 5 mmol, 1eq.) in DCM (30 mL), BOP (2.21 g, 5 mmol, 1eq.) and DiEA (2.61 mL, 15 mmol, 3 eq.) were added. After stirring at room temperature for 3h, the reaction was evaporated to dryness in vacuo and the residue was dissolved in EtOAc (60 mL). The solution was washed with Na₂CO₃ 1 N (3x30 mL), KHSO₄ 1 N (3x30 mL), H₂O (30 mL) and brine (30 mL). The organic layer was dried with Na₂SO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give **33** (1.36 g, 78%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.36 (s, 5H, *H*_{arom}), 6.47 (d, 1H, J=4.8 Hz, *NH*), 5.34 (br s, 1H, *NH*), 5.13 (s, 2H, OCH₂), 4.44 (qt, 1H, J=7.2 Hz J=14.4 Hz, CHCH₃), 4.25 (t, 1H, J=6.6 Hz, CHCH₃), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.41 (d, 3H, J=7.2 Hz, CHCH₃), 1.37 (d, 3H, J=7.2 Hz, CHCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.5 (CO), 172.4 (CO), 156.5 (CO), 136.9 (C), 129.1 (2 CH), 128.7 (CH), 128.6 (2 CH), 82.6 (C), 67.5 (OCH₂), 51.1 (CH), 49.3 (CH), 28.6 (3 CH₃), 19.5 (CH₃), 19.0 (CH₃).

R_f (DCM/MeOH : 10/1) = 0.56.

H-Ala-Ala-O^tBu (34)



C₁₀H₂₀N₂O₃

M=216.14 g.mol⁻¹

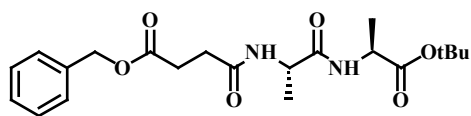
colorless syrup ; 100%

To a cooled solution (ice bath) of **33** (1.367 g, 3.91 mmol, 1eq.) in dry methanol (200 mL), Pd on charcoal (10%) 20% w/w was added and the suspension was stirred under H₂ at room temperature for 2h. the reaction was filtered through a celite pad and the solvent is removed under *vacuum* to give **34** (845 mg, 100%) as a colorless syrup.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.69 (br s , 1H, NH), 4.44 (qt, 1H, J=7.5 Hz J=14.7 Hz, CHCH₃), 3.50 (q, 1H, J=6.9 Hz J=14.1 Hz, CHCH₃), 1.69 (br s, 2H, NH₂), 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.37 (d, 3H, J=7.2 Hz, CHCH₃) 1.35 (d, 3H, J=4.8 Hz, CHCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 175.9 (CO), 173.0 (CO), 82.4 (C), 51.4 (CH), 48.8 (CH), 28.6 (3 CH₃), 22.3 (CH₃), 19.3 (CH₃).

R_f (DCM/MeOH : 10/1) = 0.21.

Bzl-Suc-Ala-Ala-O^tBu (35)C₂₁H₃₀N₂O₆M=406.21 g.mol⁻¹

gum ; 100%

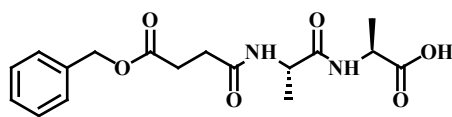
To a solution of H-Ala-Ala-O^tBu **34** (403 mg, 1.94 mmol, 1eq.) and monobenzyl succinate **32** (260 mg, 1.94mmol, 1eq.) in DCM (7 mL), BOP (857 mg, 1.94 mmol, 1eq.) and DiPEA (1.01 mL, 5.82 mmol, 3 eq.) were added. After stirring at room temperature overnight, the reaction was evaporated to dryness in vacuo and the residue was dissolved in EtOAc (60 mL). The solution was washed with Na₂CO₃ 1 N (3x30 mL), KHSO₄ 1 N (3x30 mL), H₂O (1x30 mL) and brine (1x30 mL). The organic layer was dried with Na₂SO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give **35** (74 mg, 100%) as a gum.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.36 (br s, 5H, *H*_{arom}), 6.50 (d, 1H, J=7.2 Hz, *NH*), 6.22 (d, 1H, J=7.2 Hz, *NH*), 5.14 (s, 2H, CH₂O), 4.45 (qt, 2H, J=7.5 Hz J=14.7 Hz, CHCH₃), 2.75 (t, 2H, J=6.6 Hz, CH₂CO), 2.53 (t, 2H, J=6.6 Hz, CH₂CO), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.39 (d, 6H, J=7.2 Hz, CHCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 173.3 (CO), 172.6 (CO), 172.4 (CO), 171.9 (CO), 136.5 (C), 129.2 (2 CH), 128.9 (CH), 128.8 (2 CH), 82.5 (C), 67.2 (OCH₂), 49.4 (2 CH), 31.4 (CH₂), 29.8 (CH₂), 28.6 (3 CH₃), 19.4 (CH₃), 18.8 (CH₃).

R_f (PE/EtOAc : 50/50) = 0.24.

Bzl-Suc-Ala-Ala-OH (36)



C₁₇H₂₂N₂O₆

M=350.14 g.mol⁻¹

white solid ; 100%

With iodine in CH₃CN/H₂O :

To a solution of **35** (370 mg, 0.71mmol, 1 eq.) in CH₃CN (6 mL) was added iodine (104 mg, 0.40 mmol, 0.6 eq.) and water (120 µL). The reaction was heated at 75°C for 5 h. A solution of Na₂S₂O₅ 1M (20 mL) was added and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2x30 mL). The organic layers were combined and dried over MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give **36** (271 mg, 100%) as a white solid.

