

Composition du jury

Professeur Jacqueline Marchand-Brynaert (Promoteur)

Université Catholique de Louvain

Professeur Olivier Riant (Président)

Université Catholique de Louvain

Professeur Jean-Louis Habib-Jiwan (Secrétaire)

Université Catholique de Louvain

Professeur Jacques Fastrez

Université Catholique de Louvain

Professeur Claude Grison

Université de Montpellier

Professeur Christian Stevens

Université de Ghent

Au terme de cette thèse, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

En premier lieu, j'aimerais remercier mon promoteur, le Professeur Jacqueline Marchand-Brynaert pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Ses conseils, sa disponibilité et son efficacité m'ont permis de m'épanouir durant ma thèse.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Jean-Louis Habib-Jiwan pour ses conseils et sa collaboration lors de l'étude de complexation par spectrométrie de masse et pour avoir accepté de juger cette thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi au Professeur Olivier Riant, au Professeur Jacques Fastrez, au Professeur Christian Stevens et au Professeur Claude Grison qui ont accepté d'être membre du jury de cette thèse.

De nombreuses personnes ont directement contribué à cette thèse. Je voudrais tout d'abord remercier Anny Dekoker et Sonia Gharbi pour les synthèses qu'elles ont réalisées pour moi. Je remercie aussi les personnes avec qui nous avons collaboré à Liège : Georges Dive, Paulette Charlier et Eric Sauvage pour la cristallographie. Les tests biologiques ont été effectués par l'équipe de Moreno Galleni entre autres Carine Brebone, Adriana Herteg-Fernea, Patricia Lassaux et Lionel Vercheval. Les études de spectrométrie de masse ont quant à elle été réalisées avec l'aide de Laetitia Maton au laboratoire de spectrométrie de masse de l'UCL. Mes remerciements s'adressent aussi au docteur Alex Cordi de l'institut de recherches Servier pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Je souhaite remercier l'UCL pour le financement de thèse qu'elle m'a accordé et l'opportunité de pouvoir allier recherche et enseignement.

Cette expérience très enrichissante m'a apporté beaucoup de joie mais aussi beaucoup de travail... Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai collaboré tout d'abord au laboratoire : Nadine, Daniel, Marie-José, Richard, Frank, et en séances d'exercices : Marianne, Aude, Mathieu D., Louise, Benoît, Aurore, Chantal, Mathieu L., Agnès, Patrick, Sébastien, Olivier, Nuno, Corinne.... et j'en oublie sans doute, veuillez m'en excuser et les professeurs Michel Devillers, Marko Istvan et Olivier Riant.

Je remercie aussi Chantal, qui est toujours disponible pour nous aider lors de nos petits tracas en tout genre qu'ils soient professionnels ou personnels. Je voudrais également remercier Karima Cheboub qui était « ma marraine » lors de mon arrivée au laboratoire et qui est toujours une amie chère. Je voulais aussi remercier Sonia pour son amitié, son soutien et pour sa collaboration efficace en enseignement. Je tiens aussi à remercier tout le laboratoire ORGJ, les anciens comme les nouveaux : Allan, Jérôme, Arnaud, Pablo, pour qui j'aurai toujours une petite pensée, Maryam, Gaëtan, Claudio, Raphaël, Ludo, Fred B., Fred D., Sabrina, J-C, Vincent R., Olivier H., Olivier P., Martin, Vincent P., Marion, Benoît, Prosper, Aline et finalement Cédric. J'espère n'avoir oublié personne...

Merci aussi à Christelle, Géraldine, Luc, Geneviève, Isabelle, Matthieu, Peggy, Noël, Cathy, Xavier, Claire et Christophe, mes amis d'ici et d'ailleurs pour votre soutien et votre amitié.

Je voulais aussi remercier ma famille et ma belle-famille, qui m'ont soutenu tout au long de mes études et particulièrement Antoine qui m'a appris à me servir d'un ordinateur.

Finalement, je veux remercier la personne que j'aime, Patrick, pour avoir été à mes côtés tout au long de cette thèse, pour m'avoir soutenue, supportée jusqu'au bout et secourue face à l'irrationalité de l'informatique.

Merci à tous.

RESUME

La production de β -lactamases est la principale cause de résistance bactérienne aux antibiotiques de type β -lactame. Ces enzymes inactivent les antibiotiques en hydrolysant la liaison amide du cycle β -lactame. Notre laboratoire s'intéresse à la synthèse et l'évaluation biologique d'inhibiteurs potentiels des β -lactamases des classes A, B, C et D.

La cristallisation de BS3, une β -lactamase de la classe A, dans un tampon citrate a révélé le rôle inattendu de ce composé qui est parfaitement positionné dans la cavité enzymatique. Le citrate est un inhibiteur de toutes les β -lactamases de la classe A, actif au niveau micromolaire.

Ces observations récentes effectuées au Centre d'Ingénierie des Protéines (Université de Liège) nous ont permis de considérer le citrate comme un *lead* pour la conception de nouveaux inhibiteurs sélectifs et de hautes affinités des β -lactamases. Tout d'abord, nous avons essayé d'augmenter l'affinité dans la cavité enzymatique en remplaçant la fonction alcool par une fonction amine sur laquelle nous pouvons fixer une variété de chaînes latérales. Le remplacement d'une (ou deux) fonctions acides carboxyliques par les acides phosphoniques et l'allongement d'une ou deux chaînes acides pour créer de nouvelles interactions ont aussi été envisagées. Différents dérivés aminés du citrate et de l'iso-citrate ont été synthétisés et une évaluation de leur activité biologique a été effectuée sur différentes β -lactamases et sur R39. Le complexe entre l'aminocitrate et BS3 a été analysé par diffraction des rayons X. Plusieurs dérivés aminophosphoniques et *bis*-phosphoniques ont été synthétisés et leur potentiel inhibiteur a été évalué sur différentes PBPs. Finalement, la capacité complexante de

certaines des molécules synthétisées a été évaluée par spectrométrie de masse.

Ce travail a mis en évidence une activité inhibitrice intéressante de plusieurs composés : **3, 14, 23, 27, 29**, en série amino-citrate ; **12, 15, 26, 31**, en série acylamino-citrate ; **36**, en série amino-iso-citrate ; **48, 49, 56, 60**, en série amino-phosphonique.

ABSTRACT

The production of β -lactamases represents the most widespread and often the most efficient mechanism devised by bacteria to escape to the lethal action of β -lactam antibiotics. Our research focuses on the synthesis and the biological evaluation of potential inhibitors of classes A, B, C and D β -lactamases.

The crystallization of class A β -lactamase BS3 from a citric acid buffer revealed the unexpected role of this compound which is perfectly located in the enzymic cavity. The citrate is an inhibitor of all class A β -lactamases at the micromolar level.

These recent observations carried out in the Centre d'Ingénierie des Protéines (université de Liège) led us to consider the citrate as a lead for the design of new selective and high affinity inhibitors of β -lactamases. We tried to increase the binding in the enzymic cavity by replacing the alcohol function by an amine function on which we could fix a variety of lateral chains. We have also considered the replacement of one (or two) carboxylic functions with the bioisoster phosphonic acids and the lengthening of one or two acidic chains to create novel interactions. Several derivatives of the amino-bioisoster of citric acid have been synthesized with carboxylic or ester functions and the biological activity of aminocitrate derivatives has been evaluated against PBPs (Penicillin Binding Proteins). The complex between the aminocitrate and BS3 has been analysed by X-Ray diffraction. The amino-phosphonic and *bis*-phosphonic derivatives have been synthesized and the biological evaluation has been achieved against PBPs. Finally, the complexing capacity of several molecules has been evaluated by mass spectrometry.

This work has pointed out the promising activity of several compounds: **3, 14, 23, 27, 29**, for the amino-citrate series; **12, 15, 26, 31**, for the acylamino-citrate series; **36**, for the amino-iso-citrate series; **48, 49, 56, 60**, for the amino-phosphonic series.

LISTE DES ABREVIATIONS

AAE	Acides amines excitatoires
BrSiMe ₃	Bromure de triméthylsilane
CCM	Chromatographie sur couche mince
CIP	Centre d'ingénierie des protéines
DCM	Dichlorométhane
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DMAP	Diméthylaminopyridine
eV	Electron volt
HMPA	hexaméthylphosphoramide
HN ₃	Azoture d'hydrogène
Hz	Hertz
Ki	Constante d'inhibition
KHMDS	Hexaméthyldisilazane de potassium
LDA	Diisopropylamidure de lithium
LiOH (KOH, NaOH)	Hydroxyde de lithium (potassium ou sodium)
LiPO ₃ Et ₂	Diéthylphosphite de lithium
μM	Micromolaire
NaH	Hydruure de sodium
m/z	masse/charge
PBPs	Penicilling Binding proteins
Pd/C	Palladium sur charbon
P(OTMS)(OEt) ₂	Phosphite de triméthylsilyldiéthyle
ppm	Partie par million
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RX	Rayons X

SCID	Source Collision-Induced Dissociation
SM	Spectrométrie de masse
UCL	Université catholique de Louvain
ULg	Université de Liège
W	Watt
Z/E	Zusammen/entgegen

AVANT-PROPOS

L'introduction de la pénicilline G (antibiotique de type β -lactame) en essais cliniques il y a environ 60 ans représente un des progrès majeurs de la chimiothérapie moderne. Le succès des pénicillines est dû à leur efficacité et à leur spécificité. Cependant, dès l'introduction des β -lactames comme agents antibactériens, cette efficacité a été contrée par l'apparition de nouvelles souches bactériennes résistantes. L'utilisation intensive et parfois inadéquate des antibiotiques est aussi responsable de la dissémination des résistances. Ce phénomène est actuellement une préoccupation médicale majeure. Les recherches actuelles en antibiothérapie suivent deux grandes stratégies : soit la recherche de nouvelles enzymes-cibles dans les bactéries dont l'inhibition serait létale, soit la poursuite des travaux dans le domaine des inhibiteurs de PBPs (Penicillin Binding Proteins), en exploitant les acquis récents concernant la structure et le fonctionnement de ces enzymes. Beaucoup d'inhibiteurs de PBPs ont été décrits dans la littérature ces dernières décennies. Cependant, toutes ces drogues sont des β -lactames, et à force d'être exposées à ces molécules, les bactéries acquièrent des résistances. Pour sortir du cercle vicieux, les inhibiteurs non β -lactamiques peuvent être une alternative. Le but de ce travail est de synthétiser de nouvelles familles d'inhibiteurs non β -lactamiques des PBPs analogues et homologues aminés et phosphorés du citrate et de l'iso-citrate. En effet, des études cristallographiques et biologiques effectuées au centre d'ingénierie des protéines de l'université de Liège ont montré que le citrate est un inhibiteur modeste de toutes les β -lactamases de la classe A. C'est donc une découverte fortuite que nous

avons exploitée dans le cadre d'une recherche de nouveaux « leads » en chimie médicinale.

Ce manuscrit se décompose en six chapitres auxquels s'ajoute une partie expérimentale. Dans un premier temps, nous allons présenter une revue de la littérature concernant les enzymes bactériennes D,D-peptidases et β -lactamases des classes A, B, C et D. La deuxième partie de l'introduction (chapitre 1) décrit les inhibiteurs actuels des β -lactamases, qu'ils soient β -lactamiques ou non. Finalement, la dernière partie de l'introduction aborde les différentes voies de synthèse et les activités biologiques des acides aminés, des acides aminophosphoniques et des acides aminobisphosphoniques. Les objectifs et stratégies de la thèse seront ensuite présentés dans le chapitre 2. La synthèse et l'évaluation biologique vis-à-vis des PBPs des dérivés aminés du citrate et de l'iso-citrate sont décrites dans le chapitre 3. Le chapitre 4 concerne quant à lui la synthèse et l'évaluation biologique de l'ensemble des dérivés phosphoniques. Les propriétés complexantes vis-à-vis des ions calcium et zinc de certaines molécules synthétisées dans les deux chapitres précédents ont été évaluées par spectrométrie de masse (chapitre 5). Finalement, les conclusions générales et perspectives de la thèse sont décrites dans le chapitre 6.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 1	1

INTRODUCTION.....	1

I.	LES PROTEASES A SERINE.....	1
I.1.	<i>Les D,D-peptidases.....</i>	3
I.2.	<i>La résistance bactérienne.....</i>	4
I.3.	<i>Les PBPs résistantes.....</i>	5
I.4.	<i>Les β-lactamases à sérine.....</i>	6
I.4.1.	Les β -lactamases des classes A.....	6
I.4.2.	Les β -lactamases de la classe C.....	11
I.4.3.	Les β -lactamases de la classe D.....	14
II.	LES METALLOPROTEASES A ZINC	16
III.	LES INHIBITEURS DES ENZYMES BACTERIENNES	21
III.1.	<i>Les β-lactames.....</i>	22
III.2.	<i>Les inhibiteurs non β-lactamiques.....</i>	28
III.2.1.	Les inhibiteurs des β -lactamases des classes A, C et D	28
III.2.2.	Les inhibiteurs des métallob- β -lactamases.....	36
IV.	LES ACIDES AMINES, LES ACIDES AMINOPHOSPHONIQUES ET LES ACIDES AMINOBISPHOSPHONIQUES EN CHIMIE MEDICINALE.....	42
IV.1.	<i>Les acides aminés.....</i>	42
IV.1.1.	Méthodes de synthèse	43
IV.1.2.	Activités biologiques	49
IV.2.	<i>Les acides α-aminophosphoniques.....</i>	55
IV.2.1.	Méthodes de synthèse	56
IV.2.2.	Activités biologiques.....	60
IV.3.	<i>Les acides aminobisphosphoniques.....</i>	66
IV.3.1.	Méthodes de synthèse	66
IV.3.2.	Activités biologiques	70
V.	CONCLUSIONS	74
VI.	REFERENCES	75

CHAPITRE 2	81

OBJECTIFS ET STRATEGIES.....	81

I.	NOTRE PROJET	81
I.1.	<i>Cristallographie.....</i>	82
I.2.	<i>Résultats biologiques.....</i>	84
II.	CHOIX DES CIBLES	85
II.1.	<i>Dérivés aminés du citrate et de l'iso-citrate</i>	85
II.2.	<i>Dérivés amino-phosphoniques.....</i>	86
III.	CHOIX DES STRATEGIES DE SYNTHÈSE.....	87

III.1.	Synthèse des dérivés aminés du citrate et de l'iso-citrate	87
III.2.	Synthèse des dérivés aminophosphoniques et des dérivés aminobisphosphoniques	88
IV.	EVALUATIONS BIOLOGIQUES	89
IV.1.	Evaluation biochimique vis-à-vis des β -lactamases et co-cristallisation	89
IV.2.	Evaluation biologique vis-à-vis des récepteurs du système nerveux central	91
IV.3.	Evaluation de la capacité de complexation des cations	92
V.	REFERENCES	93

CHAPITRE 3 95

SYNTHESE DE DERIVES AMINES DU CITRATE ET DE L'ISO-CITRATE..... 95

I.	STRATEGIE 1 : DIALKYLATION DU NITROACETATE D'ETHYLE	95
I.1.	Dialkylation du nitroester.....	95
I.1.1.	Réaction avec le bromo-acétate d'éthyle	95
I.1.2.	Réaction de Michael.....	96
I.2.	Hydrogénation du groupement nitro	96
I.3.	Acylation de l'amine	97
II.	STRATEGIE 2 : DIALKYLATION DE L'IMINE DU GLYCINATE DE METHYLE.....	98
II.1.	Synthèse de l'imine 6	98
II.2.	Dialkylation de l'imine	98
II.3.	Hydrolyse de l'imine.....	99
II.4.	Acylation de l'amine	99
II.5.	Transformation des esters méthyliques en acides carboxyliques 100	
III.	CHANGEMENT DE GROUPEMENTS PROTECTEURS SUR L'AGENT ALKYLANT..	103
III.1.	Dialkylation de l'imine	103
III.2.	Hydrolyse de l'imine.....	104
III.3.	Acylation de l'amine	105
III.4.	Déprotection sélective des esters.....	105
IV.	CHANGEMENT DES GROUPEMENTS PROTECTEURS SUR L'IMINE DE LA GLYCINE	106
IV.1.	Synthèse des imines.....	106
IV.2.	Dialkylation des imines.....	107
IV.2.1.	Utilisation du carbonate de potassium	107
IV.2.2.	Utilisation de l'hydruide de sodium	108
IV.2.3.	Utilisation du diisopropylamidure de lithium	111
IV.3.	Hydrolyse des imines en amines.....	113
IV.4.	Acylation de l'amine	115
IV.5.	Déprotection sélective des esters.....	115
IV.6.	Evaluation biochimique	116
IV.7.	Etudes cristallographiques	121
IV.7.1.	Différentes interactions du citrate, de l'isocitrate et de l'aminocitrate dans BS3.....	121
IV.7.2.	Complexe BS3-aminocitrate	123
V.	SYNTHESE D'UN COMPOSE HOMOLOGUE	124
V.1.	Dialkylation de l'imine	124

V.2.	Hydrolyse de l'imine	124
V.3.	Hydrolyse du γ -lactame et des esters éthyliques.....	125
V.4.	Evaluation biochimique	127
VI.	SYNTHÈSE DU DÉRIVÉ AMINE DE L'ISO-CITRATE	128
VI.1.	Synthèse de l'imine.....	128
VI.2.	Monoalkylation de l'imine	129
VI.3.	Hydrolyse de l'imine	129
VI.4.	Hydrolyse du γ -lactame et des esters éthyliques.....	130
VI.5.	Evaluation biochimique	131
VII.	CARACTÉRISATION DES PRODUITS	132
VIII.	REFERENCES	135

CHAPITRE 4 137

SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS AMINOPHOSPHONIQUES..... 137

I.	SYNTHÈSE DU BIOISOSTÈRE PHOSPHONIQUE DE L'AMINOCITRATE.....	137
I.1.	Stratégie 1 : dialkylation de l'imine de l'aminométhyle phosphonate de diéthyle 37	137
I.1.1.	Synthèse de l'amine.....	137
I.1.2.	Formation de l'imine	138
I.1.3.	Dialkylation et hydrolyse de l'imine.....	139
I.2.	Stratégie 2 : Alkylation de l'imine mono-substituée 40	140
I.2.1.	Synthèse de l'imine mono-substituée	140
I.2.2.	Alkylation de l'imine	142
I.2.3.	Hydrolyse de l'imine	145
I.2.4.	Déprotection totale à l'acide chlorhydrique	146
I.2.5.	Déprotection sélective des esters phosphoniques.....	146
I.3.	Stratégie 3 : Réaction de Kabachnik-Fields.....	147
I.3.1.	Utilisation d'un catalyseur à base d'indium.....	149
I.3.2.	Utilisation du micro-onde.....	151
I.4.	Stratégie 4 : Addition d'un phosphite activé sur l'énamine 50	152
I.4.1.	Réaction de Pudovik.....	152
I.4.2.	Addition de phosphite de triméthylsilyldiéthyle sur l'énamine 50	155
I.5.	Evaluation biochimique	160
II.	SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS HOMOLOGUES ET BIS-HOMOLOGUES	162
II.1.	Une seule chaîne carbonée plus longue	162
II.1.1.	Addition de Michael de l'imine substituée 40	162
II.1.2.	Hydrolyse de l'imine	163
II.1.3.	Hydrolyse acide du γ -lactame et des esters éthyliques ..	164
II.1.4.	Déprotection sélective de l'ester phosphonique	164
II.2.	Deux chaînes carbonées plus longues.....	165
II.2.1.	Double addition de Michael de l'imine	165
II.2.2.	Hydrolyse de l'imine	166
II.2.3.	Hydrolyse des esters éthyliques	167
II.2.4.	Déprotection de l'ester phosphonique	168
II.3.	Evaluation biochimique	168
III.	SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS BIS-PHOSPHONATES	171
III.1.	Synthèse de l'amine	171

III.2.	Formation de l'imine.....	171
III.3.	Synthèse du bioisostère bis-phosphonique de l'aminocitrate	172
III.3.1.	Alkylation de l'imine	172
III.3.2.	Hydrolyse de l'imine.....	172
III.3.3.	Hydrolyse totale à l'acide chlorhydrique 6N	173
III.4.	Synthèse d'un homologue bis-phosphonique	173
III.4.1.	Réaction de Michael.....	173
III.4.2.	Hydrolyse de l'imine.....	174
III.4.3.	Hydrolyse des esters phosphoniques.....	175
III.5.	Evaluation biochimique	175
IV.	CARACTERISATION DES PRODUITS	176
V.	REFERENCES	180

CHAPITRE 5 183

ETUDE DE COMPLEXATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE 183

I.	INTRODUCTION	183
II.	PRINCIPE	186
III.	ETUDE DU POUVOIR COMPLEXANT DE MOLECULES DE LA FAMILLE DE L'AMINOCITRATE	187
III.1.	Etude de la molécule 4	187
III.1.1.	Spectre de masse du ligand 4	187
III.1.2.	Complexes formés avec le calcium.....	188
III.1.3.	Complexes formés avec le zinc	191
III.2.	Etude de la molécule 10	195
III.2.1.	Spectre de masse du ligand 10	195
III.2.2.	Complexes formés avec le calcium.....	195
III.2.3.	Complexes formés avec le zinc	197
III.3.	Etude de la molécule 55	198
III.3.1.	Spectre de masse de 55	198
III.3.2.	Complexes formés avec le calcium.....	199
III.3.3.	Complexes formés avec le zinc	201
III.4.	Etude de la molécule 59	203
III.4.1.	Spectre de masse du ligand 59	203
III.4.2.	Complexes formés avec le calcium.....	203
III.4.3.	Complexes formés avec le zinc	205
III.5.	Etude de la molécule 69	207
III.5.1.	Spectre de masse de 69	207
III.5.2.	Complexes formés avec le calcium.....	208
III.5.3.	Complexes formés avec le zinc	209
III.6.	Structure des complexes.....	211
III.6.1.	Introduction.....	211
III.6.2.	Hypothèses de structure	219
III.6.2.a.	Ligand 4	219
III.6.2.b.	Ligand 10	220
III.6.2.c.	Ligand 55	221
III.6.2.d.	Ligand 59	222
III.6.2.e.	Ligand 69	223
III.7.	Conclusions.....	224

IV. REFERENCES	227
CHAPITRE 6	229
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	229
I. BILAN DES SYNTHESES	229
I.1. Synthèse de dérivés aminés du citrate et de l'iso-citrate	229
I.2. Dérivés aminophosphoniques	231
II. BILAN DES ACTIVITES BIOLOGIQUES	234
II.1. Dérivés aminés du citrate et de l'iso-citrate	234
II.2. Dérivés aminophosphoniques	238
III. EVALUATION DE LA CAPACITE COMPLEXANTE DES LIGANDS	241
IV. PERSPECTIVES	242
V. REFERENCES	246
FORMULAIRE	247
CHAPITRE 7	253
PARTIE EXPERIMENTALE	253
I. GENERALITES	253
I.1. Appareillages et analyses	253
I.2. Solvants et réactifs	254
I.3. Purification des produits	254
II. SYNTHSE DE DERIVES AMINES DU CITRATE ET DE L' ISO-CITRATE	255
II.1. Synthèse du -2-nitropropane-1,2,3-tricarboxylate de triéthyle 1	255
II.2. Synthèse du 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de triéthyle 3	256
II.3. Synthèse du 2-(2-phénylacétamido)aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de triéthyle 5	258
II.4. Synthèse des imines	260
II.5. Synthèse de 2-(3-chlorobenzylidèneamino)propane-1,2,3-tricarboxylate de triméthyle	263
II.6. Dialkyltion des imines : procédure améliorée	264
II.7. Hydrolyse des imines : Procédure générale	269
II.8. Synthèse de 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de tribenzyle 23	272
II.9. Produits secondaires isolés lors des réactions d'hydrolyse	273
II.10. Acylation des amines : Procédure générale	275
II.11. Synthèse de l'acide 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylique 27	281
II.12. Hydrogénation des esters benzyliques des amines 14 et 22	282
II.13. Hydrogénation des esters benzyliques des amides	284
III. SYNTHSE D'UN DERIVE HOMOLOGUE DU CITRATE	287
III.1. Synthèse de triéthyle-2-nitropentane-1,2,3-tricarboxylate 2	287

III.2. Synthèse de 3-(3-chlorobenzylidèneamino)pentane-1,3,5-tricarboxylate de triéthyle 30	288
III.3. Synthèse de δ -carbethoxy- δ -(β -carbethoxyethyl)- α -pyrrolidinone 4	289
III.4. Synthèse de N-tert-butyl- δ -carbethoxy- δ -(β -carbethoxyethyl)- α -pyrrolidinone 32	292
III.5. Synthèse de l'acide 3-aminopentane-1,3,5-tricarboxylique.....	293
IV. SYNTHÈSE DU DÉRIVÉ AMINE DE L'ISO-CITRATE	296
IV.1. Synthèse du N-(diphénylméthylène)glycinate d'éthyle 33	296
IV.2. Synthèse du 1-(diphénylméthylamino)succinate de triéthyle 34	297
IV.3. Synthèse du mélange 35	299
IV.4. Synthèse de l'acide 1-aminopropane-1,2,3-tricarboxylique 36	302
V. SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS AMINOPHOSPHONIQUES	303
V.1. Synthèse du bioisostère phosphonique de l'aminocitrate	303
V.1.1. Synthèse du (dibenzylamino)méthylphosphonate de diéthyle 38	303
V.1.2. Synthèse de l'aminométhylphosphonate de diéthyle 37	305
V.1.3. Synthèse de l'imine 39	306
V.1.4. Synthèse du 4-diéthoxyphosphonylazetidine-2-one 44	307
V.1.5. Synthèse de l'amine 42	309
V.1.6. Synthèse de N-3-(3-chlorobenzylidène)amino-3-(diéthoxyphosphoryl)propanoate de méthyle 40	310
V.1.7. Synthèse de N-3-(3-chlorobenzylidène)amino-3-(diéthoxyphosphoryl)pentanedioate de diméthyle 41	312
V.1.8. Synthèse de N-3-(3-chlorobenzylidèneamino)-3-(diéthoxyphosphoryl)propanoate d'éthyle 45	315
V.1.9. Synthèse de l'amine 43	317
V.1.10. Synthèse de l'acide 3-amino-3-phosphonopentanedioïque 48	320
V.1.11. Synthèse de l'acide 3-amino-1,5-diméthoxy-1,5-dioxopentane-3-ylphosphonique 49	321
V.1.12. Synthèse de 3-(benzylamino)pent-2-ènedioate de diméthyle 50	322
V.1.13. Synthèse de l'amine 51	324
V.2. Synthèse de dérivés homologues	327
V.2.1. Synthèse de N-3-(3-chlorobenzylidèneamino)-3-(diéthoxyphosphoryl)hexanedioate de diéthyle 53	327
V.2.2. Synthèse des produits 54 et 55	329
V.2.3. Synthèse du mélange 56	332
V.2.4. Synthèse de l'acide 2-(2-éthoxy-2-oxoéthyl)-5-oxopyrrolidine-2-ylphosphonique 57	334
V.2.5. Synthèse de N-4-(3-chlorobenzylidèneamino)-4-(diéthoxyphosphoryl)heptanedioate de diéthyle 58	335
V.2.6. Synthèse de δ -(diéthoxyphosphoryl)- δ -(β -carbethoxypropyl)- α -pyrrolidinone 59	337
V.2.7. Synthèse de l'acide 3-(5-oxo-2-phosphonopyrrolidine-2-yl)propanoïque 60	339

V.2.8. Synthèse de l'acide 2-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-5-oxopyrrolidin-2-ylphosphonique 61	340
VI. SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS BISPHOSPHONIQUES	342
VI.1. Synthèse de (dibenzylamino)méthyldiphosphonate de tétraéthyle 62	342
VI.2. Synthèse d'aminométhyldiphosphonate de tétraéthyle 63	343
VI.3. Synthèse de l'imine 64	344
VI.3.1. Synthèse de N-(3-chlorobenzylideneamino)-3,3-bis(diethoxyphosphoryl)propanoate de méthyle 65	346
VI.3.2. Synthèse de l'amine 66	348
VI.3.3. Synthèse de l'acide 3-amino-3,3-diphosphonopropanoïque	349
VI.3.4. Synthèse de N-4-(3-chlorobenzylideneamino)-4,4-bis(diethoxyphosphoryl)butanoate d'éthyle 68	351
VI.3.5. Synthèse de 2,2-bis(diethoxyphosphoryl)- α -pyrrolidone 69	353
VI.3.6. Synthèse de l'acide 5-oxopyrrolidine-2,2-diylphosphonic 70	354
VII. EVALUATION BIOCHIMIQUE	356
VIII. ÉTUDE DE COMPLEXATION PAR SPECTOMETRIE DE MASSE.....	356

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

I. Les protéases à sérine

Les protéases de l'organisme humain ont pour rôle de catalyser sélectivement l'hydrolyse des liens peptidiques[1].

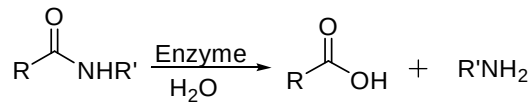


Schéma 1 : Hydrolyse d'un peptide par une protéase

Ces enzymes sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques, notamment la digestion, la croissance et la différenciation cellulaire, les défenses immunologiques...

Les protéases sont classées selon leur mécanisme catalytique. Elles se distribuent en cinq familles :

- protéases à sérine
- protéases à cystéine
- protéases à zinc

- protéases à aspartate
- protéases à thréonine

Dans le cadre de ce travail, seules les protéases à sérine et à zinc sont étudiées.

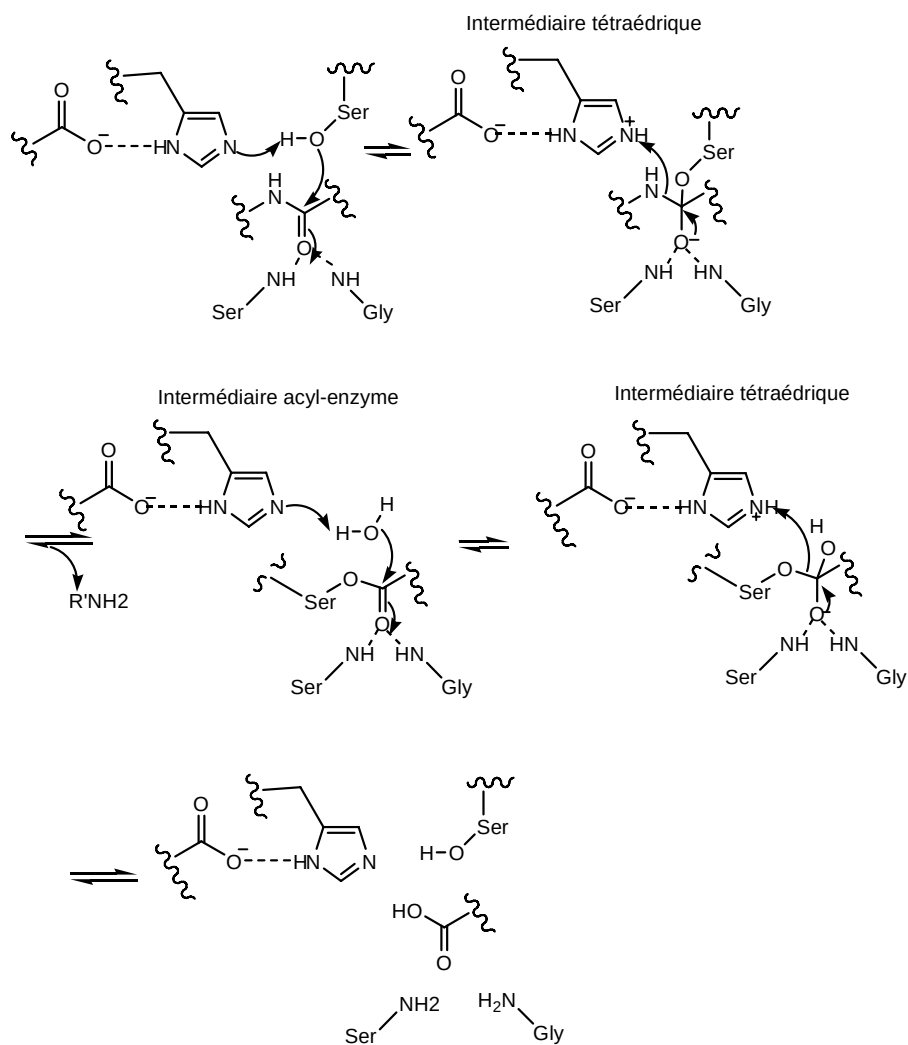


Schéma 2 : Mécanisme d'hydrolyse d'un peptide par les protéases à sérine

Le mode d'action des protéases à sérine a été précisément établi[2]. Il fait intervenir trois acides aminés : l'acide aspartique 102, l'histidine 57 et la sérine 195. L'acide aspartique permet l'orientation de l'histidine. L'histidine joue le rôle de base afin d'activer la sérine qui peut réagir avec la liaison amide et former un intermédiaire tétraédrique. Cet intermédiaire se décompose et relargue le groupe partant grâce à l'assistance de l'histidine. L'eau attaque l'acyl-enzyme, assistée par l'histidine, menant à un second intermédiaire tétraédrique. Cet intermédiaire se décompose en libérant la sérine active et relarguant un acide inactif.

Ces enzymes ont des rôles physiologiques importants. À titre d'exemple, on peut citer la chymotrypsine et la trypsine qui sont des enzymes digestives, l'élastase qui intervient dans la protéolyse des tissus connectifs, la thrombine qui est impliquée dans le contrôle de la coagulation du sang.

Les bactéries possèdent aussi des protéases à sérine : les D,D-peptidases qui interviennent dans la biosynthèse de la paroi bactérienne et les β -lactamases qui sont impliquées dans les mécanismes de défense des bactéries contre les antibiotiques.

I.1. Les D,D-peptidases

Il s'agit d'un groupe d'enzymes bactériennes qui se situent sur la membrane interne des bactéries[3]. Leur rôle est la finition de la biosynthèse du peptidoglycane, constituant majeur de la paroi bactérienne. Certaines D,D-peptidases sont des enzymes bifonctionnelles contenant deux domaines : un domaine transpeptidase et un domaine transglycolase. Ces enzymes catalysent la liaison (cross-linking ou réticulation) de deux brins de peptidoglycane voisins dans l'étape finale de la biosynthèse de la paroi cellulaire. Elles sont la cible des antibiotiques. Les Penicillin-Binding Proteins (PBPs) ont la capacité de catalyser la rupture de la liaison amide

du β -lactame des antibiotiques et de former un intermédiaire où la sérine de l'enzyme est liée de manière covalente au carbonyl du β -lactame. Cet intermédiaire est stable car la déacylation de l'enzyme est très lente. L'antibiotique est efficace si k_3 est petit ; k_3 est presque toujours inférieur à $< 0,001 \text{ s}^{-1}$.

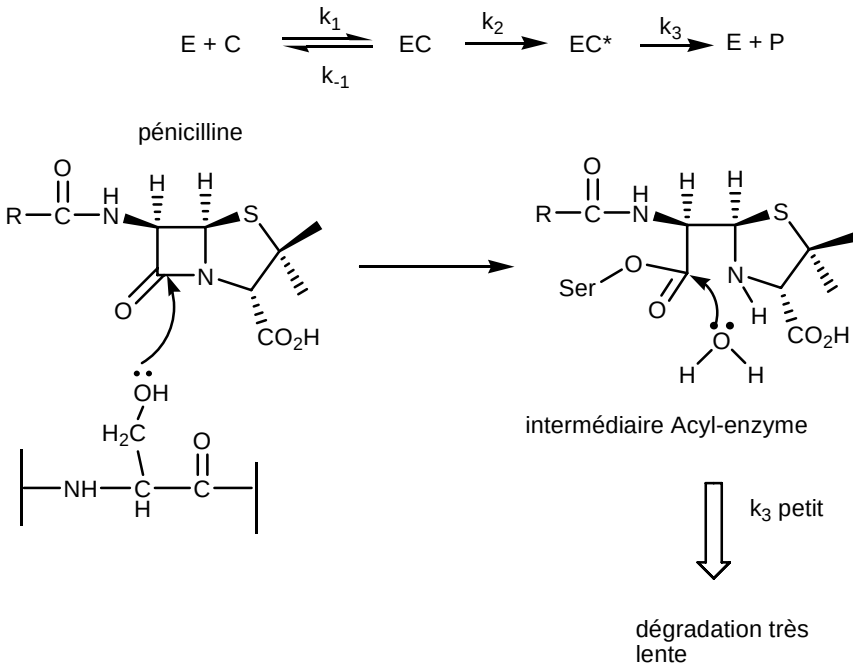


Figure 1 : Action des D,D-peptidases sur les antibiotiques

I.2.La résistance bactérienne

L'utilisation médicale de la pénicilline a débuté au milieu des années 40. Les premiers phénomènes de résistance sont apparus deux ans après son introduction[4],[5]. Il existe trois grands types de résistance bactérienne. La production de β -lactamases constitue un des mécanismes de résistances des bactéries contre les antibiotiques[3]. Ce sont des enzymes bactériennes qui catalysent l'hydrolyse extrêmement rapide de la liaison amide du β -lactame (antibiotique) afin de donner un acide aminé qui ne possède plus aucune

activité. Un autre mécanisme de résistance est l'altération des PBPs qui conduit à leur non-reconnaissance par l'antibiotique et à la survie de la bactérie. Ces deux phénomènes de résistance seront détaillés par la suite. Le dernier type de résistance est lié à la perméabilité de la membrane. Pour que les antibiotiques soient efficaces, ils doivent atteindre leurs cibles et accumuler une concentration leur permettant d'agir dans un laps de temps raisonnable. Les bactéries Gram-négatives et Gram-positives qui sont devenues résistantes aux tétracyclines surproduisent des protéines membranaires qui agissent comme des pompes d'efflux pour la drogue. La drogue est pompée hors de la bactérie plus vite que sa vitesse de diffusion, du coup la concentration en antibiotique reste basse et inefficace[5].

I.3. Les PBPs résistantes

Deux possibilités peuvent expliquer la résistance des PBPs. La première est que les PBPs existent sous forme d'un nombre accru de copies. La seconde est que les PBPs sont altérées par la sélection de mutants qui assument toujours leur rôle vis-à-vis du peptidoglycane mais qui ont une affinité moindre vis-à-vis des β -lactames. Ces deux procédés co-existent mais c'est le dernier qui s'est montré le plus versatile. La bactérie susceptible *S. aureus* contient quatre PBPs. PBP1, PBP2 et PBP3 ont des masses moléculaires importantes de l'ordre de 70-80 kDa alors que PBP4 a une masse moléculaire faible de l'ordre de 46 kDa. Pour la bactérie *S. aureus*, l'enzyme ciblée par les β -lactames est PBP2. Une comparaison de la composition en PBPs d'une souche résistante montre que cette bactérie contient les quatre mêmes PBPs que la bactérie susceptible et une cinquième enzyme additionnelle appelée PBP2a[6]. PBP2a est présente en quantité substantielle et est une enzyme de faible affinité vis-à-vis des β -lactames. Quand l'enzyme résistante est confrontée à un antibiotique β -lactamique, l'enzyme PBP2 n'a plus d'activité transpeptidase par contre l'activité

transpeptidase de l'enzyme PBP2a n'est pas affectée et la bactérie survit. En fait, la concentration en β -lactame atteinte n'est pas suffisante pour inactiver l'activité transpeptidase de cette nouvelle enzyme. En présence d'antibiotiques β -lactamiques, le domaine transglycosylase de PBP2 travaille en coopération avec le domaine transpeptidase de PBP2a afin de maintenir l'intégrité de la paroi bactérienne de la bactérie *S. aureus*[7].

I.4. Les β -lactamases à sérine

Les β -lactamases constituent le mécanisme de défense le plus efficace des bactéries contre les antibiotiques[3]. Ce sont des enzymes bactériennes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison amide du β -lactame (antibiotique) afin de donner un acide aminé qui ne possède plus aucune activité. On trouve ces enzymes généralement dans le périplasme des bactéries Gram-négatives et dans le milieu extérieur des bactéries Gram-positives. Les β -lactamases sont réparties en 4 catégories A, B, C et D, dont trois sont formées d'enzymes à sérine et une est formée d'enzymes à zinc (B). Dans le site actif des β -lactamases à sérine, il y a deux ensembles d'acides-amino. Le premier est l'ensemble catalytique constitué au minimum de cinq acides-amino : la sérine nucléophile, la base générale pour activer la sérine, la cavité pour stabiliser l'intermédiaire oxyanion (deux acides-amino) et le site de reconnaissance cationique du groupement carboxylate. Le second est l'ensemble d'identification qui complète les parties hydrophobes et hydrophiles présentées par la structure complète de l'antibiotique.

I.4.1. Les β -lactamases des classes A

Les enzymes les plus répandues sont les β -lactamases de la classe A[3]. La sérine du site actif de la β -lactamase acyle les antibiotiques de type β -lactame formant un intermédiaire acyl-enzyme similaire à celui formé avec les D,D-peptidases. La différence entre ces deux types d'enzymes lors du

mécanisme est purement quantitative. En effet avec les D,D-peptidases, k_3 est très petit (presque jamais au-dessus de $0,001 \text{ s}^{-1}$) et les acyl-enzymes sont très stables avec un temps de demi-vie supérieur à 10 minutes alors qu'avec les β -lactamases, des valeurs de k_3 très élevées sont observées, supérieures à 10^4 s^{-1} .

Par analogie avec les protéases à sérine qui hydrolysent aussi une liaison amide et impliquent un intermédiaire acyl-enzyme, le site actif des β -lactamases contient un acide aminé qui va augmenter la nucléophilie du groupement hydroxyle de Ser70 en agissant comme une base catalytique lors de l'acylation. Dans le cas des β -lactamases de la classe A, deux écoles s'affrontent.

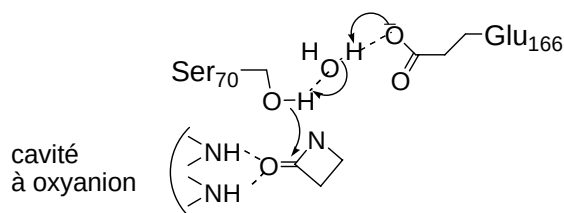


Schéma 3 : Glu166, base dans l'étape d'acylation

Une des hypothèses est que ce rôle est joué par Glu166. Les données cristallographiques soulignent la présence d'une molécule d'eau W1, formant un pont entre le groupement hydroxyle de Ser70 et le groupement carboxylate de Glu166. Cette molécule d'eau est retrouvée dans la même position dans beaucoup de structures à haute résolution des β -lactamases de la classe A. Glu166 semble malgré tout trop loin de Ser70 pour agir directement. Des études de modélisation moléculaire suggèrent que la molécule d'eau peut agir comme un relais pour le transfert de proton entre Ser70 et Glu166. Ser70 activé peut alors attaquer le carbonyle et un proton est donné à l'atome d'azote du β -lactame à travers le réseau de liaisons

d'hydrogène impliquant une seconde molécule d'eau W2, Lys73 et Lys234 et le groupement hydroxyle de Ser130, qui agit comme le dernier donneur de proton. L'hydrolyse de l'acyl-enzyme aura lieu ensuite par un mécanisme symétrique où Glu166 active la molécule d'eau W1 pour l'attaque du groupement carbonyle de l'acyl-enzyme. Durant l'acylation et la déacylation, des états de transition tétraédriques sont formés dans lesquels l'oxygène du groupement carbonyle est chargé négativement. Cette charge est stabilisée par liaison hydrogène avec les groupements amides de Ser70 et du résidu 237 qui forment la cavité à oxyanion.

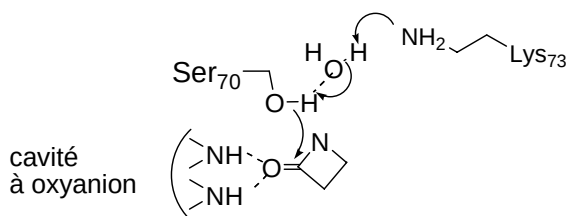


Schéma 4 : Lys73, base dans l'étape d'acylation ?