With TFA/DCM

To a solution of **35** (100 mg, 0.25 mmol) in DCM (0.37 mL) was added, at 0°C, TFA (0.25 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 **36** (87 mg, 100%) as a white solid.

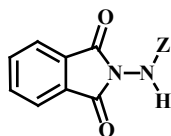
With AcOH/*i*PrOH/H₂O

35 (100 mg, 0.25 mmol) was dissolved in a solution of AcOH/*i*PrOH/H₂O (4/4/1) (18 mL). The mixture was heated at 98°C for 18h and concentrated under *vacuum*. The resultant product was diluted in DCM and concentrated till complete remove trace of solvents to give **36** (87 mg, 100%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃) δ 9.57 (s, 1H, OH), 8.79 (br s, 1H, NH), 7.35-7.32 (m, 5H, H_{arom}), 7.08 (d, 1H, J=7.5 Hz, NH), 5.14-5.10 (m, 2H, OCH₂), 4.61-4.49 (m, 1H, CHCH₃), 4.21-4.10 (m, 1H, CHCH₃), 2.73-2.64 (m, 2H, CH₂CO), 2.58-2.51 (m, 2H, CH₂CO), 1.39-1.28 (m, 6H, CHCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 175.5 (CO), 173.4 (CO), 173.2 (CO), 172.4 (CO), 136.3 (C), 129.2 (CH), 129.1 (CH), 128.9 (CH), 128.8 (CH), 128.2 (CH), 67.2 (OCH₂), 49.5 (CH), 49.0 (CH), 31.3 (CH₂), 30.1 (CH), 18.9 (CH₃), 18.4 (CH₃).

R_f (PE/EtOAc : 20/80) = 0.16.

***N*-Benzyloxycarbonylaminophthalimide (38)**C₁₆H₁₂N₂O₄M=296.08 g.mol⁻¹

white solid ; 87%

To a suspension of phthalic anhydride (44.43 g, 0.30 mol, 1 eq.) 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 CHCl₃/CCl₄ to give *N*-benzyloxycarbonylaminophthalimide **38** (77.625 g, 87%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.90-7.85 (m, 2H, *H*_{PhI}), 7.79-7.74 (m, 2H, *H*_{PhI}), 7.33 (br s, 5H, *H*_{arom}), 7.23 (s, 1H, NH), 5.19 (s, 2H, OCH₂).

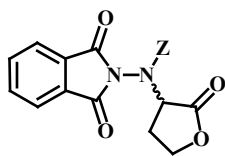
¹³C NMR (CDCl₃) δ 165.8 (CO), 155.2 (2 CO), 135.7 (C), 135.4 (2 CH), 130.5 (2 C), 129.2 (5 CH), 124.7 (2 CH), 69.2 (OCH₂).

HRMS calculated for C₁₆H₁₂N₂O₄ [M]⁺ *m/z* = 296.0797, found 296.0790.

mp = 134°C

R_f (PE/EtOAc: 60/40) = 0.63.

α -(N-Benzoyloxycarbonylaminophthalimide)- γ -butyrolactone (39**)**



$C_{20}H_{16}N_2O_6$

$M=380.09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

white solid; 88%

Under Nitrogen and at 0°C, to a stirred solution of **38** (5.15 g, 17.4 mmol, 1 eq.), PPh_3 (5.48 g, 20.9 mmol, 1.2 eq.), and 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 **39** (5.84 g, 88%) as a white solid.

1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.87-7.84 (m, 2H, H_{PhI}), 7.76-7.71 (m, 2H, H_{PhI}), 7.32-7.07 (m, 5H, H_{arom}), 5.08 (br s, 2H, OCH_2), 4.82 (t, 1H, $J=9.1$ Hz, $CHCH_2$), 4.38 (br s, 1H, OCH_2), 4.19 (br s, 1H, OCH_2), 2.67 (br s, 2H, $CHCH_2$).

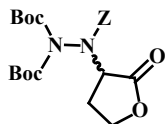
^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 171.8 (4 CO), 135.7 (CH), 135.6 (2 CH), 130.5 (C), 129.1 (2 C), 128.9 (2 CH), 128.1 (2 CH), 125.0 (CH), 124.9 (CH), 69.7 (OCH_2), 66.2 (OCH_2), 59.1 (CH), 28.4 (CH_2).

ESI calculated for $C_{20}H_{16}N_2NaO_6$ $[M + Na]^+$ $m/z = 403.0901$, found 403.0886.

mp = 136°C

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

α -[Na-(Benzyloxycarbonyl)- N^{β},N^{β} -bis(*tert*-butyloxycarbonyl)-hydrazino]- γ -butyrolactone (40**)**


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

yellow oil; 98%

To a solution of **39** (1.9 g, 5.00 mmol, 1eq.) in THF (100 mL) was added a solution of MeNH₂ 2M in MeOH (3.75 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 (3.27 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 **40** (2.21 g, 98%) as a yellow oil.

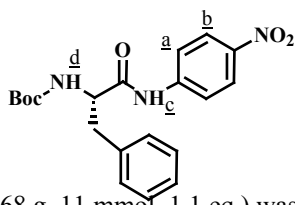
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.32 (br s, 5H, H_{arom}), 5.26-5.14 (m, 2H, OCH₂), 4.50-4.37 (m, 2H, OCH₂), 4.26-4.13 (m, 1H, CHCH₂), 2.77-2.67 (m, 1H, CHCH₂), 2.59-2.48 (m, 1H, CHCH₂), 1.48-1.42 (m, 18H, 2 C(CH₃)₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.6 (CO), 154.3 (CO), 150.8 (2 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), 28.4 (6 CH₃), 27.2 (CH₂).