La seconde hypothèse repose principalement sur les propriétés structurales du mutant de la β -lactamase TEM-1 où Glu166 est remplacé par Asn, qui forme un intermédiaire acyl-enzyme dont le temps de vie est long. Les auteurs de ces recherches maintiennent que Glu166 n'est pas indispensable dans l'étape d'acylation. Ils proposent un mécanisme qui n'est pas symétrique avec deux bases différentes, Lys73 et Glu166, participant à l'acylation et à la déacylation respectivement. D'après eux, le groupement amine de la chaîne latérale de Lys73 agit comme un abstracteur de proton afin d'augmenter la nucléophilie de la sérine du site actif. L'enzyme doit fournir un environnement local favorable afin de permettre à la lysine de rester déprotonée à pH neutre. La réduction forte de pK_a (5-6 unités de pH) pour le groupement ammoniumalkyle de Lys234 résulterait de liaisons hydrogène avec Ser70, Asn132 et Ser130, et par un champ électrique positif créé par le dipôle de l'hélice α_2 et Lys234. Cependant dans

l'enzyme naturelle, le groupement carboxylate de Glu166 est proche de la chaîne latérale et donc de l'amine de Lys73, la charge négative de Glu166 pourrait gêner l'efficacité catalytique de l'acylation. En conséquence, la suppression de ce résidu chargé négativement devrait augmenter la vitesse d'acylation. Toutefois quand on remplace Glu166 par un résidu neutre par mutagenèse dirigée (Ala, Cys, Tyr ou Asn), l'étape d'acylation est significativement gênée.

Plusieurs mutants de Glu166 ont été préparés avec des enzymes variées de la classe A, et lorsque des études cinétiques détaillées sont réalisées, il apparaît que les vitesses d'acylation et de déacylation diminuent. De plus, comme rapporté pour la β -lactamase I *B. cereus*/ H, la mutation de Lys73 en Arg cause une diminution d'un facteur 100 de la valeur de k_2 pour l'hydrolyse de la benzylpénicilline, alors que la mutation de Glu166 en Asp provoque une diminution d'un facteur 2000 dans les valeurs de k_2 et k_3 . Cette observation semble indiquer un rôle plus important pour Glu166 que pour Lys73 dans l'étape d'acylation. Toutes ces études cinétiques semblent affaiblir l'hypothèse d'un mécanisme non symétrique et sont plus en accord avec le mécanisme proposé par Lamotte-Brasseur et *al.*, où la base générale est Glu166 dans les étapes d'acylation et de déacylation[3].

Finalement, la dépendance au pH de la modification chimique des groupements aminés et le titrage RMN des résidus lysines marqués au ^{13}C dans la β -lactamase TEM-1 indiquent clairement la valeur du pKa (>10) de la chaîne latérale de Lys73. Cette valeur de pKa n'est pas suffisamment basse dans l'enzyme sauvage, la Lys73 est donc un mauvais candidat pour l'abstraction du proton en catalyse. Mais plus récemment, les cinétiques enzymatiques, la RMN ^{15}N , les calculs théoriques ont montré une valeur de

pKa de 8-8,5 pour Lys73[8]. Ceci contredit les résultats obtenus auparavant.

En 2002, Minasov et *al.* ont publié la structure à ultra haute résolution (0,85Å) de la β -lactamase TEM-1 en complexe avec un analogue de l'état de transition[9]. Cette structure permet d'observer l'état de protonation de Lys73, Glu166 et W1004. Elle permet aussi de déterminer la manière dont ces entités interagissent avec Ser70 et l'analogue de l'état de transition. Le résultat le plus intéressant qui émerge de cette structure est l'état de protonation de Glu166 et le réseau de liaisons hydrogène dans lequel il participe qui mime l'intermédiaire de haute énergie de l'acylation. Le proton de l'acide glutamique est donné à W1004 pour former une liaison hydrogène. Cette molécule d'eau donne à son tour un de ses protons à Ser70 qui peut seulement accepter un proton car elle forme un adduit avec l'analogue de l'état de transition. Une interprétation de ces observations est que Glu166, agissant comme la base catalytique pendant l'acylation, active W1004 qui active à son tour Ser70. Cette activation mène à un transfert de proton de la sérine à l'acide glutamique via une molécule d'eau. Pendant ce temps-là, le groupe partant est activé en acceptant un proton de Ser130 qui est aussi visible dans cette structure. Le rôle de Lys73 est peut-être d'activer électrostatiquement Ser70 et Ser130. Lys 73 peut aussi transférer un proton à Ser130 pour remplacer celui qu'elle a donné au groupe partant.

Récemment Mobashery et *al.* ont démontré que l'étape d'acylation procéderait par une double participation des résidus Lys73 et Glu166 qui ont chacun le potentiel d'agir comme la base générale afin d'activer Ser70[10]. L'existence de ces deux voies menant aux espèces tétraédriques est cohérente avec les données expérimentales des différents mutants de la

β -lactamase TEM-1. Par contre, pour la déacylation, tous les auteurs maintenant sont d'accord : Glu166 est la base.

Malgré la conservation de certains motifs, les β -lactamases de la classe A démontrent une vaste diversité de séquences ainsi que de leurs propriétés catalytiques. En terme de résistance bactérienne, les β -lactamases de la classe A se subdivisent en trois sous-classes prédominantes : TEM/SHV (pénicillinases), PER/OXA/TOHO (céphalosporines) et CTX-M (NMC-A, carbapénèmase). De nouvelles variantes de TEM, SHV ou d'autres enzymes de la classe A apparaissent continuellement en milieu hospitalier. Certaines de ces enzymes sont résistantes vis-à-vis des céphalosporines les plus récentes, d'autres sont résistantes vis-à-vis des carbapénèmes et sont connues sous le nom d' « expanded-spectrum β -lactamases » (ESBL).

I.4.2. Les β -lactamases de la classe C

Les β -lactamases de la classe C partagent avec les β -lactamases de la classe A un mécanisme similaire dans l'étape d'acylation du site actif et dans l'étape de déacylation durant l'hydrolyse des β -lactames. Elles ont été originellement appelées cephalosporinases à cause de leur préférence envers les substrats de type céphalosporines. Elles sont présentes dans la plupart des bactéries Gram-négatives et sont encodées chromosomiquement dans plusieurs organismes. La structure de ces enzymes a été révélée pour la première fois à partir des souches bactériennes de P99, *C. freundii* et *E. cloacae*[11]. Les structures révèlent une similarité globale par rapport aux β -lactamases de la classe A. Ser64, Lys67, Lys315 et Tyr150 correspondent respectivement aux résidus Ser70, Lys73, Lys315 et Ser130[12].

Dans la première étape, Ser64 attaque la fonction carbonyle du β -lactame, ouvrant le β -lactame et formant un intermédiaire acyl-enzyme. Dans la

seconde étape, cet intermédiaire acyl-enzyme est attaqué par une molécule d'eau activée libérant le β -lactame hydrolysé[13]. Les détails de cette étape d'hydrolyse restent controversés. Des études structurales antérieures suggèrent que le résidu Tyr150 est la base catalytique qui a activé la molécule d'eau pour son attaque de l'intermédiaire acyl-enzyme[11],[12]. La substitution du résidu Tyr150 par Phe ou Ser réduit l'activité de l'enzyme d'un facteur 10^4 . La viabilité de cette proposition est diminuée par des études RMN et de mutagenèse dirigée. D'autres études ont montré que ces substitutions affectaient seulement légèrement la catalyse pour les substrats qui s'hydrolysent lentement comme la cefotaxime[14]. Ce résultat est contradictoire avec les études précédentes et ne permet pas de confirmer le rôle de Tyr150. Les récentes données de Kato-Toma et *al.* indiquent une valeur de pKa normal pour Tyr150[15]. Ceci implique une réévaluation de la seconde partie de la réaction. Oefner et *al.* ont déduit de la structure cristalline de la β -lactamase de classe C de la bactérie *Citrobacter freundii* que Tyr150 déprotoné sert de base générale pour la seconde étape de la réaction dans l'activation d'une molécule d'eau pour l'étape de déacylation[11]. Un résidu Tyr150 protoné ne peut pas exécuter cette fonction. Ces observations soutiennent la participation de Lys67 dans l'activation de la sérine durant l'acylation. Le rôle de Lys67 consisterait à extraire un proton de Tyr150, qui à son tour, activerait la sérine. En outre, pour l'étape de déacylation, en absence d'un résidu équivalent à Glu166 pour les β -lactamases de la classe A, les structures cristallines suggèrent que l'approche de la molécule d'eau est effectuée sur la face β d'un antibiotique de type β -lactame. Bulychiev et *al.*[16] proposent que l'atome d'azote du β -lactame est idéalement positionné pour promouvoir l'addition de l'eau sur l'acyl-enzyme lors de la déacylation. Deux composés ont été synthétisés comme sondes mécanistiques pour explorer si la molécule d'eau

hydrolytique approche réellement les intermédiaires acyl-enzyme par la face β et pour étudier le rôle du cycle aminé dans la réaction d'hydrolyse.

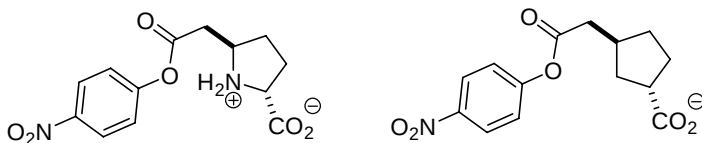


Schéma 5 : Molécules utilisées comme sondes

La première molécule acyle la sérine du site actif de la β -lactamase Q908R, et subit ensuite la déacylation. La deuxième molécule acyle le site actif, mais n'ayant pas l'amine requise dans sa structure, l'intermédiaire acyl-enzyme résiste à la déacylation. La deuxième molécule est donc un inhibiteur irréversible de l'enzyme alors que la première est un substrat. Une structure cristallographique d'une espèce acyl-enzyme de la β -lactamase AmpC et du moxolactame confirme cette proposition[13]. Cet acyl-enzyme suggère que Tyr150 et l'atome d'azote cyclique du substrat lui-même stabilisent l'état de transition hydrolytique et les inhibiteurs de type β -lactame peuvent physiquement agir en bloquant cette activation.

Les céphalosporines de troisième génération ont été utilisées efficacement contre les β -lactamases de la classe C. Cependant, une β -lactamase de la classe C, capable d'hydrolyser la plupart des céphalosporines de troisième génération, a été isolée pour la première fois dans les années 80 et encore plus récemment d'une souche virulente de *E. cloacae*[17]. Ces enzymes, nommées extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), montrent des résistances envers les céphalosporines de troisième génération et les monobactames mais n'affectent pas les cephamycines ou les carbapénèmes[18]. D'après la structure de l'enzyme *E. cloacae*, Crichlov et al. suggèrent que la flexibilité conformationnelle de la boucle Ω facilite

l'hydrolyse des céphalosporines de troisième génération en permettant une plus grande mobilité de la partie acyle[19].

I.4.3. Les β -lactamases de la classe D

Ces enzymes sont originellement appelées oxacillinases pour leur capacité à hydrolyser l'oxacilline et la cloxacilline[20]. Ce n'est que récemment que ces enzymes ont été le sujet d'études structurales et mécanistiques. Ceci est dû dans une certaine mesure à l'apparition récente de microbes pathogènes d'importance médicale mais aussi dans une plus grande mesure à leurs propriétés hétérogènes et à la difficulté historique de leur analyse *in vitro*[21],[22],[23]. Les propriétés de l'enzyme ont été explorées pour expliquer ces difficultés. Une possibilité serait un équilibre entre les formes monomère et dimère de l'enzyme avec une dépendance possible d'un métal bivalent[24],[25]. En fait, le paramètre critique et source de confusion contribuant à la variabilité des analyses *in vitro*, le CO_2 , a été identifié par Golemi et al[26].

La structure cristalline de la β -lactamase Oxa-10 de *P. aeruginosa* a été décrite dans la littérature simultanément par Paetzel et al. et par Golemi et al. en décembre 2000[27],[28].

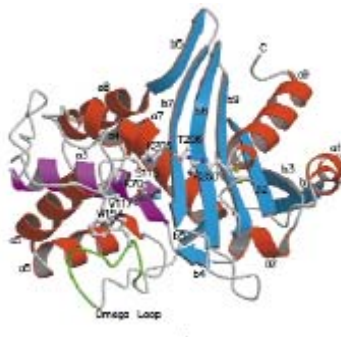


Figure 2 : Représentation structurale d'un monomère d'Oxa-10

Cette structure a révélé que la β -lactamase Oxa-10 et les β -lactamases des classes A et C, malgré une similarité de séquence très faible, ont une structure tertiaire globalement similaire. La plupart des différences se trouvent dans le site actif. Le groupement hydroxyle des chaînes latérales de Ser67 agirait probablement comme le nucléophile dans l'étape d'acylation. Les analyses cristallographiques ont aussi révélé que la lysine du site actif était N-carboxylée (résultat de l'addition de la chaîne latérale aminée sur le CO_2). L'acide carbamique formé s'ionise alors facilement en carbamate qui est en contact avec la sérine du site actif par liaisons hydrogènes. Le rôle de cet acide aminé inhabituel est à la fois le rôle de base générale pour l'étape d'acylation (activation de la sérine) et de déacylation (activation d'une molécule d'eau)[29].

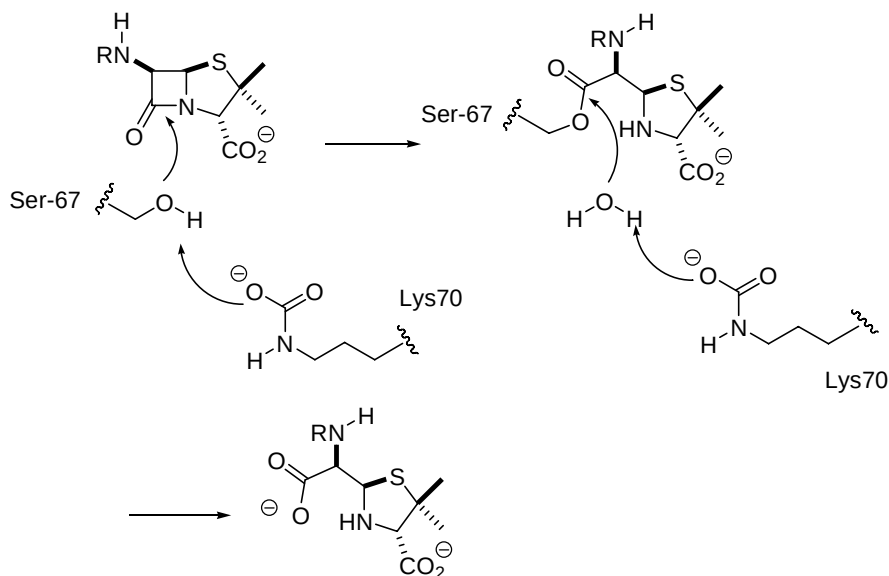


Schéma 6 : Mécanisme probable d'hydrolyse d'une pénicilline par Oxa-10

Toutes les données suggèrent que ces enzymes sont spécifiques. La valeur de ces enzymes est leur capacité à s'adapter, sous la pression de la sélection, à un β -lactame spécifique.

II. Les métalloprotéases à zinc

Toutes les métalloprotéases connues utilisent un atome de zinc comme catalyseur pour effectuer l'hydrolyse de la liaison amide[30],[31]. L'ion zinc est généralement coordonné à trois groupements donneurs (souvent des histidines) et à une molécule d'eau. Il y a attaque nucléophile de la molécule d'eau sur le carbonyle du substrat amide. Il se forme alors un oxyanion stabilisé par l'ion zinc. Le zinc fait une liaison de coordination avec le carbonyle et la molécule d'eau. Ensuite, l'acide glutamique donne son proton à l'atome d'azote, avec libération d'une amine et d'un acide carboxylique.

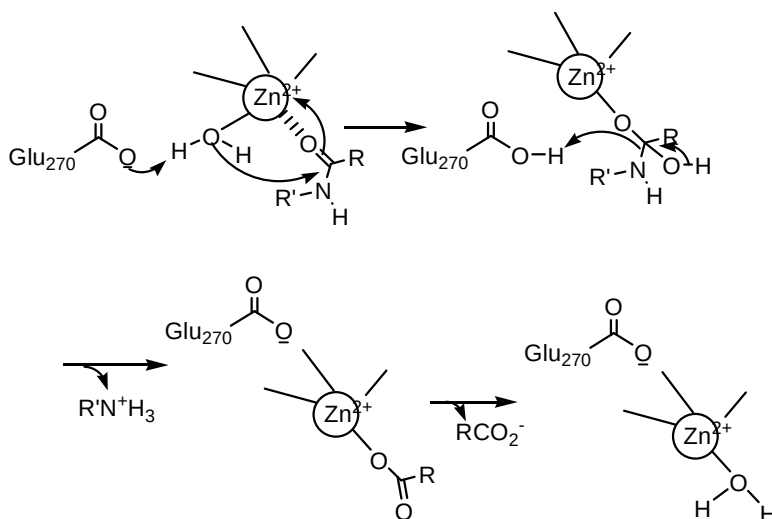


Schéma 7 : Mécanisme d'hydrolyse d'un peptide par la carboxypeptidase A

Ces enzymes ont des rôles physiologiques importants. À titre d'exemple, citons l'ACE (angiotensin converting enzyme) et la NEP (neutral endopeptidase) qui sont responsables de différents problèmes cardiovasculaires et qui sont impliquées dans l'hypertension, et les MMPs (matrix metalloproteases) qui dégradent les protéines structurales dans la matrice extracellulaire comme le collagène.

Les bactéries possèdent aussi des enzymes à zinc : les β -lactamases de classe B contribuent au mécanisme de défense des bactéries contre les antibiotiques. Ces enzymes, produites par les bactéries sont des enzymes extracellulaires ou périplasmiques qui utilisent des ions zinc comme cofacteurs. Les métallob- β -lactamases hydrolysent les antibiotiques de type β -lactame même les carbapénèmes comme l'imipenem alors que ces antibiotiques-là sont normalement stables vis-à-vis des autres β -lactamases. Les métallob- β -lactamases sont des petites enzymes qui partagent un motif commun $\alpha\beta\beta\alpha$, avec un sandwich β central et deux hélices α de chaque côté. Ce motif a un site de fixation du métal localisé à un bord du sandwich β . Ce site est occupé par un atome de zinc bivalent orientant une disposition tétraédrique de trois histidines et d'une molécule d'eau. Il y a un consensus pour dire que le ligand eau de l'ion zinc est le nucléophile conduisant à l'ouverture du β -lactame, mais il n'y a pas de données directes établissant ce rôle. Les métallob- β -lactamases possèdent une grande diversité de structures primaires qui incluent notamment la création dans quelques enzymes d'un second site de fixation du zinc. Dans ces enzymes binucléaires, les deux atomes de zinc sont séparés par une distance de 3,5 Å et participent tous les deux à la coordination de l'eau.

Les β -lactamases à zinc sont-elles actives avec un ou deux atomes de zinc ? La controverse persiste, et des mécanismes pour les deux états de l'enzyme sont proposés. Le mécanisme catalytique de l'hydrolyse de la benzylpénicilline par la β -lactamase mono-zinc de *B. cereus* est décrit ci-dessous[32].

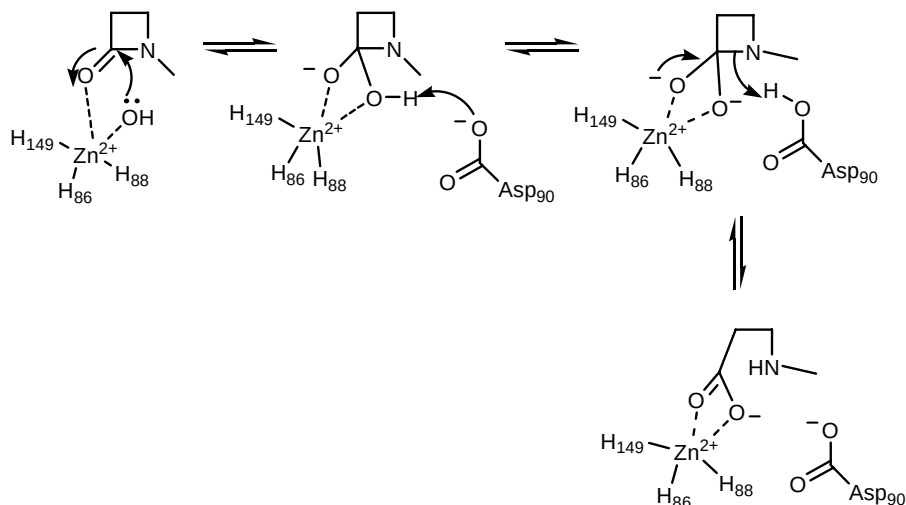


Schéma 8 : Mécanisme d'hydrolyse de la benzylpénicilline par la β-lactamase mono-zinc

L'ion zinc (II) coordine l'oxygène du groupement carbonyle et le groupement hydroxyle lié au zinc attaque le carbonyle. L'oxyanion résultant est stabilisé par $Zn(II)$. Ceci est suivi par la déprotonation par Asp90 pour mener à un intermédiaire tétraédrique dianionique. Asp90 donne son proton à l'azote ce qui conduit à l'ouverture du cycle.

Le mécanisme catalytique de l'hydrolyse de la nitrocéfine par la métallo-β-lactamase di-zinc de *B. fragilis* est décrit ci-dessous[33].

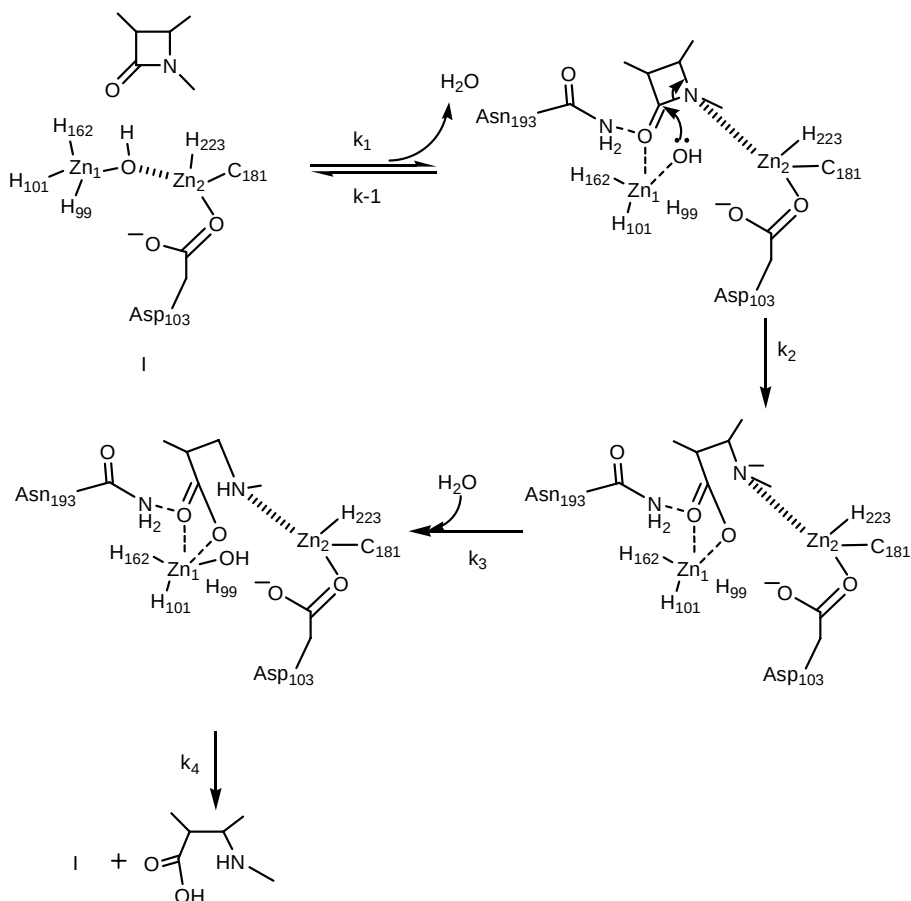


Schéma 9 : Mécanisme d'hydrolyse d'un antibiotique par la métallo-β-lactamase di-zinc

Le nucléophile est préformé : il s'agit d'un groupement hydroxyle lié à un atome de zinc. L'atome Zn_1 fait une liaison de coordination avec l'oxygène du groupement carbonyle alors que l'atome Zn_2 fait une liaison de coordination avec l'atome d'azote du lactame. L'attaque du nucléophile mène à l'ouverture du cycle et à la stabilisation d'un oxyanion par Zn_1 et par Asn193. L'azote du lactame est libéré comme un anion qui est stabilisé par Zn_2 qui agit comme un acide de Lewis. De l'eau va ensuite protoner l'intermédiaire et ainsi mener à la libération du produit inactif.

Les métallob- β -lactamases sont classées dans trois sous-classes : B1, B2 et B3. La sous-classe B1 présente un profil de substrat large. Les enzymes appartenant à cette sous-classe sont les suivantes : BcII de *Bacillus cereus*, CcrA de *Bacteroides fragilis*, IMP-1 et VIM-1 de *P. aeruginosa*, et BlaB de *Chryseobacterium meningosepticum*. Dans la sous-classe B2, les enzymes hydrolysent seulement efficacement les carbapénèmes et sont actives avec un seul atome de zinc. Elles se trouvent dans la bactérie *Aeromonas hydrophila* (CphA). Les enzymes de la sous-classe B3 présentent un large spectre d'activité avec une préférence pour les céphalosporines. La sous-classe B3 comprend l'enzyme L1 de *Stenotrophomonas maltophilia*. La structure tertiaire de l'enzyme L1 se trouve au milieu de la figure 3[34]. A sa gauche est représentée la β -lactamase CcrA de *Bacteroides fragilis* et à sa droite la β -lactamase BcII de *Bacillus cereus*.

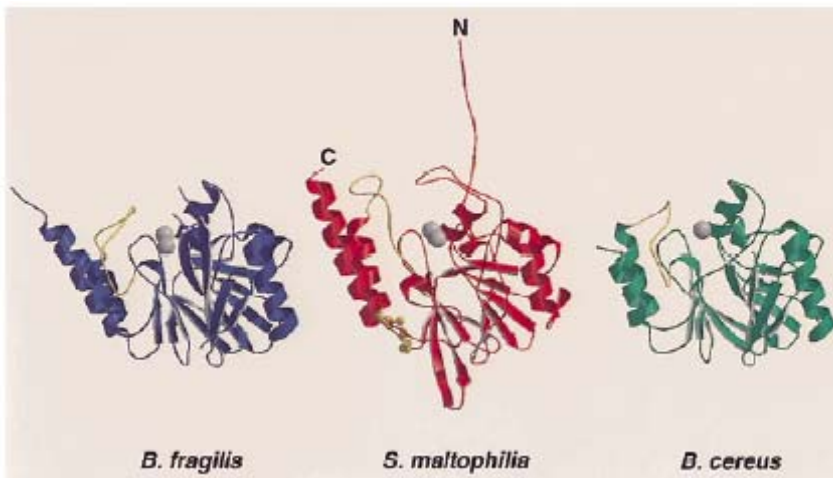


Figure 3 : Représentation de la structure de L1, CcrA et BcII

La comparaison de ces trois structures montre que la topologie globale est conservée malgré des séquences différentes.

Les enzymes VIM, qui ont été observées pour la première fois en 1997, ont été bien moins étudiées biochimiquement[35]. Il y a une homologie de séquences entre VIM et IMP (approximativement 30-40%) et le modèle de reconnaissance des substrats de type β -lactame est similaire[36]. Sept variantes de VIM ont été isolées pour le moment[37].

III. Les inhibiteurs des enzymes bactériennes

L'introduction de la pénicilline G en essais cliniques il y a environ 60 ans représente un des progrès majeur de la chimiothérapie moderne. Le succès des pénicillines est dû à leur efficacité et à leur spécificité. Cependant, dès l'introduction des β -lactames comme agents antibactériens, leur efficacité est contrée par l'apparition de nouvelles souches bactériennes résistantes. En conséquence, de nouvelles molécules sont progressivement introduites, mais de nouvelles résistances sont apparues. Ce phénomène est une préoccupation médicale majeure. Les recherches actuelles en antibiothérapie suivent deux grandes stratégies : soit la recherche de nouvelles enzymes-cibles dans la bactérie dont l'inhibition serait létale, soit la poursuite des travaux dans le domaine des inhibiteurs de PBPs (D,D-peptidases et β -lactamases), en exploitant les acquis récents concernant la structure et le fonctionnement de ces enzymes. Une stratégie thérapeutique consiste à administrer simultanément un inhibiteur de β -lactamases et un antibiotique. Beaucoup d'exemples d'inhibiteurs de β -lactamases sont décrits dans la littérature. Nous allons présenter différents exemples d'inhibiteurs de β -lactamases possédant un cycle β -lactame dans un premier temps et des inhibiteurs non β -lactamiques dans un second temps.

III.1. Les β -lactames

Il y a seulement trois inhibiteurs de β -lactamases en utilisation clinique. Il s'agit de l'acide clavunique, du sulbactam et du tazobactam[38],[39].

L'acide clavunique est le premier inhibiteur utilisé en clinique. Il a été isolé pour la première fois en 1976 et est produit par la bactérie *Streptomyces clavuligerus*. L'acide clavunique est un inhibiteur sélectif et irréversible des β -lactamases de la classe A avec des IC_{50} variant entre 0,01 et 1 μ M. Il possède une faible activité antibactérienne et est donc principalement utilisé en combinaison avec l'amoxicilline (Augmentin[®]).

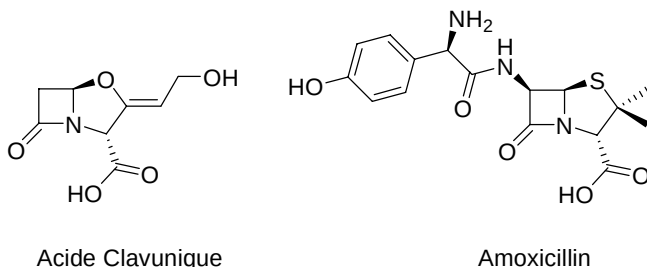


Schéma 10 : Combinaison d'un inhibiteur de β -lactamase et d'un antibiotique

L'acide clavunique agit comme un inhibiteur suicide et acyle efficacement toutes les β -lactamases de la classe A. Par contre, ce n'est pas un inhibiteur des D,D-peptidases et des β -lactamases de la classe C.

Le sulbactame est le premier de la famille des sulfones à avoir été synthétisé en 1978 par le laboratoire Pfizer. Sa structure est proche de celle des pénicillines. Comme l'acide clavunique, le sulbactame est essentiellement un inhibiteur suicide des β -lactamases de la classe A avec des valeurs d' IC_{50} oscillant entre 0,1 et 100 μ M. C'est aussi un inhibiteur de la D,D-peptidase PBP2. Le mécanisme d'action du sulbactame est

similaire à celui de l'acide clavunique. Le sulbactame est utilisé en association avec l'ampicilline en clinique.

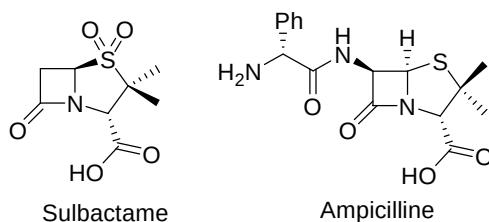
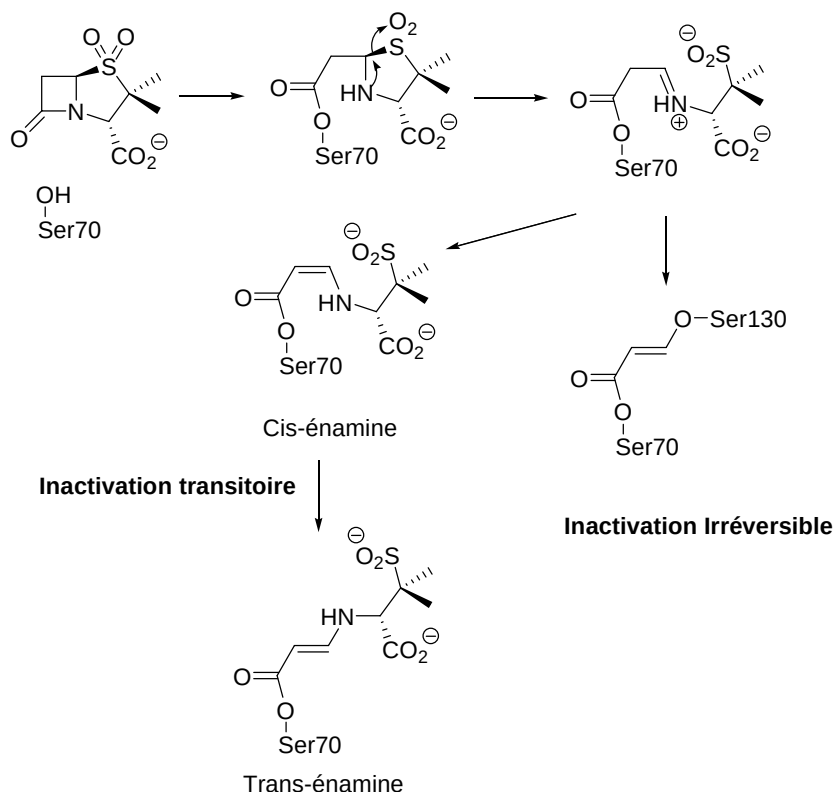


Schéma 11 : Association de Sulbactame et d'Ampicilline

Les inhibiteurs suicides forment un complexe stable avec l'enzyme visant à l'inactiver de façon permanente. L'enzyme reconnaît l'inhibiteur comme son substrat et entame le processus de modification de ce dernier. L'étape suivante est celle au cours de laquelle l'inhibiteur modifié devient très réactif et se lie de façon très stable à l'enzyme. L'enzyme contribue ainsi à sa propre inactivation irréversible d'où le nom d'inhibition « suicide ». Le mécanisme d'inactivation des β -lactamases de la classe A par le sulbactame est présenté ci-dessous[40].



L'iminium formé par ouverture du cycle peut évoluer de deux manières. Soit l'iminium se transforme en énamine par tautomérie et inhibe transitoirement l'enzyme. Soit l'iminium réagit avec la Ser130 et inhibe de manière irréversible l'enzyme.

L'hémisynthèse du tazobactame a été décrite en 1987 par l'équipe de Micetich et *al.*[41]. Le tazobactame est un inhibiteur efficace des β -lactamases avec une bonne activité vis-à-vis de la plupart des β -lactamases de la classe A et de quelques β -lactamases de la classe D et une activité modérée vis-à-vis des β -lactamases de la classe C[42]. Les IC_{50} varient

entre 0,01 et 10 μM pour les β -lactamases de la classe A, entre 0,1 et 100 μM pour les β -lactamases de la classe D et entre 1 et 100 μM pour les β -lactamases de la classe C. L'amélioration du spectre d'action est probablement due à l'interaction du substituant triazole en position 2 β avec la protéine. Le tazobactame est actuellement combiné avec la piperacilline. Cette combinaison est utilisée contre de nombreuses infections telles que les pneumonies et les infections abdominales.

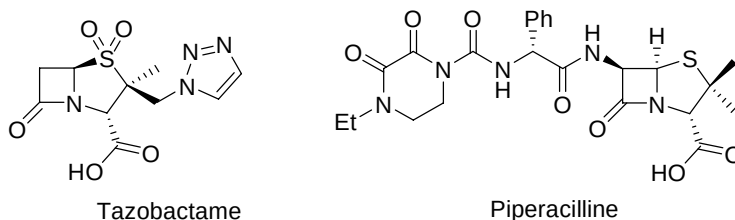


Schéma 13 : Association de Tazobactame et de Piperacilline

Les carbapénèmes sont des antibiotiques efficaces avec un large spectre d'activité antibactérienne et sont généralement stables vis-à-vis de la plupart des β -lactamases importantes au niveau clinique. Beaucoup de carbapénèmes sont aussi des inhibiteurs de β -lactamases. La thienamycine a été isolée pour la première fois à partir de la souche *Streptomyces cattleya*, en 1978[43]. La thienamycine et ses dérivés sont des puissants inhibiteurs de β -lactamases. L'imipénème est couramment utilisé en clinique à cause de son efficacité contre les cibles D,D-transpeptidases et la plupart des β -lactamases à sérine. En fait, l'imipénème a en même temps une activité antibiotique et inhibitrice des β -lactamases. Les IC_{50} varient entre 0,01 et 100 μM pour les β -lactamases de la classe A, entre 0,1 et 10 μM pour les β -lactamases de la classe C et entre 1 et 100 μM pour les β -lactamases de la classe D.

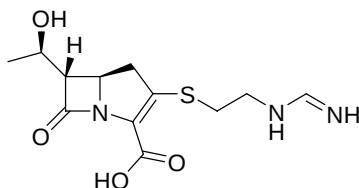


Schéma 14 : Imipénème

Beaucoup de β -lactames mono-cycliques provenant de sources naturelles ont une affinité importante pour les β -lactamases des classes A et C. L'Aztreonam est un inhibiteur efficace des β -lactamases de la classe C avec des IC_{50} entre 0,01 et 1 μM .

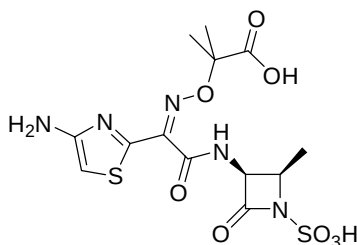


Schéma 15 : Aztreonam

Les métallob- β -lactamases se distinguent par un large spectre d'activité. Elles sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et même les inhibiteurs des β -lactamases à sérine comme l'acide clavunique. En conséquence, peu d'exemples d'inhibiteurs de métallob- β -lactamases possédant un cycle β -lactame sont décrits dans la littérature. Bien que la thioxocéphalosporine soit hydrolysée par la métallob- β -lactamase BcII, elle agit aussi comme un inhibiteur compétitif de l'enzyme durant l'hydrolyse de substrats plus réactifs comme la nitrocéfine avec un K_i de 720 μM [44].

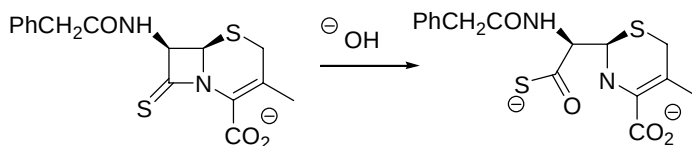


Schéma 16 : Inhibiteurs développés par Tsang et al.

Le produit d'hydrolyse de la céphalosporine est un meilleur inhibiteur compétitif avec un K_i de 96 μM .

Buynak et *al.* ont rapporté la synthèse et l'évaluation d'inhibiteurs qui inactivent à la fois les β -lactamases à sérine et à zinc[45].

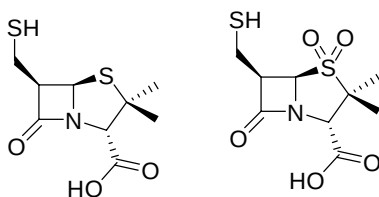


Schéma 17 : Inhibiteurs développés par Buynak

Ces deux composés (et leurs énantiomères) inhibent simultanément certains représentants des β -lactamases des classe A (TEM-1) et C (P99) et des métallob- β -lactamases (BcII et L1). Le second composé est le meilleur inhibiteur avec des IC_{50} variant de 0,1 à 10 μM .

Beaucoup de composés ayant une activité d'inhibiteurs de β -lactamases ont été décrits dans la littérature. Pour contrer l'inactivation des antibiotiques par les β -lactamases, des combinaisons (mélanges ou associations covalentes) de β -lactames et d'inhibiteurs de β -lactamases ont été introduites en clinique. Cependant, toutes ces drogues sont des β -lactames, et à force d'être exposées à ces molécules, les bactéries acquièrent des résistances. Pour sortir du cercle vicieux, les inhibiteurs non β -lactamiques peuvent être une alternative.

III.2. Les inhibiteurs non β -lactamiques

III.2.1. Les inhibiteurs des β -lactamases des classes A, C et D

Une grande variété d'inhibiteurs de β -lactamases à sérine ont été obtenus à partir de sources naturelles ou par le design et la synthèse. Les plus efficaces de ces derniers sont les inhibiteurs basés sur le mécanisme ou les analogues des états de transition. Ces analogues comprennent en particulier beaucoup de dérivés boronates et phosphates ou phosphonates[46].

Les acides boroniques sont des inhibiteurs des β -lactamases à sérine. Ils agissent comme des analogues de l'état de transition. Ils forment des adduits réversibles avec la sérine du site actif et adoptent une géométrie tétraédrique qui ressemble à celle d'un intermédiaire à haute énergie. En 1995, Jones et al. ont utilisé la structure cristallographique de la β -lactamase RTEM-1 pour le design rationnel d'un analogue de l'état de transition[47]. Cet acide boronique a été conçu en considérant les interactions de l'enzyme avec un substrat céphalosporine.

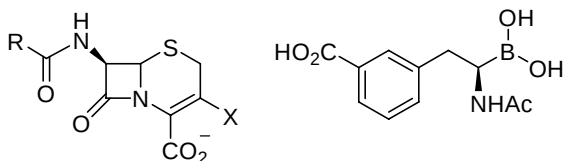


Schéma 18 : Design d'un analogue à partir d'une structure cristallographique

Il est envisagé que le bore électrophile réagirait dans le site actif avec Ser70 pour former un intermédiaire tétraédrique stabilisé par la cavité à oxyanion. De plus, le groupement acétyle est correctement orienté pour réaliser les liaisons hydrogène avec Ala237 et Asn132, alors que le groupement carboxylate est convenablement positionné pour interagir avec Arg244, Ser235 et Lys234. Cette molécule est un inhibiteur de haute affinité par rapport à RTEM-1 avec un K_i de 110 nM.

En 1996, Strynadka et al. ont perfectionné la structure de l'acide boronique décrit en 1995 en identifiant les interactions critiques observées dans la structure cristallographique de l'intermédiaire acyl-enzyme entre la benzylpénicilline et TEM-1[48]. En utilisant la modélisation moléculaire, des variantes d'acides boroniques contenant les substituants qui mimeraient mieux l'intermédiaire pénicilline G/TEM-1 ont été synthétisées.

Les caractéristiques clefs du design d'un inhibiteur acide boronique sont les suivantes :

- Interaction du bore électrophile avec Ser70 pour former un intermédiaire tétraédrique de telle façon que la charge négative du bore soit stabilisée par la cavité à oxyanion de l'enzyme
- Orientation correcte de la chaîne latérale phenylacétyle pour obtenir des liaisons hydrogène avec Ala237 et Asn132
- Position stratégique du carboxylate afin d'obtenir des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène avec les résidus Lys234, Ser235 et Arg244.

En utilisant toutes ces informations et la modélisation moléculaire, un groupement phenylacetamido et un groupement phénol sont incorporés menant aux molécules suivantes.

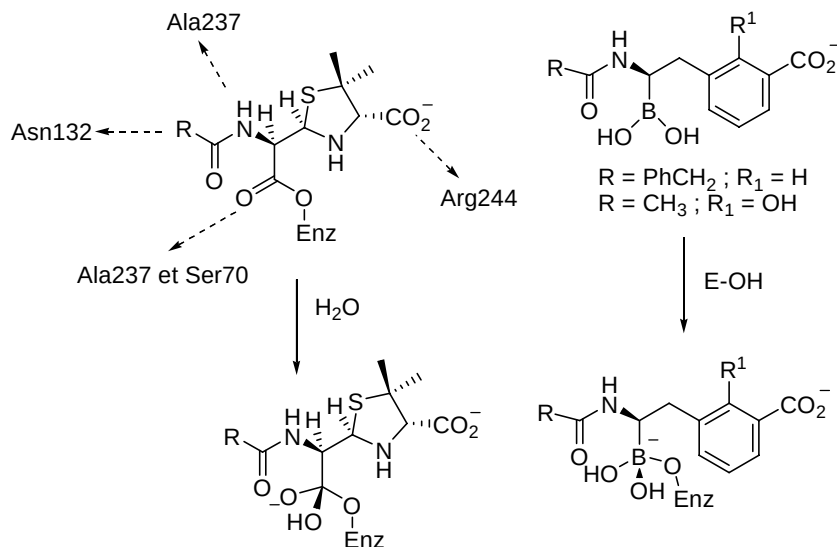


Schéma 19 : Intermédiaire tétraédrique de déacylation

Ces produits ont montré des propriétés inhibitrices plus grandes que la molécule d'origine ($K_i=110$ nM) avec des valeurs de K_i de 5,9 nM et de 13 nM. L'affinité de ces analogues est comparable à celle des inhibiteurs utilisés en clinique (acide clavunique, sulbactame, et tazobactame).