ESI calculated for C₂₂H₃₀N₂NaO₈ [M + Na]⁺ m/z = 473.1894, found 473.1891.

R_f (PE/EtOAc : 70/30) = 0.37.

Boc-Phe-*p*-NA (**41**)



$C_{20}H_{23}N_3O_5$

$M=385.16 \text{ g.mol}^{-1}$

pale yellow powder ; 84%

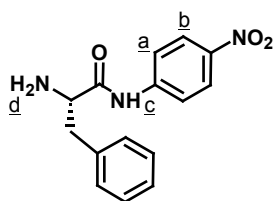
$POCl_3$ (1.68 g, 11 mmol, 1.1 eq.) was added dropwise to a vigorously stirred mixture of Boc-*L*-Phe-OH (2.65 g, 10 mmol, 1eq.) and 4-nitro-aniline (1.38 g, 10 mmol, 1eq.) in dry pyridine (30 mL) at -10°C . After 15 min, the reaction was quenched by addition of ice-water (100 mL) and the mixture is extracted with EtOAc (3x30 mL). The combined extracts were washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ (2x30 mL) and brine (2x30 mL). The combined organic layers were 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 **41** (3.25 g, 84%) as a pale yellow powder.

$^1\text{H NMR}$ ($CDCl_3$) δ 8.35 (s, 1H, NH_c), 8.19 (d, 2H, $J=9 \text{ Hz}$, H_b), 7.60 (d, 2H, $J=9 \text{ Hz}$, H_a), 7.34-7.27 (m, 5H, H_{arom}), 5.02 (br s, 1H, NH_d), 4.47 (q, 1H, $J=7.2 \text{ Hz}$ $J=14.5 \text{ Hz}$, $CHCH_2$), 3.18 (d, 2H, $J=6.6 \text{ Hz}$, $CHCH_2$), 1.44 (m, 9H, $C(CH_3)_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ ($CDCl_3$) δ 171.2 (2 CO), 144.2 (C), 144.0 (C), 136.7 (C), 129.8 (2 CH), 129.5 (2 CH), 127.9 (CH), 125.5 (2 CH), 119.8 (2 CH), 81.9 (C), 57.5 (CH), 38.6 (CH_2), 28.9 (3 CH_3).

mp = 150°C

Rf (PE/EtOAc : 70/30) = 0.48.

H-Phe-*p*-NA (42)C₁₅H₁₅N₃O₃M=285.11 g.mol⁻¹

pale yellow powder ; 94%

Boc-Phe-NH-*p*-NA (385 mg, 1 mmol) was stirred in 1:1 trifluoroacetic acid TFA/DCM (10 mL) under nitrogen at room temperature for 4h. The volatiles were removed in a rotary evaporator. The crude was stirred with saturated aqueous NaHCO₃ (15 mL) (Caution CO₂ gas evolution!) for 1h. The product was extracted with DCM (2x25 mL) and the combined organic layers sequentially were washed with water (25 mL) and brine (25 mL). The organic layers were combined, dried with Na₂SO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give amine **41** (368 mg, 94%) as a pale yellow powder.

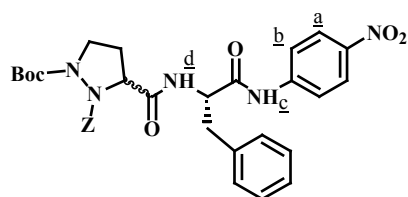
¹H NMR (CDCl₃) δ 9.91 (s, 1H, NH_c), 8.21 (d, 2H, J=5.7 Hz, H_a), 7.77 (d, 2H, J=6 Hz, H_b), 7.32 (br s, 5H, H_{arom}), 3.78 (br s, 1H, CHCH₂), 3.37 (d, 1H, J=11.7 Hz, CHCH₂), 2.85 (d, 1H, J=9 Hz, CH₂CH), 1.63 (d, 2H, NH_{2d}).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 173.7 (CO), 144.1 (C), 137.7 (2 C), 129.8 (2 CH), 129.5 (CH), 127.7 (2 CH), 125.6 (2 CH), 119.4 (2 CH), 57.3 (CH), 41.0 (CH₂).

mp = 140°C

Rf (PE/EtOAc : 70/30) = 0.15.

Z- δ azaPro(Boc)-Phe-*p*-NA (43)



$C_{32}H_{35}N_5O_8$

$M=617.25 \text{ g.mol}^{-1}$

Brown oil ; 69%

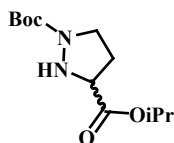
POCl_3 (0.15 mL, 1.65 mmol, 1.1 eq.) was added dropwise to a vigorously stirred mixture of **2** (526 mg, 1.5 mmol, 1eq.) and H-Phe-*p*-NA **42** (427 mg, 1.5 mmol, 1eq.) in dry pyridine (30 mL) at -10°C . After 15 min, the reaction was quenched by addition of ice-water (100 mL) and the mixture is extracted with EtOAc (3x30 mL). The combined extracts were washed with saturated aqueous NaHCO_3 (2x30 mL) and brine (2x30 mL). The combined organic layers were dried with MgSO_4 , filtered and concentrated under *vacuum* to give **43** (751 mg, 69%) as a brown oil.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.76 (s, 1H, NH_c), 8.19-8.16 (m, 2H, H_a), 7.87-7.79 (m, 2H, H_b), 7.35-7.25 (m, 10H, H_{arom}), 6.90 (br s, 1H, NH_d), 5.31-5.14 (m, 2H, OCH_2), 4.91-4.88 (m, 1H, CHCH_2), 4.60-4.53 (m, 1H, CHCH_2), 4.07-4.01 (m, 1H, NCH_2), 3.61-3.55 (m, 1H, CHCH_2), 3.30-3.24 (m, 1H, NCH_2), 2.98-2.86 (m, 1H, CHCH_2), 2.55-2.52 (m, 2H, CHCH_2), 1.42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 170.2 (CO), 169.1 (CO), 157.0 (2 CO), 136.4 (4 C), 128.9 (2 CH), 128.6 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (2 CH), 127.1 (2 CH), 126.6 (2 CH), 124.4 (2 CH), 119.1 (2 CH), 83.7 (C), 68.4 (OCH_2), 61.4 (CH), 54.4 (CH), 49.3 (NCH_2), 36.7 (CH_2), 31.2 (CH_2), 29.4 (3 CH_3).