En partant de la structure cristallographique du complexe de la β -lactamase Amp-C avec l'acide m-aminophénylboronique, Weston et al. ont modélisé différents composés dans le site actif de la protéine. Finalement, 37 molécules ont été testées sur la β -lactamase Amp-C. Le plus puissant de ces composés est représenté ci-dessous.

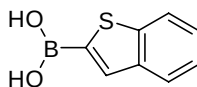


Schéma 20 : Inhibiteur découvert par Weston et al.

Cette molécule a un K_i de 27 nM. En plus, ces inhibiteurs renforcent l'activité des antibiotiques comme l'amoxicilline et le ceftazidime contre les bactéries qui expriment des β -lactamases de la classe C.

L'inhibition des β -lactamases à sérine par une molécule possédant un groupement phosphate implique la phosphorylation du groupement hydroxyle de la sérine du site actif et le départ d'un groupement partant du phosphore.

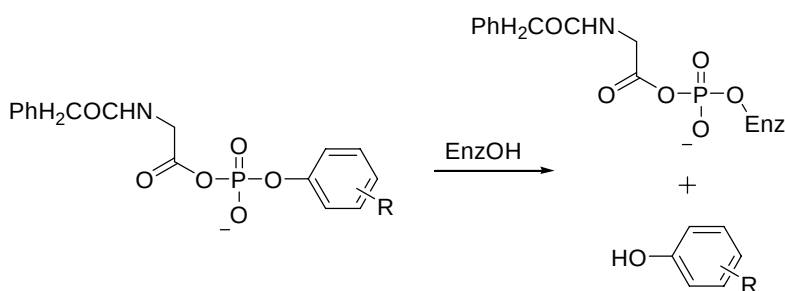


Schéma 21 : Mécanisme probable d'inhibition

Initialement, il a été découvert que les β -lactamases à sérine catalysent l'hydrolyse d'une variété de depsipeptides et que ces depsipeptides sont des substrats de ces enzymes. Pratt et *al.* ont synthétisé l'analogue phosphorylé d'un depsipeptide en 1989. Ce phosphate est inhibiteur spécifique de la β -lactamase de la classe C, P99[49] mais n'a pas d'activité vis-à-vis des β -lactamases de la classe A.

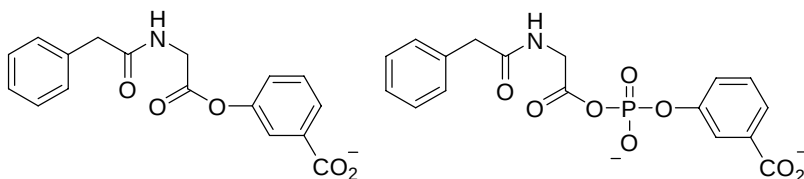


Schéma 22 : Inhibiteurs de P99

La raison de la spécificité limitée du composé pourrait être due à un mauvais groupe partant sur l'atome de phosphore[50]. La molécule suivante possédant un meilleur groupe partant est alors synthétisée.

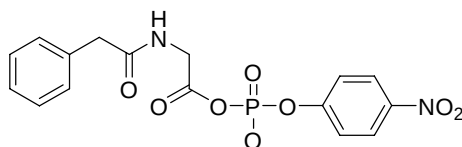


Schéma 23 : Inhibiteur de β -lactamases des classes A et C

Ce composé n'est pas seulement un inhibiteur efficace des β -lactamases de la classe C mais aussi un inhibiteur des β -lactamases de la classe A, PC1 et TEM. C'est aussi un inhibiteur faible de la D,D-peptidase R61. La structure cristalline de ce phosphate lié à l'enzyme révèle la liaison covalente attendue du phosphore à la sérine (Ser70) du site actif menant à un intermédiaire phosphoré tétraédrique.

Pratt et *al.* ont décrit en 1998 la synthèse et l'évaluation d'un phosphate cyclique[51]. Après l'attaque nucléophile de cette molécule par l'enzyme, le groupe partant resterait accroché, comme dans le cas de l'inhibition des D,D-peptidases par les pénicillines, et empêcherait l'hydrolyse de l'intermédiaire covalent.

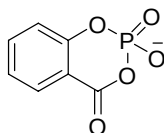


Schéma 24 : Phosphate cyclique

Cette molécule a transitoirement inhibé les β -lactamases P99 (C), TEM (A), et la D,D-peptidase R61. Les temps de demi-vie des complexes formés avec ces enzymes sont de 14, 140 et 340 minutes respectivement.

Li et *al.* ont montré en 1998 que les dérivés acylphosphonate, acylphosphate et bis-acylphosphate sont des inhibiteurs des β -lactamases typiques des classe A et C[52]. Ces molécules ont la possibilité de former un intermédiaire acyl-enzyme ou/et un intermédiaire phosphoryl-enzyme.

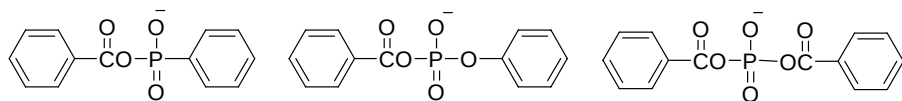


Schéma 25 : Inhibiteurs décrit par Li

Ces molécules réagissent rapidement avec la β -lactamase de la classe C, P99, en formant un intermédiaire acyl-enzyme d'un temps de demi-vie de 40 secondes qui régénère doucement l'enzyme libre. Le dérivé phosphonate réagit encore plus doucement pour produire un complexe encore plus inerte. La dernière molécule réagit avec la β -lactamase de la classe A, TEM, et forme un intermédiaire acyl-enzyme d'un temps de demi-vie de 8 secondes, et plus doucement un complexe plus inerte d'un temps de demi-vie de 2 heures.

Majumdar et *al.* ont rapporté en 2005 l'inhibition de β -lactamases de la classe D par des dérivés diaroyl phosphate.

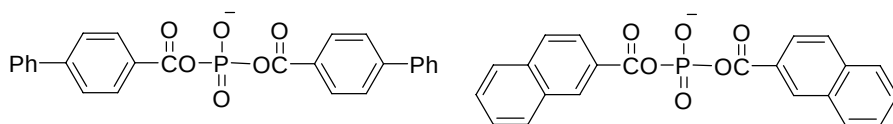


Schéma 26 : Inhibiteurs décrits par Majumdar

La réaction d'Oxa-1 avec les inhibiteurs entraîne l'acylation de la sérine du site actif avec le départ d'un groupement aryle phosphate. Le taux d'acylation de la β -lactamase Oxa-1 n'est pas vraiment affecté par les effets électroniques des substituants mais est considérablement augmenté par des

substituants hydrophobes. La déacylation est lente et directement influencée par les effets électroniques des substituants. La combinaison d'une acylation facile et d'une déacylation lente conduit à des K_i très bas de 0,11 nM pour la première molécule et de 4,6 nM pour la seconde. La première molécule est aussi un puissant inhibiteur d'Oxa-10 avec un K_i de 0,085 nM.

Pratt et *al.* ont décrit la synthèse et l'évaluation de β -céto-phosphonates et phosphates en 2006[53].

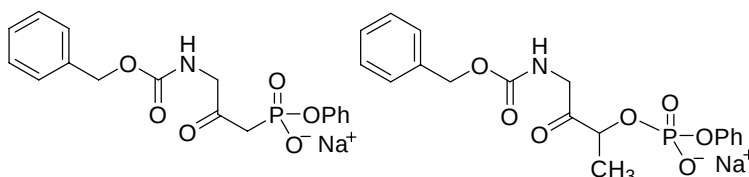


Schéma 27 : Inhibiteurs spécifiques des β -lactamases de la classe D

Ces molécules n'ont pas d'activité inhibitrice vis-à-vis des β -lactamases des classe A, C et B mais sont des inhibiteurs des β -lactamases de la classe D. La première molécule a une valeur de K_i de 77 μ M vis-à-vis de l'enzyme Oxa-10 et la seconde a une valeur de K_i de 88 μ M vis-à-vis de l'enzyme Oxa-1.

En 2001, Kumar et *al.* ont décrit la préparation et l'évaluation de α -céto-hétérocycles[54]. Ces molécules sont des inhibiteurs de P99 mais ne sont pas des inhibiteurs de TEM.

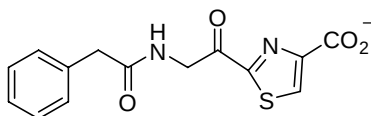


Schéma 28 : Inhibiteur décrit par Kumar

Cette molécule est l'inhibiteur le plus efficace de la série avec une valeur de K_i modeste de 0,11 mM.

En 2006, Adediran et al. ont rapporté la synthèse et l'évaluation de dérivés peptidiques[55]. Les composés suivants sont des substrats des β -lactamases P99 (C), TEM (A), et PC1 (A) et des D,D-peptidases R-61, R-39 et PBP3 mais aucun complexe inhibiteur fort n'est détecté.

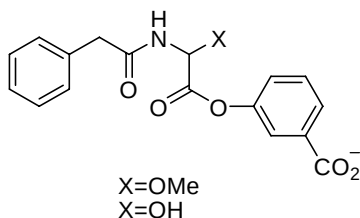


Schéma 29 : Substrats de β -lactamase et D,D-peptidase

Récemment, Pratt et al. ont décrit la synthèse d'hydroxamates N-carbonatés et les premiers résultats de leur évaluation biologique[56].

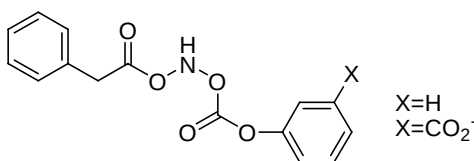


Schéma 30 : Inhibiteurs décrits par Pratt

La première molécule inhibe, essentiellement de manière irréversible, la β -lactamase de la classe C, P99. La seconde molécule est aussi un bon inhibiteur de la β -lactamase de la classe C, le groupement carboxylate ne permettant pas d'améliorer l'activité. Ce résultat est contraire à celui qui était attendu. Une structure cristalline de l'enzyme AmpC inhibée par la première molécule a été obtenue. Les différences par rapport à la structure native sont localisées dans le site actif. Dans le monomère A de la structure, l'oxygène de Ser64 est retourné de 180° et fait partie d'un pont carbamate

sans précédent vers Lys315. Le schéma suivant représente une hypothèse du mécanisme d'inhibition de P99 par ces deux molécules.

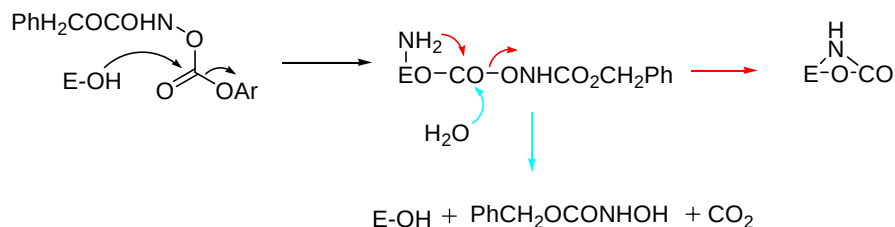


Schéma 31 : Mécanisme d'inhibition proposé par Pratt et al.

Ceci représente un nouveau « cross-linking » dans le site actif. Ces molécules sont aussi des inhibiteurs de TEM, une β -lactamase de la classe A.

III.2.2. Les inhibiteurs des métallo- β -lactamases

Bien que beaucoup d'exemples d'inhibiteurs soient décrits dans la littérature, aucun n'est actuellement utilisé en clinique. Les premiers inhibiteurs de β -lactamases synthétiques ont été décrits dans la littérature en 1996. Il s'agit de dérivés d'alcool ou de cétones portant un groupement trifluorométhyle[57].

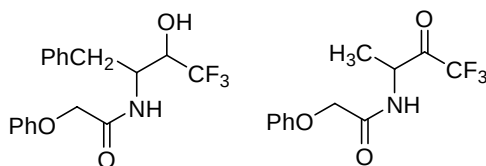


Schéma 32 : Premiers inhibiteurs synthétiques décrits dans la littérature

Le dérivé alcool est un inhibiteur des métallo- β -lactamases *B. cereus* et *P. aeruginosa* avec des K_i de 30 et 60 μM respectivement. Le dérivé cétone a montré une activité intéressante vis-à-vis des enzymes de *X. Maltophilia* avec un K_i de 1,5 μM .

Payne et *al.*[58] ont décrit en 1997 la découverte de dérivés thiodésipeptides qui sont des inhibiteurs irréversibles des métallo- β -lactamases de *B. cereus*, *S. malthophilia* et *A. hydrophila* mais pas de *B. fragilis*.

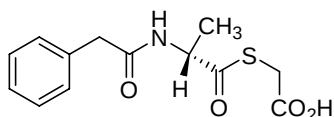


Schéma 33 : Molécule SB214751

Cette molécule a une K_i de 38 μM pour BcII, et d'environ 3 μM pour L1 et CphA. Ces molécules inhibent l'enzyme en libérant le thiol correspondant qui modifie alors un résidu cystéine du site actif par formation d'un pont disulfure. Greenlee et *al.* a montré que ces thiodésipeptides sont aussi des inhibiteurs de la métallo- β -lactamase IMP-1 et que l'introduction de groupements plus hydrophobes sur le carbone terminal augmente l'activité de ces inhibiteurs[59].

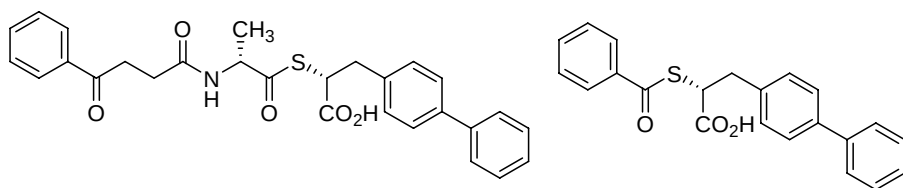


Schéma 34 : Meilleurs inhibiteurs développés par Greenlee

Le premier composé a un IC_{50} de 0,25 μM et le second a un IC_{50} de 0,4 nM. Les thioesters sont des substrats de l'enzyme IMP-1 qui libèrent après hydrolyse les thiols correspondants qui sont aussi des inhibiteurs efficaces. La stéréochimie du centre chiral est importante car l'énantiomère S est 300 fois moins actif que l'énantiomère R vis-à-vis d'IMP-1.

En 2001, Mollard et *al.* ont montré que des composés soufrés ayant une structure très simple comme l'acide thiomandélique sont aussi des inhibiteurs efficaces de BcII. Ces molécules ont des K_i variant entre 0,21 et 0,46 μM [60].

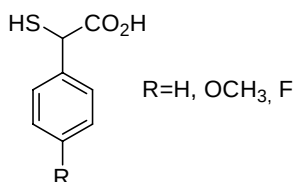


Schéma 35 : Dérivés d'acide thiomandélique

L'acide thiomandélique ($\text{R}=\text{H}$) est aussi un inhibiteur de CfiA, L1, IMP-1, IMP-2, VIM-1, BlaB et Fez-1 avec des valeurs de K_i entre 0,029 et 0,80 μM . L'acide thiomandélique est le premier inhibiteur à large spectre de metallo- β -lactamases. Les interactions entre l'acide thiomandélique et l'enzyme BcII ont été étudiées par RMN. Les résultats semblent confirmer l'hypothèse que le groupement thiol se lie aux deux atomes de zinc dans le site actif, et que le groupement carboxylate se lie à Arg91.

En 1999, Walter et *al.* ont décrit la synthèse et l'évaluation biologique de dérivés hydroxamates[61].

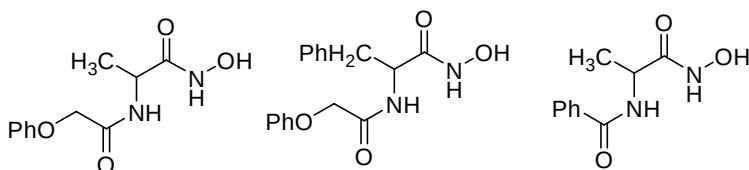


Schéma 36 : Inhibiteurs développés par Walter

Aucune de ces molécules n'est active vis-à-vis de BcII mais elles inhibent CPhA.

En 1998, Toney et *al.* ont rapporté l'identification de nouveaux inhibiteurs de métallob- β -lactamases par une méthode de screening à haut flux[62]. Ces nouveaux inhibiteurs sont des dérivés biphenyle tétrazole.

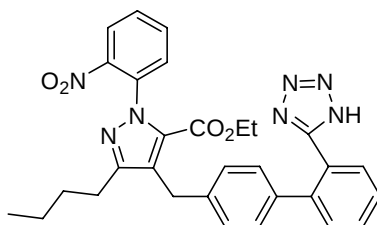
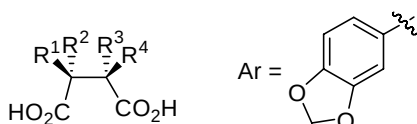


Schéma 37 : Composé le plus actif

Le composé le plus actif de cette série avait un K_i de 18 μM vis-à-vis de la β -lactamase CfiA.

En 2001, Toney et *al.* ont décrit la découverte, toujours par une méthode de screening, de dérivés d'acides succiniques disubstitués qui sont des inhibiteurs puissants de IMP-1[63].



R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Configuration	IC ₅₀ (μM)
ArCH ₂	H	ArCH ₂	H	S, S	0,009
PhCH ₂	H	PhCH ₂	H	S, S	0,0027

Figure 4 : Constante d'inhibition des dérivés succiniques

Ces molécules sont des puissants inhibiteurs avec des IC_{50} variant de 3 à 9 nM. L'acide succinique est quant à lui peu actif avec un IC_{50} de 6,3 μM .

Bien que peu d'informations structurales soient disponibles, quelques points communs sont évidents dans les interactions de ces composés disparates avec l'enzyme[64]. Premièrement, l'atome de soufre des composés possédant un groupement thiol ou l'oxygène du carboxylate de l'acide succinique disubstitué déplace le groupement hydroxyde ponté sur le centre métallique qui est impliqué comme nucléophile dans l'étape d'hydrolyse. Deuxièmement, l'atome d'azote de Lys224 interagit de manière similaire avec les substituants carboxylate ou tétrazole. Kurosaki et *al.* ont exploité ces caractéristiques communes dans le mode de liaison des substrats et des inhibiteurs pour générer une nouvelle classe d'inhibiteurs irréversibles[65].

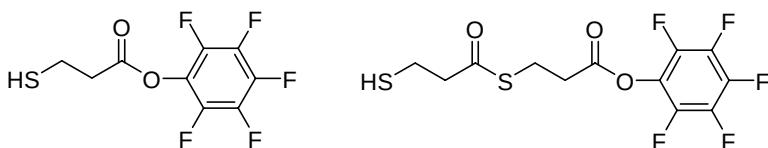


Schéma 38 : Inhibiteurs irréversibles développés par Kurosaki

Le premier dérivé a un K_i de 3,4 μM et le second a une K_i de 0,42 μM . La stratégie pour l'inhibition irréversible de IMP-1 est la suivante : le groupement thiol de la seconde molécule se coordine à un ou à deux atomes de zinc dans le site actif comme une ancre. Lys224 est conservé dans presque toutes les métallo- β -lactamases de la sous-classe B1. Lys224 peut alors attaquer l'ester activé afin de former un adduit inhibiteur-enzyme lié de manière covalente qui inhibe l'enzyme irréversiblement.

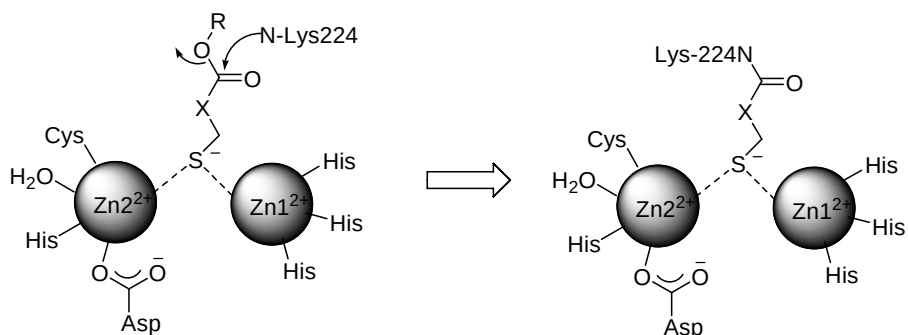


Schéma 39 : Stratégie pour l'inhibition irréversible de composés avec un thiol et un bon groupe partant

La structure cristalline de IMP-1 avec la seconde molécule montre que l'inhibiteur se lie de manière covalente à l'enzyme et confirme donc la stratégie.

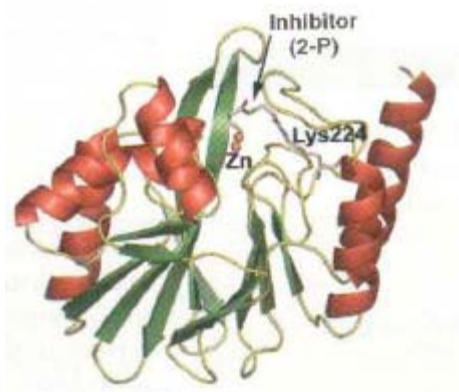


Figure 5 : Structure d'IMP-1 complexé par la seconde molécule

Finalement beaucoup d'inhibiteurs sont obtenus par des variations structurales simples, mais bien pensées, sur des motifs de type amino-acides, aminophosphonates ou phosphoniques, thiol-acides, hydroxy-acides, analogues de dipeptides, depsipeptides....

La famille des acides aminés au sens large du terme reste une source de grande inspiration en chimie médicinale

IV. Les acides aminés, les acides aminophosphoniques et les acides aminobisphosphoniques en chimie médicinale

IV.1. Les acides aminés

Un acide aminé est une molécule organique possédant un squelette carboné et deux fonctions : une amine et un acide carboxylique. Dans les α -acides aminés, l'amine et l'acide carboxylique sont portés par le même carbone (le carbone α). Bien qu'il existe plus de 100 acides α -aminés dans la nature, l'hydrolyse des protéines ou peptides naturels conduit seulement à 20 acides aminés. Ces acides aminés sont des blocs de construction des protéines. Les acides aminés peuvent soit former des chaînes polymériques courtes appelées peptides (moins de 20 acides aminés) ou des chaînes plus longues appelées polypeptides ou protéines. Il y a aussi beaucoup d'acides aminés non naturels qui sont importants. On peut citer par exemple les agents chélatants EDTA et acide nitriloacétique qui sont synthétisés industriellement.

La structure générale d'un α -acide aminé est la suivante :

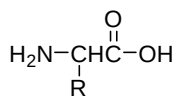


Schéma 40 : Structure générale d'un α -acide aminé

R représente une chaîne latérale spécifique à chaque acide aminé. Le carbone α est un centre chiral (sauf pour la glycine). Les acides aminés sont en général classés en quatre groupes selon les propriétés de la chaîne

latérale : acide, basique, hydrophile (polaire) et hydrophobe (apolaire). Comme les acides aminés possèdent à la fois une amine et un acide carboxylique, ils peuvent être considérés comme des bases et comme des acides. Au point isoélectronique, le groupement amine est protoné et l'acide carboxylique est déprotoné. Cet ion est nommé zwitterion.

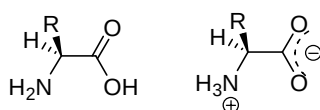


Schéma 41 : Forme normale et forme zwitterionique d'un acide aminé

IV.1.1.Méthodes de synthèse

Outre l'extraction de produits naturels, beaucoup de méthodes de synthèse d'acides aminés ont été développées[66]. La réaction de Strecker rapportée en 1850 est la plus vieille synthèse connue d' α -amino-acides[67]. La réaction est une condensation d'un aldéhyde, d'ammoniac et d'une source de cyanure, suivie d'une hydrolyse de l' α -aminonitrile résultant. Lorsqu'une amine est utilisée à la place de l'ammoniac, la formation de l'imine suivie de l'hydrocyanation, représente une alternative largement appliquée.

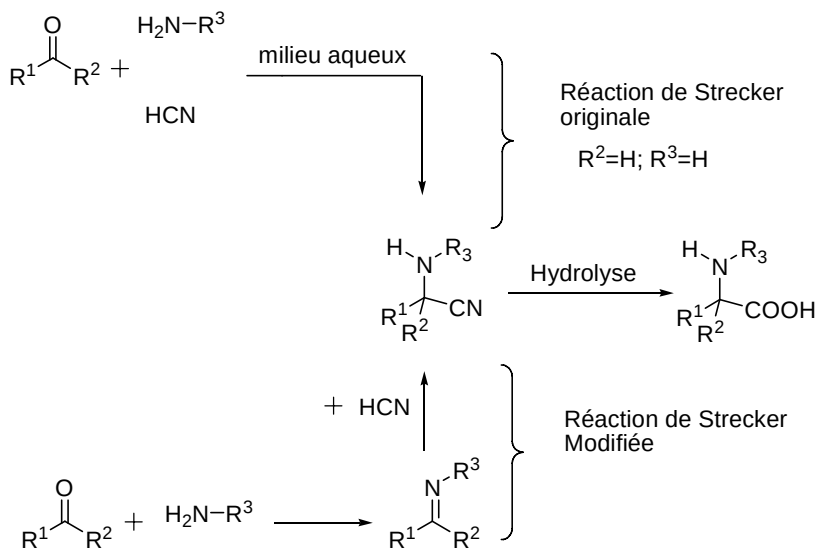


Schéma 42 : Principe des variantes de la réaction de Strecker

Beaucoup de procédures one-pot ont aussi été développées pour la synthèse d'α-aminonitriles à partir d'aldéhydes, d'amines et de triméthylsilylcyanure utilisant différents acides de Lewis tels que LiClO_4 , NiCl_2 , BiCl_3 , ZnX_2 où X est un atome d'halogène, RuCl_3 et montmorillonite. Les aryles imines, formées in situ à partir des aldéhydes et des amines, subissent une addition nucléophile du cyanure de triméthylsilyle sur la surface de l'argile montmorillonite KSF dans des conditions réactionnelles douces afin d'obtenir les α-aminonitriles correspondants avec d'excellents rendements[68].

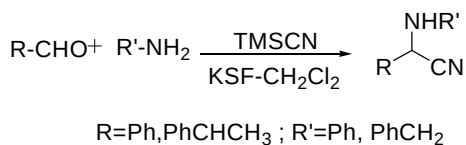


Schéma 43 : Synthèse one-pot catalysée par une montmorillonite

Ranu et *al.* ont développé la synthèse d' α -aminonitriles disubstitués catalysée par un catalyseur à base d'indium, InCl_3 [69].

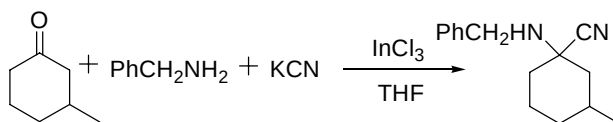
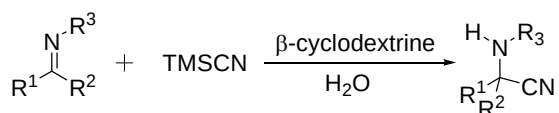


Schéma 44 : Réaction de Stecker catalysée par InCl_3

L'addition nucléophile sur les imines est une grande source de diversité pour la synthèse d'une variété d'amines ; cependant l'activation de la double liaison $\text{C}=\text{N}$, qui est légèrement pauvre en électrons, est nécessaire pour obtenir une réactivité satisfaisante. La liaison $\text{C}=\text{N}$ peut être activé de différentes manières, à l'aide d'acides de Lewis ou de Bronsted ou d'espèces métalliques comme AlMe_3 [70]. La liaison $\text{C}=\text{N}$ peut aussi être substituée par un groupement activant comme un carbonyle, un sulfonyle, un sulfinyle, un phosphoryle ou un silyle pour faciliter la réaction[71],[72].

Surendra et *al.* ont décrit en 2006 l'addition nucléophile de cyanure de triméthylsilyle sur des imines dans l'eau en présence de β -cyclodextrine comme catalyseur[73].



R^1 =aryl, naphtyl; R^2 =H; CH_3 ; R^3 =aryl,benzyl,tosyl

Schéma 45 : Réactions décrites par Surendra

Les rendements en α -aminonitriles sont excellents et le temps de réaction est court (2h au maximum).

La Réaction de Petasis est une réaction *one-pot* de plusieurs composés qui permet la préparation d'amines ou d'acides aminés. Elle implique la

condensation d'une amine, d'une cétone ou de l'acide glyoxylique et d'un acide boronique. La première étape de la réaction est la formation d'un iminium. Ensuite, l'organoborane se coordine à l'acide carboxylique et il y a un transfert du groupement vinyle sur l'iminium[74]. L'amino-acide protégé est obtenu avec un rendement de 80%.

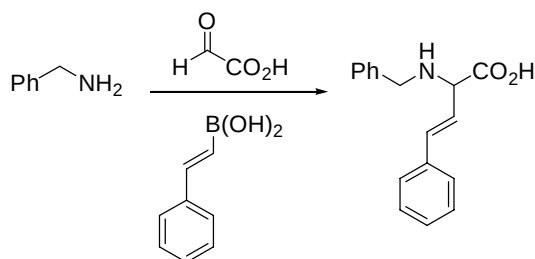


Schéma 46 : Synthèse d'un dérivé amino-acide du styrène par la réaction de Petasis

Une autre méthode est l'amination d'un acide α -halogéné. Elle peut être faite avec de l'ammoniac mais elle conduit alors à un mélange d'amines primaire, secondaire et tertiaire. Afin d'éviter ce mélange, l'ammoniac est remplacé par le phthalimide. Cette réaction est appelée la synthèse de Gabriel[75].

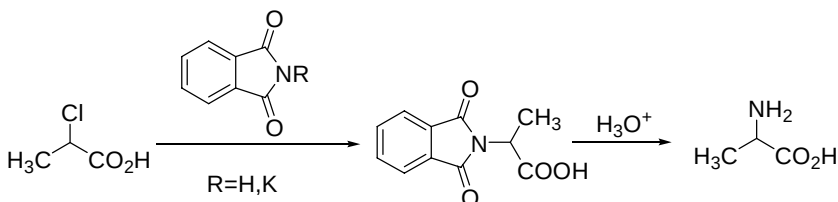


Schéma 47 : Synthèse de Gabriel

La réaction de Bucherer-Bergs est la condensation entre une cétone, du cyanure de potassium et du carbonate d'ammonium menant à la formation d'hydantoïnes. L'hydantoïne doit ensuite être hydrolysée en milieu acide ou basique afin d'obtenir l'acide amino-disubstitué.

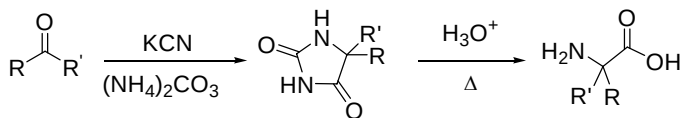


Schéma 48 : Réaction de Bucherer-Bergs

Conway et *al.* ont utilisé cette réaction pour la synthèse de dérivés phénylglycine[76].

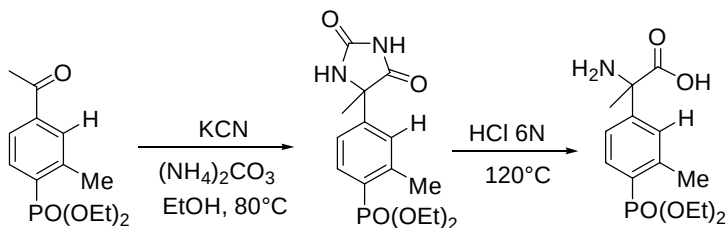


Schéma 49 : Synthèse de dérivés phénylglycine

Malheureusement cette réaction est difficilement réalisable avec des cétones aliphatiques et fonctionnalisées due à leur résistance lors de la formation des hydantoïnes

D'autres méthodes de synthèses d'acides aminés disubstitués ont été décrites dans la littérature. La stratégie commune à ces méthodes est l'alkylation de dérivés protégés d'acides aminés tels que le nitroacétate ou les bases de Schiff des acides aminés. Le nitroacétate d'éthyle réagit avec la diisopropyléthylamine et le bromure de benzyle pour fournir le produit dialkylé. Le groupement nitro est ensuite réduit avec de l'hydrogène et du Ni Raney puis l'ester éthylique est hydrolysé avec de l'hydroxyde de potassium afin d'obtenir l'acide aminé disubstitué[77].

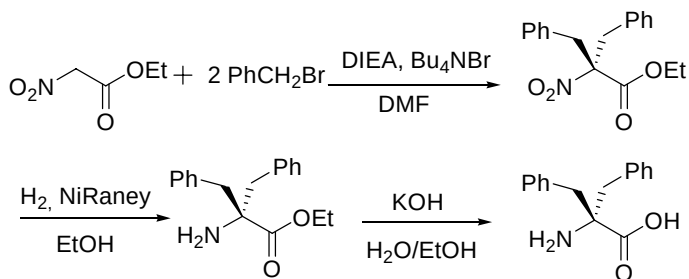


Schéma 50 : Dialkylation du nitroacétate

Les imines des acides aminés sont des synthons anioniques utiles pour la préparation d'aminoacides mono ou disubstitués. O'Donnell *et al.* ont décrit l'alkylation des imines de différents aminoacides par une réaction de transfert de phase[78]. Après alkylation, les imines sont hydrolysées afin d'obtenir les aminoacides substitués.

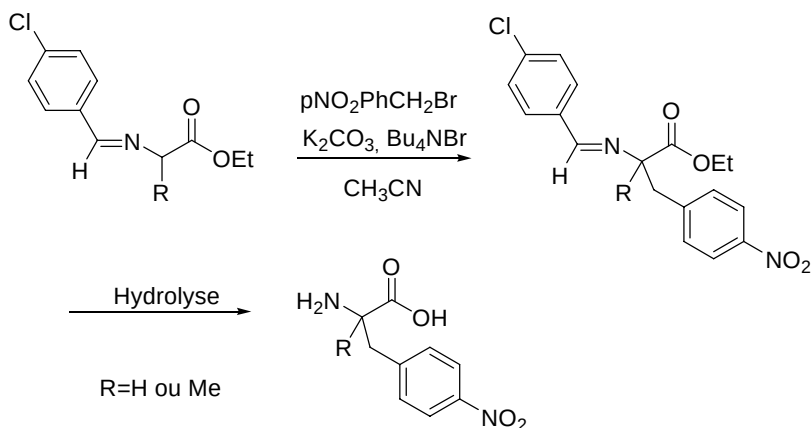


Schéma 51 : Méthode O'Donnell

L'application d'agents de transfert de phase chiraux à l'alkylation asymétrique d'imine de la glycine est rapportée pour la première fois par le groupe d'O'Donnell en 1989[79]. Des sels d'ammonium quaternaires dérivés des alcaloïdes *Cinchona* sont employés pour ce procédé, menant à des énantiosélectivités comprise entre 42 et 66%. Depuis ces travaux

pionniers, les catalyseurs ont été optimisés afin d'augmenter très significativement la discrimination faciale[80],[81].

IV.1.2.Activités biologiques

Les acides aminés ont de nombreuses activités biologiques potentielles différentes. Beaucoup d'industries pharmaceutiques ont investi dans la recherche d'acides aminés, agonistes ou antagonistes des récepteurs AAE avec l'espoir de développer de nouveaux traitements pour des maladies neurologiques variées. Les acides aminés excitatoires (AAE) sont connus pour modérer l'excitation synaptique, et donc la transmission du signal au nerf, dans le système nerveux central des mammifères en se liant aux récepteurs AAE. L'acide glutamique L, qui est un neurotransmetteur majeur, est connu pour agir sur les récepteurs GluRs. Ceux-ci sont divisés en deux groupes : les récepteurs glutamiques ionotropiques (iGluRs) couplés à des canaux ioniques qui contrôlent le flux d'ions sodium, potassium et calcium dans la cellule nerveuse et sont capables d'un temps de réponse très rapide (de l'ordre de la milliseconde) et les récepteurs glutamiques métabotropiques (mGluRs) couplés aux protéines G et responsables entre autre de l'activation de la phospholipase. Ces récepteurs jouent un rôle clef dans de nombreux processus fondamentaux incluant le développement des neurones, l'apprentissage et la mémoire. Une stimulation trop importante des ces récepteurs peut conduire à la mort des neurones. Elle est aussi impliquée dans une grande diversité de désordres et de maladies aiguës ou chroniques du système nerveux central (SNC) comme l'épilepsie, la schizophrénie, l'ischémie, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson[82],[83],[84].

Les récepteurs glutamiques ionotropiques peuvent être sélectivement activés et sont caractérisés par leurs agonistes. Trois classes principales de récepteurs iGlu ont été identifiées : les récepteurs sensibles à l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA), à l'acide (S)-2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-isoxazol-4-yl)propanoïque (AMPA) et à l'acide kaïnique (KA).

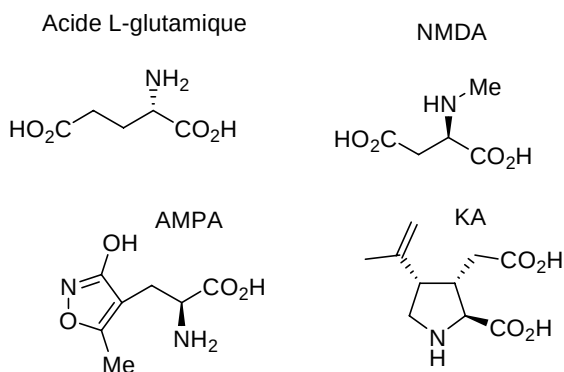


Schéma 52 : Agonistes utilisés pour définir les récepteurs glutamates ionotropiques

Les récepteurs NMDA sont des oligomères tétramériques ou pentamériques des sous-unités NR1, NR2A-NR2D et NR3, avec le site de liaison du glutamate sur NR1 et le site d'un co-agoniste glycine localisé sur NR1. NMDA est un agoniste sélectif du récepteur NMDA comme l'acide (RS)-2-amino-2-(3-hydroxy-5-méthyl-isoxazol-4-yl)acétique (AMMA). Le dérivé racémique tétrazol-5-ylglycine est un agoniste très sélectif de NMDA de l'ordre du nanomolaire.

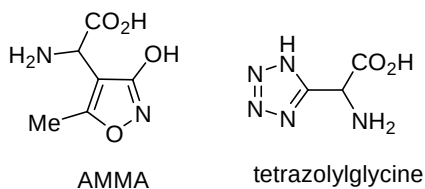


Schéma 53 : Agonistes du récepteur NMDA

Il y a beaucoup d'exemples d'antagonistes du récepteur NMDA qui possèdent un acide phosphonique. Des exemples seront cités par la suite dans le paragraphe parlant des activités biologiques des dérivés aminophosphoniques (IV.2.2). D'autres sont des acides aminés cycliques.

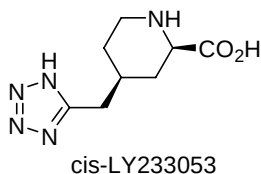


Schéma 54 : Antagoniste du récepteur NMDA

Les récepteurs AMPA contiennent les sous unités iGluR1 à iGluR4. Le récepteur AMPA est activé sélectivement par la S-AMPA, par l'acide (RS)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-*tert*-butyl-isoxazol-4-yl)propionique (ATPA), par l'acide (RS)-2-amino-2-(3-hydroxy-5-bromométhyl-isoxazol-4-yl) propionique (ABPA) et par l'acide (RS)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-méthyl-isoxazol-4-yl)propionique (ACPA).

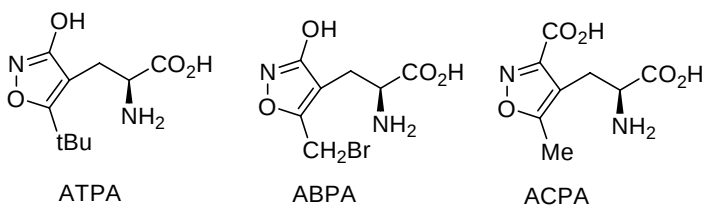


Schéma 55 : Exemples d'agonistes du récepteur AMPA

L'ajout d'un groupement acétyle sur l'alcool en position 3 conduit à un antagoniste, (RS)-AMOA. D'autres composés cycliques sont des antagonistes du récepteur AMPA comme les quinoxalinediones

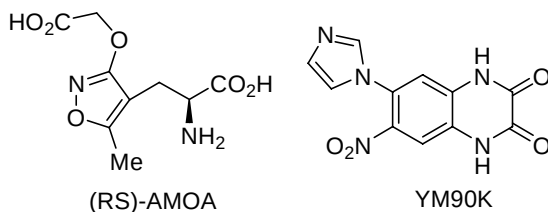


Schéma 56 : Antagonistes du récepteur AMPA

Le récepteur kaïnate a été jusqu'à présent beaucoup moins étudié que les récepteurs AMPA et NMDA. Cinq récepteurs kaïnates ont été identifiés : KA1, KA2, GluR5, GluR6 et GluR7. Ils ont une distribution plus limitée dans le cerveau et leur fonction est mal définie. Il y a donc peu d'exemples d'agonistes et d'antagonistes dans la littérature. Le (S)-5-iodowillardiine est un agoniste puissant et sélectif qui se lie au récepteur GluR5 avec une haute affinité et une sélectivité excellente vis-à-vis des récepteurs AMPA et GluR6. Un analogue de AMPA, l'ATPA montre aussi une sélectivité pour GluR5.

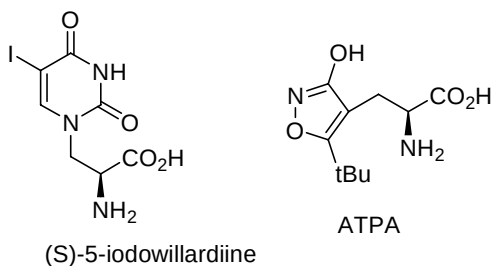


Schéma 57 : Agonistes du récepteur GluR5

Les antagonistes sélectifs pour les récepteurs kaïnates sont moins abondants. Un des premiers à être mentionné dans la littérature est l'oxime de l'isatine (NS-102) qui est sélectif vis-à-vis du récepteur GluR6.

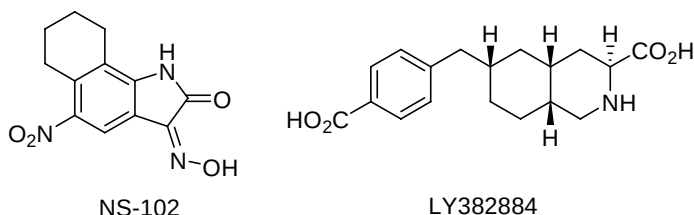


Schéma 58 : Antagonistes des récepteurs KA

Des décahydroisoquinolines ont aussi montré une activité d'antagoniste sélective vis-à-vis du récepteur GluR5.

Les aminoacides ont beaucoup d'autres activités biologiques potentielles. Kati et *al.* ont découvert après avoir testé 300 α -aminoacides et β -aminoacides qu'un dérivé phénylglycine est un inhibiteur du virus neuraminidase Influenza[85].

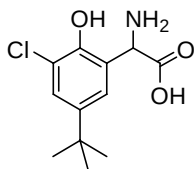


Schéma 59 : Inhibiteur décrit par Kati

Cette molécule est un inhibiteur compétitif avec une valeur de K_i de 41 μM .

Vallance et *al.* ont décrit la préparation de dérivés aminoacides possédant une fonction guanidine.

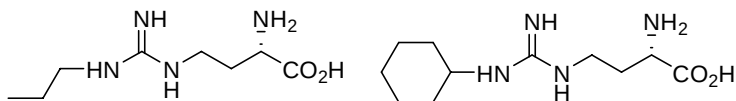


Schéma 60 : Molécules décrites par Vallance

Ces molécules sont des inhibiteurs de l'enzyme diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH). Elles offrent un potentiel dans le traitement du cancer, de l'asthme, de la neurodégénération et de la douleur.

Les agents chélatants bifonctionnels constituent un domaine de recherche important à cause de leur utilité dans le diagnostic et la thérapie des cancers. Les agents chélatants utiles pour les imageries et les thérapies radioimmunes doivent être capables de former des complexes métalliques avec une grande stabilité thermodynamique ainsi qu'une grande inertie cinétique *in vivo* pour réduire les intoxications dues à la perte de métaux lourds radioactifs. Des dérivés des structures de DTPA et de DOTA, comme le BAD[86], sont souvent utilisés dans ce but actuellement, mais de nouveaux chélates avec des propriétés adaptés pour différentes applications biologiques sont toujours souhaitables.

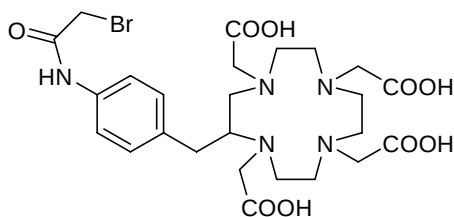


Schéma 61 : BAD

Les composés dérivés du TAME sont des agents chélatants dans l'encapsulation complète des ions Ga^{3+} [87]. Ces composés sont très utiles en tomographie d'émission de positrons, une technique d'imagerie puissante et non invasive utilisée en diagnostic médical, principalement en oncologie.

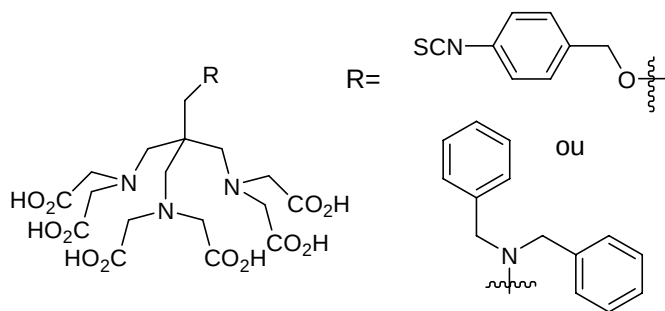


Schéma 62 : TAME-Hex A et TAME-Hex B

TAME-Hex A et TAME-HEX B montrent une bonne stabilité avec les ions gallium (III) et sont donc des bons candidats pour l'utilisation en imagerie médicale[88].

IV.2. Les acides α -aminophosphoniques

Le rôle clef des aminoacides dans la chimie de la vie et comme unités structurales de base des peptides et des protéines a conduit vers d'intenses recherches de leurs mimétiques. Une classe intéressante de ces mimétiques est formée par les acides aminophosphoniques, définis comme étant des analogues des aminoacides dans lesquelles la fonction carboxylique est remplacée par une fonction phosphonique. Leur toxicité négligeable vis-à-vis des mammifères et le fait qu'ils miment les aminoacides rendent ces composés extrêmement importants car ils concurrencent les fonctions carboxyliques dans le site actif des enzymes et des récepteurs cellulaires. Bien qu'étant des bioisostères, ces molécules ont des propriétés physico-chimiques différentes. Les acides phosphoniques diffèrent des acides carboxyliques par leur encombrement, leur géométrie et leur acidité. En effet, l'atome de phosphore a un rayon significativement plus grand que celui de l'atome de carbone, l'acide carboxylique a une géométrie trigonale plane alors que l'acide phosphonique a une géométrie tétraédrique, l'acide

phosphonique est plus acide que l'acide carboxylique d'environ trois unités de pKa.

IV.2.1.Méthodes de synthèse

Une grande variété de méthodes est présentée dans la littérature pour la préparation des dérivés α -aminophosphonates[89],[90],[91],[92]. Les différentes stratégies sont résumées sur le schéma suivant.

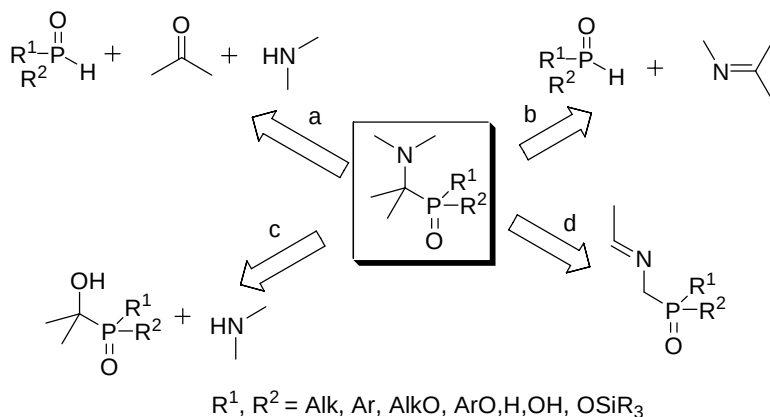


Schéma 63 : Principales stratégies pour la synthèse de dérivés α -aminophosphonates

Au début des années 1950, Kabachnik[93] et Fields[124] ont montré indépendamment que la réaction d'une amine, d'un composé carbonylé et d'un phosphite de dialcyle mène à la formation de dérivés α -aminophosphonates (voie a). Cette réaction porte aujourd'hui le nom de ses créateurs et est donc connue sous le nom de réaction de Kabachnik-Fields.

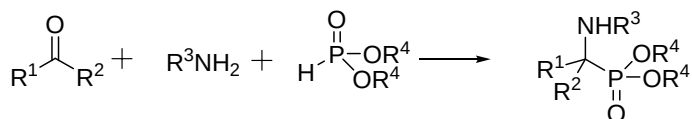


Schéma 64 : Réaction de Kabachnik-Fields

La gamme de composés qui peut être impliquée dans ce procédé est extrêmement large. La réaction peut être effectuée avec ou sans catalyseur, avec ou sans solvant. Il y a beaucoup d'exemples de cette réaction dans la littérature. Son mécanisme dépend de la nature des substrats. L'amine et le composé hydrophosphorylé forment un complexe où un des deux partenaires peut réagir avec le composé carbonylé. Souvent, la basicité de l'amine permet de déterminer la voie que prend la réaction. Des amines peu basiques comme l'aniline, qui peuvent agir comme donneurs de proton dans des liaisons hydrogènes, favorisent la formation de l'imine, alors que les amines alkylées comme la cyclohexamine ne forment pas d'imine[90].

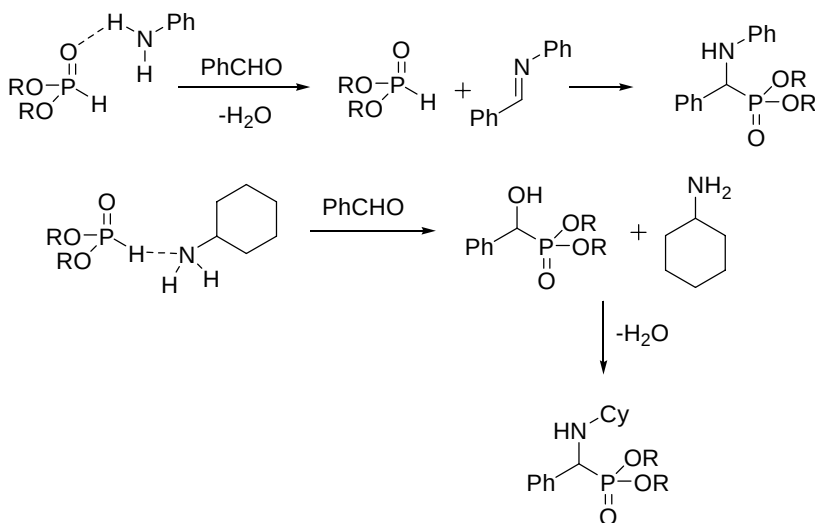


Schéma 65 : Mécanisme proposé pour la réaction de Kabachnik-Fields

L'addition catalysée ou non-catalysée d'un composé hydrophosphorylé sur une imine est en fait une réaction de Pudovik[94] (voie b). Beaucoup d'acides aminophosphoniques ont été obtenus par l'addition du phosphite de diéthyle sur une imine portant un groupement benzyle qui pourra être clivé par la suite par une réaction d'hydrogénation avec un catalyseur au palladium. Cette réaction peut-être effectuée en présence des catalyseurs acides ou basiques ou juste en chauffant. Beaucoup d'exemples de cette

réaction sont décrits dans la littérature et plusieurs revues y sont en partie consacrées[89],[90]. Voici un exemple de cette réaction appliquée à une imine chirale. L'aminophosphonate est obtenu par réaction avec un excès de sel de sodium du phosphite de diéthyle en solution dans le phosphite de diéthyle avec un rendement de 98% et un excès diastéréomérique de 95%[95]. L'hydrogénation du groupement α -méthyl-benzyle et la déprotection du groupement phosphonate conduisent au dérivé aminophosphonique.

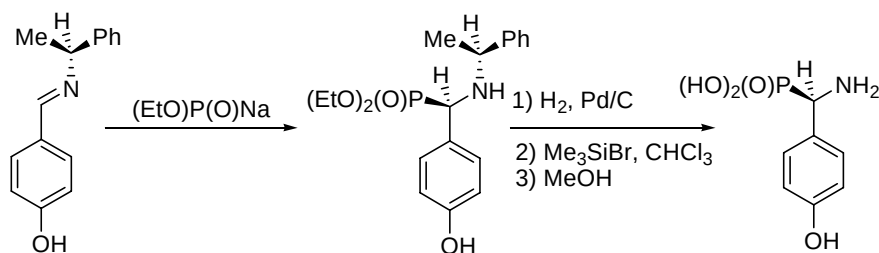


Schéma 66 : Réaction de Pudovik sur une imine chirale

La réaction de Pudovik peut aussi être activée par un acide de Lewis comme ZnCl_2 , PdCl_2 , NiCl_2 , LaCl_3 , AlCl_3 et CdI_2 . Kabachnik et al. ont synthétisé différents aminophosphonates par une réaction de Pudovik catalysée par de l'iodure de cadmium[96].

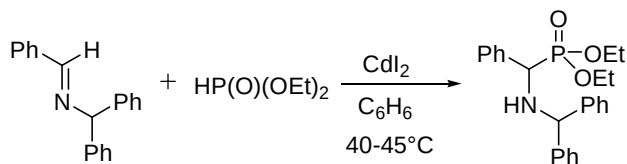


Schéma 67 : Réaction de Pudovik catalysée par CdI_2

La voie c est l'amination nucléophile d'un hydroxyphosphonate. Elle peut être réalisée par une réaction de Mitsunobu, soit une réaction one-pot entre un alcool, un azodicarboxylate, de la triphénylphosphine et un nucléophile (ici HN_3)[97].

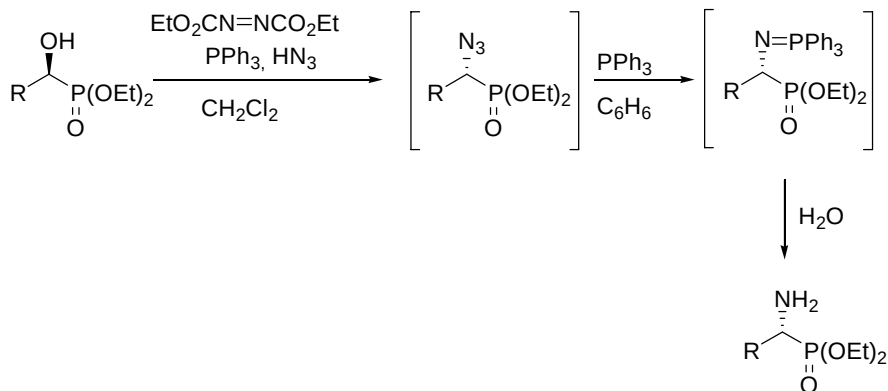


Schéma 68 : Réaction de Mitsunobu

Elle conduit à l'azoture correspondant avec une inversion de configuration. L'azoture est ensuite réduit en amine par traitement avec de la triphénylphosphine et une hydrolyse aqueuse avec un rendement entre 70 et 90% selon les substituents.

De nombreuses méthodes de synthèse des dérivés aminophosphoniques, basées sur la voie d, supposent que la combinaison créée préalablement d'un groupement phosphoryle, d'un carbone α et d'une amine soit utilisée comme synthon. La synthèse de l'aminophosphonique ciblé est alors effectuée par l'introduction des groupements fonctionnels désirés sur le carbone α ou/et sur l'atome d'azote ou/et sur l'atome de phosphore. La génération de carbanions sur les dérivés aminophosphonates et leur fonctionnalisation avec un agent électrophile approprié sont une approche populaire pour la synthèse de dérivés aminophosphonates polyfonctionnalisés divers. Dans ces processus, une imine synthétisée à partir d'un dérivé aminophosphonique et d'un aldéhyde ou d'une cétone est souvent utilisée comme produit de départ.

L'alkylation énantiosélective de l'imine d'un dérivé du camphre est effectuée par traitement de l'imine avec du diisopropylamidure de lithium et divers agents alkylants[98].

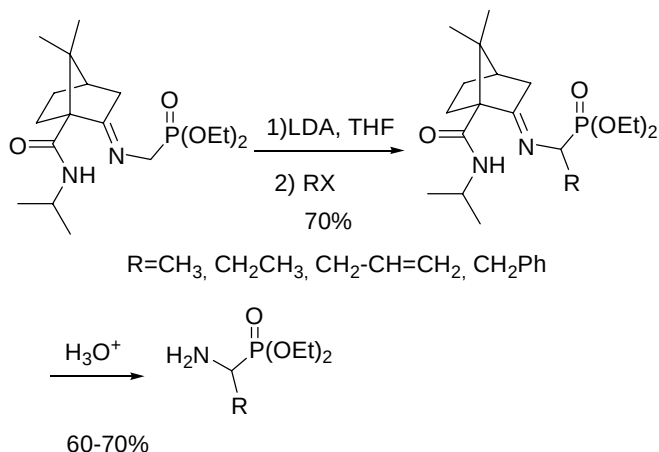


Schéma 69 : Alkylation énantiosélective

Les rendements sont de l'ordre de 70 % pour l'étape d'alkylation et de 60 à 70% pour l'étape d'hydrolyse. L'énantiosélectivité est faible lorsque R=Me (22%), moyenne lorsque R=Et (56%) et excellente lorsque R=CH₂-CH=CH₂ et CH₂Ph (91% et 99% respectivement).

IV.2.2.Activités biologiques

En dehors des applications en agrochimie (exemple : glyphosate), les acides aminophosphoniques ont de nombreuses activités en chimie médicinale, en tant qu'inhibiteurs enzymatiques, agonistes ou antagonistes de récepteurs du système nerveux central, analogues de produits naturels et complexants de métaux[99]. Le premier exemple d'acide aminophosphonique comme inhibiteur enzymatique remonte à 1959. L'analogue γ -phosphonique de l'acide glutamique est un inhibiteur de la glutamine synthase de poule.

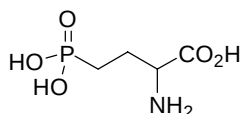


Schéma 70 : Premier inhibiteur enzymatique décrit dans la littérature

Beaucoup de protéases sont impliquées dans des maladies humaines variées. Les substrats peptidiques dans lesquels un groupement phosphonate mime l'état de transition tétraédrique de la réaction de clivage de la liaison peptidique sessile deviennent les meilleurs inhibiteurs de ces enzymes. Il y a peu d'acides aminophosphoniques de structure simple qui sont des inhibiteurs efficaces de ces enzymes.

Parmi ces molécules, les inhibiteurs des aminopeptidases à zinc ont des activités intéressantes. L'altération de l'activité de la leucine aminopeptidase a été associée au cancer, à la cataracte et même au sida. L'analyse du complexe composé de l'enzyme et de l'analogue phosphonique de la leucine, un des inhibiteurs les plus efficace de l'enzyme, a permis de trouver de nouveaux composés ayant une activité inhibitrice plus importante que le « lead »[100].

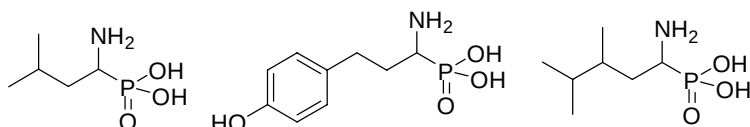


Schéma 71 : Lead et nouveaux inhibiteurs

L'analogue α -phosphonique de l'acide glutamique est un inhibiteur de l'aminopeptidase A et les analogues phosphoniques de la méthionine et de la norleucine sont des inhibiteurs de la methionine aminopeptidase[101],[102].

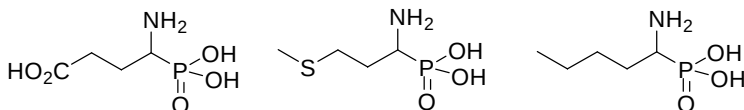


Schéma 72 : Inhibiteurs de deux aminopeptidase à zinc

L'analogue phosphonique de la tyrosine est un substrat de la tyrosinase. L'homologue possédant un groupement méthylène supplémentaire est aussi un substrat alors que celui possédant une chaîne alkyle plus courte est un inhibiteur de l'enzyme[103].

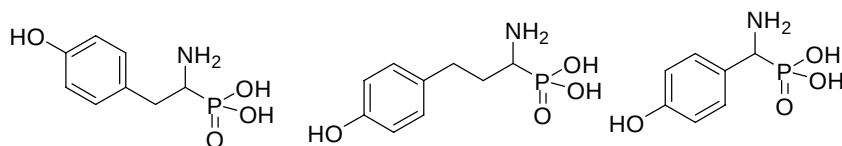


Schéma 73 : Analogues et homologues phosphoniques de la tyrosine

La tyrosinase est impliquée dans les mélanomes (cancer de la peau). Des études préliminaires ont montré que les aminophosphoniques actifs envers la tyrosinase sont aussi cytotoxiques contre les cellules de mélanome de souris B16[104].

Les aminophosphoniques étant des analogues d'acides aminés, beaucoup de recherches ont été effectuées sur leur potentiel d'agonistes et d'antagonistes vis à vis des différents récepteurs du système nerveux central. Tous ces récepteurs fonctionnent grâce à leur ligand endogène, le glutamate, et sont des cibles potentiellement intéressantes pour le traitement de maladies neurologiques telles que l'épilepsie. Les dérivés aminophosphoniques se retrouvent principalement en tant qu'antagonistes des récepteurs NMDA et AMPA.

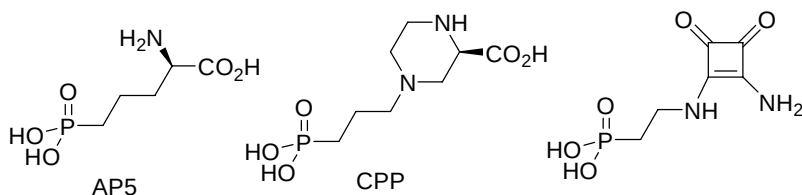


Schéma 74 : Antagonistes du récepteur NMDA

La molécule AP5 a été utilisée comme « lead » et a permis la découverte de beaucoup d'antagonistes puissants, sélectifs et compétitifs. La molécule CCP fait partie des plus puissants antagonistes compétitifs. La dernière molécule représente une classe structurale unique d'antagoniste de NMDA. Les premières études pharmacologiques sur les récepteurs AMPA et KA ont été entravées par le manque de sélectivité d'antagonistes efficaces. L'ATPO a été développé en utilisant l'AMPA comme « lead ». Un dérivé quinoxalinedione est aussi un antagoniste du récepteur AMPA.

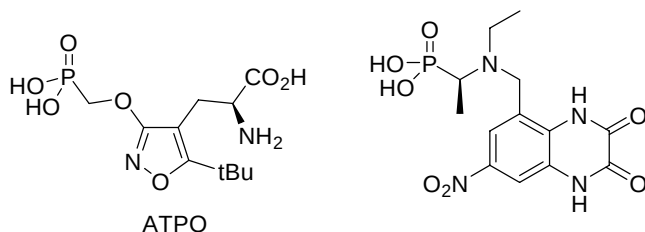


Schéma 75 : Antagonistes du récepteur AMPA

L-AP4 est un agoniste des récepteurs métabotropiques mGlu du groupe III. Une approche classique pour augmenter l'efficacité et la sélectivité est de contraindre la structure des ligands non sélectifs. Les stéréoisomères de l'acide 1-amino-2-phosphonométhylcyclopropanecarboxylique ont été synthétisés et évalués sur les récepteurs mGlu du groupe III[105].

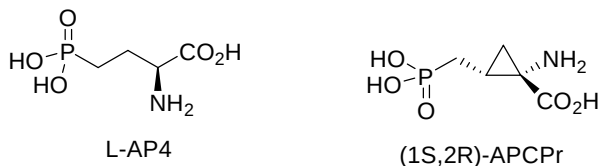


Schéma 76 : L-AP4 et agoniste le plus efficace décrite par Sibille

L'isomère le plus puissant (1S,2R)-APCPr montre un profil pharmacologique similaire à celui de L-AP4 avec des EC_{50} de 0,72, 1,95, >500 et 0,34 μM pour les récepteurs m-Glu4, m-Glu6, m-Glu7 et m-Glu8, respectivement.

La Fosmidomycine est le premier représentant d'une nouvelle classe de drogues antimalaria agissant par l'inhibition de la reductoisomerase 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, une enzyme essentielle dans une des voies de synthèse des isoprenoides.

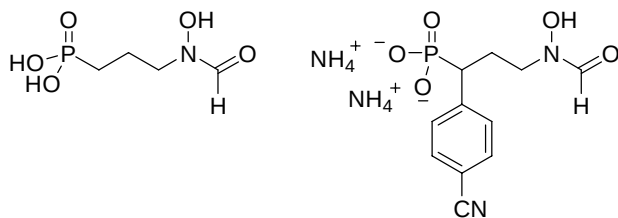


Schéma 77 : Fosmidomycine et un analogue

L'analogue a une activité inhibitrice équivalente à celle de la fosmidomycine avec un IC_{50} de 0,054 μM vis-à-vis de la reductoisomerase 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate[106]. Il a une activité plus importante dans un test in vitro contre la souche D2d *P. falciparum* avec un IC_{50} de 0,27 μM alors que la fosmidomycine a un IC_{50} de 1,1 μM .

L'enzyme mutase UDP-galactopyranose catalyse l'isomérisation de l'UDP-galactopyranose en UDP-galacofuranose, une étape essentielle de la biosynthèse de la paroi cellulaire des mycobactéries. Vincent et *al.* ont décrit la synthèse de deux mimes des intermédiaires de haute énergie[107].

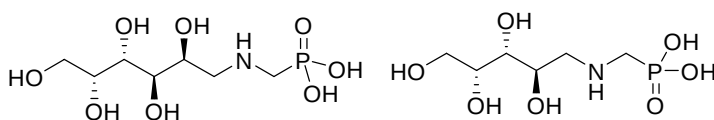


Schéma 78 : Inhibiteurs faibles décrits par Vincent.

A une concentration d'inhibiteurs de 2M, la première molécule n'a aucune activité et la seconde molécule inhibe la réaction de 11%.

Les propriétés magnétiques uniques de l'ion gadolinium (III) le placent au milieu d'un développement révolutionnaire en médecine et plus précisément en imagerie médicale[108]. De nombreuses molécules ont été synthétisées afin de complexer cet ion métallique et de trouver de nouveaux agents de contraste ayant des meilleures propriétés physico-chimiques que les précédents. De nombreux analogues du DOTA, qui est maintenant approuvé comme agent de contraste en clinique, ont été synthétisés. Cette molécule, analogue phosphonique du DOTA, est le DOTP.

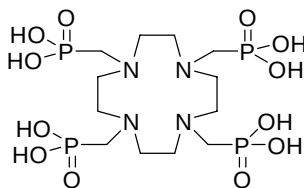


Schéma 79 : DOTP

Les complexes de Gd^{3+} avec des dérivés tétraazaphosphiniques, bien que moins stables que le DOTA, sont capables de lier fortement l'ion

gadolinium afin d'assurer l'excrétion rapide et complète de cet ion métallique toxique dans un temps raisonnable après l'administration.

IV.3. Les acides aminobisphosphoniques

Les premiers bisphosphonates ont été synthétisés au 19^{ème} siècle. Ils étaient initialement utilisés principalement comme agents désincrustants et anticorrosifs mais aussi comme agents complexants dans l'industrie des textiles, des fertilisants et des huiles. Ce n'est que vers la fin des années 60 que leur potentiel dans le traitement des maladies du métabolisme des os est devenu évident[109],[110],[111].

IV.3.1.Méthodes de synthèse

Différentes voies de synthèse des dérivés bisphosphoniques ont été décrites dans la littérature et ont fait l'objet de plusieurs revues[112],[113]. Une méthode simple de préparation est la condensation d'un acide carboxylique avec de l'acide phosphoreux et du trichlorure de phosphore, ou du pentachlorure de phosphore ou encore de l'oxychlorure de phosphore.

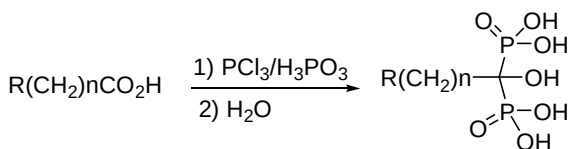


Schéma 80 : Synthèse one-pot de dérivés bis-phosphoniques

Le tableau suivant reprend les rendements obtenus selon les substituants R et la longueur de la chaîne n[114].

R	NH ₂	NH ₂	NH ₂	NH ₂	CH ₃
n	2	3	4	5	10
Rendement (%)	57	89	78	89	95

Tableau 1 : Rendements en fonction de la longueur de la chaîne

Les rendements varient entre 57% et 95%. Lorsque la chaîne de méthylène est plus courte (juste deux motifs), le rendement est moins bon.

Mizrahi et *al.* ont préparé des dérivés bisphosphoniques à partir des amino-acides[115]. La synthèse a nécessité des protections sur l'amine et éventuellement sur les chaînes latérales.

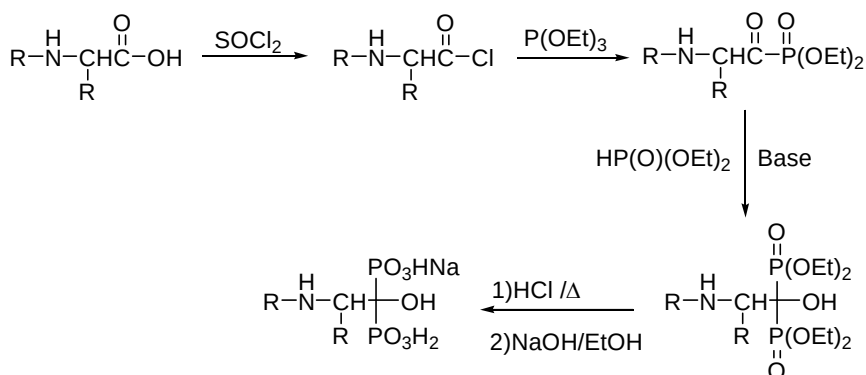


Schéma 81 : Synthèse de dérivés à partir d'acides aminés

L'acide carboxylique est transformé en chlorure d'acide par réaction avec du chlorure de thionyle. Les atomes de phosphore sont insérés en deux étapes. Tout d'abord, le chlorure est substitué par du phosphite de triéthyle dans une réaction d'Arbusov. L'étape suivante est l'attaque de l'acylphosphonate par du phosphite de diéthyle en présence de base. Finalement, les acides bisphosphoniques sont obtenus par des réactions d'hydrolyse en milieu acide et basique.

Du et *al.* ont décrit en 2002 la synthèse de dérivés cycliques en générant un énolate qui va réagir avec un dérivé phosphoré (III) électrophile et une oxydation du phosphore[116].

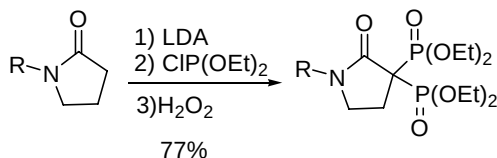


Schéma 82 : Synthèse de dérivés cycliques

Montchamp et *al.* ont décrit en 2005 la synthèse de dérivés aminobisphosphoniques par une réaction radicalaire d'hypophosphite de sodium sur un alcyne terminal suivie d'une oxydation avec de l'ozone.

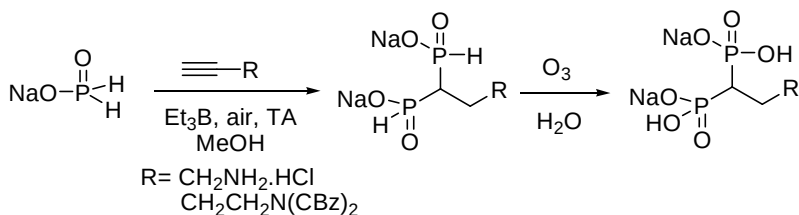


Schéma 83 : Réaction radicalaire sur des alcynes suivie d'une ozonolyse

Les rendements de l'étape radicalaire sont compris entre 42 et 48%.

Szajnman et *al.* ont préparé ces dérivés par réaction de l'acide phosphoreux sur un nitrile ou une amide[117].

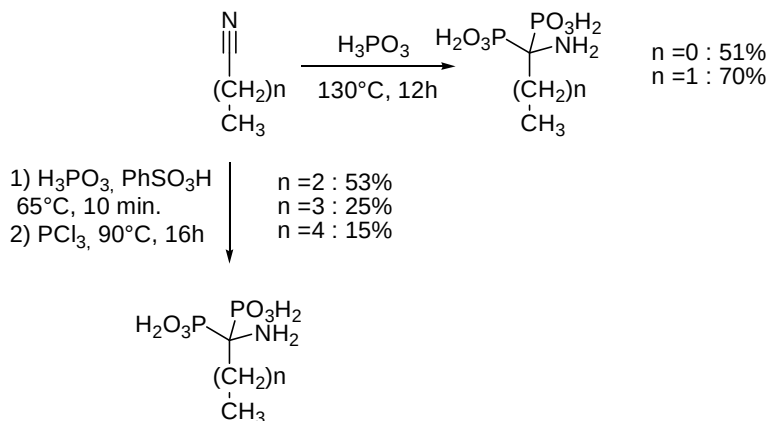


Schéma 84 : Synthèse one-pot d' α -aminobisphosphoniques

Lorsque $n = 0$ ou 1 , le rendement de la réaction varie entre 51 et 70%. Par contre lorsque la longueur de la chaîne est supérieure, il est nécessaire de changer les conditions réactionnelles même si cela ne permet pas d'obtenir des bons rendements.

En 2006, Zhang et *al.* ont décrit la synthèse de dérivés α -aminobisphosphoniques par une réaction one-pot de condensation d'aldéhyde, d'hydroxylamine, de trichlorure de phosphore et d'eau en présence de pyridine[118].

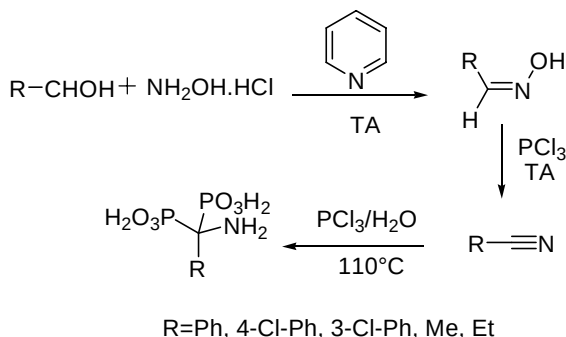


Schéma 85 : Réaction one pot décrite par Zhang

Les rendements de ce procédé sont moyens entre 43% et 55%.

Palacios et *al.* ont décrit la synthèse d'imines bisphosphonates et leur réduction[119].

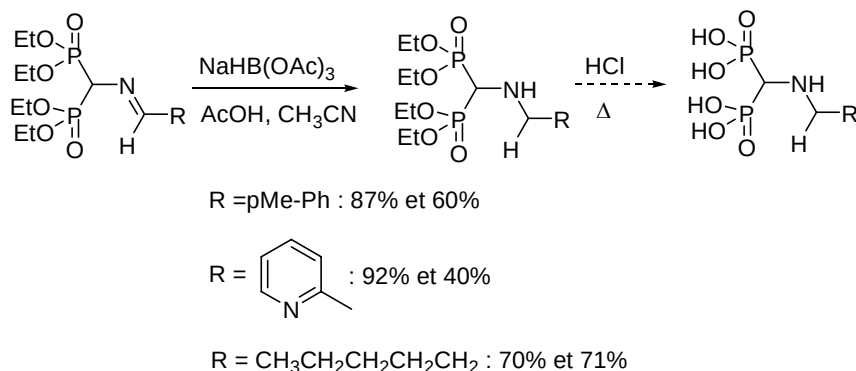


Schéma 86 : Réduction des imines

La première étape est la synthèse de l'imine à partir des différents aldéhydes et de l'aminométhylbisphosphonate. Cette étape a des rendements compris entre 70% et 92%. L'étape suivante est la réduction des imines et les rendements sont compris entre 40% et 71%. L'hydrolyse des groupements phosphonates n'est pas décrite par les auteurs.

IV.3.2. Activités biologiques

Les dérivés acides bisphosphoniques sont aujourd'hui une importante classe de composés phosphorés avec des utilisations pharmacologiques diverses[120]. Ce sont des analogues du motif pyrophosphate où la liaison P-O-P est remplacée par une liaison P-C-P qui est plus stable vis-à-vis de l'hydrolyse chimique et enzymatique. Ces molécules ont une affinité de liaison pour les os très importante et sont utilisées de manière routinière pour le traitement de la résorption des os et dans les autres désordres des os comme la maladie de Paget, les cancers liés à l'hypercalcémie et

l'ostéoporose. L'ostéoporose est la plus courante des maladies métaboliques des os. Elle touche 40% à 50% des femmes âgées et 10% à 15% des hommes âgés. Cette maladie implique la perte graduelle de la masse osseuse et est le résultat d'un déséquilibre entre l'activité de résorption des ostéoclastes et l'activité de formation des ostéoblastes. Les aminobisphosphoniques, qui sont les molécules les plus efficaces, agissent en inhibant les enzymes dans la voie mevalonate. Plusieurs aminobisphosphoniques ont été décrits : les premiers et les plus simples sont les pamidronate, alendronate et neridronate qui se différencient par la longueur de la chaîne aminoalkyle.

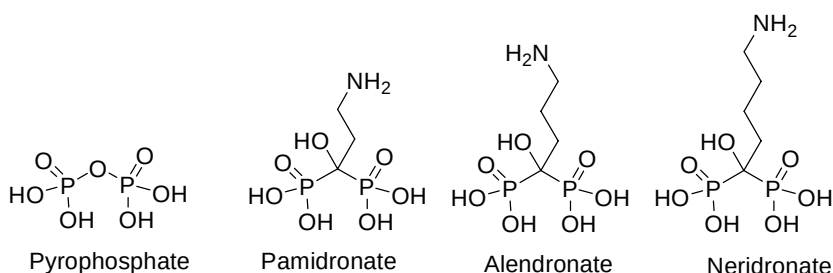


Schéma 87 : Pyrophosphate et Aminobisphosphoniques

Bien que de meilleurs produits aient été découvert depuis, ces molécules sont toujours largement utilisées en médecine. D'autres aminobisphosphoniques sont maintenant testés en clinique dans certains pays comme l'ibandronate et l'incandronate.

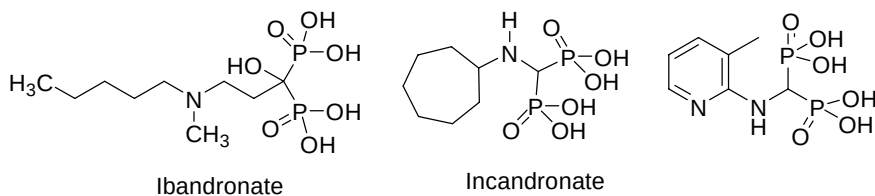


Schéma 88 : Exemples d'autres aminobisphosphoniques

Szajzman *at al.* ont décrit la synthèse et l'évaluation biologique de dérivés aminobisphosphoniques vis-à-vis de la forme intracellulaire du parasite

Trypanosoma cruzi qui est responsable de la maladie de Chagasie (maladie tropicale)[117].

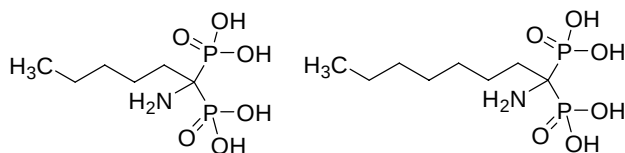


Schéma 89 : Inhibiteurs décrit par Szanjanman

Les deux plus puissants inhibiteurs de la farnesyl pyrophosphate synthase sont représentés ci-dessus et ont des IC_{50} de respectivement 0,38 μM et de 3,57 μM . Ces deux molécules sont aussi des inhibiteurs de la croissance du parasite avec des IC_{50} respectivement de 77 et 72 μM .

Leon et *al.* ont testé une librairie de 117 bisphosphonates pour leur activité antibactérienne contre *Escherichia coli*[121].

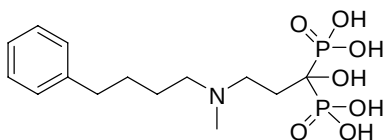


Schéma 90 : Inhibiteur le plus efficace

L'inhibiteur de croissance le plus efficace, qui a un IC_{50} de 33 μM pour *E. Coli* K12, est une molécule connue aussi pour son activité d'inhibition de la résorption des os. L'activité de cette molécule est renforcée en présence de fosmidomycine.

Nous avons déjà parlé auparavant des applications possibles d'agents chélatants. Kubicek et *al.* ont synthétisé un dérivé bisphosphonique du DOTA et quelques complexes avec des lanthanides[122].

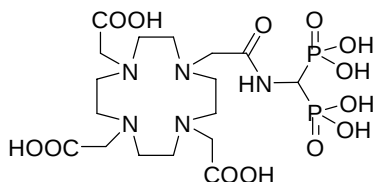


Schéma 91 : Ligand décrit par Kubicek

Chaleix et *al.* ont décrit en 2007 la synthèse de ligands tripodaux possédant des groupements bisphosphoniques pour la thérapie par chélation des actinides comme l'uranium[123]. L'effet principal à long terme d'une contamination accidentelle à l'uranium est l'induction d'un cancer. Actuellement, la thérapie par décorporation basée sur l'utilisation d'un agent chélatant est la méthode la plus efficace pour réduire la dose de radiation et la toxicité chimique des actinides.

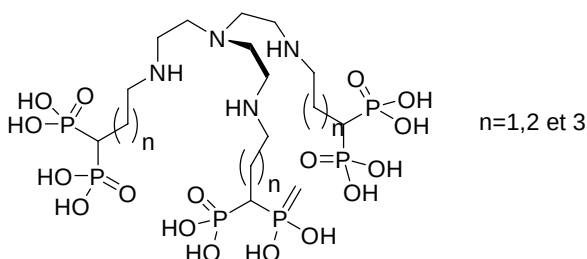


Schéma 92 : Ligands tripodaux synthétisés par Chaleix

Les premiers résultats des études de complexation de cette molécule avec l'ion uranyle sont excellents.

V. Conclusions

Cette introduction nous a démontré que les acides aminés, leurs analogues, leurs homologues et leurs bioisostères sont des « leads » en matière de recherche en chimie médicinale.

Comme nous l'avons vu précédemment dans la littérature, il y a de nombreux exemples de dérivés aminoacides et aminophosphoniques qui sont des inhibiteurs enzymatiques. Cependant, dans le cadre de la recherche de nouveaux agents antibactériens, cette piste est peu documentée.

L'objectif de cette thèse est de synthétiser de nouvelles familles d'inhibiteurs potentiels non β -lactamiques des PBPs, en exploitant la chimie des acides aminés et de leurs bioisostères phosphoniques.

VI. Références

- [1] Hooper N. M., *Essays in Biochemistry* **2002**, 38, *Proteases in Biology and Medicine*, 1-8.
- [2] Hedstrom L., *Chem. Rev.* **2002**, 102, 12, 4501-4523.
- [3] Matagne A., Lamotte-Brasseur J., Frere J.-M., *Biochem. J.* **1998**, 330, 2, 581-598.
- [4] Knowles J. R., *Acc. Chem. Res.* **1985**, 18, 4, 97-104.
- [5] Walsh C., *Nature* **2000**, 406, 6797, 775-781.
- [6] Pucci M. J., Dougherty T. J., *J. Bacteriol.* **2002**, 184, 2, 588-591.
- [7] Pinho M. G., Filipe S. R., De Lencastre H., Tomasz A., *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 22, 6525-6531.
- [8] Golemi-Kotra D., Meroueh S. O., Kim C., Vakulenko S. B., Bulychev A., Stemmler A. J., Stemmler T. L., Mobashery S., *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 33, 34665-34673.
- [9] Minasov G., Wang X., Shoichet B. K., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 19, 5333-5340.
- [10] Meroueh S. O., Fisher J. F., Schlegel H. B., Mobashery S., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 44, 15397-15407.
- [11] Oefner C., D'Arcy A., Daly J. J., Gubernator K., Charnas R. L., Heinze I., Hubschwerlen C., Winkler F. K., *Nature* **1990**, 343, 6255, 284-288.
- [12] Lobkovsky E., Moews P. C., Liu H., Zhao H., Frere J. M., Knox J. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 23, 11257-11261.
- [13] Patera A., Blaszcak L. C., Shoichet B. K., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 43, 10504-10512.
- [14] Dubus A., Normark S., Kania M., Page M. G. P., *Biochemistry* **1994**, 33, 28, 8577-8586.
- [15] Kato-Toma Y., Iwashita T., Masuda K., Oyama Y., Ishiguro M., *Biochem. J.* **2003**, 371, 1, 175-181.
- [16] Bulychev A., Massova I., Miyashita K., Mobashery S., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 33, 7619-7625.
- [17] Nukaga M., Haruta S., Tanimoto K., Kogure K., Taniguchi K., Tamaki M., Sawai T., *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 11, 5729-5735.
- [18] Bradford P. A., *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, 14, 4, 933-951.
- [19] Crichlow G. V., Kuzin A. P., Nukaga M., Mayama K., Sawai T., Knox J. R., *Biochemistry* **1999**, 38, 32, 10256-10261.
- [20] Fisher J. F., Meroueh S. O., Mobashery S., *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2, 395-424.
- [21] Danel F., Frere J. M., Livermore D. M., *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. and Mol. Enzymol.* **2001**, 1546, 1, 132-142.
- [22] Franceschini N., Segatore B., Perilli M., Vessillier S., Franchino L., Amicosante G., *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 49, 2, 395-398.

- [23] Pernot L., Frenois F., Rybkine T., L'Hermite G., Petrella S., Delettre J., Jarlier V., Collatz E., Sougakoff W., *J. Mol. Biol.* **2001**, 310, 4, 859-874.
- [24] Danel F., Paetzel M., Strynadka N. C. J., Page M. G. P., *Biochemistry* **2001**, 40, 31, 9412-9420.
- [25] Franceschini N., Boschi L., Pollini S., Herman R., Perilli M., Galleni M., Frere J.-M., Amicosante G., Rossolini G. M., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 12, 3509-3516.
- [26] Golemi D., Maveyraud L., Vakulenko S., Samama J. P., Mobashery S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 25, 14280-14285.
- [27] Paetzel M., Danel F., De Castro L., Mosimann S. C., Page M. G. P., Strynadka N. C. J., *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 10, 918-925.
- [28] Golemi D., Maveyraud L., Vakulenko S., Tranier S., Ishiwata A., Kotra L. P., Samama J.-P., Mobashery S., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 25, 6132-6133.
- [29] Maveyraud L., Golemi-Kotra D., Ishiwata A., Meroueh O., Mobashery S., Samama J.-P., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11, 2461-2465.
- [30] Hooper N. M., *Zinc Metalloproteases in Health and Disease* **1996**, 1-21.
- [31] Auld D. S., *Handbook of Proteolytic Enzymes (2nd Edition)* **2004**, 1, 268-289.
- [32] Bounaga S., Laws A. P., Galleni M., Page M. I., *Biochem. J.* **1998**, 331, 3, 703-711.
- [33] Wang Z., Fast W., Benkovic S. J., *Biochemistry* **1999**, 38, 31, 10013-10023.
- [34] Ullah J. H., Walsh T. R., Taylor I. A., Emery D. C., Verma C. S., Gamblin S. J., Spencer J., *J. Mol. Biol.* **1998**, 284, 1, 125-136.
- [35] Docquier J.-D., Lamotte-Brasseur J., Galleni M., Amicosante G., Frere J.-M., Rossolini G. M., *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, 51, 2, 257-266.
- [36] Livermore D. M., Woodford N., *Curr. Opin. Microbiol.* **2000**, 3, 5, 489-495.
- [37] Toleman M. A., Rolston K., Jones R. N., Walsh T. R., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 1, 329-332.
- [38] Page M. G. P., *Drug Resist. Updates* **2000**, 3, 2, 109-125.
- [39] Bryskier A., Couturier C., Lowther J., *Antimicrob. Agents* **2005**, 410-446.
- [40] Buynak J. D., *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71, 7, 930-940.
- [41] Micetich R. G., Maiti S. N., Spevak P., Hall T. W., Yamabe S., Ishida N., Tanaka M., Yamazaki T., Nakai A., Ogawa K., *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 8, 1469-1474.
- [42] Bush K., Macalintal C., Rasmussen B. A., Lee V. J., Yang Y., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 4, 851-858.