ESI calculated for $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{NaO}_8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z=640.2378$ found 640.2374.

Rf (PE/EtOAc : 20/80) = 0.54.

H- δ azaPro(Boc)-OiPr (64)C₁₂H₂₂N₂O₄M=258.15 g.mol⁻¹

oil; 100%

A 10 mL CEM microwave process tube was charged with **1** (100 mg, 0.24 mmol), palladium on charcoal (10 mg, 10 %), and methanol (5 mL). 1,4-cyclohexadiene (0.26 mL, 1.9 mmol, 6 eq.) was added and the tube was capped. The mixture was stirred and heated under microwave conditions at 100°C (3x5 min). The reaction mixture was filtered through a celite pad and concentrated under *vacuum* to give **64** (62 mg, 100%) as an oil.

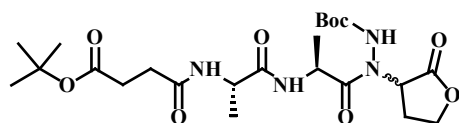
¹H NMR (CDCl₃) δ 5.03 (qt, 1H, J=6.0 Hz J=12.3 Hz, CH(CH₃)₂), 4.49 (d, 1H, J=6.6 Hz, NH), 3.79 (br d, 1H, J=6.6 Hz, NCH), 3.64-3.58 (m, 1H, NCH₂), 3.45-3.36 (m, 1H, NCH₂), 2.41-2.30 (m, 1H, CHCH₂), 2.10-1.99 (m, 1H, CHCH₂), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.23 (d, 6H, J=6.3 Hz, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.7 (2 CO) 81.4 (C), 70.0 (CH), 60.4 (NCH), 46.3 (NCH₂), 32.7 (CH₂), 28.7 (3 CH₃), 22.3 (2 CH₃).

ESI calculated for C₁₂H₂₂N₂NaO₄ [M + Na]⁺ m/z = 281.1472, found 281.1491.

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

N-(1-{2-[N'-tert-Butoxycarbonyl-N-(2-oxo-tetrahydro-furan-3-yl)-hydrazino]-1-methyl-2-oxo-ethylcarbamoyl}-ethyl)-succinamic acid tert-butyl ester (82**)**



$C_{23}H_{38}N_4O_9$

$M=514.26 \text{ g.mol}^{-1}$

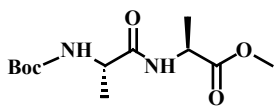
Oil ; 23%

To a stirred solution of **88** (134 mg, 0.52 mmol, 2 eq.) in dry DCM (5 mL) was added 1-chloro-*N,N*,2-trimethyl-1-propen-1-amine (0.07 mL, 0.52 mmol, 2 eq.) at 0°C. The mixture was stirred for 20 min at this temperature, and then cooled to -20°C. **12** (54 mg, 0.26 mmol, 1 eq.) in DCM (5 mL) was added, followed by 2,4,6-collidine (0.05 mL, 0.05 mmol, 4 eq.). The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred overnight, then diluted with EtOAc (100 mL) and washed successively with HCl 1 M (3x30 mL), saturated aqueous NaHCO_3 (2x30 mL) and brine (2x30 mL), dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel with EtOAc to give **82** (61 mg, 23%) as an oil.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.08-6.94 (m, 1H, *NH*), 6.40-6.32 (m, 2H, *NH*), 4.90-4.83 (m, 1H, *CHCH}_2*), 4.54-4.41 (m, 2H, *CHCH}_3*), 4.31-4.18 (m, 2H, *OCH}_2*), 2.61-2.43 (m, 4H, *COCH}_2*), 1.95 (br s, 2H, *CHCH}_2*), 1.44 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.39 (d s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.36 (d, 6H, $J=3.9 \text{ Hz}$, *CHCH}_3*).

ESI calculated for $C_{23}H_{38}N_4NaO_9$ $[M + \text{Na}]^+$ $m/z = 537.2531$, found 537.2537.

Rf (PE/EtOAc: 0/100) = 0.35.

Boc-Ala-Ala-OMe (85)C₁₂H₂₂N₂O₅M=274.15 g.mol⁻¹

White solid ; 100%

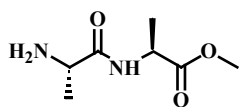
To a stirred solution of Boc-Ala-OH (1 g, 5.29 mmol, 1 eq.) in DCM (70 mL) was successively added at room temperature triethylamine (1.45 mL, 15.87 mmol, 3 eq.), H-Ala-OMe.HCl (889 mg, 6.35 mmol, 1.2 eq.) and HOBT (857 mg, 6.35 mmol, 1.2 eq.). At 0°C, EDCI (985 mg, 6.35 mmol, 1.2 eq.) was added too. The mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was concentrated under *vacuum* and the residue was partitioned between DCM (50 mL) and 1N aqueous HCl (30 mL). The organic layer was washed with portions of 1N aqueous HCl (2×30 mL) and brine (3×30 mL), dried with MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give **85** (1.449 g, 100%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃) δ 6.62 (d, 1H, J=5.1 Hz, NH), 4.99 (br s, 1H, NH), 4.57 (qt, 1H, J=7.2 Hz, J=14.4 Hz, CHCH₃), 4.16 (br t, 1H, J=6.3 Hz, CHCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 1.44 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.40 (d, 3H, J=6.9 Hz, CHCH₃), 1.36 (d, 3H, J=7.2 Hz, CHCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 173.8 (CO), 172.8 (CO), 156.1 (CO), 80.8 (C), 53.1 (OCH₃), 48.7 (2 CH), 29.0 (3 CH₃), 19.0 (2 CH₃).

R_f (PE/EtOAc: 60 /40) = 0.33.

H-Ala-Ala-OMe (86)



$C_7H_{14}N_2O_3$

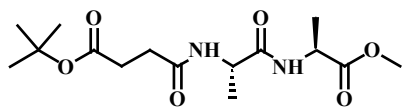
$M=174.10 \text{ g.mol}^{-1}$

Oil ; 100%

85 (1.095 g, 5.29 mmol) was stirred in 40:60 trifluoroacetic acid TFA/DCM (12.3 mL) under nitrogen at room temperature overnight. The volatiles were removed in a rotary evaporator. The crude was stirred with saturated aqueous NaHCO_3 (15 mL) for 1h. The product was extracted with DCM (2x50 mL) and the combined organic layers sequentially were washed with water (30 mL) and brine (30 mL). The organic layers were combined, dried with MgSO_4 , filtered and concentrated under *vacuum* to give amine **86** (920 mg, 100%) as an oil.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 6.21 (br s, 1H, NH), 4.61-4.51 (m, 1H, CHCH_3), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.54-3.47 (m, 1H, CHCH_3), 1.40 (d, 3H, $J=7.2 \text{ Hz}$, CHCH_3), 1.33 (d, 3H, $J=6.6 \text{ Hz}$, CHCH_3), 1.26 (d, 2H, $J=7.5 \text{ Hz}$, NH_2).

Rf (PE/EtOAc: 60/40) = 0.08.

^tBu-Suc-Ala-Ala-OMe (87)C₁₅H₂₆N₂O₆M=330.18 g.mol⁻¹

Oil ; 95%

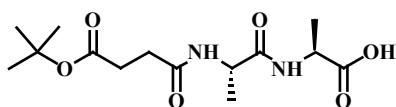
To a solution of **86** (920 mg, 5.28 mmol) in DCM (50 mL) were added: triethylamine (5.92 mL, 15.8 mmol, 3 eq.), ^tBu-Suc-OH (1.103 g, 6.34 mmol, 1.2 eq.) and HOBt (862 mg, 6.34 mmol, 1.2 eq.) and at 0°C EDC (983 mg, 6.34 mmol, 1.2 eq.) was added. The mixture was stirred for 24 h. The solvent was removed under *vaccum*. 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 MgSO₄, filtered and concentrated under *vacuum* to give pseudodipeptide **87** (1.655 g, 95%) as an oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ 6.84 (d, 1H, J=6.9 Hz, NH), 6.40 (d, 1H, J=7.2 Hz, NH), 4.53 (qt, 2H, J=7.2 Hz, J=14.4 Hz, CHCH₃), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 2.61-2.41 (m, 2H, COCH₂), 2.46-2.41 (m, 2H, COCH₂), 1.43 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.38 (d, 6H, J=7.2 Hz, 2 CHCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 173.7 (CO), 172.5 (CO), 172.2 (2 CO), 81.5 (C), 53.1 (OCH₃), 49.4 (CH), 48.8 (CH), 31.8 (CH₂), 31.3 (CH₂), 28.7 (3 CH₃), 18.8 (CH₃), 18.6 (CH₃).

R_f (PE/EtOAc: 40/60) =0.25.

^tBu-Suc-Ala-Ala-OH (88)



C₁₄H₂₄N₂O₆

M=316.16 g.mol⁻¹

Oil ; 87%

To a stirred solution of **87** (652 mg, 2.52 mmol, 1 eq.) in 0.8 M aqueous CaCl₂ in iPrOH/H₂O (7/3) (30 mL) was added aqueous 1N NaOH (2.52 mL, 2.52 mmol, 1 eq.). The mixture was stirred at room temperature during 2h. The reaction mixture was concentrated under *vacuum*. The crude was dissolved in water (20mL). The aqueous layer was washed with cyclohexane (2x20 mL). The aqueous layer was acidified with a solution of 1N HCl until pH=2. The aqueous layer was extracted with EtOAc (4x30 mL). The organic layers was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum to give **88** (537 mg, 87%) as an oil.

¹H NMR (CDCl₃) δ 9.55 (s, 1H, OH), 7.45 (d, 1H, J=7.2 Hz, NH), 7.21 (d, 1H, J=7.5 Hz, NH), 4.61 (br t, 1H, J=7.2 Hz, CHCH₃), 4.49 (br t, 1H, J=7.2 Hz, CHCH₃), 2.67-2.4 (m, 4H, 2 COCH₂), 1.43-1.32 (m, 15H, (CH₃)₃ and 2 CHCH₃).

R_f (PE/EtOAc: 0/100) = 0.32.