- [43] Kahan J. S., Kahan F. M., Goegelman R., Currie S. A., Jackson M., Stapley E. O., Miller T. W., Miller A. K., Hendlin D., et al., *J. Antibiot.* **1979**, 32, 1, 1-12.
- [44] Tsang W. Y., Dhanda A., Schofield C. J., Frere J.-M., Galleni M., Page M. I., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 7, 1737-1739.
- [45] Buynak John D., Chen H., Vogeti L., Gadhachanda Venkat R., Buchanan Christine A., Palzkill T., Shaw Robert W., Spencer J., Walsh Timothy R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5, 1299-1304.
- [46] Sandanayaka V. P., Prashad A. S., *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 12, 1145-1165.
- [47] Martin R., Jones J. B., *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 46, 8399-8402.
- [48] Ness S., Martin R., Kindler A. M., Paetzel M., Gold M., Jensen S. E., Jones J. B., Strynadka N. C. J., *Biochemistry* **2000**, 39, 18, 5312-5321.
- [49] Pratt R. F., *Science* **1989**, 246, 4932, 917-919.
- [50] Rahil J., Pratt R. F., *Biochem. J.* **1991**, 275, 3, 793-795.
- [51] Pratt R. F., Hammar N. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 13, 3004-3006.
- [52] Li N., Pratt R. F., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 18, 4264-4268.
- [53] Perumal S. K., Pratt R. F., *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 13, 4778-4785.
- [54] Kumar S., Pearson A. L., Pratt R. F., *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 8, 2035-2044.
- [55] Adediran S. A., Cabaret D., Flavell R. R., Sammons J. A., Wakselman M., Pratt R. F., *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 20, 7023-7033.
- [56] Wyrembak P. N., Babaoglu K., Pelto R. B., Shoichet B. K., Pratt R. F., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 31, 9548-9549.
- [57] Walter M. W., Felici A., Galleni M., Soto R. P., Adlington R. M., Baldwin J. E., Frere J.-M., Gololobov M., Schofield C. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 20, 2455-2458.
- [58] Payne D. J. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 1, 135-140.
- [59] Greenlee M. L., Laub J. B., Balkovec J. M., Hammond M. L., Hammond G. G., Pompilano D. L., Epstein-Toney J. H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 17, 2549-2554.
- [60] Mollard C., Moali C., Papamichael C., Damblon C., Vessilier S., Amicosante G., Schofield C. J., Galleni M., Frere J.-M., Roberts G. C. K., *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 48, 45015-45023.
- [61] Walter M. W., Valladares M. H., Adlington R. M., Amicosante G., Baldwin J. E., Frere J.-M., Galleni M., Rossolini G. M., Schofield C. J., *Bioorg. Chem.* **1999**, 27, 1, 35-40.
- [62] Toney J. H., Cleary K. A., Hammond G. G., Yuan X., May W. J., Hutchins S. M., Ashton W. T., Vanderwall D. E., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 18, 2741-2746.

- [63] Toney J. H., Hammond G. G., Fitzgerald P. M. D., Sharma N., Balkovec J. M., Rouen G. P., Olson S. H., Hammond M. L., Greenlee M. L., Gao Y.-D., *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 34, 31913-31918.
- [64] Spencer J., Walsh T. R., *Angew.Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 7, 1022-1026.
- [65] Kurosaki H., Yamaguchi Y., Higashi T., Soga K., Matsueda S., Yumoto H., Misumi S., Yamagata Y., Arakawa Y., Goto M., *Angew.Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 25, 3861-3864.
- [66] Groeger H., *Chem. Rev.* **2003**, 103, 8, 2795-2827.
- [67] Strecker A., *Ann. Chem. Pharm.* **1850**, 75, 27.
- [68] Yadav J. S., Reddy B. V. S., Eeshwaraiah B., Srinivas M., *Tetrahedron* **2004**, 60, 8, 1767-1771.
- [69] Ranu B. C., Dey S. S., Hajra A., *Tetrahedron* **2002**, 58, 13, 2529-2532.
- [70] Yanada R., Okaniwa M., Kaieda A., Ibuka T., Takemoto Y., *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4, 1283-1286.
- [71] Fukuda N., Sasaki K., Sastry T. V. R. S., Kanai M., Shibasaki M., *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 3, 1220-1225.
- [72] Ooi T., Uematsu Y., Maruoka K., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8, 2548-2549.
- [73] Surendra K., Krishnaveni N. S., Mahesh A., Rao K. R., *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 6, 2532-2534.
- [74] Southwood T. J., Curry M. C., Hutton C. A., *Tetrahedron* **2006**, 62, 1, 236-242.
- [75] Mulzer J., Angermann A., Schubert B., Seilz C., *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 26, 5294-5299.
- [76] Conway S. J., Miller J. C., Howson P. A., Clark B. P., Jane D. E., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 6, 777-780.
- [77] Fu Y., Hammarstroem L. G. J., Miller T. J., Fronczek F. R., McLaughlin M. L., Hammer R. P., *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 21, 7118-7124.
- [78] O'Donnell M. J., Wojciechowski K., Ghosez L., Navarro M., Sainte F., Antoine J. P., *Synthesis* **1984**, 4, 313-315.
- [79] O'Donnell M. J., Bennett W. D., Wu S., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6, 2353-2355.
- [80] O'Donnell M. J., *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 8, 506-517.
- [81] Lygo B., Andrews B. I., *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 8, 518-525.
- [82] Moloney M. G., *Nat. Prod. Rep.* **1998**, 15, 2, 205-219.
- [83] Braeuner-Osborne H., Egebjerg J., Nielsen E., Madsen U., Krogsgaard-Larsen P., *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 14, 2609-2645.
- [84] Moloney Mark G., *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 5, 597-616.
- [85] Kati W. M., Montgomery D., Maring C., Stoll V. S., Giranda V., Chen X., Laver W. G., Kohlbrenner W., Norbeck D. W., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 9, 2563-2570.

- [86] Kukis D. L., DeNardo G. L., DeNardo S. J., Mirick G. R., Miers L. A., Greiner D. P., Meares C. F., *Cancer Res.* **1995**, 55, 4, 878-884.
- [87] Green M. A., Welch M. J., Huffman J. C., *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 12, 3689-3691.
- [88] Arslantas E., Smith-Jones P. M., Ritter G., Schmidt R. R., *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 19, 3979-3984.
- [89] Kukhar V. P., *Russ. Chem. Rev.* **1987**, 56, 9, 859-874.
- [90] Cherkasov R. A., *Russ. Chem. Rev.* **1998**, 67, 10, 857-882.
- [91] Kukhar V. P., Hudson H. R., Editors, *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids: Chemistry and Biological Activity*. 2000; p 634 pp.
- [92] Syamala M., *Organic Preparations and Procedures International* **2005**, 37, 4, 409.
- [93] Kabachnik M. I., Medved T. Y., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1952**, 83, 689-692.
- [94] Pudovik A. N., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1952**, 83, 865-868.
- [95] Cherenok S., Vovk A., Muravyova I., Shivanyuk A., Kukhar V., Lipkowski J., Kalchenko V., *Org. Lett.* **2006**, 8, 4, 549-552.
- [96] Kabachnik M. M., Ternovskaya T. N., Zobnina E. V., Beletskaya I. P., *Russ. J. Org. Chem.* **2002**, 38, 4, 480-483.
- [97] Gajda T., Matusiak M., *Synth. Commun.* **1992**, 22, 15, 2193-2203.
- [98] Cabella G., Jommi G., pagliarin R., Sello G., Sisti M., *Tetrahedron* **1995**, 51, 6, 1817-1826.
- [99] Kafarski P., Lejczak B., *Curr. Med. Chem.- Anti-Cancer Agents* **2001**, 1, 3, 301-312.
- [100] Grembecka J., Kafarski P., *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, 1, 2, 133-144.
- [101] Iturrioz X., Vazeux G., Celerier J., Corvol P., Llorens-Cortes C., *Biochemistry* **2000**, 39, 11, 3061-3068.
- [102] Lowther W. T., Zhang Y., Sampson P. B., Honek J. F., Matthews B. W., *Biochemistry* **1999**, 38, 45, 14810-14819.
- [103] Lejczak B., Kafarski P., Makowiecka E., *Biochem. J.* **1987**, 242, 1, 81-88.
- [104] Lejczak B., Dus D., Kafarski P., *Anti-Cancer Drug Des.* **1990**, 5, 4, 351-358.
- [105] Sibille P. et al., *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 15, 3585-3595.
- [106] Devreux V., Wiesner J., Jomaa H., Rozenski J., Van der Eycken J., Van Calenbergh S., *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 10, 3783-3789.
- [107] Pan W., Ansiaux C., Vincent S. P., *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 25, 4353-4356.
- [108] Kiss T., Lazar I., Kafarski P., *Metal-Based Drugs* **1994**, 1, 2-3, 247-264.
- [109] Fleisch H., Russell R. G. G., Straumann F., *Nature* **1966**, 212, 5065, 901-903.

- [110] Francis M. D., Russell R. G. G., Fleisch H., *Science* **1969**, 165, 3899, 1264-1266.
- [111] Fleisch H., Russell R. G. G., Francis M. D., *Science* **1969**, 165, 3899, 1262-1264.
- [112] Fernandes C., Leite R. S., Lancas F. M., *Quim. Nova* **2005**, 28, 2, 274-280.
- [113] Lecouvey M., Leroux Y., *Heteroat. Chem.* **2000**, 11, 7, 556-561.
- [114] Kieczkowski G. R., Jobson R. B., Melillo D. G., Reinhold D. F., Grenda V. J., Shinkai I., *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 25, 8310-8312.
- [115] Mizrahi D. M., Waner T., Segall Y., *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2001**, 173, 1-25.
- [116] Du Y., Jung K.-Y., Wiemer D. F., *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 48, 8665-8668.
- [117] Szajnman S. H., Ravaschino E. L., Docampo R., Rodriguez J. B., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 21, 4685-4690.
- [118] Zhang X. Z., Wu M. S., Huang Y., Chen R. Y., *Chin. Chem. Lett.* **2006**, 17, 6, 765-768.
- [119] Palacios F., Gil M. J., de Marigorta E. M., Rodriguez M., *Tetrahedron* **2000**, 56, 34, 6319-6330.
- [120] Widler L. et al., *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 17, 3721-3738.
- [121] Leon A., Liu L., Yang Y., Hudock M. P., Hall P., Yin F., Studer D., Puan K.-J., Morita C. T., Oldfield E., *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 25, 7331-7341.
- [122] Kubicek V., Rudovsky J., Kotek J., Hermann P., Vander Elst L., Muller R. N., Kolar Z. I., Wolterbeek H. T., Peters J. A., Lukes I., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 47, 16477-16485.
- [123] Chaleix V., Lecouvey M., *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 4, 703-706.
- [124] Fields E. K., *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 1528-1531.

CHAPITRE 2

OBJECTIFS ET STRATEGIES

I. Notre projet

Notre projet découle de certaines observations récentes effectuées au Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP) de l'Université de Liège. La cristallisation des β -lactamases de la classe A en présence d'un tampon citrate a mis en évidence le rôle inattendu du citrate qui se loge parfaitement dans la cavité enzymatique[1].

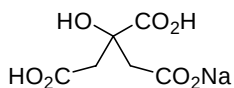


Schéma 93 : Citrate monosodique

I.1.Cristallographie

Les études cristallographiques ont été effectuées avec la β -lactamase BS3. Le site actif de BS3 est délimité par les motifs SxxK (Ser70, Lys73) sur l'hélice α 2, SDN (Ser130, Asn132) sur une boucle, KTG (Lys234, Thr235) sur le brin β 3, Arg244 et la boucle oméga contenant Glu166 et Asn170.

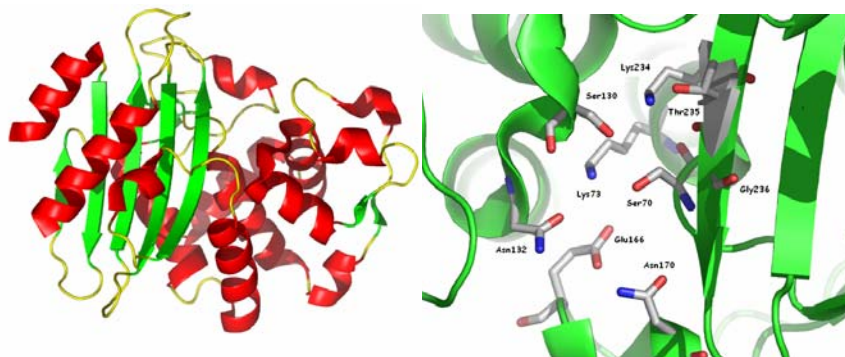


Figure 6 : Représentation de la structure tertiaire et du site actif de BS3

De façon fortuite, l'équipe de Paulette Charlier a pu co-cristalliser le citrate dans l'enzyme BS3 à la figure 7. L'image ci-dessous est une représentation du citrate logé dans le site actif. Sur l'image, nous voyons le site actif de BS3 et les lignes en tiret représentent les liaisons hydrogène. La molécule de citrate interagit via le groupement 4 avec les atomes d'oxygène du groupement hydroxyle de Ser70 et de Ser130. Le groupement alcool du citrate interagit avec l'ion Na^+ , l'ion Na^+ étant lui même en contact avec le groupement hydroxyle de Tyr274. Le groupement 1 interagit avec Thr216 et Arg244. Le groupement 3 a une interaction avec Arg244, Thr216 et Ser130. Le citrate interagit aussi avec les chaînes latérales de Thr235 et Arg144, les deux acides aminés bordant le site actif et impliqués dans le positionnement des substrats.

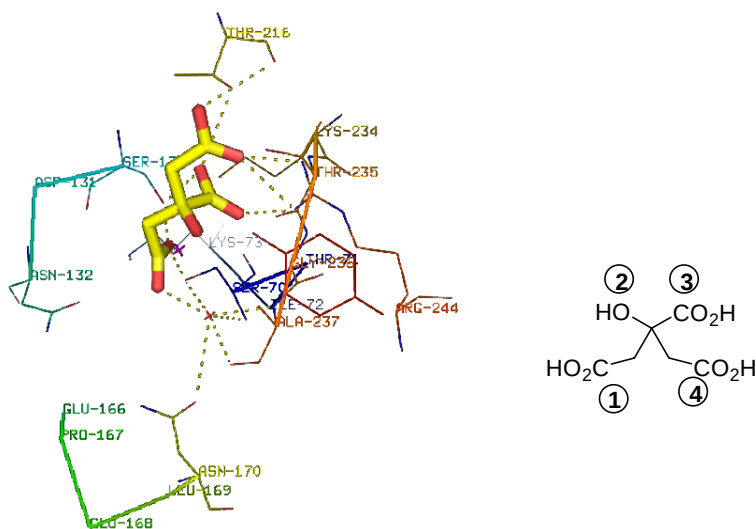


Figure 7 : Représentation du citrate dans le site actif

L'iso-citrate a aussi été co-cristallisé avec BS3. Le groupement 3 interagit avec Ser130, Lys73 et Ser70. L'alcool interagit avec Thr274 via une molécule d'eau. Le groupement 1 interagit avec Tyr105, Thr216 et Arg244 via une molécule d'eau. Un des oxygènes du groupement 4 interagit avec Asn132 et Asn170 via une molécule d'eau. L'autre oxygène du groupement 4 interagit avec Ala237 et Ser70. Il interagit aussi avec Asn170 via une molécule d'eau.

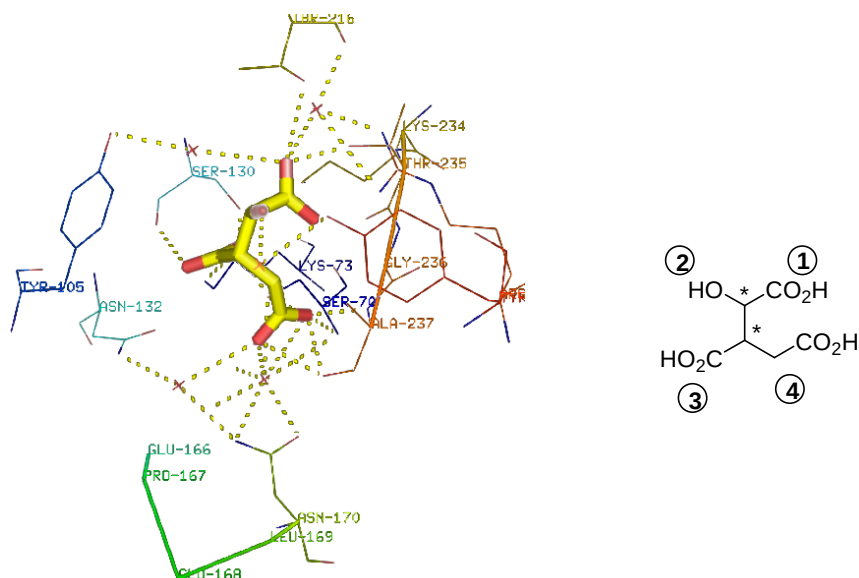


Figure 8 : Représentation de l'iso-citrate dans le site actif

Bien que l'iso-citrate utilisé pour la co-cristallisation soit un mélange des quatre diastéréoisomères, un seul diastéréoisomère, dont la configuration est (R,S), est retrouvé dans la cavité enzymatique

I.2.Résultats biologiques

Le citrate est un inhibiteur de toutes les β -lactamases de la classe A. Les constantes d'inhibition du citrate et de l'iso-citrate sont reprises dans le tableau 2. L'iso-citrate est beaucoup moins actif que le citrate vis-à-vis des β -lactamases de la classe A sauf dans le cas de la β -lactamase NMCA. Les constantes d'inhibition varient entre 53 et 730 μ M pour le citrate et 60 et 2200 μ M pour l'isocitrate (ces valeurs n'ont pas été corrigées afin de prendre en compte le fait que, très probablement, seul un des quatre stéréoisomères est actif). Le citrate et l'iso-citrate ne sont pas actifs vis-à-vis des β -lactamases des classes B, C et D.

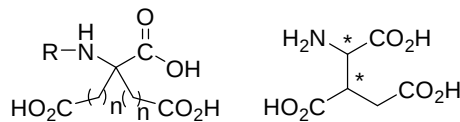
Classe	Enzymes	Ki citrate	Ki iso-citrate
A	BS3	490 μ M	2200 μ M
A	NMCA	53 μ M	60 μ M
A	Albus G	210 μ M	1600 μ M
A	TEM-1	730 μ M	1500 μ M
B	BcII	>10 mM	>10 mM
C	Q908R	>10 mM	>10 mM
D	Oxa-10	>10 mM	>10 mM

Tableau 2 : Constante d'inhibition du citrate et de l'iso-citrate

II. Choix des cibles

II.1.Dérivés aminés du citrate et de l'iso-citrate

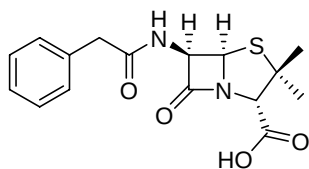
Ces données expérimentales nous permettent de considérer le citrate et l'iso-citrate comme des « leads » pour la conception de nouveaux inhibiteurs sélectifs et de haute affinité pour les β -lactamases. Nous envisageons d'augmenter le « binding » dans la cavité enzymatique en remplaçant la fonction alcool du citrate par une fonction amine sur laquelle on pourrait ancrer une variété de chaînes latérales.



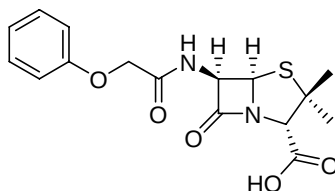
R= H, chaîne acyle
n=1, 2

Schéma 94 : Molécules cibles (première famille)

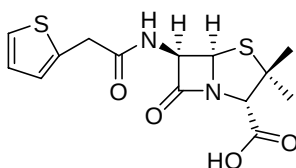
Les chaînes acyles choisies sont les chaînes des pénicillines G, V et de la 2-thienyl pénicilline et devraient permettre d'augmenter les interactions dans le site actif, notamment aux niveau des acides aminés Thr235 et Arg144 impliqués dans le positionnement du substrat.



Pénicilline G



Pénicilline V



2-thienyl Pénicilline

Schéma 95 : Chaînes latérales des différentes pénicillines

L'aminocitrate et ses dérivés ayant seulement un ou deux acides libres nous permettront de déterminer l'importance des trois fonctions acides carboxyliques. Les dérivés homologues peuvent éventuellement créer de nouvelles interactions. L'amino-iso-citrate est aussi une des molécules cibles même si l'iso-citrate a montré une activité moins intéressante que celle du citrate sur les β -lactamases de la classe A.

II.2.Dérivés amino-phosponiques

Les acides phosponiques sont des bioisostères des acides carboxyliques. En remplaçant une ou plusieurs des 3 fonctions carboxyliques par des fonctions phosphonates, de nouveaux inhibiteurs pourraient être créés. Cette modification permettrait en outre d'envisager des inhibiteurs de β -lactamases à zinc (classe B), ainsi que des inhibiteurs de β -lactamases à sérine (classe A) fonctionnant comme des « analogues de l'état de transition ». La première série de molécules représente le bioisostère phosphonique de l'aminocitrate et ses homologues. La seconde

série de molécules possède un groupement bisphosphonique et une chaîne carbonée de longueur variable.

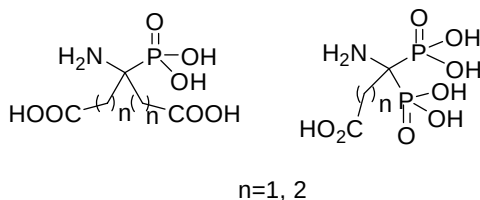
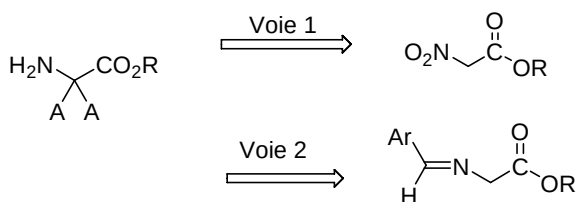


Schéma 96 : Molécules cibles (deuxième famille)

III.Choix des stratégies de synthèse

III.1.Synthèse des dérivés aminés du citrate et de l'iso-citrate

Tout d'abord, la méthode basée sur la double alkylation du nitroacétate d'éthyle (stratégie 1) sera envisagée. Une autre méthode, développée à l'origine par O'Donnell, basée sur l'alkylation de l'anion de l'imine de la glycine sera testée en parallèle (stratégie 2). En effet, la méthode 2 permet des variations structurales (esters benzyliques) que ne permet pas la méthode 1 à cause de l'étape de réduction du groupement nitro qui est effectuée dans des conditions assez dures.



A : chaîne alkyle terminée par un acide carboxylique

Schéma 97 : Deux stratégies de double alkylation

Le choix de l'imine est important. L'utilisation d'une imine dérivée de la benzophénone est conseillée si nous voulons nous arrêter à la monoalkylation[2]. Cette méthode est largement utilisée dans la littérature

afin de synthétiser des amino-acides non naturels de manière énantiosélective. Elle a été appliquée à de nombreuses synthèses totales comme celle de l' Isodityrosine 21[3]. Par contre, il vaut mieux utiliser une imine dérivée d'un aldéhyde aromatique comme le métachlorobenzaldéhyde si on veut faire une réaction de dialkylation.

La synthèse de l' amino-iso-citrate sera effectuée à l'aide de la stratégie 2 par une réaction d'alkylation. L'imine choisie est celle dérivée de la benzophénone afin de favoriser la monoalkylation. Cette méthode fournira les quatre diastéréoisomères. En effet dans un premier temps, les tests biologiques peuvent être effectués sur le mélange. Si les résultats biologiques sont encourageants, la synthèse énantiosélective de cette molécule sera envisagée.

III.2.Synthèse des dérivés aminophosphoniques et des dérivés aminobisphosphoniques

La première stratégie envisagée sera la méthodologie développée pour les molécules de type aminocitrate (stratégie 2) basée sur l'alkylation d'imines. Cette stratégie sera appliquée pour la synthèse de la plupart des molécules aminophosphoniques et de tous les dérivés aminobisphosphoniques. D'autres stratégies seront aussi envisagées pour la synthèse du bioisostère phosphonique de l'aminocitrate. Il s'agit principalement de la réaction de Kabachnik-Fields et de la réaction de Pudovik[4].

IV. Evaluations biologiques

IV.1. Evaluation biochimique vis-à-vis des β -lactamases et co-cristallisation

L'évaluation biochimique des molécules sera effectuée au centre d'ingénierie des protéines (CIP) de l'université de Liège. Les activités inhibitrice de nos molécules seront testées sur des β -lactamases des classes A, B, C et D. Les β -lactamases de la classe A sélectionnées pour les tests sont les protéines: TEM-1, BS3 et NMCA. Ce choix est basé sur leur importance clinique. La β -lactamase BS3 est le point de départ du projet. Des structures cristallines de l'enzyme avec le citrate et l'iso-citrate ont été obtenues. Des essais de co-cristallisation seront réalisés avec nos nouvelles molécules possédant une bonne activité sur la β -lactamase BS3. TEM-1 est la β -lactamase la plus couramment trouvée chez les bactéries. Elle est présente notamment chez les bactéries: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* et *Shigella* spp, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, et *Serratia marcescens*. La β -lactamase TEM-1 est une protéine globulaire monomérique composée de 263 acides aminés. Sa structure comprend deux domaines : un domaine α/β constitué de cinq feuillets β et de trois hélices α et un domaine constitué de 8 hélices α [5],[6].

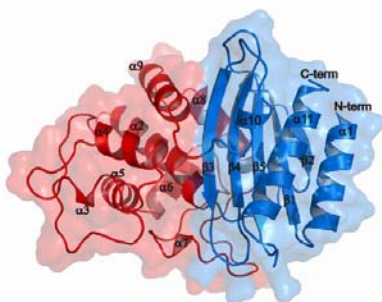


Figure 9 : Représentation de la structure de la β -lactamase TEM-1

Les β -lactamases de la classe A sont généralement des enzymes caractérisées par leur spécificité pour les pénicillines. La β -lactamase NMCA appartient à cette classe A malgré sa capacité à hydrolyser une large gamme d'antibiotiques β -lactamiques incluant les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes[7].

Les β -lactamases de la classe C sont les β -lactamases les plus couramment rencontrées après celles de la classe A. Les enzymes de la classe C ont un site actif plus large qui leur permet de se lier à des β -lactames plus encombrées telles que les céphalosporines de la troisième génération. La β -lactamase P99 provient de la souche *Enterobacter cloacae* et sa structure cristalline a été décrite dans la littérature en 1993[8]. Cette β -lactamase est souvent choisie pour les tests biologiques comme représentant-type des β -lactamases de la classe C.

La β -lactamase Oxa-10 est une β -lactamase de la classe D. La structure cristalline de la β -lactamase Oxa-10 de *P. aeruginosa* a été rapportée dans la littérature simultanément par Paetzel et *al.* et par Golemi et *al.* en décembre 2000[9],[10]. La structure a révélé que la β -lactamase Oxa-10 et les β -lactamases des classes A et C, malgré une similarité de séquence très faible, ont une structure tertiaire globalement similaire. Cependant, plusieurs différences importantes existent. Premièrement, il y a un brin plus long de trois résidus qui fournit une extension de la cavité enzymatique. Deuxièmement, il n'y a pas de résidus carboxylate qui va jouer le rôle de base générale dans l'étape de déacylation de l'intermédiaire acyl-enzyme.

Les métallo- β -lactamases occupent une position d'intérêt en terme d'ampleur de leur distribution et de largeur de leur spectre d'activité

catalytique vis-à-vis des β -lactames[11]. Deux représentants majeurs de la classe B sont : BcII, qui est la première β -lactamase à avoir été cristallisée, et VIM-4. VIM-4 est une nouvelle β -lactamase appartenant à la famille des β -lactamases VIM[12]. Ces enzymes ont une homologie de séquences de 30 à 40% avec les enzymes IMP qui sont des métallo- β -lactamases de grande importance clinique.

Finalement, certaines molécules seront testées sur la D,D-transpeptidase-carboxypeptidase R39 qui provient de la souche *Actinomadura*. La structure cristalline de R39 a été décrite dans la littérature par Sauvage et *al.* en 2005[13]. La protéine est composée de trois domaines : un domaine de liaison de la pénicilline similaire à celui de PBP5 et deux domaines de fonctions inconnues.

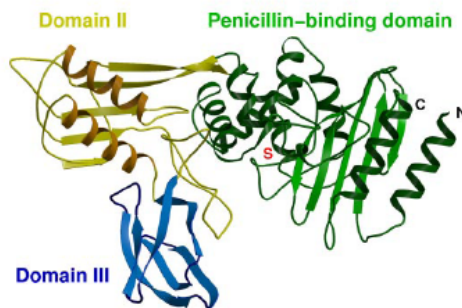


Figure 10 : Représentation de la structure de R39

IV.2.Evaluation biologique vis-à-vis des récepteurs du système nerveux central

L'activité agoniste/antagoniste de certaines molécules sera testée sur les récepteurs ionotropiques NMDA, AMPA, Kainate, PCP, glycine_A et glycine_B, dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut de recherches SERVIER.

Les récepteurs NMDA sont des oligomères tétramériques ou pentamériques des sous-unités NR1, NR2A-NR2D et NR3, avec le site de liaison du glutamate sur NR1. Les récepteurs AMPA contiennent les sous unités iGluR1 à iGluR4. Le récepteur kaïnate a été jusqu'à présent beaucoup moins étudié que les récepteurs AMPA et NMDA. Cinq récepteurs kaïnates ont été identifiés : KA1, KA2, GluR5, GluR6 et GluR7. Ils ont une distribution plus limitée dans le cerveau et leur fonction est mal définie. Les antagonistes non compétitifs du récepteur NMDA sont connus pour se lier à un site de liaison phénylcyclidine (PCP) localisé à l'intérieur du canal cationique du récepteur NMDA[14]. La glycine agit comme un neurotransmetteur inhibiteur et cet effet de la glycine est régulé par les récepteurs ionotropiques sensibles à la strychnine appelé glycine_A. La glycine est aussi un co-transmetteur du récepteur NMDA. Ces récepteurs qui sont activés par le glycine et qui sont insensibles à la strychnine sont les récepteurs glycine_B[15].

IV.3.Evaluation de la capacité de complexation des cations

La spectrométrie de masse par électrospray est une technique suffisamment douce pour permettre l'étude des complexes non covalents. La capacité complexante de certaines des molécules synthétisées sera évaluée en collaboration avec l'équipe du Pr Jean-Louis Habib-Jiwan de l'université catholique de Louvain. Les ions considérés dans l'étude de complexation seront le calcium et le zinc introduits sous forme de perchlorate. Le choix du calcium est guidé par le fait que des molécules complexant le calcium peuvent être potentiellement intéressantes dans le traitement des maladies des os, comme par exemple le pamidronate (cf introduction p71). Le zinc quant à lui est impliqué dans le mécanisme d'hydrolyse des β -lactames par les β -lactamases de la classe B. Ces molécules complexant bien le zinc, après reconnaissance par l'enzyme, pourraient être des inhibiteurs.

V. Références

- [1] Fonze E., Vanhove M., Dive G., Sauvage E., Frere J.-M., Charlier P., *Biochemistry* **2002**, 41, 6, 1877-1885.
- [2] O'Donnell M. J., *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 8, 506-517.
- [3] Lygo B., Andrews B. I., *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 8, 518-525.
- [4] Cherkasov R. A., *Russ. Chem. Rev.* **1998**, 67, 10, 857-882.
- [5] Strynadka N. C. J., Adachi H., Jensen S. E., Johns K., Sielecki A., Betzel C., Sutoh K., James M. N. G., *Nature* **1992**, 359, 6397, 700-705.
- [6] Jelsch C., Lenfant F., Masson J. M., Samama J. P., *FEBS Lett.* **1992**, 299, 2, 135-142.
- [7] Swaren P. et al., *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 41, 26714-26721.
- [8] Lobkovsky E., Moews P. C., Liu H., Zhao H., Frere J. M., Knox J. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 23, 11257-11261.
- [9] Paetzel M., Danel F., De Castro L., Mosimann S. C., Page M. G. P., Strynadka N. C. J., *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 10, 918-925.
- [10] Golemi D., Maveyraud L., Vakulenko S., Tranier S., Ishiwata A., Kotra L. P., Samama J.-P., Mobashery S., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 25, 6132-6133.
- [11] Fisher Jed F., Meroueh Samy O., Mobashery S., *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2, 395-424.
- [12] Pournaras S., Tsakris A., Maniati M., Tzouvelekis Leonidas S., Maniatis Antonios N., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 12, 4026-4028.
- [13] Sauvage E., Herman R., Petrella S., Duez C., Bouillenne F., Frere J.-M., Charlier P., *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 35, 31249-31256.
- [14] Jirgensons A., Kauss V., Kalvinsh I., Gold M. R., Danysz W., Parsons C. G., Quack G., *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 6, 555-565.
- [15] Braeuner-Osborne H., Egebjerg J., Nielsen E., Madsen U., Krogsaard-Larsen P., *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 14, 2609-2645.

CHAPITRE 3

SYNTHESE DE DERIVES AMINES DU CITRATE

ET DE L'ISO-CITRATE

Deux stratégies ont été envisagées. La première est la dialkylation du nitroacétate d'éthyle. La seconde est la dialkylation de l'imine de la glycine. Ces deux stratégies ont été menées en parallèle. Tout d'abord, nous présenterons les résultats obtenus dans la stratégie 1.

I.Stratégie 1 : Dialkylation du nitroacétate d'éthyle

I.1.Dialkylation du nitroester

I.1.1.Réaction avec le bromo-acétate d'éthyle

L'alkylation est effectuée par réaction de la diisopropyléthylamine avec le nitroacétate d'éthyle et avec le bromo-acétate d'éthyle dans la diméthylformamide à 50°C pendant 24 heures[1].

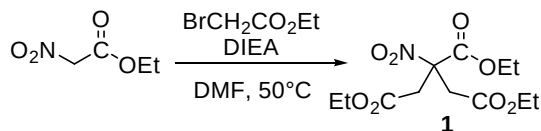


Schéma 98 : Dialkylation du nitroacétate d'éthyle

Le rendement est faible de l'ordre de 30% après purification. Ceci peut s'expliquer par des problèmes d'extraction car le produit est polaire et la manipulation se fait dans la diméthylformamide.

I.1.2.Réaction de Michael

L'acrylate d'éthyle est additionné à une solution de nitroacétate d'éthyle dans l'acétonitrile en présence d'une base aminée (DIEA).

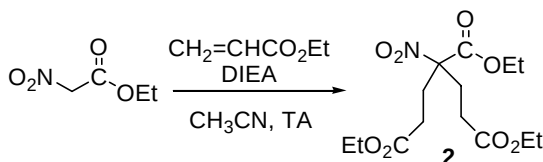


Schéma 99 : Addition de Michael

La réaction est quantitative. Le produit ne nécessite aucune purification et peut-être utilisé tel quel pour la suite

I.2.Hydrogénation du groupement nitro

La réduction du groupement nitro du composé **1** est réalisée par une réaction d'hydrogénation avec du Ni Raney et de l'hydrogène à une pression de 50 psi pendant 24h. Ce sont des conditions assez dures pour une hydrogénation, mais nécessaires lorsqu'on a un groupement nitro aliphatique. Cette réaction n'affecte pas les fonctions esters.

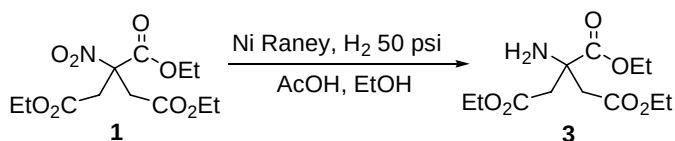


Schéma 100 : Réduction du groupement nitro

L'amine **3** est obtenue avec un rendement de 50% après purification.

La réduction du groupement nitro du composé **2** ne conduit pas à la formation de l'amine mais à la pyrrolidinone **4**.

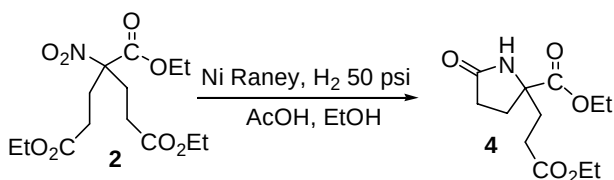


Schéma 101 : Réduction et cyclisation

La formation de la pyrrolidinone **4** peut s'expliquer par une réaction intramoléculaire de l'amine avec un des esters éthyliques. Le produit cyclique est obtenu avec un rendement de 77%.

I.3.Acylation de l'amine

L'amide **5** est obtenu par réaction de l'amine **3** avec la pyridine et le chlorure d'acide phénylacétique[2].

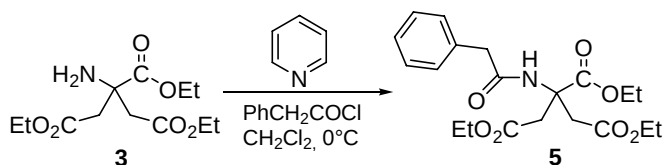


Schéma 102 : Acylation de l'amine **3**

Le rendement de la réaction est d'environ 60% après purification par chromatographie sur gel de silice.

II.Stratégie 2 : Dialkylation de l'imine du glycinate de méthyle

II.1.Synthèse de l'imine 6

La synthèse de l'imine du glycinate de méthyle a été décrite pour la première fois dans la littérature par Georges Stork en 1976[3].

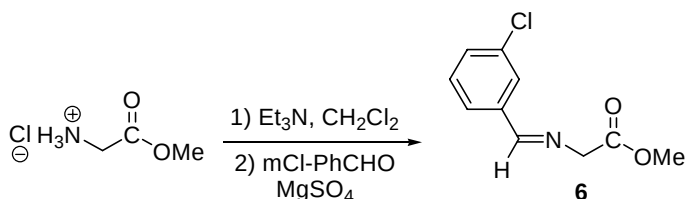


Schéma 103 : Formation de l'imine 6

L'aldéhyde et le sulfate de magnésium sont ajoutés à l'amine hydrochlorée qui est préalablement traitée avec de la triéthylamine dans le dichlorométhane. L'imine est obtenue avec un rendement de 90% et peut être conservée plusieurs mois au congélateur.

II.2.Dialkylation de l'imine

La dialkylation de l'imine est effectuée par une réaction de transfert de phase solide-liquide. La méthode utilisée est une adaptation d'un protocole d'O'Donnell utilisant le carbonate de potassium et le bromure de tétrabutylammonium, un agent de transfert de phase[4].

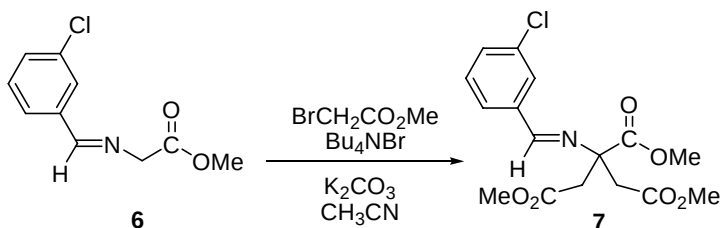


Schéma 104 : Dialkylation de l'imine 6

Le mélange réactionnel est agité à 50°C pendant 24 heures. La réaction est totale d'après les spectres RMN. Plusieurs tentatives de purification par

chromatographie (silice et alumine) ont échoué et ont conduit à une hydrolyse partielle de l'imine. Le produit est donc utilisé tel quel dans la réaction suivante.

II.3. Hydrolyse de l'imine

L'hydrolyse de l'imine **7** en amine **8** est effectuée en milieu acide selon des conditions classiques de la littérature[5]. Ensuite un traitement basique du milieu réactionnel permet de récupérer l'amine libre en phase organique.

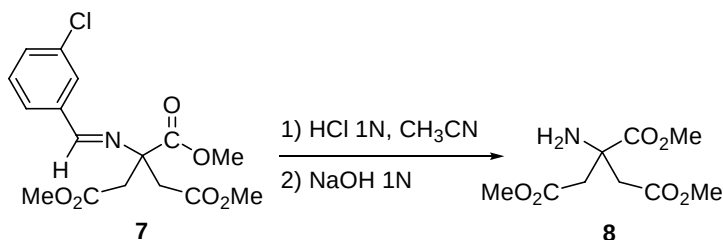


Schéma 105 : Hydrolyse de l'imine **7**

Le rendement global de la réaction d'alkylation et d'hydrolyse est d'environ 50%. Le produit est utilisé tel quel pour la réaction suivante.

II.4. Acylation de l'amine

Les différents amides sont synthétisés par action de la pyridine et du chlorure d'acide sur l'amine[2].

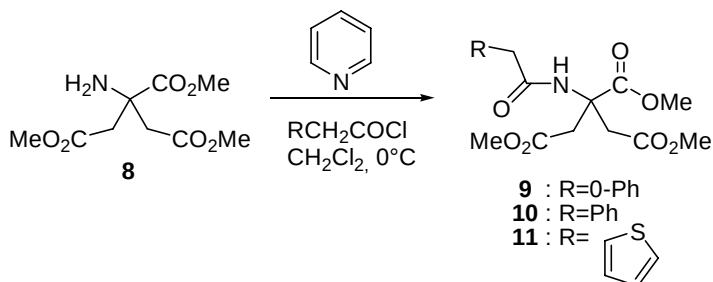


Schéma 106 : Acylation de l'amine **8**

Le rendement de la réaction est d'environ 60% après purification chromatographique. Afin d'améliorer le rendement de la réaction, d'autres conditions ont été testées. L'acylation effectuée en présence de triéthylamine a conduit à un brut réactionnel plus sale. L'ajout de DMAP n'a pas apporté d'amélioration significative, d'après les analyses RMN.

II.5. Transformation des esters méthyliques en acides carboxyliques

De nombreuses méthodes de déprotection d'esters méthyliques sont décrites dans la littérature[6]. La plus classique est la réaction de saponification. L'ester va réagir avec une base hydroxylée (LiOH, KOH, NaOH) pour former le carboxylate et l'alcool. Un traitement aqueux (pH<4) est nécessaire pour obtenir l'acide. Cette méthode est celle que nous avons employée dans un premier temps.

Jung[7] et Olah[8] ont montré que l'iodure de triméthylsilane était un agent efficace pour la déprotection des esters et des éthers. L'iodure de triméthylsilane contient du silicium comme acide dur et un ion iodure comme nucléophile mou. Le silicium réagit très facilement avec les composés organiques contenant un oxygène (base dure) formant une liaison oxygène-silicium forte. L'iodure agit alors comme un nucléophile mou dans un déplacement de type S_N2 qui coupe la liaison oxygène-alkyle, avec formation d'iodure d'alkyle. Cette réaction conduit initialement à un ester instable ($-CO_2SiMe_3$) qui s'hydrolyse immédiatement en présence d'eau et de méthanol. D'autres conditions de clivage alkyl-oxygène d'un ester sont décrites dans la littérature[6].

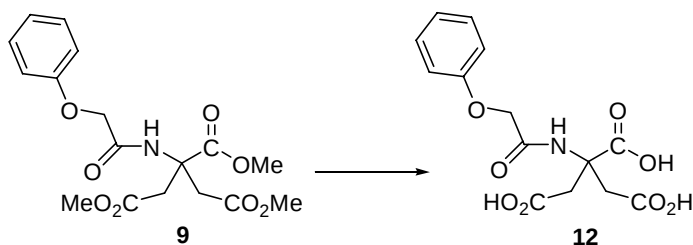


Schéma 107 : Déprotection des esters méthyliques

Les conditions de déprotections utilisées ainsi que les différents traitements sont repris dans le tableau 3 :

Réactifs	Conditions	Résultats
LiOH 1N	TA, 20h, Acidification, Extraction à l'éther	Peu de produits isolés. Coupure de la liaison amide
LiOH 1N	TA, 20h, Agitation avec Dowex acide	Coupure totale de la liaison amide
LiOH 1N	TA, 20h, Passage sur Dowex acide	Peu de produits isolés
LiOH 1N	TA, 20h, Neutralisation, Passage sur silice phase inverse	Pas de séparation de produits des sels de réaction
CsBr CH ₃ CN iPrOH	Reflux, 2-3 jours	Produit de départ
TMSCl NaI CH ₃ CN	Reflux, 24h	Produit de départ

Tableau 3 : Conditions testées pour la déprotection des esters méthyliques
du produit **9**

Dans le meilleur des cas, lorsque le produit **9** réagit avec une solution d'hydroxyde lithium 1N pendant 20h et est ensuite passé sur une résine dowex acide, le rendement en acide **12** est de l'ordre de 14%. Ceci est

sûrement dû à l'acidité trop importante de la résine qui conduit à la destruction de la liaison amide. Un mécanisme avec assistance anchimérique peut être proposé pour expliquer la rupture du lien amide.