Références bibliographiques

- (1) Mikhailov, D.; Daragan, V. A.; Mayo, K. H. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 1540.
- (2) Pelmont, J. *Enzymes: catalyseurs du monde vivant*; Presses universitaires de Grenoble, 1995.
- (3) Fischer, S.; Dunbrack, R. L.; Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11931.
- (4) Galat, A. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *216*, 689.
- (5) Hacker, J.; Fischer, G. *Mol. Microbiol.* **1993**, *10*, 445.
- (6) Rahfeld, J.-U.; Schierhorn, A.; Mann, K.; Fischer, G. *FEBS Lett.* **1994**, *343*, 65.
- (7) Chattopadhyaya, S.; Harikishore, A.; S. Yoon, H. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 5380.
- (8) Pflügl, G.; Kallen, J.; Schirmer, T.; Jansonius, J. N.; Zurini, M. G. M.; Walkinshaw, M. D. *Nature* **1993**, *361*, 91.
- (9) Bajaj, A.; Driver, J. A.; Schernhammer, E. S. *Cancer Causes Control* **2010**, *21*, 697.
- (10) Handschumacher, R.; Harding, M.; Rice, J.; Drugge, R.; Speicher, D. *Science* **1984**, *226*, 544.
- (11) Fischer, G.; Bang, H.; Mech, C. *Biomed. Biochim. Acta* **1984**, *43*, 1101.
- (12) Kofron, J. L.; Kuzmic, P.; Kishore, V.; Colon-Bonilla, E.; Rich, D. H. *Biochemistry (Mosc.)* **1991**, *30*, 6127.
- (13) Garcia-Echeverria, C.; Kofron, J. L.; Kuzmic, P.; Rich, D. H. A continuous spectrophotometric direct assay for peptidyl prolyl cis-trans isomerases <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> (accessed Aug 21, 2014).
- (14) Schutkowski, M.; Woellner, S.; Fischer, G. S. *Biochemistry (Mosc.)* **1995**, *34*, 13016.
- (15) Zhang, Y.; Füssel, S.; Reimer, U.; Schutkowski, M.; Fischer, G. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, *41*, 11868.
- (16) Bouillon, I.; Brosse, N.; Vanderesse, R.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3569.
- (17) Bouillon, I.; Brosse, N.; Vanderesse, R.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2223.
- (18) Moussodia, R.-O.; Acherar, S.; Bordessa, A.; Vanderesse, R.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4682.
- (19) Felten, A.-S.; Dautrey, S.; Bodiguel, J.; Vanderesse, R.; Didierjean, C.; Arrault, A.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10741.
- (20) Felten, A.-S.; Dautrey, S.; Bodiguel, J.; Vanderesse, R.; Didierjean, C.; Arrault, A.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10741.
- (21) Sébastien, D.; Jacques, B.; Axelle, A.; Brigitte, J.-G. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4362.
- (22) Pedetour, M.; Arrault, A.; Averlant-Petit, M.-C.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5365.
- (23) Humbert-Voss, E.; Arrault, A.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 363.
- (24) Abbas, C.; Pickaert, G.; Didierjean, C.; Grégoire, B. J.; Vanderesse, R. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4158.
- (25) Baharfar, R.; Abbasi, N. *Acta Chim Slov* **2011**, *58*, 840.
- (26) Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*, 95.
- (27) André, F.; Vicherat, A.; Boussard, G.; Aubry, A.; Marraud, M. *J Pept Res* **1997**, *50*, 372.
- (28) Milner-White, E. J. *J. Mol. Biol.* **1990**, *216*, 385.
- (29) Milner-White, E. J.; Ross, B. M.; Ismail, R.; Belhadj-Mostefa, K.; Poet, R. *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 777.
- (30) Némethy, G.; Scheraga, H. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 320.
- (31) Müller, G.; Gurrath, M.; Kurz, M.; Kessler, H. *Proteins Struct Funct Genet* **1993**, *15*, 235.
- (32) Beausoleil, E.; Lubell, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12902.
- (33) Halab, L.; Lubell*, W. D. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 92.
- (34) Feytens, D.; Chaume, G.; Chassaing, G.; Lavielle, S.; Brigaud, T.; Byun, B. J.; Kang, Y. K.; Miclet, E. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 4069.
- (35) Chaume, G.; Feytens, D.; Chassaing, G.; Lavielle, S.; Brigaud, T.; Miclet, E. *New J. Chem.* **2013**, *37*, 1336.
- (36) Zondlo, N. J. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1039.
- (37) Thomas, K. M.; Naduthambi, D.; Zondlo, N. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2216.
- (38) Hodges, J. A.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4695.
- (39) Lecoq, A.; Boussard, G.; Marraud, M.; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5209.
- (40) Pagani Zecchini, G.; Paglialunga Paradisi, M.; Torrini, I.; Lucente, G.; Mastropietro, G.; Paci, M.; Spisani, S. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1996**, *329*, 517.
- (41) Voss, E.; Arrault, A.; Jamart-Grégoire, B. Synthèse d'Analogues Bis-azotés de la Proline et Applications, INPL, 2011.
- (42) Voss, E.; Arrault, A.; Bodiguel, J.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, *20*, 1809.
- (43) Brosse, N.; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 249.
- (44) Krause, J. G.; Kwon, S.; George, B. J. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2040.
- (45) Bouillon, I. *Synthèses d'[alpha]-hydrazinopeptides*; Vandoeuvre-les-Nancy, INPL, 2006.
- (46) Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, *1981*, 1.
- (47) Brosse, N.; Pinto, M.-F.; Jamart-Grégoire, B. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4370.
- (48) Stafford, J. A.; Brackeen, M. F.; Karanewsky, D. S.; Valvano, N. L. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7873.
- (49) Iwagami, H.; Yasuda, N. *HETEROCYCLES* **1990**, *31*, 529.

- (50) Quinn, J. F.; Razzano, D. A.; Golden, K. C.; Gregg, B. T. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 6137.
- (51) Karl W Rosenmund; Heise, F. *Ber. dtsch. Chem. Ges.* **1921**, 54, 2038.
- (52) M Bergmann; Zervas, L. *Ber. dtsch. Chem. Ges.* **1932**, 65, 1192.
- (53) Kim, H.-O.; Gardner, B.; Kahn, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6013.
- (54) Ciufolini, M. A.; Xi, N. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2320.
- (55) Boger, D. L.; Schüle, G. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6421.
- (56) Liu, F.; Stephen, A. G.; Adamson, C. S.; Gousset, K.; Aman, M. J.; Freed, E. O.; Fisher, R. J.; Burke, T. *R. Org. Lett.* **2006**, 8, 5165.
- (57) Li, W.; Gan, J.; Ma, D. *Org. Lett.* **2009**, 11, 5694.
- (58) Kimura, T.; Takai, M.; Masui, Y.; Morikawa, T.; Sakakibara, S. *Biopolymers* **1981**, 20, 1823.
- (59) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067.
- (60) Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205.
- (61) Wang, W.; McMurray, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2501.
- (62) Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, 1219.
- (63) Giacomelli, G.; Porcheddu, A.; Salaris, M. *Org. Lett.* **2003**, 5, 2715.
- (64) Pettit, G. R.; Taylor, S. R. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2322.
- (65) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397.
- (66) Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9678.
- (67) Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3039.
- (68) Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Chao, H. G.; DeSelms, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9651.
- (69) Carpino, L. A.; Mansour, E.-S. M. E.; Sadat-Aalae, D. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2611.
- (70) Carpino, L. A.; El-Faham, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5401.
- (71) 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.
- (72) Beyermann, M.; Bienert, M.; Niedrich, H.; Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 721.
- (73) Carpino, L. A.; Ionescu, D.; El-Faham, A.; Henklein, P.; Wenschuh, H.; Bienert, M.; Beyermann, M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 241.
- (74) Hoffman, R. V.; Hwa-Ok, K. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 2953.
- (75) Liu, W.; Xu, D. D.; Repič, O.; Blacklock, T. J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 2439.
- (76) Otani, Y.; Hori, T.; Kawahata, M.; Yamaguchi, K.; Ohwada, T. *Tetrahedron* **2012**, 68, 4418.
- (77) Ozturk, T.; Ertas, E.; Mert, O. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 5210.
- (78) Ori, M.; Nishio, T. *Heterocycles* **2000**, 52, 111.
- (79) Downing, S. V.; Aguilar, E.; Meyers, A. I. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 826.
- (80) Dreier, F.; Müller, M. Q.; Sinz, A.; Schäfer, M. *J. Mass Spectrom.* **2010**, 45, 178.
- (81) Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Broxterman, Q. B.; Kaptein, B.; Corbier, C.; Saviano, M.; Palladino, P.; Benedetti, E. *Macromolecules* **2003**, 36, 8164.
- (82) Bax, A.; Freeman, R. *J. Magn. Reson.* **1969** **1981**, 44, 542.
- (83) Bax, A.; Freeman, R.; Morris, G. *J. Magn. Reson.* **1969** **1981**, 42, 164.
- (84) Bothner-By, A. A.; Stephens, R. L.; Lee, J.; Warren, C. D.; Jeanloz, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 811.
- (85) Felten, A.-S. *Synthèse de N-aminopeptides. Application à la synthèse de nouveaux foldamères*; Vandoeuvre-les-Nancy, INPL, 2007.
- (86) Dautrey, S. *Synthèse et étude conformationnelle de nouveaux oligomères mixtes : les [[alpha]/[alpha]-N-amino]mères*; Vandoeuvre-les-Nancy, INPL, 2009.
- (87) Altmayer-Henzien, A.; Declerck, V.; Merlet, D.; Baltaze, J.-P.; Farjon, J.; Guillot, R.; Aitken, D. J. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 6031.
- (88) Reimer, U.; Scherer, G.; Drewello, M.; Kruber, S.; Schutkowski, M.; Fischer, G. *J. Mol. Biol.* **1998**, 279, 449.
- (89) Keller, M.; Sager, C.; Dumy, P.; Schutkowski, M.; Fischer, G. S.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 2714.
- (90) Dumy, P.; Keller, M.; Ryan, D. E.; Rohwedder, B.; Wöhr, T.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 918.
- (91) Zhang, W.-J.; Berglund, A.; Kao, J. L.-F.; Couty, J.-P.; Gershengorn, M. C.; Marshall, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1221.
- (92) Ye, B.; Akamatsu, M.; Shoelson, S. E.; Wolf, G.; Giorgetti-Peraldi, S.; Yan, X.; Roller, P. P.; Burke, T. *R. J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4270.
- (93) Wu, Y.; Xu, J.-C. *Tetrahedron* **2001**, 57, 8107.
- (94) Isomura, S.; Wirsching, P.; Janda, K. D. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4115.
- (95) Sharma, S. K.; Miller, M. J.; Payne, S. M. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 357.