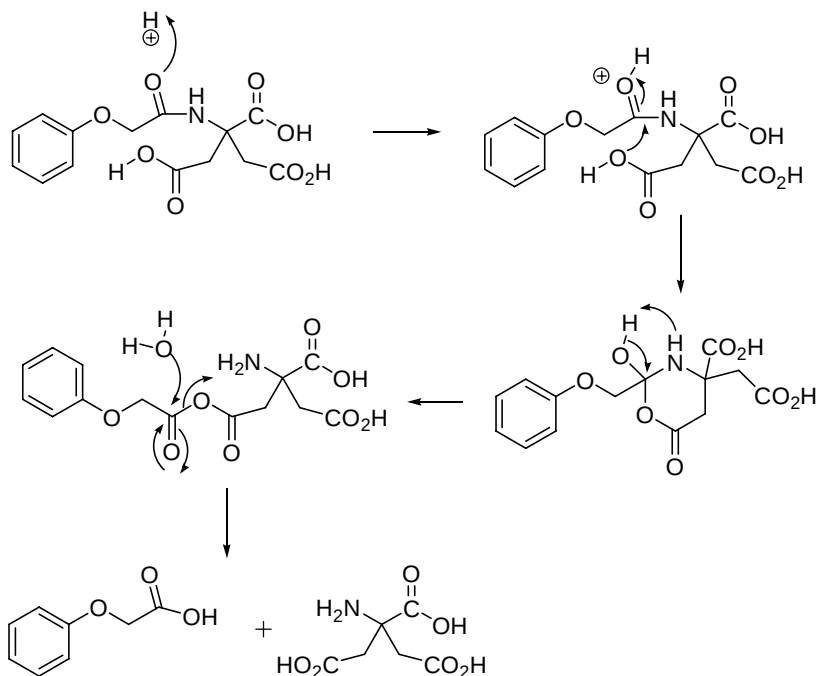


Schéma 108 : Mécanisme proposé pour le clivage de l'amide

Nos résultats sont cohérents avec la littérature. En effet, Greenlee *et al.* ont utilisé des résines échangeuses d'ions pour transformer des fonctions amides en acides carboxyliques ou en esters[9].

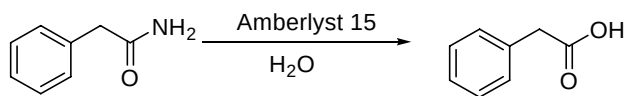


Schéma 109 : Hydrolyse du lien amide par une résine

Vu les difficultés rencontrées, nous avons décidé de suivre la réaction par RMN ^1H .

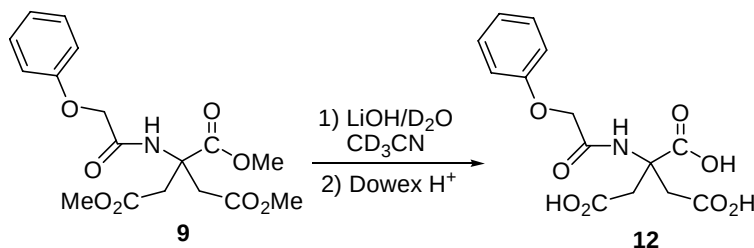


Schéma 110 : Suivi RMN de la réaction

La réaction de saponification proprement dite est finie en cinq heures avec du LiOH 1N à température ambiante (quantité ~150 mg). Le problème est toujours l'étape d'acidification et la récupération du produit. Une alternative est l'isolation du produit sous forme de sels de lithium en mettant juste la quantité nécessaire de LiOH mais dans ce cas-là, la réaction n'est jamais complète.

Les deux stratégies 1 et 2 ont été examinées en parallèle, mais du fait des problèmes rencontrés avec les esters méthyliques (qui seront identiques avec les esters éthyliques), un changement de groupements protecteurs a été envisagé et le choix s'est porté sur le groupement ester benzylique qui peut être clivé par hydrogénation. Cet ester n'est pas compatible avec la stratégie 1 où il y a une étape de réduction d'un groupement nitro par hydrogénation.

III. Changement de groupements protecteurs sur l'agent alkylant

III.1. Dialkylation de l'imine

L'imine utilisée est l'imine de l'ester méthylique de la glycine. La réaction de dialkylation utilise le protocole modifié de O'Donnell qui a été précédemment validé.

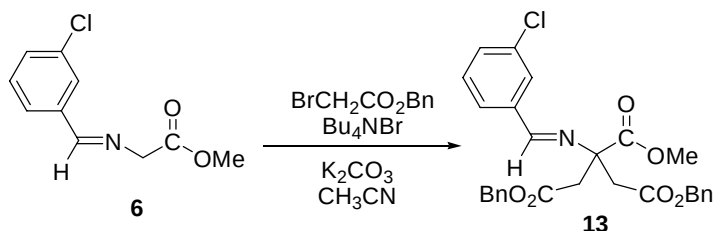


Schéma 111 : Dialkylation avec le bromo-acétate de benzyle

Le temps de réaction nécessaire pour obtenir ce produit est un peu plus long. Ceci peut s'expliquer par l'encombrement plus important des esters benzyliques par rapport aux esters méthyliques. La réaction est quantitative après 30 heures.

III.2. Hydrolyse de l'imine

La réaction d'hydrolyse de l'imine **13** est plus délicate car les esters benzyliques sont sensibles au milieu acide et basique.

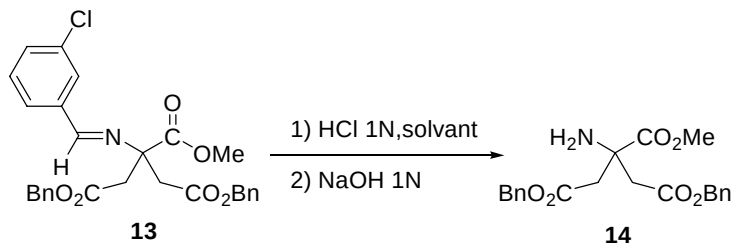


Schéma 112 : Hydrolyse de l'imine **13**

Le temps de réaction est raccourci et différentes conditions et solvants ont été testés: HCl 1N/CH₃CN, HCl 1N/DCM, HCl 1N ou Acide citrique 50%/Et₂O. Lorsque le co-solvant est de l'éther ou du dichlorométhane, l'imine est hydrolysée mais l'amine formée reste dans la phase organique au lieu de passer dans la phase aqueuse. La purification est donc plus difficile car le produit se retrouve avec l'aldéhyde et l'excès de bromoacétate. Dans le cas de l'utilisation de l'acide citrique, l'hydrolyse

n'est pas finie au bout de 30 minutes. Ce temps de réaction est trop long pour les esters benzyliques. Les meilleures conditions sont donc le système HCl 1N dans l'acétonitrile avec un temps de réaction de 15 minutes. Une méthode d'extraction est mise au point pour récupérer l'amine **14**.

III.3. Acylation de l'amine

L'amine **14** est acylée par le chlorure de phénoxyacétyl en présence de pyridine dans le dichlorométhane.

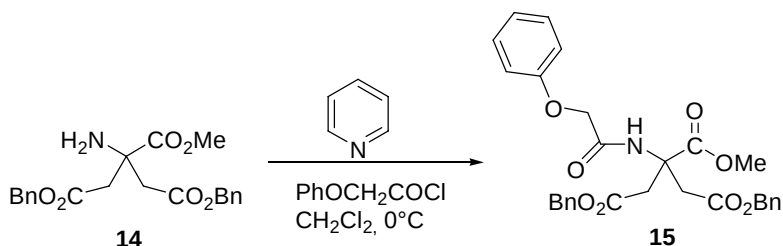


Schéma 113 : Acylation de l'amine **14**

Le rendement de la réaction est de l'ordre de 60% après purification par chromatographie sur gel de silice.

III.4. Déprotection sélective des esters

L'étape suivante est l'hydrogénation des groupements benzyliques. Elle est tout d'abord effectuée dans le méthanol, mais l'acidité de la molécule suffit à catalyser la transestérification d'un des acides carboxyliques. La réaction est donc effectuée dans l'acétate d'éthyle. La déprotection est quantitative.

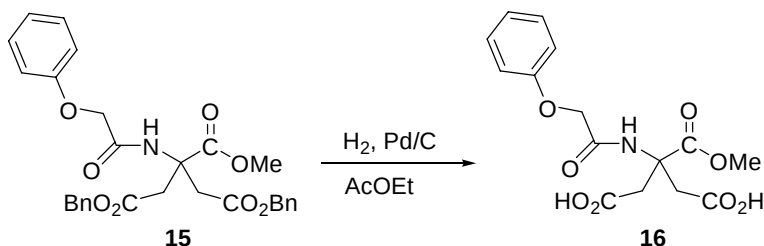


Schéma 114 : Réduction des esters benzyliques

A ce stade, il reste encore à déprotéger l'ester méthylique. Le produit **16** étant hygroscopique et peu soluble dans les solvants organiques, il est préférable de tout d'abord déprotéger la fonction ester méthylique de **15**. L'utilisation d'éthanethiolate de sodium dans la diméthylformamide est décrite dans la littérature comme une méthode efficace pour déprotéger les esters méthyliques encombrés[10]. La réaction a lieu selon un mécanisme de type SN2 avec une attaque du nucléophile sur le groupement méthyle de l'ester.

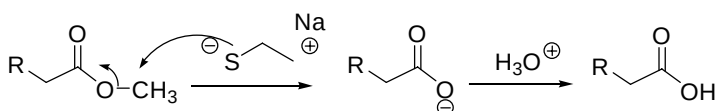


Schéma 115 : Déprotection d'un ester par réaction SN2

Malheureusement dans ces conditions-là, ce n'est pas l'ester méthylique qui est libéré mais les esters benzyliques.

Vu les difficultés rencontrées pour la déprotection de l'ester méthylique auparavant et le résultat négatif que nous venons d'obtenir, cette stratégie est abandonnée. A ce stade, le changement du groupement protecteur sur l'imine est envisagé afin d'obtenir les dérivés amino-acides et amides.

IV.Changement des groupements protecteurs sur l'imine de la glycine

IV.1.Synthèse des imines

Les bases de Schiff sont synthétisées par réaction de l'amine de la glycine hydrochlorée possédant différentes fonctions esters et le méta-chlorobenzaldéhyde.

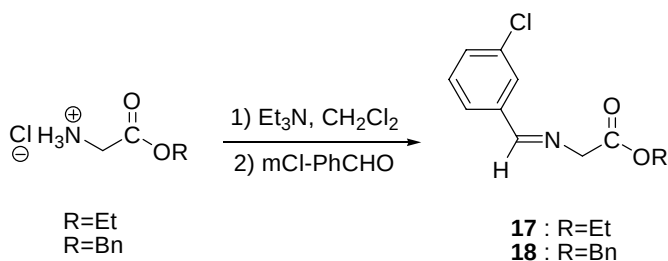


Schéma 116 : Formation des imines

Les imines sont obtenues avec des rendements supérieurs à 90% et sont utilisées telles quelles dans la réaction suivante.

IV.2. Dialkyltion des imines

IV.2.1. Utilisation du carbonate de potassium

Les imines brutes sont ensuite dialkylées avec deux équivalents de bromoacétates variés et de carbonate de potassium en condition de transfert de phase.

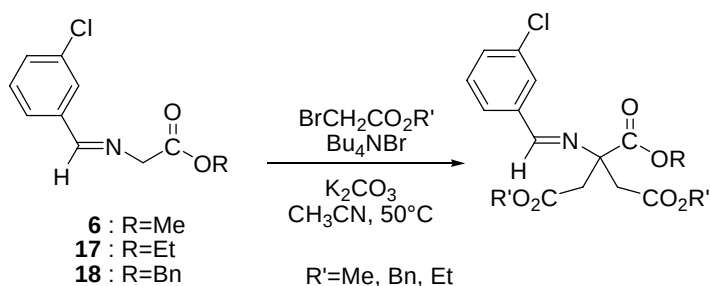


Schéma 117 : Dialkyltion des différentes imines

Les résultats sont repris dans le tableau 4 :

Composé	R	R'	Rendement ^(a)
7	Me	Me	~100
13	Me	Bn	~100
19	Et	Et	~100
20	Bn	Me	~60
21	Bn	Bn	<20

(a) Produit brut, ratio déterminé par RMN ¹H

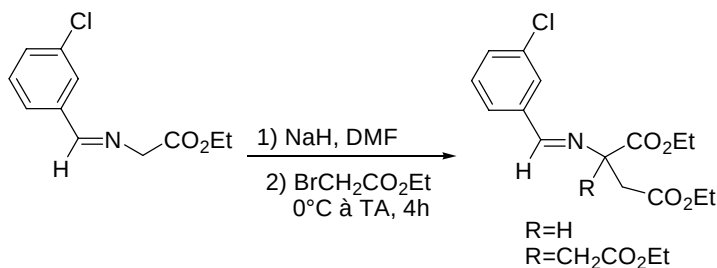
Tableau 4 : Rendements de la dialkylation

Quand R=Me ou Et, la réaction nécessite un à deux jours pour être totale. La réaction est moins efficace lorsque R=Bn et le rendement dépend de l'effet stérique de R'.

IV.2.2. Utilisation de l'hydrure de sodium

La réaction de dialkylation par la méthode de O'Donnell (K_2CO_3 , $BrCH_2CO_2R$) est limitée à la manipulation de petites quantités (environ 350 mg) et le temps de réaction est trop long. Une autre méthode de dialkylation, utilisant NaH dans le tétrahydrofurane est alors testée[11]. Deux essais sont effectués sur l'imine de l'ester méthylique de la glycine (~300 mg) avec le bromoacétate de benzyle. Lors du premier essai, un seul ajout de NaH et d'agent alkylant est réalisé. Ceci conduit à un mélange de produit de départ et de produit monoalkylé dans un rapport 5/95 (déterminé par RMN ¹H). Lors du second essai, la base et l'agent alkylant sont ajoutés en deux fois. Ceci conduit à un mélange de produit monoalkylé et de produit dialkylé dans un rapport 50/50. Le tétrahydrofurane est remplacé par la diméthylformamide car ce solvant sépare mieux les paires ioniques, d'où une hausse de réactivité du NaH et de l'anion du glycinate[12].

Les résultats obtenus sur l'imine de l'ester éthylique de la glycine par action du NaH dans la DMF sont résumés dans la figure 11 :

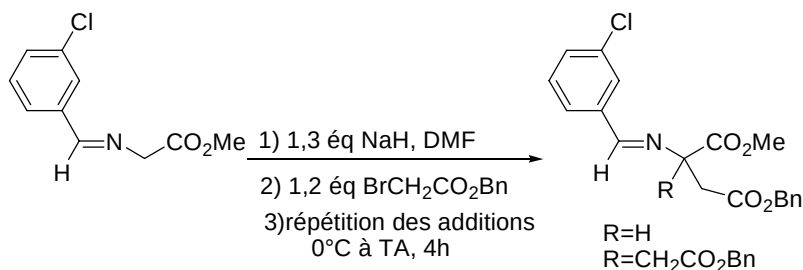


Entrée	Quantité d'imine (mg)	Eq NaH	Eq BrCH ₂ CO ₂ Et	Rapport Mono/Dialkylé
1	274	2,2	2,2	50/50
2	305	1,3 et 1,1	1,1 et 1,1	10/90
3	310	1,1 et 1,1	1,1 et 1,1	12/88
4	322	1,3 et 1,3	1,2 et 1,0	0/100
5	582	1,3 et 1,3	1,2 et 1,0	59/41

Figure 11 : Dialkylation de l'imine 17

Les meilleures conditions sont l'addition en deux fois de la base et du bromoacétate (entrée 4). Malheureusement, lorsque la quantité d'imine est plus importante, les résultats ne sont plus aussi bons avec une majorité de produit monoalkylé (entrée 5).

Les meilleures conditions sont appliquées à la dialkylation de l'imine de l'ester méthylique de la glycine. Les résultats sont repris dans la figure 12 :



Quantité d'imine (mg)	Rapport Mono/Dialkylé
317	0/100
403	33/67
610 ^(c)	31/69
500 ^{(a) (c)}	0/100
570 ^{(a) (b) (c)}	0/100

(a) Ajout d'éther couronne 15-C-5

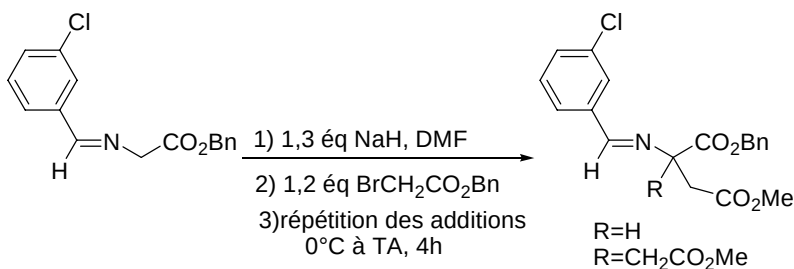
(b) La diméthylformamide est remplacée par du tétrahydrofurane

(c) Le temps de réaction est d'une nuit au lieu de 4h

Figure 12 : Dialkylation de l'imine **6**

Lorsqu'on augmente la quantité d'imine, le taux de dialkylation diminue même si le temps de réaction est plus long. L'ajout d'éther-couronne permet d'améliorer la situation et d'avoir une réaction complète même lorsqu'une quantité plus importante d'imine est utilisée. De plus, il est possible dans ce cas de remplacer la diméthylformamide par le tétrahydrofurane sans diminuer le taux de dialkylation.

De la même façon, les meilleures conditions obtenues dans le cas de l'imine de l'ester éthylique sont appliquées à la dialkylation de l'imine de l'ester benzylique de la glycine. Les résultats sont repris dans la figure 13.



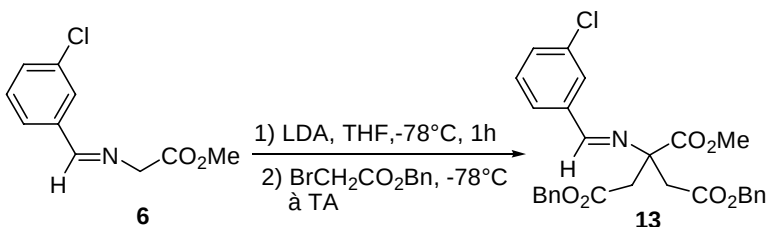
Quantité d'imine (mg)	Rapport Mono/Dialkylé
293	71/29
317	19/81

Figure 13 : Dialkylation avec NaH de l'imine **18**

La réaction n'est pas totale dans ces conditions et le rendement en produit dialkylé est variable et peu reproductible. Ceci peut s'expliquer par l'encombrement stérique de l'imine, mais aussi par l'hétérogénéité du milieu réactionnel.

IV.2.3.Utilisation du diisopropylamidure de lithium

A ce stade, une base permettant d'obtenir un milieu réactionnel homogène, le diisopropylamidure de lithium, est envisagée afin d'améliorer le rendement et de travailler sur des quantités plus importantes (de l'ordre du gramme)[13]. Les conditions réactionnelles ont été optimisées sur l'imine de l'ester méthylique de la glycine comme décrit dans la figure 14.



Base	Quantité d'imine (g)	Temps de réaction (h)	Rapport Mono/Dialkylé/Ps ^(a)
LDA in situ	0,48	24	0/86/14
LDA in situ	0,488	5	0/75/25
LDA in situ ^(b)	0,4	24	0/50/50
LDA in situ	0,8	2	0/83/17
LDA commercial	0,759	5	10/90/0
LDA commercial	0,56	3	18/82/0
LDA commercial	1	24	0/100/0

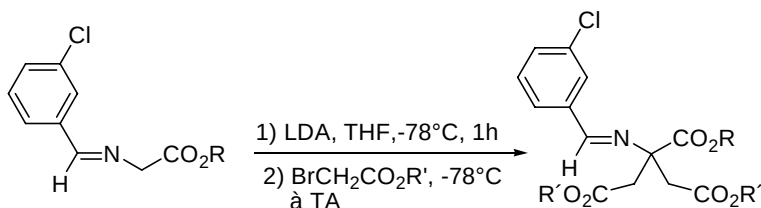
(a) Ps = produit secondaire ; rapports déterminés par RMN ¹H

(b) 2 ajouts de 1,2 équivalents de LDA et 2 ajouts de 1,1 équivalents de BrCH₂CO₂Bn

Figure 14 : Optimisation des conditions avec LDA

Lors de l'utilisation de LDA préparé *in situ* par ajout de butyllithium sur de la diisopropylamine, il y a formation d'un produit secondaire non identifié. Les imines ne sont pas suffisamment stables pour être purifiées par chromatographie et le produit secondaire ne peut donc pas être isolé à ce stade-ci. Peut-être reste-t-il du Buli qui serait la cause de la formation de ce produit secondaire. Afin de vérifier cette hypothèse, nous utilisons du LDA commercial. Effectivement, aucune trace de produit secondaire (visible par RMN ¹H) n'est détectée. Les meilleurs résultats sont donc obtenus avec le LDA commercial (solution 2M dans le tétrahydrofurane) et un temps de réaction de 24h. Cette méthode est applicable à des quantités plus importantes que la méthode de O'Donnell et permet un temps de réaction plus court.

Les conditions réactionnelles optimisées ont été appliquées aux autres imines. Les résultats sont repris dans la figure 15 :



Composé	Quantité d'imine (g)	R	R'	Temps de réaction (h)	Rapport Mono/Dialkylé
20	1	Bn	Me	24	25/75
19	1	Et	Et	24	0/100
21	0,25	Bn	Bn	6	3/97^(a)

(a) Il s'agit de 3% de produit de départ et 97% de produits dialkylés.

Figure 15 : Application des conditions optimisées

La réaction n'est pas totale lorsque R=Bn et R'=Me, par contre elle est beaucoup plus efficace lorsque R=R'=Bn. Ceci peut s'expliquer par l'encombrement plus important de l'ester méthylique par rapport à l'ester benzylique qui peut s'orienter dans un autre plan par rapport à l'imine de départ. Par contre, la dialkylation est totale lorsque R=R'=Et.

IV.3. Hydrolyse des imines en amines

Les amines libres sont obtenues par hydrolyse acide avec de l'acide chlorhydrique 1N dans l'acétonitrile des imines correspondantes.

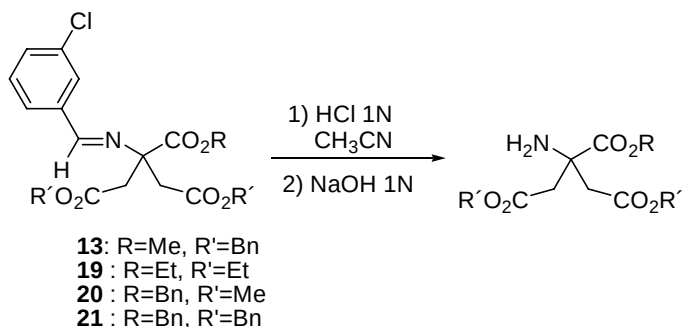


Schéma 118 : Hydrolyse des imines

Les meilleurs résultats sont repris dans le tableau 5 :

Composé	R ¹	R ²	Rendement
14	Me	Bn	60%
3	Et	Et	50%
22	Bn	Me	40%
23	Bn	Bn	52%

Tableau 5 : Meilleurs rendements obtenus

Il s'agit de rendements en produits purs obtenus en deux étapes (dialkylation et hydrolyse) et après une purification par chromatographie. Lors de la purification des produits d'hydrolyse des imines **13** et **20**, les produits secondaires **24** et **25** ont été isolés, respectivement. Ces produits sont présents sur la chromatographie sur couche mince (CCM) avant la purification. Ils proviennent donc soit de l'étape d'alkylation soit de l'étape d'hydrolyse de l'imine. Nous n'avons pas d'explications pour le moment quant à leur formation et durant quelle étape.

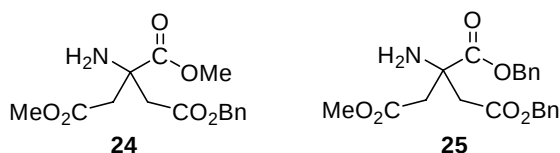


Schéma 119 : Produits secondaires isolés

Lors de l'hydrolyse de l'imine **21**, seule la première extraction à l'éther est nécessaire. L'amine **23** n'est pas soluble dans l'eau (car elle possède trois esters benzyliques, qui sont des groupements hydrophobes) ; il n'est donc pas nécessaire de basifier la phase aqueuse avec de l'hydroxyde de sodium 1N.

IV.4.Acylation de l'amine

L'amine **23** a réagi avec la pyridine et le chlorure de phénoxyacétyle afin de donner l'amide **26**.

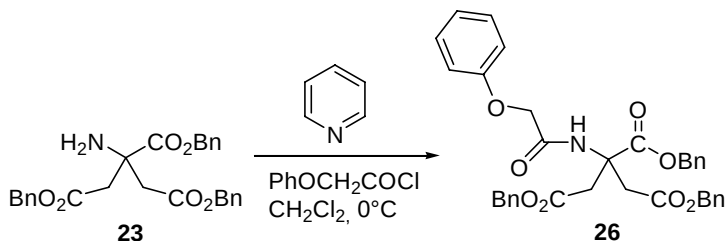


Schéma 120 : Acylation de l'amine **23**

L'amide **26** est obtenu avec un rendement de 88% après purification par chromatographie sur gel de silice.

IV.5.Déprotection sélective des esters

L'hydrolyse des esters éthyliques est effectuée dans l'acide chlorhydrique 6N à reflux pendant une nuit[14].

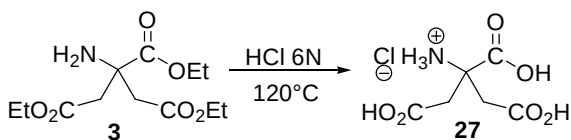


Schéma 121 : Hydrolyse des esters éthyliques

L'acide 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylique **27** (bioisostère aminé de l'acide citrique) est obtenu avec un rendement de 90%, sous forme de chlorhydrate.

La dernière étape nécessaire à la synthèse des autres amino-acides est la déprotection des esters benzyliques par une réaction d'hydrogénation. Cette réaction est réalisée avec du Pd/C, de l'hydrogène et de l'acide chlorhydrique concentré dans l'acétate d'éthyle.

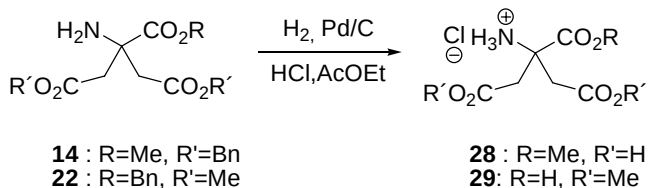


Schéma 122 : Hydrogénolyse des esters benzyliques

Elle est conduite en milieu acide car nous voulons isoler les produits sous formes d'amino-acides hydrochlorés pour des raisons de stabilité chimique. Les rendements sont respectivement de 65% pour le dérivé **28** et de 90% pour le dérivé **29**.

Le dérivé amide **12** est obtenu de manière quantitative par hydrogénation catalytique des esters benzyliques du précurseur **26**. Ce même produit n'avait pas pu être isolé lors de l'hydrolyse des esters méthylique du précurseur **10** (cf. schéma 110).

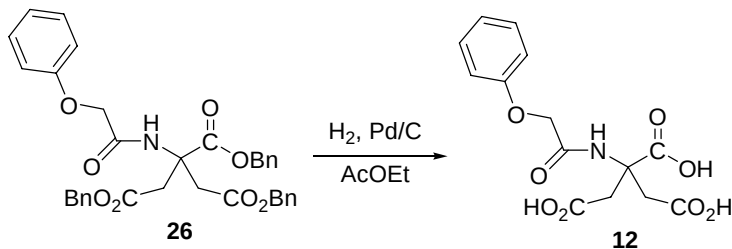
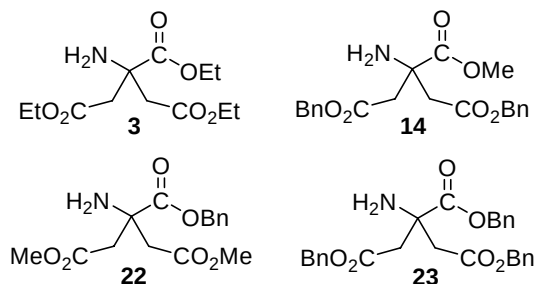


Schéma 123 : Hydrogénation catalytique du dérivé **26**

IV.6.Evaluation biochimique

Les tests biochimiques ont été effectués au centre d'ingénierie des protéines sur des β -lactamases des classes A, B, C et D. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'activité résiduelle. La concentration en inhibiteur est égale à 100 μM sauf quand précisé (*concentration = 0,2 mM, X : non déterminé). Les inhibiteurs ont été testés à pH physiologique et à pH 5 dans

certains cas. Voici les résultats pour une première série de molécules : les amines **3**, **14**, **22** et **23**.

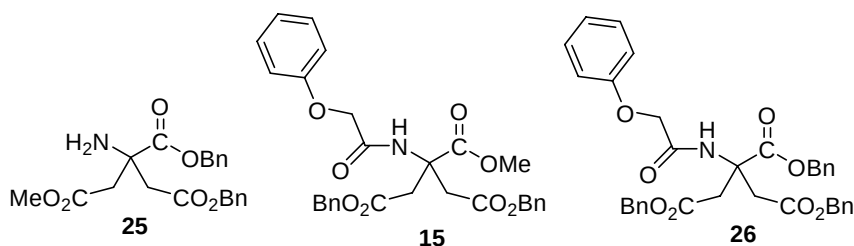


Enzyme (classe)	Activité résiduelle			
	3 (%)	14 (%)	22 (%)	23 (%)
TEM-1 (A)	71*	81*	/	100
BS3 (A)	82	100	/	100
NMCA (A)	60	63	/	/
P99 (C)	87	100	/	/
Oxa-10 (D)	98	100	100	10
BcII (B) pH 5/pH 7	93/92	93/100	100	90

Tableau 6 : Activité résiduelle des enzymes en présence d'amines

L'activité de l'enzyme NMCA en présence de **3** et **14** est diminuée de manière significative. L'activité résiduelle d'Oxa-10 est seulement de 10% en présence de **23** à pH 7. Ce résultat est vraiment très intéressant et nous avons donc décidé de tester les dérivés **15**, **25** et **26** sur l'enzyme Oxa-10.

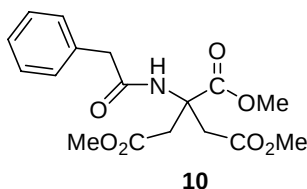
Les résultats sont repris dans la figure 16 :



Composé	Activité résiduelle (%)
15	10
25	100
26	10

Figure 16 : Activité résiduelle d'Oxa-10

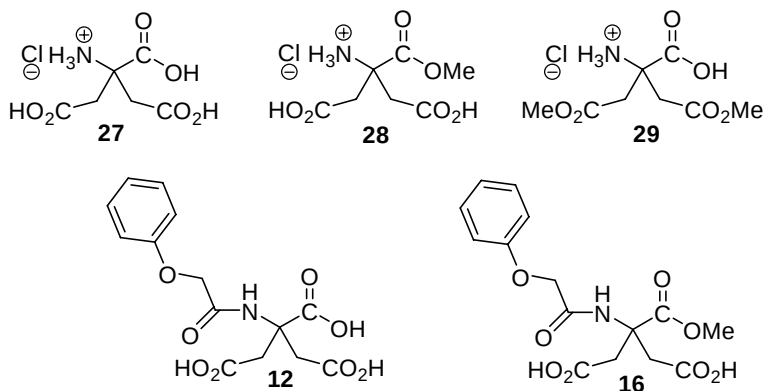
Les dérivés amides **15** et **26** inhibent aussi de manière compétitive Oxa-10 avec seulement 10% d'activité résiduelle. Par contre, les amines **14** et **25** n'ont pas d'activité inhibitrice sur Oxa-10 alors que l'amide **15** est un bon inhibiteur. La découverte de ces inhibiteurs est d'autant plus intéressante que peu d'inhibiteurs des β -lactamases de la classe D sont décrits dans la littérature. Les trois inhibiteurs ont en commun 2 esters benzyliques hydrophobes et dans le cas des molécules **15** et **26** une fonction amide avec un substituant aromatique supplémentaire. Cette protéine possède dans son site actif une poche très hydrophobe dans laquelle ces molécules pourraient interagir. Afin de mieux comprendre l'inhibition importante d'Oxa-10 par cette famille de composés, une étude de docking de **26** dans Oxa-10 est actuellement en cours au CIP. L'amide **10** a été testé seulement sur la β -lactamase BcII et n'a montré aucune activité.

Schéma 124 : Composé **10**

Les amines hydrochlorées **27**, **28** et **29** et les amides **12** et **16** ont aussi été testées sur les différentes β -lactamases. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle. La concentration en inhibiteur est égale à

100 μ M sauf quand précisé ([#]concentration = 2 mM, X : non déterminé).

Les résultats sont repris dans le tableau suivant :



Enzymes (classe)	Activité résiduelle (%)				
pH 5/pH 7	27	28	29	12	16 ^(a)
TEM-1 (A)	X/95 [#]	92/99	87/99	100/96	X/98
BS3 (A)	X/88	97/96	100/95	70/80	X/96
NMCA (A)	X/94	96/94	99/95	85/96	X/66
P99 (C)	X/81	93/100	73/100	100/97	X/85
Oxa-10 (D)	X/100	83/96	79/100	82/84	X/100
BcII (B)	100/83	85/100	100/100	100/X	100/86
VIM-4	X/100	X/100	X/94	X/100	X/100

(a) La concentration de **16** est de 5 mM.

Tableau 7 : Activité résiduelle des enzymes

L'activité résiduelle de BS3 en présence de **12** est réduite (70% d'activité résiduelle de l'enzyme). La molécule **29** inhibe l'enzyme P99 avec une activité résiduelle de l'enzyme de 73% à pH 5.

L'aminocitrate **27** inhibe de manière compétitive les β -lactamases BS3, TEM-1 et Oxa-10. Les constantes d'inhibition (K_i) de l'aminocitrate vis-à-

vis des différentes β -lactamases ont été déterminées et sont reprises dans le tableau 8 :

Enzyme (classe)	Ki (μ M)		
	Citrate	Iso-citrate	Aminocitrate
BS3 (A)	490	2200	250
NMCA (A)	53	60	*
Albus G (A)	210	1600	*
TEM-1 (A)	730	1500	150
BcII (B)	*	*	*
Q908R (C)	*	*	*
Oxa-10 (D)	*	*	200

*> 10 mM

Tableau 8 : Constantes d'inhibition de l'aminocitrate **27**

L'aminocitrate **27** est un meilleur inhibiteur que le citrate et l'iso-citrate pour les β -lactamases BS3 et TEM-1. Ce composé est aussi un inhibiteur de la β -lactamase Oxa-10 avec un Ki de 200 μ M. Ces activités bien que significatives, restent modestes.

IV.7. Etudes cristallographiques

IV.7.1. Différentes interactions du citrate, de l'isocitrate et de l'aminocitrate dans BS3

Dans le cadre d'une collaboration avec le centre d'ingénierie des protéines de l'ULg, l'acide 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylique **27** a été co-cristallisé avec la β -lactamase BS3 (classe A) par l'équipe de Dr. Paulette Charlier. Le site actif de BS3 est délimité par les motifs SxxK (Ser70, Lys73) sur l'hélice $\alpha 2$, SDN (Ser130, Asn132) sur une boucle, KTG (Lys234, Thr235) sur le brin $\beta 3$, Arg244 et la boucle oméga contenant Glu166 et Asn170. Les groupements fonctionnels des inhibiteurs sont numérotés de 1 à 4 : 1, 3 et 4 pour les fonctions carboxyliques et 2 pour l'alcool ou l'amine. Le positionnement de notre molécule (appelée aminocitrate) dans le site actif est comparé à celui du citrate et de l'iso-citrate (voir chapitre 2, p83 et 84). Le tableau 9 rassemble les interactions directes et via des molécules d'eau, éventuellement en interaction avec d'autres résidus.

	BS3-CITRATE	BS3-ISOCITRATE	BS3-AMINOCITRATE
1-O1	CO Thr216 3,6	/	OH Tyr105 3,5
1-O2	NH1 Arg244 2,8 NH2 Arg244 2,8	OG Thr216 3,3 HOH214 3,2 HOH214-OH Tyr105 2,8 HOH26 3,4 HOH26-CO Thr216 2,7 HOH26-NH1 Arg244 2,7 HOH26-NH2 Arg244 3,4	OH Tyr105 3,4
2-O1 / NH ₂	Na 2,8 Na-OH Tyr274 3,0	HOH213 3,1 HOH213-OH Tyr274 2,8	OG Ser70 3.2 OG Ser130 2.3
3-O1	NH1 Arg244 3,1	CO Ser130 3,2	
3-O2	OG Thr216 3,4 OG Ser130 3,2	OG Ser130 2,1 NZ Lys73 3,3 OG Ser70 2,5	OG Thr235 2,3 NH1 Arg244 3,4
4-O1	OG Ser130 2,4 OG Ser70 2,5	HOH156 3,1 HOH156-ND2 Asn132 3,2 HOH156-ND2 Asn170 2,9	CO Ala237 3,1
4-O2	HOH1303 2,7 HOH1303-OG Ser70 2,8 HOH1303-NH Ser70 3,1 HOH1303-OD1 Asn170 3,6 HOH1303-CO Ala237 2,7 HOH1303-NH Ala237 2,9	NH Ala237 2,6 CO Ala237 3,0 OG Ser70 2,8 NH Ser70 3,0 HOH102 3,4 HOH102-ND2 Asn170 2,9 HOH102-OD Asn170 2,8	NH Ala237 2,8 CO Ala237 3,5 NH Ser70 2,9 OG Ser70 2,9

(a) Les chiffres à côté des acides aminés sont les distances en Å. Les distances sont données à titre indicatif

Tableau 9 : Résultats de diffraction des rayons X ^(a)

IV.7.2.Complexe BS3-aminocitrate

La position et les interactions de l'aminocitrate avec les résidus catalytiques clefs sont différents par rapport à celles du citrate, à part le groupement carboxylate 3 qui fait des interactions similaires. L'amine interagit directement avec Ser70 et Ser130 (3,2 Å et 2,3 Å respectivement) alors qu'un des atomes d'oxygène du carboxylate 4 se trouve dans la cavité à oxyanion.

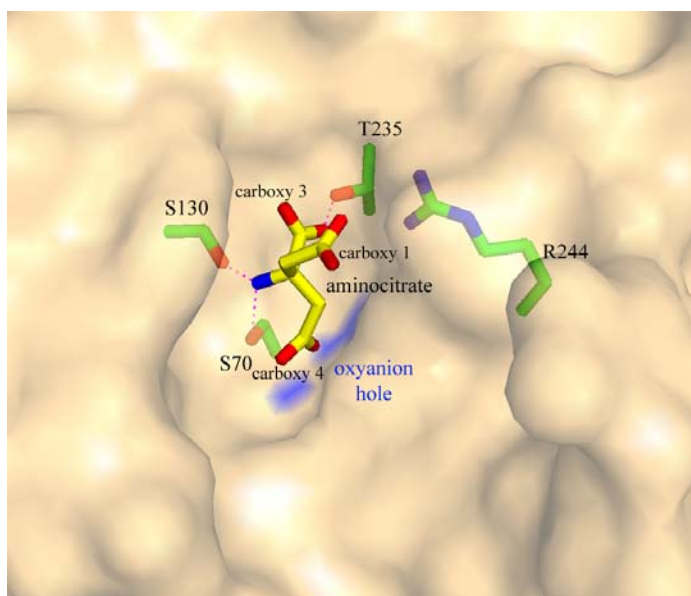


Figure 17 : Représentation de l'aminocitrate dans la cavité enzymatique

V.Synthèse d'un composé homologue

Afin de voir si la longueur des chaînes acides joue sur l'inhibition enzymatique, la synthèse d'un composé homologue a été envisagée. La stratégie est la même que celle utilisée auparavant c'est-à-dire la dialkylation d'une imine, mais dans ce cas par une réaction d'addition de Michaël.

V.1.Dialkylation de l'imine

L'étape de dialkylation est réalisée avec du carbonate de potassium et de l'acrylate d'éthyle dans l'éthanol[15]. Un solvant protique est nécessaire pour avoir une dialkylation complète.

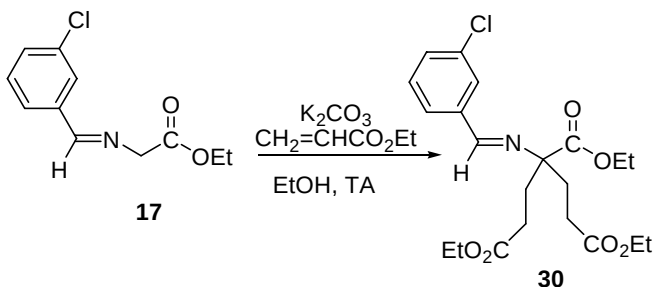


Schéma 125 : Addition de Michael de l'imine **17**

L'imine dialkylé **30** est obtenue avec un rendement brut de 91%.

V.2.Hydrolyse de l'imine

L'hydrolyse de l'imine **30** est effectuée selon les conditions classiques déjà optimisées auparavant. Ce n'est pas l'amine libre qui est isolée mais le γ -lactame aussi appelé pyrrolidinone.

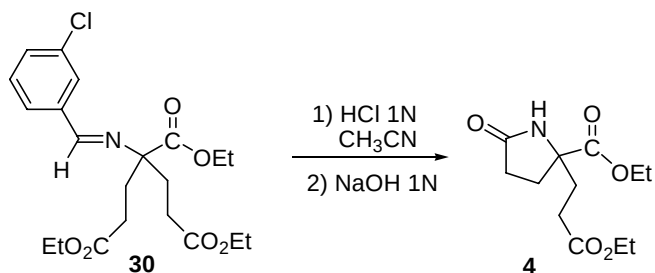


Schéma 126 : Hydrolyse de l'imine **30**

Le rendement en pyrrolidinone **4** après purification par chromatographie est de 50%. Cette molécule avait déjà été obtenue lors de l'étude de la stratégie 1 (schéma 4).

V.3. Hydrolyse du γ -lactame et des esters éthyliques

L'hydrolyse des esters et du lactame est effectuée dans de l'acide chlorhydrique 6N à 120°C.

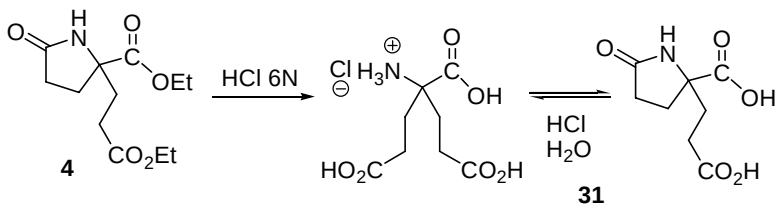


Schéma 127 : Hydrolyse des esters et du lactame

Malgré le chauffage prolongé à 120°C pendant trois jours, l'hydrolyse de la pyrrolidinone **4** n'est pas complète et un mélange des produits **31** est obtenu alors que d'après la littérature, le seul produit isolé est le composé ouvert. Notre résultat est donc en contradiction avec la littérature[16].

Dans la littérature, les pyrrolidines sont d'abord protégées par un groupement Boc avant d'être hydrolysées avec de l'acide chlorhydrique 6N et traitées avec de l'oxyde de propylène dans le méthanol[14]. La pyrrolidinone **4** a donc été protégée avec un groupement Boc par réaction

avec le di-tert-butyl dicarbonate en présence de diméthylaminopyridine et de triéthylamine dans le dichlorométhane.