- (96) Kennedy, J. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *45*, 105.
- (97) Chamorro, C.; Liskamp, R. M. J. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11145.
- (98) Yadav, J. S.; Balanarsaiah, E.; Raghavendra, S.; Satyanarayana, M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4921.
- (99) Bryan, D. B.; Hall, R. F.; Holden, K. G.; Huffman, W. F.; Gleason, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2353.
- (100) Gmeiner, P.; Feldman, P. L.; Chu-Moyer, M. Y.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3068.
- (101) SIRCAR, J. C. [US/US]; KHATUYA, H. [US/US]; THOMAS, R. J. [US/US]; ALISALA, K. [US/US]; VASSAR, V. C. [US/US]; NIKOULIN, I. [US/US]. Small molecules for treatment of hypercholesterolemia and related diseases, December 15, 2005.
- (102) Rijkers, D. T. S.; Adams, H. P. H. M.; Hemker, H. C.; Tesser, G. I. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 11235.
- (103) Percec, V.; Ahn, C.-H.; Bera, T. K.; Ungar, G.; Yeardley, D. J. P. *Chem. – Eur. J.* **1999**, *5*, 1070.
- (104) Daga, M. C.; Taddei, M.; Varchi, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5191.
- (105) Felix, A. M.; Heimer, J. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4194.
- (106) Sacchetti, A.; Silvani, A.; Lesma, G.; Pilati, T. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 833.
- (107) Laskin, J.; Heck, D.; Heindel, N. D. Preparation of phenyl carbonate derivatives as reversible inhibitors of acetylcholinesterase. WO 2010051044 A1 20100506.
- (108) Campbell, A. L.; Pilipauskas, D. R.; Khanna, I. K.; Rhodes, R. A. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2331.
- (109) Ley, S. V.; Meerholz, C. A.; Barton, D. H. R. *Tetrahedron Suppl.* **1981**, 213.
- (110) Chen, G.-H.; Pan, P.; Chen, Y.; Meng, X.-B.; Li, Z.-J. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5922.
- (111) Boger, D. L.; Yohannes, D.; Zhou, J.; Patane, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3420.
- (112) Tiecco, M.; Testaferri, L.; Marini, F.; Bagnoli, L.; Santi, C.; Temperini, A. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4441.
- (113) Ternon, M.; Outurquin, F.; Paulmier, C. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 10259.
- (114) Vatéle, J.-M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 4251.
- (115) Jarowicki, K.; Kocienski, P. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **2001**, 2109.
- (116) Adamson, J. G.; Blaskovich, M. A.; Groenevelt, H.; Lajoie, G. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3447.
- (117) Zvilichovsky, G.; Gurvich, V. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4457.
- (118) Pascal, R.; Sola, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5031.
- (119) Capicciotti, C. J.; Trant, J. F.; Leclère, M.; Ben, R. N. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 605.
- (120) Alezra, V.; Bouchet, C.; Micouin, L.; Bonin, M.; Husson, H.-P. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 655.
- (121) Nahmany, M.; Melman, A. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3733.
- (122) Altmayer-Henzien, A.; Declerck, V.; Guillot, R.; Aitken, D. J. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 802.

La δ -azaproline : impact conformationnel de son incorporation dans des pseudopeptides

mots clés: δ -azaproline, pseudopeptide, conformation, liaison hydrogène, pseudocycle

Ce travail décrit l'incorporation de la δ -azaproline dans des pseudopeptides en vue d'analyses conformationnelles et applications biologiques.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à l'élaboration d'un nouveau substrat de type Suc-Ala-X- δ azaPro-Phe-*p*-NA (où X est un acide aminé) capable de mesurer l'activité catalytique des PPIases. Ces enzymes ont déjà montré un grand intérêt dans la prévention des rejets de greffes et dans le traitement de la maladie d'Alzheimer car elles sont capables d'isomériser le lien X-Pro de la conformation *cis* vers la conformation *trans*.

Le second chapitre décrit l'incorporation de la δ -azaproline dans des pseudotripeptides et l'étude de la réactivité des deux atomes d'azote de cet analogue. Il a pu notamment être mis en évidence que l'atome d'azote supplémentaire de la δ -azaproline est beaucoup plus réactif que l'atome d'azote natif car l'encombrement stérique généré par le groupement Boc et l'oxydation spontanée de la liaison CH ^{α} -NH ^{δ} représente un frein au bon déroulement du couplage peptidique.

Finalement, la dernière partie de ce manuscrit est consacrée à l'analyse conformationnelle des pseudotripeptides synthétisés. Ces analyses ont pour but de déterminer l'influence d'un atome d'azote supplémentaire, en position δ du cycle de la proline, libre ou protégé par un groupement encombré sur la conformation du lien X- ψ Pro. Les techniques spectroscopiques comme la RMN et l'IR ont permis de mettre en évidence que l'encombrement stérique généré par un groupement Boc en position δ avec la chaîne latérale de l'acide aminé en amont de cet analogue favorise la conformation *cis* par formation d'un pseudocycle en C₁₀.

δ -azaproline : conformational impact of its incorporation into pseudotripeptides

Keywords: δ -azaproline, pseudopeptide, conformation, hydrogen bond, pseudocycle

This work describes the incorporation the δ -azaproline in pseudopeptides for conformational analysis and biological applications.

The first chapter of this thesis is devoted to the development of a new substrate of the type Suc-Ala-X- δ azaPro-Phe-*p*-NA (where X is an amino acid) able to measure the catalytic activity of PPIases. These enzymes have shown great interests in the prevention of transplant rejection and in the treatment of Alzheimer's disease because they can interconvert the *cis* and *trans* isomers of X-Pro peptidic bond.

The second section describes the incorporation of the δ -azaproline into pseudotripeptides in which the reactivity of both nitrogen atoms of this surrogate was investigated. It could be demonstrated in particular that the supplementary nitrogen atom of δ -azaproline is much more reactive than the native one because of the steric hindrance generated by the Boc protecting group and the spontaneous oxidation of the CH ^{α} -NH ^{δ} bond represent a huge problem in the peptidic coupling.

Finally, the last part of this thesis is dedicated to the conformational analysis of pseudotripeptides. These analyzes are designed to determine the influence of a supplementary nitrogen atom, in δ position into proline's cycle, which can be free or protected by a cluttered group on the conformation of the X- ψ Pro bond. Spectroscopic techniques such as NMR and IR enabled to demonstrate that steric hindrance generated by a Boc group on δ position with the side chain of amino acid upstream this surrogate promotes *cis* conformation by formation of a ten-membered ring.