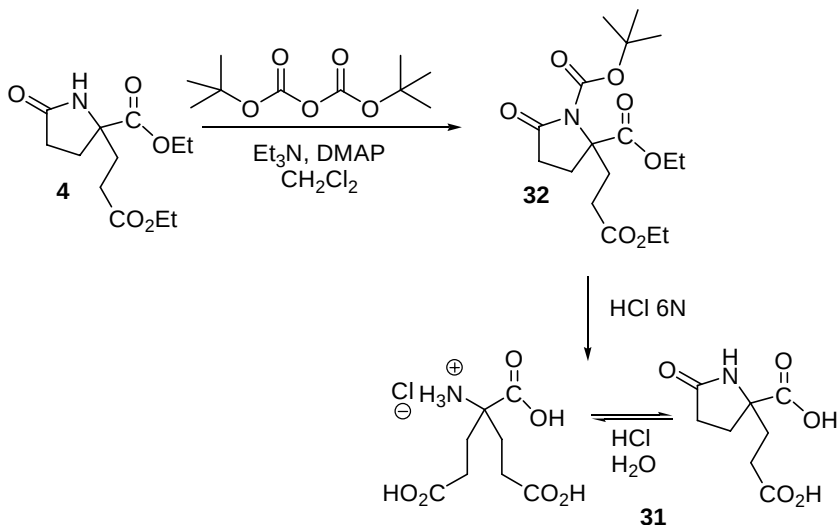


Schéma 128 : Hydrolyse de la pyrrolidinone **32**

L'hydrolyse du produit **32** est ensuite effectuée avec de l'acide chlorhydrique 6N à 120°C pendant 24 heures. Le traitement du produit **31** avec de l'oxyde de propylène dans le méthanol n'a pas conduit à la précipitation de l'acide aminé mais à un mélange de produits encore plus sale après concentration à l'évaporateur rotatif.

La synthèse du (2R)-HMGA et de son énantiomère, le (2S)-HMGA est décrite dans la littérature. [17]

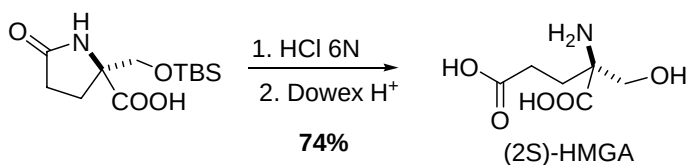


Schéma 129 : Hydrolyse d'une pyrrolidone disubstituée

La synthèse du (2S)-HMGA est effectuée par hydrolyse d'une pyrrolidinone disubstituée, comme le composé **4**, avec de l'HCl 6N à 120°C pendant 24 heures, suivie d'un passage sur une résine acide (Dowex 50Wx8) avec de l'hydroxyde d'ammonium comme éluant. Ces conditions ont été testées dans notre cas, mais là-encore le mélange de produits **31** est isolé après le passage sur la résine acide. Un dernier essai de déprotection de la pyrrolidinone **4**, réalisé avec du LiOH dans un mélange éthanol/eau à 60°C pendant 3 heures, n'a pas permis d'isoler de produits.

Les différentes tentatives ne nous ont pas permis d'isoler l'amino-triacide pur mais un mélange des produits **31**, avec le produit ouvert majoritaire d'après les spectres RMN (rapport environ 80/20).

V.4. Evaluation biochimique

Les tests biochimiques ont été effectués au centre d'ingénierie des protéines sur des β -lactamases des classes A, B, C et D et sur la D,D-peptidase R39. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle. La concentration en inhibiteur est égal à 100 μ M. Les résultats sont repris dans le tableau 10.

Enzymes (classe)	Activité résiduelle (%)	
	4 pH 5/pH 7	31 pH 5/pH 7
TEM-1 (A)	80/94	69/88
BS3 (A)	96/85	100/100
NMCA (A)	100/100	97/100
P99 (C)	100/100	81/100
Oxa-10 (D)	98/97	100/100
BcII (B)	93/100	93/X
VIM-4 (B)	X/96	X/96
R39 ^(a)	88±6	75±9

(a) Les produits sont testés à une concentration de 500 μM à pH 7,2

Tableau 10 : Activité résiduelle des enzymes en présence de **4** et **31**

Le produit **4** n'a aucune activité sur les β -lactamases et la D,D-peptidase R39. Le produit **31** est un inhibiteur de la β -lactamase TEM-1. La constante d'inhibition déterminée est de 106 μM .

VI.Synthèse du dérivé aminé de l'iso-citrate

La stratégie envisagée est la monoalkylation de l'imine de la glycine dérivée de la benzophénone par le fumarate de diéthyle.

VI.1.Synthèse de l'imine

L'imine est synthétisée par une réaction de trans-imination entre l'imine de la benzophénone et le chlorhydrate du glycinate d'éthyle[18].

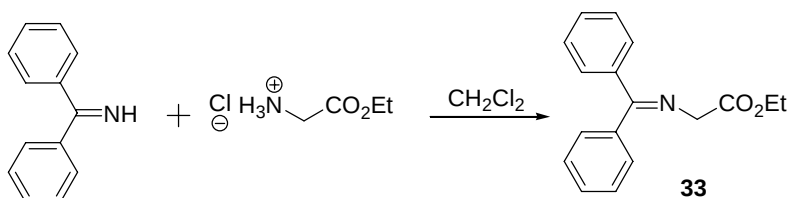


Schéma 130 : Formation de l'imine **33**

L'imine **33** est obtenue avec un rendement de 82% après recristallisation. Le choix de cette imine encombrée portant deux groupements aromatiques va favoriser la réaction de monoalkylation.

VI.2.Monoalkylation de l'imine

La réaction de monoalkylation est effectuée avec une quantité catalytique d'éthanolate de sodium et du fumarate de diéthyle dans l'éthanol[19].

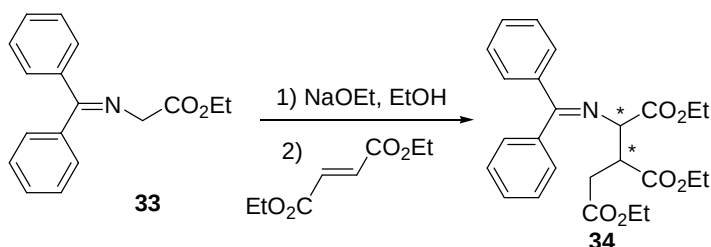
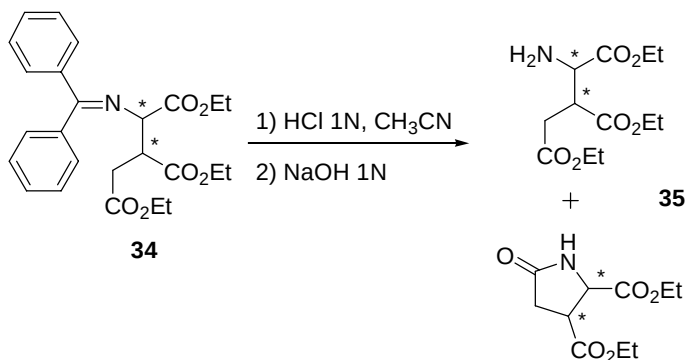


Schéma 131 : Monoalkylation de l'imine **33**

L'imine **34** est obtenue avec un rendement de 92% après purification par chromatographie. Les deux groupements aromatiques stabilisent l'imine qui peut alors être purifiée. Le composé **34** est un mélange de 4 stéréoisomères. Aucune tentative de séparation (ni de synthèse asymétrique) n'est tentée à ce stade du travail.

VI.3.Hydrolyse de l'imine

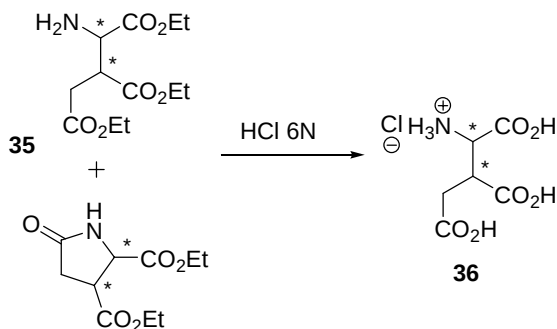
L'imine **34** est hydrolysé en milieu acide dans les conditions classiques déjà utilisées auparavant.



Cette hydrolyse conduit à un mélange de produits **35** : l'amine libre et la pyrrolidinone. Le produit majoritaire est l'amine d'après la RMN ^1H . Lors de la purification par chromatographie sur silice, il n'est pas aisé de séparer l'amine de l'amide. Le produit majoritaire isolé après la purification est l'amine contaminée par une petite trace de pyrrolidinone. Une petite fraction de pyrrolidinone pur (un seul diastéréoisomère) est obtenue en fin de colonne. Le rendement de cette réaction est de l'ordre de 66%. Le mélange peut être utilisé pour la réaction suivante.

VI.4. Hydrolyse du γ -lactame et des esters éthyliques

Le mélange **35** est hydrolysé avec de l'acide chlorhydrique 6N à reflux.



L'amine hydrochlorée **36** est obtenue avec un rendement de 80% après lyophilisation. Le γ -lactame 4,5-disubstitué s'hydrolyse plus facilement que le γ -lactame 5,5-disubstitué (voir schéma 127).

Par cette méthode de synthèse rapide, nous obtenons les quatre stéréoisomères possibles. Elle ne permet pas de contrôler les deux centres chiraux. Notons qu'une première évaluation biologique sur les β -lactamases peut se faire avec le mélange.

VI.5.Evaluation biochimique

Les tests biochimiques ont été effectués au centre d'ingénierie des protéines sur des β -lactamases des classes A, B, C et D et sur la D,D-peptidase R39. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle. Le concentration en inhibiteur est égal à 100 μ M. Le produit **35A** est un mélange d'amine et de pyrrolidinone (huit stéréoisomères) alors que le produit **35B** contient la pyrrolidinone pur (deux stéréoisomères). Le produit **36** est un mélange des quatre stéréoisomères.

Enzymes (classe)	Activité résiduelle (%)		
	35A pH 5/pH 7	35B pH 5/pH 7	36 pH 5/pH 7
TEM-1 (A)	80/94	86/100	90/100
BS3 (A)	100/100	100/100	97/85
NMCA (A)	98/100	93/100	86/100
P99 (C)	99/100	100/100	94/100
Oxa-10 (D)	88/82	87/91	85/92
BcII (B)	79/X	100/X	100/X
VIM-4	X/100	X/94	X/94
R39 ^(a) 500μM 500μM BSA	81 ±17 X	98 ±7 X	54±10 80 ±10

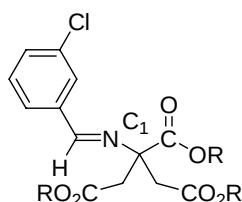
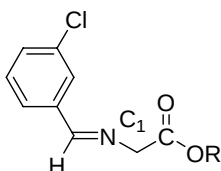
(a) Les produits sont testés à une concentration de 500 μM à pH 7,2

Tableau 11 : Tests biologiques avec **35** et **36**

A pH 7,2, un effet inhibiteur de **36** est observé sur l'activité enzymatique de R39. La molécule **36** n'est pas active vis-à-vis des β-lactamases.

VII.Caractérisation des produits

Tous les produits ont été caractérisés par RMN ¹H et ¹³C. Le tableau 12 reprend les protons et carbones caractéristiques des imines synthétisées. Voici une représentation du carbone C₁ qui est en fait le carbone quaternaire central de la molécule.

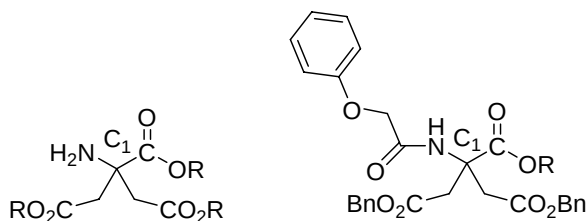


Composé	RMN ^1H H imine	RMN ^1H CH_2	RMN ^{13}C C imine	RMN ^{13}C CH_2	RMN ^{13}C C_1
6	8,26	/	164,14	/	62,01
17	8,25	/	164,03	/	61,35
18	8,26	/	164,25	/	61,93
7	8,25	2 d, 3,13 ; 3,31 J=15,92 Hz	159,58	40,43	58,00
19	8,28	2 d, 3,13 ; 3,29 J=15,8 Hz	159,53	40,83	67,86
13	8,20	2 d, 3,17 ; 3,35 J=15,82 Hz	159,97	40,94	59,00
20	8,11	2 d, 3,17 ; 3,33 J=15,95 Hz	159,73	40,35	67,90
21	8,08	2 d, 3,28 ; 3,38 J=15,85 Hz	159,93	40,16	57,92

Tableau 12 : Déplacements chimiques des imines

Les imines **20** et **21** ont leur proton de l'imine blindé par rapport au produit de départ, l'imine **17**. Les carbones des imines passent d'environ 164 ppm pour les produits de départ à environ 159 ppm pour les produits dialkylés. Les groupements CH_2 forment deux doublets avec un couplage géminale des deux protons de l'ordre de 16 Hz et ont un déplacement d'environ 40 ppm en carbone.

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage caractéristiques des amines et amides sont repris dans le tableau 13.



Composé	RMN ¹ H CH ₂	RMN ¹ H CH ₂ -Ph	RMN ¹³ C CH ₂	RMN ¹³ C C ₁
8	2 d, 2,69 ; 2,88 J=15,76 Hz	/	43,29	57,60
3	2 d, 2,69 ; 2,85 J=16 Hz	/	43,60	55,80
14	2 d, 2,73 ; 2,92 J=15,9 Hz	5,11	43,80	57,90
22	2 d, 2,69 ; 2,88 J=15,76 Hz	5,17	43,40	57,80
23	2 d, 2,76 ; 2,93 J=15,80 Hz	5,06	43,66	57,94
9	2 d, 2,95 ; 3,64 J=15,6 Hz	/	39,85	59,12
15	2 d, 2,98 ; 3,71 J=15,4 Hz	2 d, 4,98 ; 5,05 J=12,2 Hz	40,22	59,27
26	2 d, 3,00 ; 3,74 J=15,4 Hz	2 d, 4,96 ; 5,02 J=12,15 Hz	40,22	59,34

Tableau 13 : Déplacements chimiques des amines et amides

Les groupements CH₂ des amines forment deux doublets avec un couplage géminale des deux protons de l'ordre de 16 Hz et ont un déplacement d'environ 43-44 ppm en carbone. Les groupements CH₂ des amides forment deux doublets avec un couplage géminale des deux protons de l'ordre de 15,5 Hz et ont un déplacement d'environ 40 ppm en carbone. Le

déplacement chimique du C1 est de l'ordre de 56-58 ppm pour les amines et vers 59 ppm pour les amides. Les amines possédant des esters benzyliques ont plusieurs groupements CH₂ qui sortent sous la forme d'un singulet sur le spectre de RMN ¹H. Par contre, ces mêmes groupements CH₂ forment deux doublets qui ont une constante de couplage géminale de l'ordre de 12 Hz dans le cas des amides.

VIII.Références

- [1] Fu Y., Hammarstroem L. G. J., Miller T. J., Fronczek F. R., McLaughlin M. L., Hammer R. P., *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 21, 7118-7124.
- [2] Reich H. J., Jasperse C. P., Renga J. M., *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 15, 2981-2988.
- [3] Stork G., Leong A. Y. W., Touzin A. M., *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 21, 3491-3493.
- [4] O'Donnell M. J., Wojciechowski K., Ghosez L., Navarro M., Sainte F., Antoine J. P., *Synthesis* **1984**, 4, 313-315.
- [5] Al-Hassan S. S., Cameron R. J., Curran A. W. C., Lyall W. J. S., Nicholson S. H., Robinson D. R., Stuart A., Suckling C. J., Stirling I., Wood H. C. S., *J. Chem.Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, 8, 1645-1659.
- [6] Salomon C. J., Mata E. G., Mascaretti O. A., *Tetrahedron* **1993**, 49, 18, 3691-3734.
- [7] Jung M. F., Lyster M. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 3, 968-969.
- [8] Ho T.-L., Olah G. A., *Angew. Chem.* **1976**, 88, 24, 847.
- [9] Greenlee W. J., Thorsett E. D., *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 26, 5351-5353.
- [10] Feutrill G. I., Mirrington R. N., *Aust. J. Chem.* **1972**, 25, 8, 1731-1735.
- [11] Woo J. C. S., MacKay D. B., *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 14, 2881-2883.
- [12] Park K.-H., Abbate E., Olmstead M. M., Kurth M. J., Najdi S., *Chem. Commun.* **1998**, 16, 1679-1680.
- [13] Laue K. W., Haufe G., *Synthesis* **1998**, 10, 1453-1456.
- [14] Lopez A., Moreno-Manas M., Pleixats R., Roglans A., Ezquerra J., Pedregal C., *Tetrahedron* **1996**, 52, 24, 8365-8386.
- [15] Jiang Y., Wu S., Chen D., Ma Y., Liu G., *Tetrahedron* **1988**, 44, 17, 5343-5353.

- [16] Smirnova A. A., Perekalin V. V., Shcherbakov V. A., *Zh. Org. Khim.* **1968**, 4, 12, 2245-2255.
- [17] Battistini L., Curti C., Zanardi F., Rassu G., Auzzas L., Casiraghi G., *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7, 2611-2613.
- [18] O'Donnell M. J., Polt R. L., *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 13, 2663-2666.
- [19] Sturtz G., Guervenou J., *Synthesis* **1991**, 8, 661-662.

CHAPITRE 4

SYNTHESE DE DERIVES

AMINOPHOSPHONIQUES

I. Synthèse du bioisostère phosphonique de l'aminocitrate

I.1.Stratégie 1 : dialkylation de l'imine de l'aminométhyle phosphonate de diéthyle **37**

I.1.1.Synthèse de l'amine

Le clivage du groupement phthalimido (précurseur commercial) en amine est effectué avec de l'hydrazine dans l'éthanol à température ambiante[1],[2]. Cependant, la réaction n'est pas complète après 48 heures.

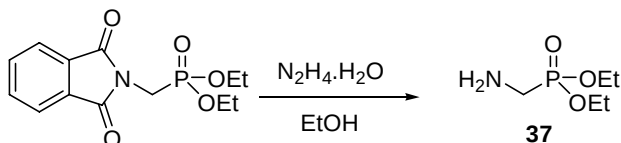


Schéma 134 : Clivage du groupement phthalimido

L'amine **37** est difficilement séparable du produit de départ. Des tentatives de précipitations et de purifications par chromatographie ont abouti à un échec. Le produit est finalement isolé avec un rendement faible de 11% après distillation.

Une autre méthode de la littérature est alors envisagée[3]. Le tribenzylhexahydrotriazine (produit commercial) est mis en réaction avec le chlorure de benzyle et le phosphite de diéthyle afin de former l'amine protégée avec un rendement moyen de 40%. L'amine **37** est obtenue après une réaction d'hydrogénation avec de l'hydroxyde de palladium avec un rendement de 90%[4].

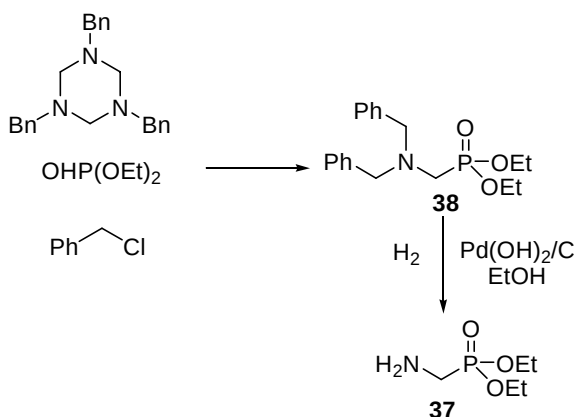
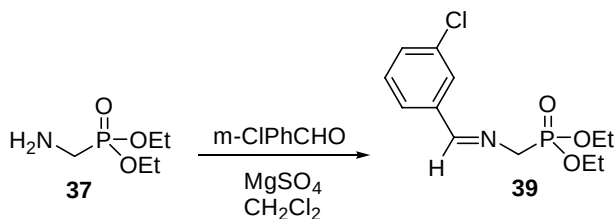


Schéma 135 : Synthèse de l'amine **37**

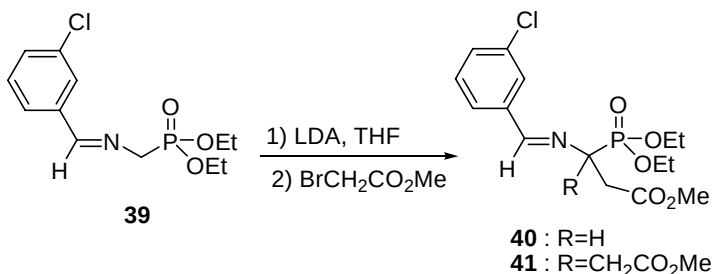
I.1.2. Formation de l'imine

L'imine **39** est obtenue par condensation de l'amine **37** avec le méta-chlorobenzaldéhyde dans le dichlorométhane avec un rendement de 76%[5].

Schéma 136 : Synthèse de l'imine **39**

I.1.3. Dialkylation et hydrolyse de l'imine

L'imine **39** est ensuite alkylée par action du diisopropylamidure de lithium dans le tétrahydrofur suivie de l'addition du bromo-acétate de méthyle[6].

Schéma 137 : Alkylation de l'imine **39**

Tout d'abord les conditions optimisées au chapitre 3 ont été testées. Seulement 51% de produit monoalkylé **40** sont obtenus. L'addition de l'imine dans une solution de LDA dans le tétrahydrofur en deux fois nous a permis d'obtenir un mélange de produits monoalkylé **40** et dialkylé **41** dans un ratio 38/21 après purification par chromatographie sur silice. Après isolation du produit monoalkylé, plusieurs essais de relance de la réaction sur le précurseur **40** ont été effectués sans succès. Ces différents essais ont conduit à la dégradation des milieux réactionnels. L'ajout d'HMPA n'a pas permis d'améliorer le résultat de la réaction, où le produit dialkylé **41** est toujours minoritaire.

L'hydrolyse des imines **40** et **41** est effectuée en milieu acide avec de l'acide chlorhydrique 1N dans l'acétonitrile suivi d'un traitement basique.

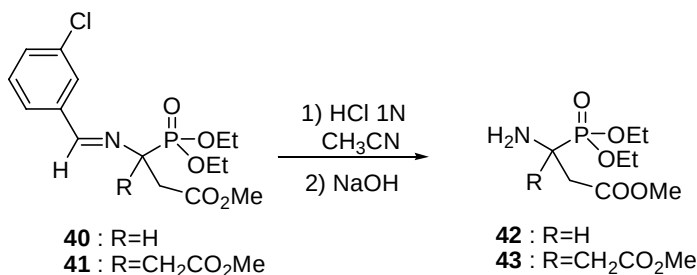


Schéma 138 : Hydrolyse des imines **40** et **41**

Le rendement de la réaction est moyen de l'ordre de 50%. Le rendement global sur les deux étapes est de 17% pour la monoalkylation (produit **42**) et de 10% pour la dialkylation (produit **43**).

Malheureusement, cette technique ne nous permet pas de travailler sur des quantités suffisantes et les rendements sont faibles. Une autre méthode est alors envisagée. Elle est basée sur la synthèse de l'imine mono-alkylée par une méthode plus propre.

I.2.Stratégie 2 : Alkylation de l'imine mono-substituée **40**

I.2.1.Synthèse de l'imine mono-substituée

La synthèse de l'imine **40** est effectuée en trois étapes à partir de la 4-acetoxy-azétidinone. Cette suite de réaction a été au départ réalisée avec le phosphite de triméthyle mais pour des problèmes de stabilité de l'amine et de rendements moyens, le groupement méthyle a été remplacé par le groupement éthyle qui confère une meilleure stabilité aux produits.

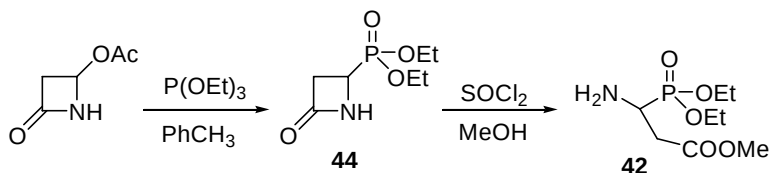


Schéma 139 : Réaction d'Arbuzov et méthanolyse

La première étape est une réaction d'Arbuzov[7], [8]. La substitution du groupement acétoxy par le phosphite de triéthyle est réalisée dans le toluène avec un rendement de 84%. L'ouverture du cycle β -lactame **44** et la formation de l'ester méthylique est effectuée avec du chlorure de thionyle dans le méthanol[9]. Les alcools primaires réagissent rapidement avec le chlorure de thionyle à 0°C pour former d'abord $\text{ROS}(\text{O})\text{Cl}$ et HCl , et ensuite $(\text{RO})_2\text{SO}$ et 2 HCl . En raison de l'oxophilie des sulfites, ces espèces contribuent avec l'acide chlorhydrique, à l'ouverture du cycle.

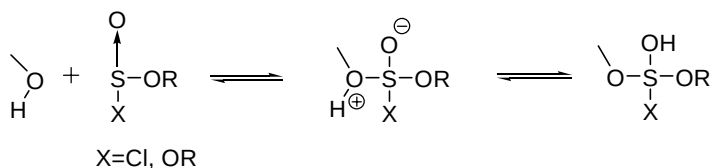


Schéma 140 : Oxophilie des sulfites

Après un traitement basique, l'amine **42** est obtenue avec un rendement de 90%. La dernière étape est la condensation de l'amine **42** et du méta-chlorobenzaldéhyde.

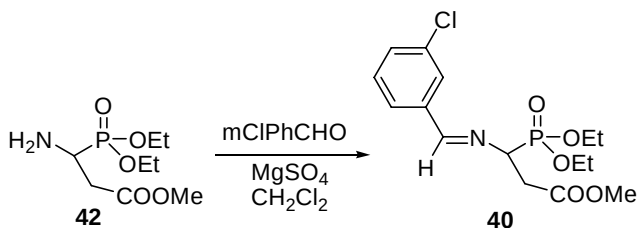
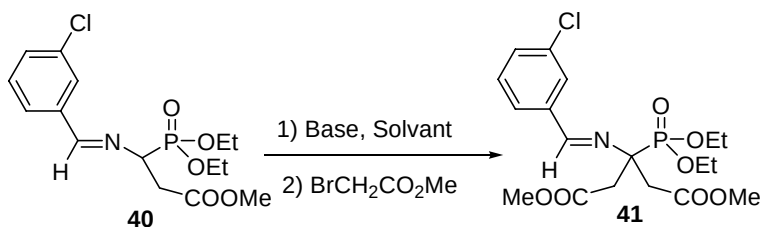


Schéma 141 : Formation de l'imine **40**

L'imine **40** est obtenue avec un rendement de 85% après purification par chromatographie sur gel de silice.

I.2.2. Alkylation de l'imine

Plusieurs conditions ont été testées pour cette étape d'alkylation. Les différents essais sont repris dans la figure 18. Les premiers essais ont été effectués en mode inverse c'est-à-dire que l'imine en solution est ajoutée sur la base (Entrées 1 à 6). Tout d'abord, l'imine est ajoutée sur le tertibutanolate de potassium (ou de sodium) dans le tétrahydrofurane ou sur l'hydruire de sodium dans la diméthylformamide ou sur le KHMDS dans le tétrahydrofurane, et le bromo-acétate de méthyle est ajouté par la suite. Ces conditions ont conduit soit à la dégradation des milieux réactionnels soit à la formation de quatre produits différents (**40**, **41** et 2 produits non identifiés).



Entrée	Base (n equiv)	Conditions	Résultat Ratio 40/41 ^(a)
1	tBuONa (1,2)	THF, TA	Dégradation
2	tBuOK (1,2)	THF, 0°C	4 produits différents
3	tBuOK (1,2)	THF, -60°C	4 produits différents
4	NaH (2)	DME, 0°C	Dégradation
5	NaH (2)	THF, 0°C	44/56
6	KHMDS (1,4)	THF, -78°C	4 produits différents
7	KHMDS (1,2)	THF, -78°C	62/38
8	K ₂ CO ₃ (2)	CH ₃ CN, 50°C	94/6
9	EtONa (1,5)	EtOH, 80°C	Transestérification

(a) ratio déterminé à partir du spectre de ¹H RMN brut

Figure 18 : Essais d'alkylation

En travaillant sur des quantités faibles de l'ordre de 200 mg, 56% de produit dialkylé **41** sont obtenus par réaction avec l'hydruure de sodium dans le tétrahydrofurane (entrée 5). Les essais des entrées 7 à 9 ont été effectués en mode normal c'est-à-dire que la base est ajoutée sur l'imine ; 38% de produit dialkylé sont obtenus par réaction avec le KHMDS dans le tétrahydrofurane. La réaction avec le carbonate de potassium a juste permis d'obtenir des traces de produit dialkylé (entrée 8). La réaction avec l'éthanolate de sodium et le bromo-acétate d'éthyle a conduit à la formation du produit de transestérification **45**.

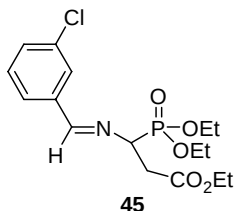


Schéma 142 : Produit de transestérification

Finalement, l'imine est déprotonée et alkylée par réaction avec le diisopropylamidure de lithium (1,4 équivalents, tétrahydrofurane, -78°C) et le bombo-acétate de méthyle. Les différents résultats sont repris dans le tableau 14 :

	Quantité (mg)	Produit alkylé 41 (%)	Produit de départ 40 (%)
Rendement (RMN ¹ H)	A : 264	42	58
	B : 551 ^(a)	40	60
	C : 383 ^(b)	70	30
Rendement ^(c)	B	20	30
	C	24	10

(a) Ajout en deux fois de l'imine sur le LDA

(b) Ajout de DMPU

(c) Après purification par chromatographie sur gel de silice

Tableau 14 : Résultats obtenus avec LDA

Le meilleur résultat obtenu avec le LDA est 24% de produit d'alkylation **41** après purification. Il semblerait que la purification soit la cause de la perte d'une partie du produit. Lorsque le nombre d'équivalents de LDA est augmenté (1,4 équivalents à 2), un produit secondaire **46** est isolé avec un rendement d'environ 5%, l'imine **41** étant isolée avec un rendement de 16%.

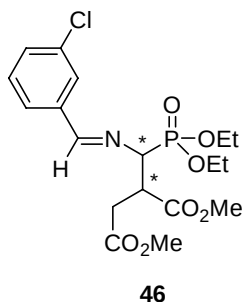


Schéma 143 : Produit secondaire isolé

Ces résultats peuvent être expliqués par l'encombrement important du groupement phosphonate, qui défavorise la réaction d'alkylation en α de l'imine. En forçant les conditions basiques, la deuxième alkylation se fait en β de l'imine.

1.2.3. Hydrolyse de l'imine

L'hydrolyse de l'imine **41** est effectuée dans les conditions classiques déjà utilisées auparavant.

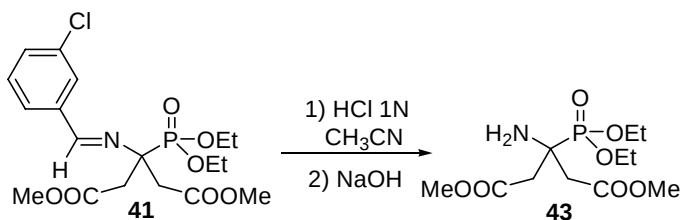


Schéma 144 : Hydrolyse de l'imine **41**

Lorsque l'imine est purifiée, l'amine **43** est obtenue avec un rendement de 80% sur cette étape et un rendement global faible de 19% sur la séquence d'alkylation et d'hydrolyse. Par contre si le brut d'alkylation est directement hydrolysé, le rendement de l'étape hydrolyse est faible de l'ordre de 28%. L'amine **43** est ensuite purifiée par chromatographie sur gel de silice et est isolée avec un rendement global faible de 17% sur les

deux étapes. Un produit secondaire **47** est isolé, avec un rendement de 5%, à l'issue de la purification par chromatographique

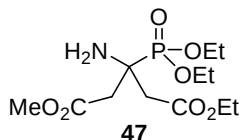


Schéma 145 : Produit secondaire

La formation de ce produit secondaire issu d'une réaction de transestérification peut être expliquée par le solvant utilisé pour la purification, un mélange d'acétate d'éthyle et d'isopropanol.

Malgré ces rendements faibles et un rendement global de 12%, suffisamment de produit **43** est isolé pour effectuer l'étape suivante permettant d'atteindre notre cible.

I.2.4. Déprotection totale à l'acide chlorhydrique

Le produit **43** est hydrolysé avec de l'acide chlorhydrique 6N à reflux.

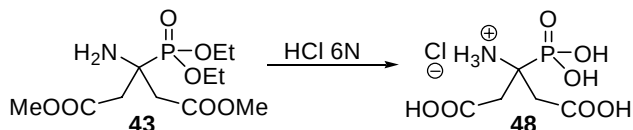


Schéma 146 : Hydrolyse acide de l'amine **43**

La réaction est quantitative et a permis l'obtention du bioisostère phosphonique de l'amino-citrate **48**.

I.2.5. Déprotection sélective des esters phosphoniques

L'hydrolyse des esters phosphoniques peut être réalisée de manière douce par différents agents silylés d'après la littérature. Notre choix s'est porté sur le bromure de triméthylsilane qui apparaît comme étant suffisamment réactif pour réagir en quelques heures à température ambiante avec le

groupement phosphonate et suffisamment sélectif pour ne pas réagir avec les fonctions esters[10].

La déprotection du groupement phosphonate est effectuée avec du bromure de triméthylsilane dans le dichlorométhane à température ambiante.

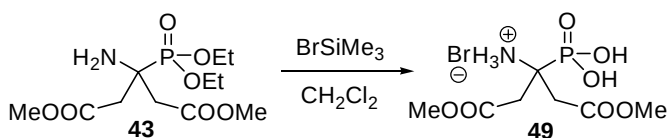


Schéma 147 : Déprotection sélective du groupement phosphonate

Lors de cette réaction, il y a formation de liaisons oxygène-silicium. Ces liaisons peuvent être clivées en utilisant de l'eau ou du méthanol et en concentrant à l'évaporateur rotatif ensuite le milieu réactionnel[11]. La réaction est quantitative.

I.3.Stratégie 3 : Réaction de Kabachnik-Fields

Parmi la grande variété de méthodes présentées dans la littérature pour la préparation des dérivés α -aminophosphonates [12-15], l'approche la plus classique est la réaction de Kabachnik-Fields, une condensation one-pot entre trois composés : un dérivé carbonyle (aldéhyde ou cétone), une amine et un phosphite de dialkyle (voir chapitre 1, schéma 64). Nous avons choisi de décrire ici quelques exemples qui nous semblaient intéressants et éventuellement applicables par la suite à notre cas.

Heydari *et al.*[16] ont rapporté la préparation d'aminophosphonates en utilisant un mélange de perchlorate de lithium dans l'éther diéthylique (LPDE) comme catalyseur.

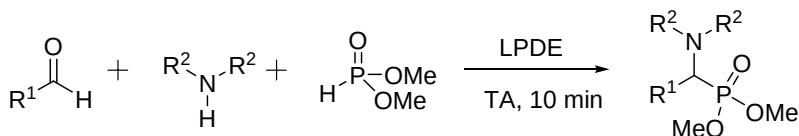


Schéma 148 : Réaction catalysée par LPDE

Une synthèse facile d'aminophosphonate dans l'eau utilisant un catalyseur combinant un acide de Lewis et un surfactant à température ambiante a été rapportée par Kobayashi et Manabe[17].

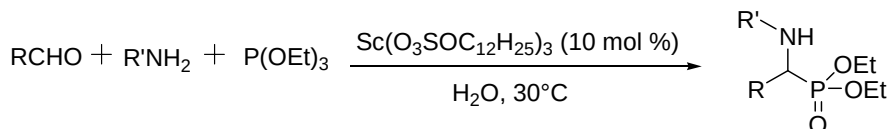


Schéma 149 : Réaction catalysée avec du scandium dans l'eau

Ranu *et al.*[18] ont décrit la synthèse d'aminophosphonates catalysée par du chlorure d'indium dans le térahydrofurane.

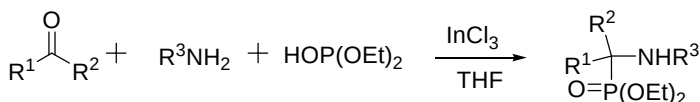


Schéma 150 : Utilisation du $InCl_3$

L'avantage de cette réaction est qu'elle est efficace sur les aldéhydes et les cétones. Le même groupe a développé une méthode simple et « verte » de synthèse d' α -amino-phosphonates via une condensation one-pot sans solvant et sans catalyseur d'un composé carbonylé, d'une amine et de phosphite de diéthyle[19].

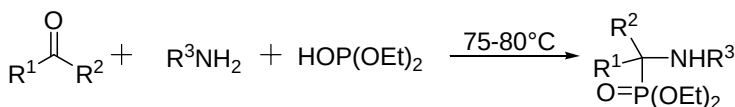


Schéma 151 : Méthode sans solvant et sans catalyseur

Matveeva *et al.*[20] ont développé une nouvelle méthode catalytique utilisant des cétones, du phosphite de diéthyle et de la benzylamine en présence de tetra-(tert-butyl)phthalocyanines.

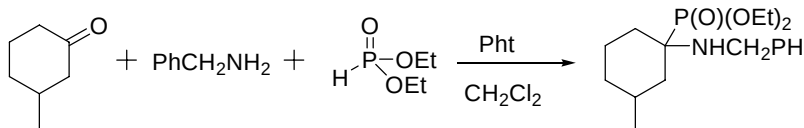


Schéma 152 : Réaction avec des cétones

D'autres méthodes de synthèse d' α -amino-phosphonates utilisant une activation par micro-ondes ont été rapportées dans la littérature récente.

Zhang *et al.*[21] mentionnent des temps de réaction très courts de l'ordre de 2 minutes à 180W. Aucun catalyseur ou solvant n'est nécessaire.

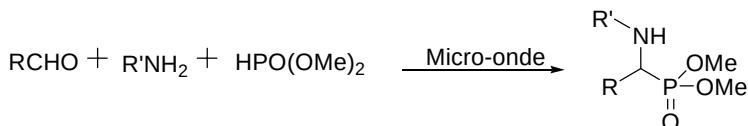


Schéma 153 : Réaction utilisant une activation micro-onde

Kabchnik *et al.*[22] ont décrit la préparation d' α -amino-phosphonates à partir de cétones, de benzylamine et du phosphite de diéthyle en utilisant un four à micro-ondes.

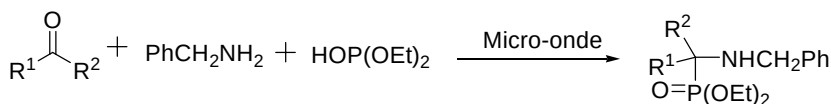


Schéma 154 : Réaction avec des cétones

I.3.1.Utilisation d'un catalyseur à base d'indium

Dans les travaux de Ranu *et al.*, un exemple nous a particulièrement intéressé (schéma 150)[18].

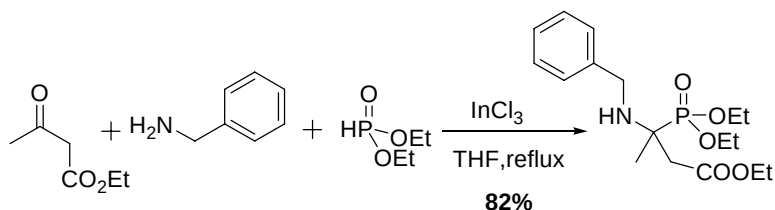


Schéma 155 : Réaction de Ranu et al.

Le produit est obtenu avec un bon rendement de 82%. Cette méthode a donc été appliquée dans notre cas. La benzylamine, la diméthyle-1,3-acétonedicarboxylate et le phosphite de diéthyle sont ajoutés à une solution de chlorure d'indium dans le tétrahydrofurane. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 16 heures.

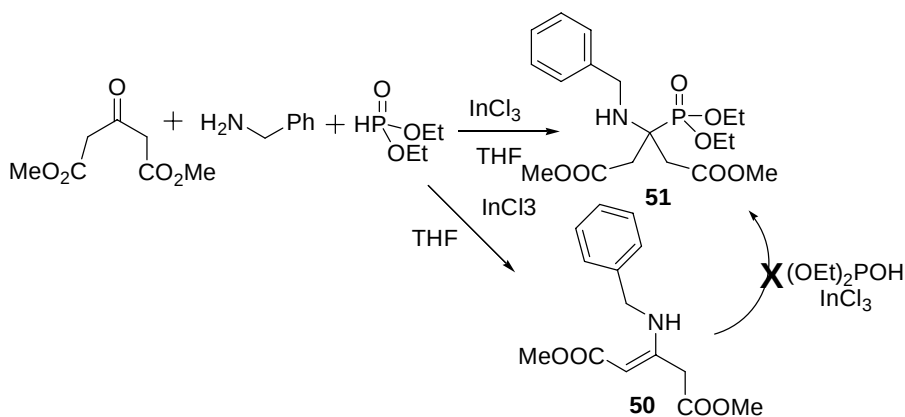


Schéma 156 : Application de la méthode de Ranu

Malheureusement, dans notre cas, le produit α -aminophosphonate **51** n'a pas été isolé. Le produit intermédiaire c'est-à-dire l'énamine **50** est isolée avec un rendement de 65% (ratio Z/E : 85/15). L'énamine pure est alors mise en réaction avec le phosphite de diéthyle dans une solution de chlorure d'indium dans le tétrahydrofurane, mais là encore aucune réaction n'a pu être observée.

Comme notre réaction ne fonctionnait pas malgré la grande ressemblance de notre substrat avec celui utilisé par l'équipe du professeur Ranu., la manipulation décrite dans la littérature a été reproduite. Les premiers essais ont conduit à l'isolation de l'énamine intermédiaire et le produit n'a pu être isolé que sous forme de trace alors que dans la publication, Ranu et al. ont isolé ce produit avec un rendement de 82%.

I.3.2.Utilisation du micro-onde

Kabachnik[22] *et al* ont montré que l'application d'un chauffage au four à micro-onde dans le cas de certaines cétones encombrées permet l'obtention d' α -aminophosphonates alors qu'un chauffage conventionnel donne dans ces cas-là des rendements faibles.

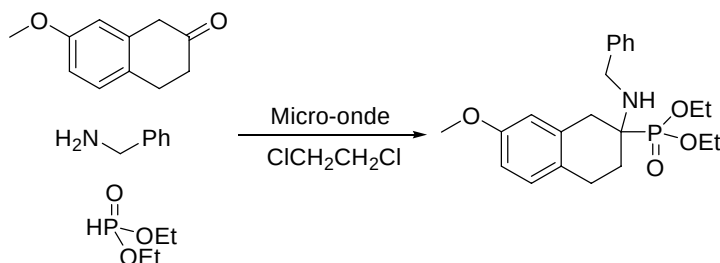


Schéma 157 : Application du four à micro-onde

Le produit est obtenu avec un rendement de 75% après 19 minutes à 102W, alors que seulement 1% de produit est isolé après 72 heures à 45°C.

Un essai de réaction au four à micro-onde a été effectué dans le dichloroéthane à 102W pendant 35 minutes.

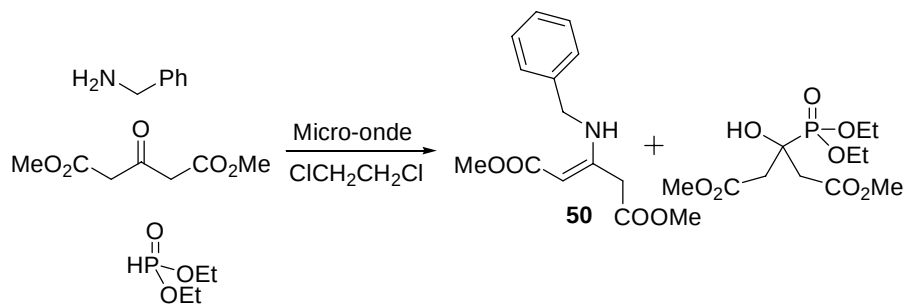


Schéma 158 : Essai avec activation micro-ondes

L'énamine **50** est isolée majoritairement dans un ratio Z/E : 77/23 et des traces (environ 10% déterminé par RMN¹H) du produit d'addition du phosphite de diéthyle sur la cétone sont observés sur le spectre RMN¹H et le spectre de masse.

I.4.Stratégie 4 : Addition d'un phosphite activé sur l'énamine **50**

I.4.1.Réaction de Pudovik

La réaction de Pudovik[23], méthode très souvent utilisée pour la synthèse des dérivés α -aminophosphoniques, utilise généralement du phosphite de diéthyle et une imine portant un groupement benzyle qui pourra être clivé par la suite par une réaction d'hydrogénation avec un catalyseur au palladium.

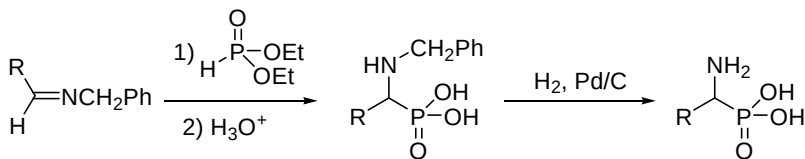


Schéma 159 : Réaction de Pudovik sur les bases de Schiff

Cette réaction peut-être effectuée en solution ou en phase condensée avec des catalyseurs acides ou basiques ou juste en chauffant[12],[14].

La capacité des phosphites à effectuer une addition de Michael sur les doubles liaisons activées est aussi utilisée pour la synthèse des dérivés α -, β - et γ -aminophosphoniques. L'analogue phosphonique de l'acide aspartique où le groupement carboxylique β a été remplacé par un groupement phosphonique est obtenu par la réaction du phosphite de diméthyle et de l'acrylate de méthyle-2-acétamide[24].

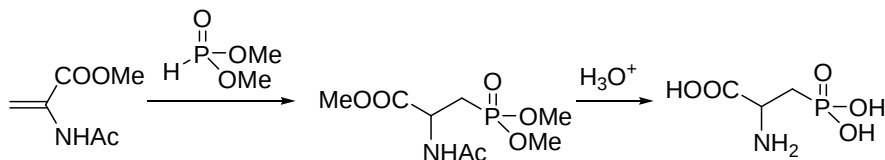


Schéma 160 : Réaction entre un acrylate et un phosphite

L'analogue phosphonique de l'acide aspartique dans lequel le groupement phosphonique remplace le groupement carboxylique α , est obtenu par réaction du phosphite de diéthyle sur l'acetamidomethylenemalonate suivie d'une hydrolyse et d'une décarboxylation[25].

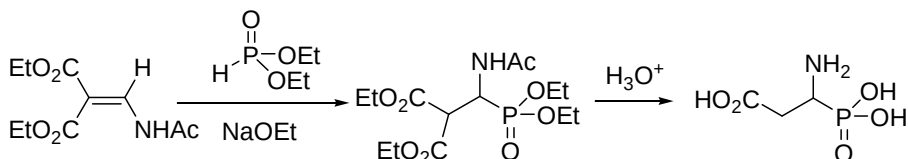


Schéma 161 : Réaction de Michael entre un dérivé malonate et un phosphite

Le phosphite de diéthyle est généralement considéré comme un nucléophile pauvre car il existe principalement sous sa forme $\sigma_4\lambda_5$. Il est en équilibre avec sa forme $\sigma_3\lambda_3$ mais cet équilibre est fortement déplacé vers la gauche (confirmé par RMN ^1H et ^{31}P)[26]

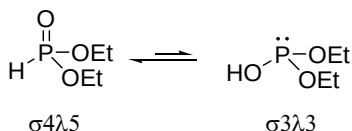


Schéma 162 : Équilibre entre les deux formes du phosphite de diéthyle

La nucléophilie du phosphite de diéthyle peut être améliorée principalement de trois façons. L'utilisation de bases fortes permet l'isolation de sels de lithium, sodium ou potassium qui sont ensuite utilisés en réaction. Smith *et al.*[27] ont montré que l'addition de LiPO_3Et_2 sur une imine qui s'isomérise facilement en énamine (conjugaison avec un groupement phényle) ne conduit pas au produit d'addition mais à l'énamine.

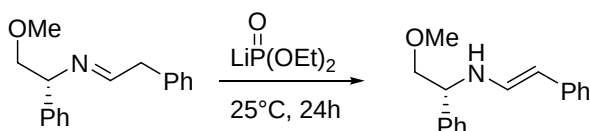


Schéma 163 : Echec de l'addition du sel de lithium de phosphite

L'utilisation de bases moins fortes comme l'éthanolate de sodium permet de déplacer l'équilibre et favorise la forme $\sigma_3\lambda_3$ plus nucléophile durant la réaction, conduisant à un meilleur résultat. L'addition d'une catalyse acide est une autre voie d'activation du phosphite de diéthyle. Beaucoup d'acides de Lewis ont été utilisés pour la synthèse des α -aminophosphonates tels que par exemple: BF_3 , AlCl_3 , Me_2AlCl , ZnCl_4 , TiCl_4 , et SnCl_4 [28],[29],[30].

Une autre façon d'augmenter la nucléophilie du phosphite de diéthyle a été décrite par Afarinkia[31] dans la littérature. Le phosphite de diéthyle est transformé en phosphite de triméthylsilyldiéthyle. Ceci peut être réalisé de manière très simple par réaction du phosphite de diéthyle avec du chlorure de triméthylsilane et de la triéthylamine dans le dichlorométhane.

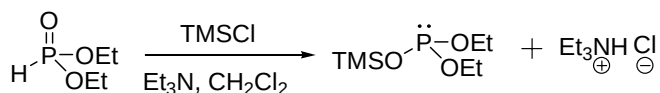


Schéma 164 : synthèse du phosphite de triméthylsilyldiéthyle

Cette dernière stratégie nous a plus particulièrement intéressé et a été appliquée à notre substrat qui n'est pas une imine mais une énamine.

I.4.2. Addition de phosphite de triméthylsilyldiéthyle sur l'énamine **50**

La synthèse de l'énamine **50** est effectuée par réaction de la benzylamine avec la diméthyle-1,3-acetonedicarboxylate en présence de tamis moléculaire 3Å dans le méthanol[32].

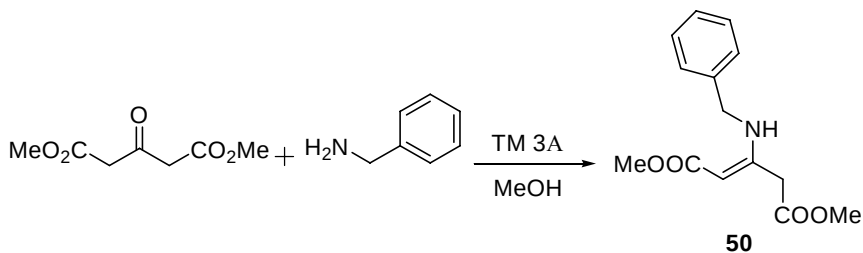


Schéma 165 : Formation de l'énamine **50**

L'énamine brute **50** est obtenue avec un rendement de 67% sous la forme d'un mélange des isomères Z et E. Le ratio Z/E varie de 13/87 à 86/14 en utilisant les mêmes conditions réactionnelles. Ces deux isomères ne sont pas séparables par chromatographie sur colonne car ils migrent de manière similaire en chromatographie sur couche mince. Le produit étant un solide, des tentatives de recristallisations ont été effectuées avec du méthanol, de l'éther diéthylique à chaud ou avec un mélange d'éther-hexane à froid mais sans succès. Finalement, l'énamine **50** est purifié par chromatographie sur gel de silice sans séparation des stéréoisomères.

Lors des premiers essais d'addition du phosphite sur l'énamine **50**, une solution d'énamine dans le dichlorométhane est ajoutée sur le phosphite de triméthylsilyldiéthyle produit in situ dans le dichlorométhane en présence de chlorure de triéthylammonium selon la méthode d'Afarinkia[31].

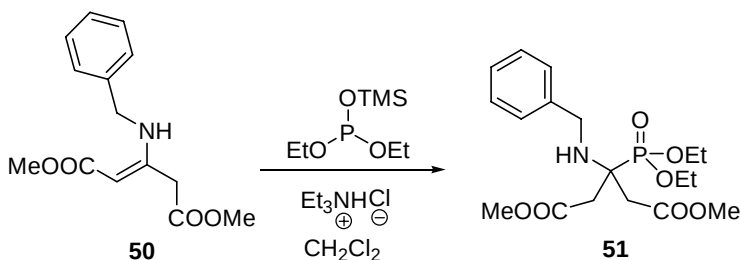


Schéma 166 : Premiers essais avec le phosphite de triméthylsilyldiéthyle

Lorsqu'on travaille à température ambiante dans le dichlorométhane, le produit de départ est retrouvé en fin de réaction. Lors de l'essai suivant, le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant trois jours dans le dichlorométhane. Après purification, l'énamine **50**, dont le ratio Z/E est 78/22, est récupérée et il n'y a pas de trace de produit d'addition. Dans cette réaction, une source de protons est nécessaire afin de permettre un équilibre tautomère entre la forme énamine et la forme imine et un proton est aussi ajouté lors de la réaction d'addition. Il semblerait que le sel de triéthylamine ne soit pas une source de protons suffisamment forte.

En 2005, Moonen *et al.* ont montré qu'il est possible de réaliser une réaction d'addition tandem 1,4-1,2 de phosphites sur des imines α,β -insaturées[33].

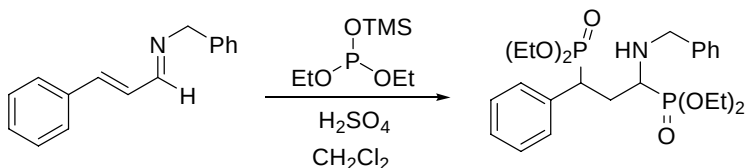


Schéma 167 : Réaction d'addition tandem 1,2-1,4

Cette réaction effectuée avec le phosphite de triméthylsilyldiéthyle est accélérée en remplaçant le chlorure de tétrabutylammonium (72 heures à 40°C) par du sulfate d'ammonium (3h à 40°C) ou par de l'acide sulfurique (30 minutes à température ambiante).

Nous avons donc décidé d'appliquer ces conditions à notre système. Le premier essai est effectué avec le phosphite de triméthylsilyldiéthyle et le sulfate d'ammonium dans le dichlorométhane à reflux pendant 24 heures. Le produit de départ est récupéré en fin de réaction. Les essais suivants sont réalisés avec l'acide sulfurique.

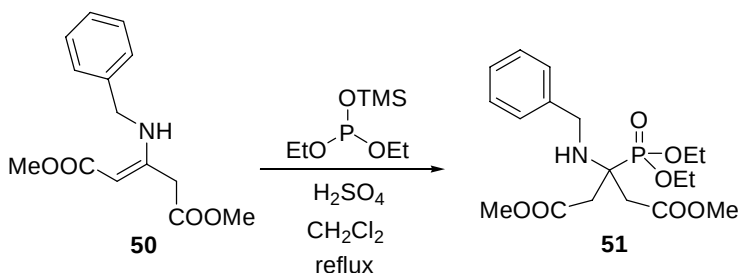


Schéma 168 : Addition de phosphite sur l'énamine **50**

Les résultats obtenus sont repris dans le tableau 15 :

Entrée	Equivalents		Rendement (%)
	H ₂ SO ₄	P(OTMS)(OEt) ₂	
1	0,5	1,05	30
2	0,75	2	11*
3	0,5	1,3	11

*Un produit secondaire est isolé avec un rendement de 10%.

Tableau 15 : Résultats de l'addition de P(OTMS)(OEt)₂

Le produit **51** est isolé avec un rendement faible de 30% (entrée 1) dans le meilleur des cas, rendement qui n'a pas pu être amélioré en augmentant la quantité d'acide ou de nucléophile. Le problème majeur rencontré dans cette réaction est la dégradation rapide de l'énamine dans des conditions acides. Il faut donc trouver le juste milieu entre une quantité d'acide nécessaire à la réaction et la dégradation du produit de départ. Lors de

l'ajout de 0,75 équivalents d'acide sulfurique et de deux équivalents de $P(OTMS)(OEt)_2$, le produit de décarboxylation **52** est isolé avec un rendement de 10% (entrée 2).

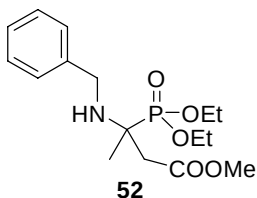


Schéma 169 : Produit secondaire isolé

Les différences de rendement observées entre l'entrée 1 et les entrées 2 et 3 peuvent aussi s'expliquer par le fait que dans l'entrée 1, le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 6 heures avant d'être chauffé alors que dans les entrées 2 et 3, le milieu réactionnel est chauffé directement dégradant alors plus rapidement l'énamine qui ne peut plus réagir avec le phosphite de triméthylsilyldiéthyle. Le faible rendement de la réaction peut aussi être expliqué par le fait que cette réaction n'est pas réalisée sur des énamines dans la littérature mais sur des imines. En plus, ces imines ne sont que rarement disubstituées alors que dans notre cas, l'énamine est disubstituée.

Deux hypothèses mécanistiques peuvent expliquer la formation du produit **51**. La première hypothèse envisagée est la tautomérisation de l'énamine en iminium en milieu acide suivie de l'addition du phosphite de triméthylsilyldiéthyle sur l'iminium et d'un traitement aqueux afin de libérer le groupement phosphonate. Ce mécanisme permettrait d'expliquer le faible rendement d'amine obtenue. En effet, l'énamine est stabilisée par résonance, la double liaison étant conjuguée avec l'ester méthylique défavorisant ainsi l'équilibre tautomère.

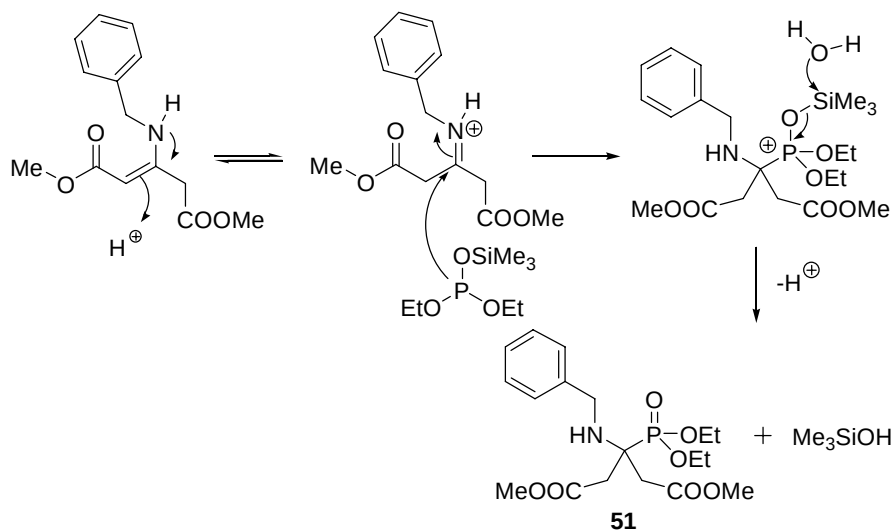


Schéma 170 : Première hypothèse mécanistique

La seconde hypothèse est l'addition de Michael du phosphite de triméthylsilyldiéthyle sur l'énamine activée par un des deux esters méthyliques.

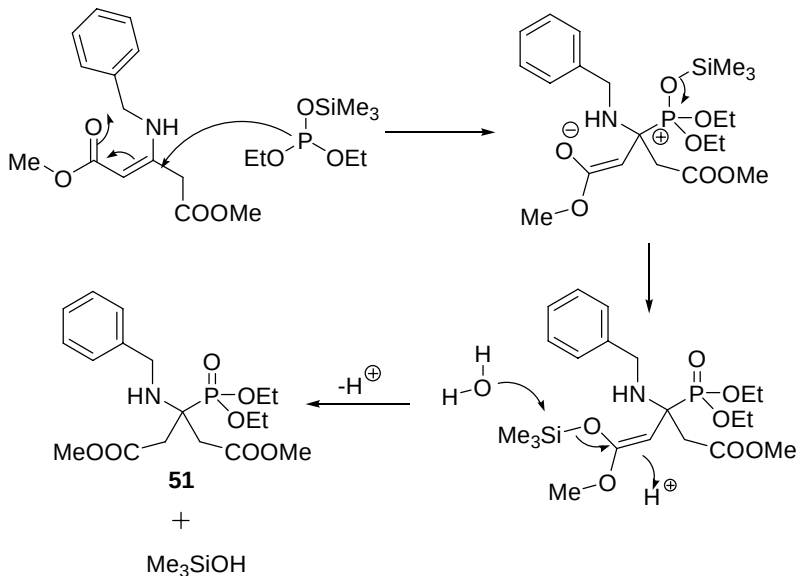


Schéma 171 : Hypothèse mécanistique 2

La seconde hypothèse est beaucoup moins crédible car la double liaison est disubstituée par une amine qui défavorise l'addition et par une fonction ester qui a un effet inductif capteur. L'amine libre **43** est obtenue à partir de l'amine protégée **51** par une réaction d'hydrogénation avec de l'hydroxyde de palladium dans l'éthanol[4].

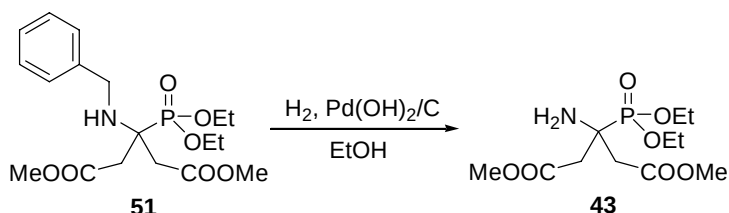
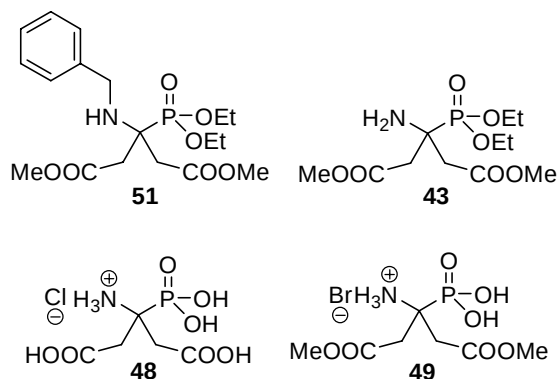


Schéma 172 : Hydrogénolyse catalytique de **51**

L'amine **43** est isolée de manière quantitative et pure après filtration sur célite. Cette méthode a permis d'obtenir l'amine **43**, intermédiaire clé dans la synthèse du bioisostère phosphonique de l'aminocitrate, en moins d'étapes et avec un meilleur rendement global de 20% contre 12% avec la stratégie 2. La déprotection totale ou partielle des esters de **43** a été décrite précédemment.

I.5.Evaluation biochimique

Les tests biochimiques ont été effectués au Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP) sur des β -lactamases des classes A, B, C et D et sur l'enzyme R39 qui est une DD-transpeptidase/carboxypeptidase. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle. La concentration en inhibiteur est égale à 100 μM sauf quand précisé (X : non déterminé). Les inhibiteurs ont été testés à pH physiologique et à pH 5.



Enzymes (classe)	Activité résiduelle (%)			
	51 pH 5/pH 7	43 pH 5/pH 7	48 pH 5/pH 7	49 pH 5/pH 7
TEM-1 (A)	88/80	83/96	89/100	92/100
BS3 (A)	100/100	97/89	100/100	98/100
NMCA (A)	95/100	83/100	83/100	76/100
P99 (C)	97/93	98/100	100/99	97/100
Oxa-10 (D)	97 /100	100/92	96/89	91/88
BcII (B)	95/100	100/X	100/X	100/X
VIM-4 (B)	X/100	X/97	X/99	X/100
R39 ^(a) 500µM 500µM BSA	X	98 ±7 X	36 ±3 52±4	71±5 X

(a) Les produits sont testés à une concentration de 500 µM à pH 7,2

Tableau 16 : Tests biologiques avec **43**, **48**, **49** et **51**

L'activité résiduelle de la β -lactamase NMCA est de 76% en présence de l'amine **49**, ce qui représente une constante d'inhibition de 800 µM. L'amine **49** est aussi un inhibiteur faible de l'enzyme R39. Les amines **43**

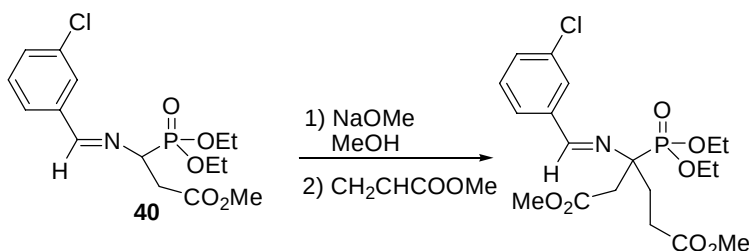
et **51** n'ont pas d'activité vis-à-vis des différentes β -lactamases. L'activité résiduelle de R39 est fortement diminuée en présence de l'amine **48**.

II. Synthèse de dérivés homologues et bis-homologues

II.1. Une seule chaîne carbonée plus longue

II.1.1. Addition de Michael de l'imine substituée **40**

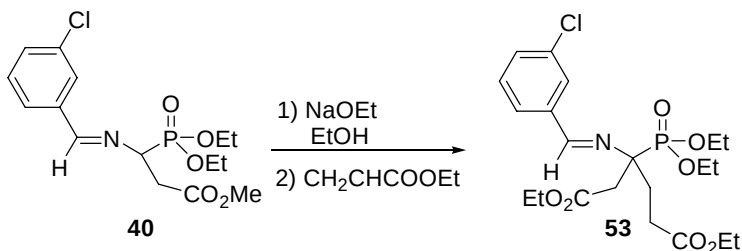
Les premiers essais ont été effectués avec du méthanolate de sodium dans le méthanol et de l'acrylate de méthyle. Les résultats sont repris dans le tableau 17 :



Temps	Température (C°)	Rendement (RMN 1H)
		Produit de départ/Produit alkylé (%)
18 h	30	93/7
4 jours	30	93/7
18 h	80	76/24

Tableau 17 : Résultats obtenus avec MeONa

Très peu de produit alkylé est obtenu avec le méthanolate de sodium. Auparavant dans le chapitre 3, l'éthanolate de sodium avait été une base de choix pour faire des réactions de Michael[34]. Puisque la molécule **40** possède un ester méthylique, une réaction de transestérification va avoir lieu en plus de la réaction d'alkylation. Les essais réalisés avec l'éthanolate de sodium dans l'éthanol sont résumés dans le tableau 18 :



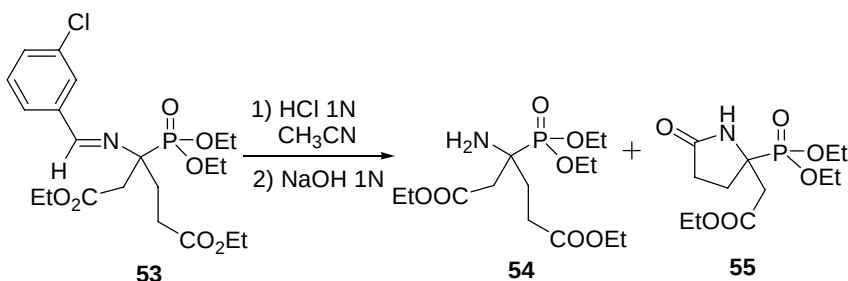
Temps (h)	Température (°C)	Rendement (RMN ^1H) 40/53 (%)
18	25	15/85
5	80	0/100

Tableau 18 : Addition de Michael avec EtONa de l'imine **40**

Les réactions d'alkylation et de transestérification sont complètes avec une quantité catalytique d'éthanolate de sodium (0,15 équivalents) dans l'éthanol en 5 heures à 80°C.

II.1.2. Hydrolyse de l'imine

La base de Schiff est hydrolysée en milieu acide dans les conditions optimisées au chapitre 3.

Schéma 173 : Hydrolyse de l'imine **53**

L'amine **54** et la pyrrolidinone **55** sont obtenues respectivement avec un rendement de 31% et de 29% après purification par chromatographie sur gel de silice. En phase pure, l'amine **54**, moins polaire que la pyrrolidinone

56, cyclise spontanément en γ -lactame **56** même lorsqu'elle est conservée à basse température.

II.1.3. Hydrolyse acide du γ -lactame et des esters éthyliques

L'hydrolyse de la pyrrolidinone **55** est effectuée avec de l'acide chlorhydrique 6N à reflux pendant 20 heures.

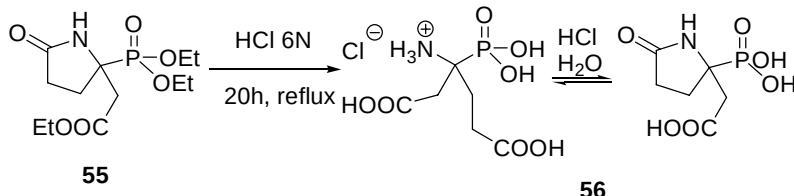


Schéma 174 : Hydrolyse acide du γ -lactame **55**

Un mélange de produits **56** est obtenu (analyse RMN). Un prolongement du temps de chauffage (48 h) n'a pas permis d'obtenir uniquement l'amine hydrochlorée. Oleksyszyn *et al.* ont rencontré le même problème lors de la synthèse d'analogues phosphoniques de l'acide aspartique[35]. En milieu acide, l'acide α -méthylpyroglutamique est en équilibre avec le composé ouvert.

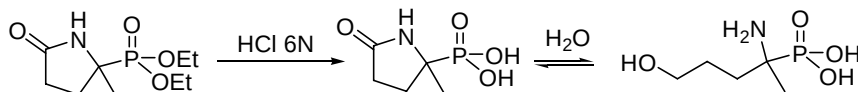


Schéma 175 : Equilibre entre le lactame et la forme ouverte

Ainsi même après un chauffage prolongé dans l'acide chlorhydrique, un mélange de produits cyclique et ouvert est obtenu.

II.1.4. Déprotection sélective de l'ester phosphonique

La déprotection sélective de l'ester phosphonique de **55** est réalisée avec quatre équivalents de bromure de triméthylsilane dans le dichlorométhane à température ambiante pendant 20 heures[11].

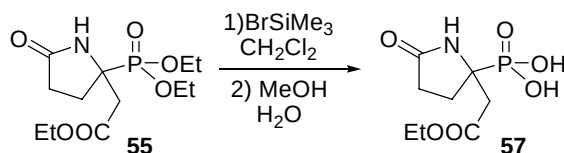


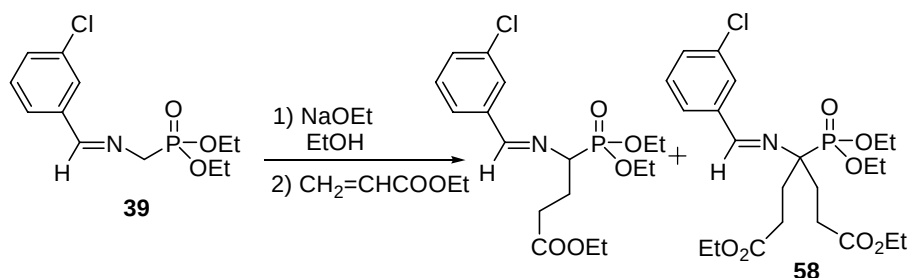
Schéma 176 : Déprotection sélective de l'ester phosphonique

Après un traitement au méthanol ou à l'eau, le produit **57**, solide blanc très hygroscopique, est obtenu avec un rendement de 90%. Lorsque la réaction est réalisée avec cinq équivalents de bromure de triméthylsilane et que le milieu réactionnel est agité pendant 41 heures à température ambiante, un mélange du produit **57** et du produit cyclique **56** est obtenu dans un rapport 60/40. En effet, lorsque la concentration de bromure de triméthylsilane est plus importante et le temps de réaction plus long, l'ester éthylique est transformé après traitement aqueux en acide carboxylique. Cette réaction est donc difficile à contrôler en présence d'une fonction ester.

II.2. Deux chaînes carbonées plus longues

II.2.1. Double addition de Michael de l'imine

La réaction de l'imine **39** avec l'acrylate d'éthyle est plus difficile à réaliser. La première tentative est effectuée avec du carbonate de potassium dans l'acétonitrile. Le produit de départ est retrouvé intact en fin de réaction.

Schéma 177 : Double addition de Michael de l'imine **39**

Les essais suivants ont été effectués avec de l'éthanolate de sodium dans l'éthanol. Le premier essai est réalisé à température ambiante et a conduit à la formation du produit monoalkylé exclusivement (entrée 1). Les différents essais sont repris dans le tableau 19 :

Entrée	Temps (h)	Température (C°)	Proportions ^(a) Produit Mono/Dialkylé	Rendements ^(b)
1	18	20	100/0	/
2	22	80	60/40	/
3	22	80	27/73	10/44
4	24	80	8/92	0/35

(a) Rendements relatifs déterminé par RMN ¹H (rapport en imine)

(b) Rendement après purification par chromatographie

Tableau 19 : Optimisation de la réaction de double addition

La réaction est d'abord effectuée avec deux équivalents d'acrylate d'éthyle (entrées 1 et 2). Lorsque la quantité d'acrylate d'éthyle est augmentée (4 équivalents), le pourcentage de produit dialkylé augmente. Dans le meilleur des cas, 44% de produit **58** est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice. Malgré ces rendements moyens, suffisamment de produit a été synthétisé pour poursuivre la synthèse. Ces rendements moyens peuvent s'expliquer par la formation de produits secondaires non identifiés.

II.2.2. Hydrolyse de l'imine

L'hydrolyse de l'imine **58** est effectuée avec de l'acide chlorhydrique 1N dans l'acétonitrile. La réaction est peu reproductible avec des rendements

variant de 20 à 53%. Le produit isolé n'est pas l'amine libre mais la pyrrolidinone **59**.

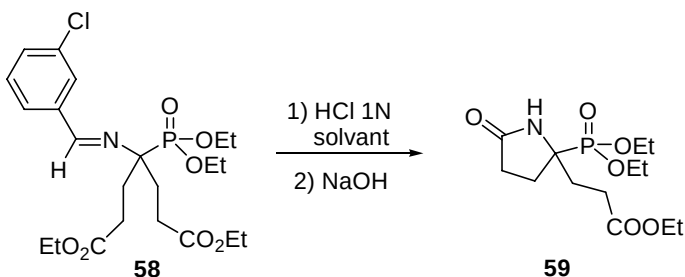


Schéma 178 : Hydrolyse de l'imine **58**

Le remplacement de l'acétonitrile par l'éther a permis d'obtenir 45% de pyrrolidine **59** après un traitement de la phase aqueuse par de l'hydroxyde de sodium 1N et différentes extractions.

II.2.3. Hydrolyse des esters éthyliques

L'hydrolyse des esters éthyliques est réalisée dans l'acide chlorhydrique 6N à reflux. Le lactame a résisté à ces conditions d'acidité et de température car il n'est pas hydrolysé.

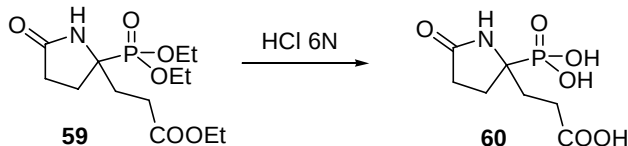


Schéma 179 : Hydrolyse des esters éthyliques de la pyrrolidinone **59**

Le produit **60** est isolé de manière quantitative. Il est étonnant que dans ce cas-là, il n'y ait pas de mélange de produit cyclique et de produit ouvert (cf schéma 174).

II.2.4. Déprotection de l'ester phosphonique

L'ester phosphonique est transformé en acide phosphonique en utilisant du bromure de triméthylsilane dans le dichlorométhane.

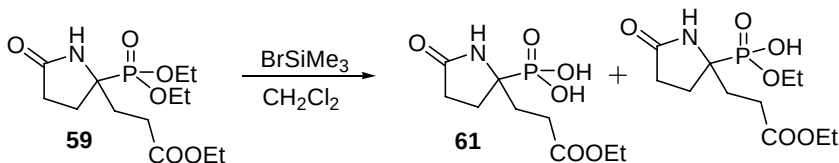
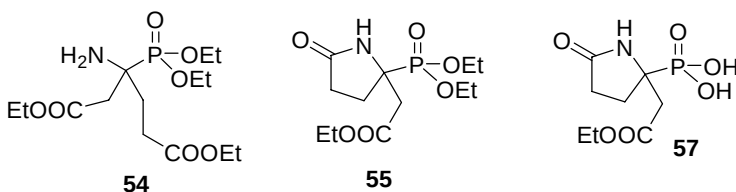


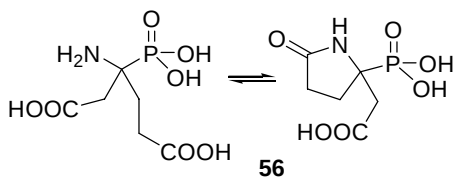
Schéma 180 : Déprotection du groupement phosphonate

Le produit **61** est un solide blanc très hygroscopique, obtenu avec un rendement de 75% d'après le spectre RMN ^1H . La déprotection du groupement phosphonate n'est pas totale. En effet, le spectre RMN ^1H montre la présence de 25% du monoester phosphonique.

II.3. Evaluation biochimique

Les tests biochimiques ont été effectués au CIP sur des β -lactamases des classes A, B, C et D et sur l'enzyme R39. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle. La concentration en inhibiteur est égale à 100 μM sauf quand précisé (X : non déterminé). Les inhibiteurs ont été testés à pH physiologique et à pH 5. Le tableau 20 reprend les résultats pour les molécules **54** à **57**.





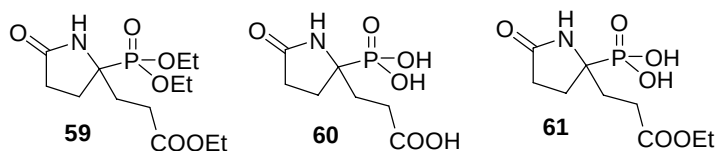
Enzymes (classe)	Activité résiduelle (%)			
	54 pH 5/pH 7	55 pH 5/pH 7	56 pH 5/pH 7	57 pH 5/pH 7
TEM-1 (A)	87/100	84/100	94/100	100/95
BS3 (A)	100/100	100/100	98/99	100/100
NMCA (A)	99/100	83/91	64 /98	100/100
P99 (C)	93/100	97/100	100/92	100/100
Oxa-10 (D)	96/85	98/93	92/87	87/99
BcII (B)	87/X	92/X	100/X	85/97
VIM-4 (B)	X/99	X/100	X/95	X/100
R39 ^(a) 500μM 500μM BSA	98 ±7 X	91 ±5 X	56 ±5 73±5	X

(a) Les produits sont testés à une concentration de 500 μM à pH 7,2

Tableau 20 : Activité résiduelle des enzymes avec les composés **54** à **57**

Les molécules **54**, **55** et **57** ne présentent pas d'activité intéressante. La molécule **56** inhibe la β-lactamase NMCA à pH 5 (activité résiduelle de 64 %) et la constante d'inhibition déterminée est de 360 μM. L'activité résiduelle de la D,D-peptidase R39 en présence de **56** est également diminuée.

Le tableau 21 reprend les résultats pour les molécules **59**, **60** et **61**.



Enzymes (classe)	Activité résiduelle (%)		
	59 pH 5/pH 7	60 pH 5/pH 7	61 pH 5/pH 7
TEM-1 (A)	92/100	97/100	100/90
BS3 (A)	100/99	97/100	99/100
NMCA (A)	97/100	92/100	100/100
P99 (C)	95/100	100/95	100/98
Oxa-10 (D)	92/85	92/92	96/100
BcII (B)	100/X	88/X	95/100
VIM-4 (B)	X/100	X/96	X/91
R39 ^(a) 500μM 500μM BSA	100 ±15 X	67 ±8 72 ±9	X

(a) Les produits sont testés à une concentration de 500 μM à pH 7,2

Tableau 21 : Activité résiduelle des enzymes en présence de **59**, **60** et **61**

Les molécules **59** et **61** n'ont pas montré d'activité intéressante sur les β-lactamases. L'activité résiduelle de la D,D-peptidase R39 est diminuée en présence de **60**. Ce résultat pourrait indiquer que dans le cas du composé **56**, c'est la forme cyclique qui est active sur R39.

III.Synthèse de dérivés bis-phosphonates

III.1.Synthèse de l'amine

La synthèse de l'amine **63** est décrite dans la littérature[36]. La réaction du triéthylformate, du phosphite de diéthyle et de la dibenzylamine conduit à l'amine **62** protégée par deux groupements benzyles avec un rendement de 42% après purification.

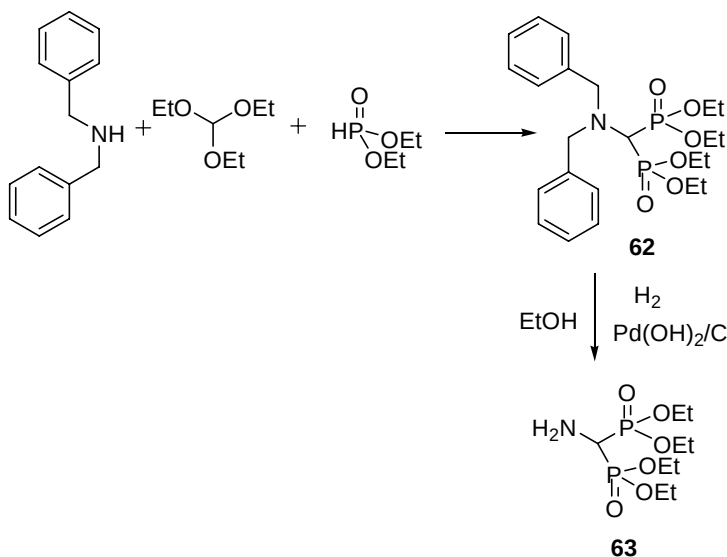


Schéma 181 : Synthèse de l'amine **63**

Dans la publication d'origine[36], l'amine **63** est obtenue par une réaction d'hydrogénation avec du cyclohexène, du Pd/C et du méthanol avec un rendement de 75%. L'utilisation de l'hydroxyde de palladium et d'hydrogène dans l'éthanol a permis l'obtention de l'amine **63** de manière quantitative.

III.2.Formation de l'imine

L'imine **64** est obtenue par condensation de l'amine **63** et du méta-chlorobenzaldéhyde[37].

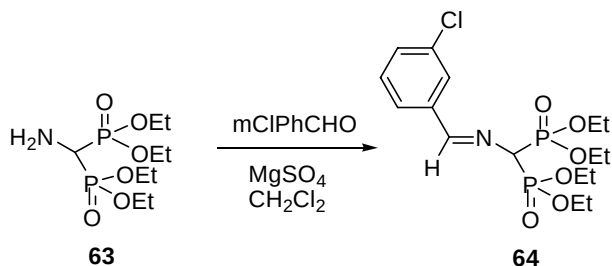


Schéma 182 : Synthèse de l'imine **64**

Celle-ci est isolée avec un rendement de 70% après purification par chromatographie.

III.3.Synthèse du bioisostère bis-phosphonique de l'aminocitrate

III.3.1.Alkylation de l'imine

L'imine **64** est alkylée par réaction avec du carbonate de potassium, du bromure de tétrabutylammonium et du bromo-acétate de méthyle dans l'acétonitrile[38].

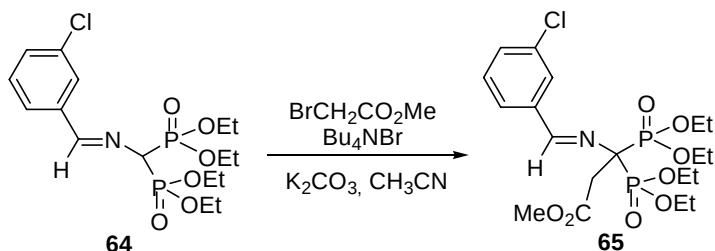


Schéma 183 : Alkylation de l'imine **64**

Le produit brut **65** est obtenu avec un rendement de 91%.

III.3.2.Hydrolyse de l'imine

L'imine **65** est hydrolysée avec de l'acide chlorhydrique 1N dans l'acétonitrile suivi d'un traitement basique.

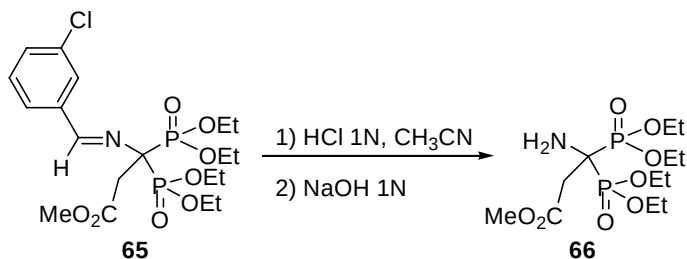


Schéma 184 : Hydrolyse de l'imine **65**

L'amine **66** est obtenue avec un rendement de 76% après purification par chromatographie sur gel de silice.

III.3.3. Hydrolyse totale à l'acide chlorhydrique 6N

Les groupements phosphonates et l'ester méthylique sont hydrolysés par traitement avec de l'acide chlorhydrique 6N à reflux.

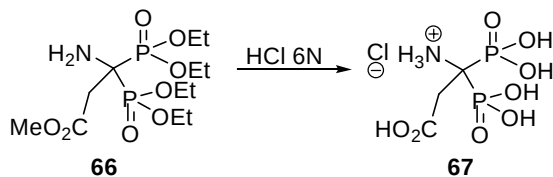


Schéma 185 : Hydrolyse des esters de l'amine **66**

Le bioisostère bis-phosphonique de l'amino-citrate **67** est obtenu de manière quantitative sous forme d'un chlorhydrate.

III.4. Synthèse d'un homologue bis-phosphonique

III.4.1. Réaction de Michael

La première base testée pour cette réaction est la diisopropyléthylamine (DIEA) en solution dans l'acétonitrile. Le produit de départ est retrouvé inchangé en fin de réaction. La réaction de Michael de l'imine **64** est alors effectuée avec de l'éthanolate de sodium dans l'éthanol et avec de l'acrylate d'éthyle.

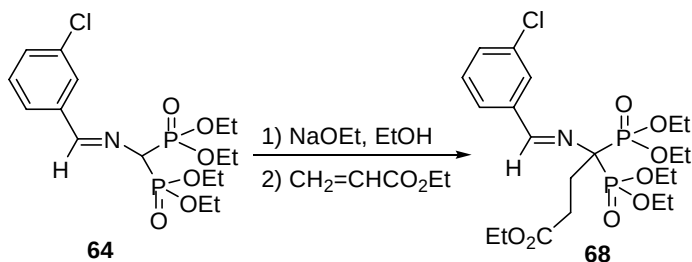


Schéma 186 : Réaction de Michael avec l'imine **64**

Les premiers essais ont été effectués à température ambiante conduisant à une réaction complète certaines fois et à une réaction incomplète d'autres fois. Les essais suivants ont donc été réalisés à 80°C pendant deux heures et ont permis l'obtention de l'imine **68** avec un rendement brut de 98%.

III.4.2. Hydrolyse de l'imine

L'imine **68** est hydrolysée avec de l'acide chlorhydrique 1N dans l'acétonitrile pour fournir la pyrrolidinone **69**. Les rendements sont peu reproductibles variant de 20 à 50%. Lorsque l'acétonitrile est remplacé par de l'éther, le rendement n'est guère meilleur de l'ordre de 25%.

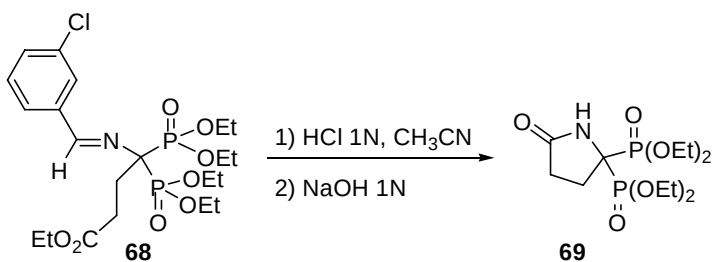


Schéma 187 : Hydrolyse de l'imine **68**

III.4.3. Hydrolyse des esters phosphoniques

L'hydrolyse des esters phosphoniques de **69** est effectuée avec de l'acide chlorhydrique 6N à reflux.

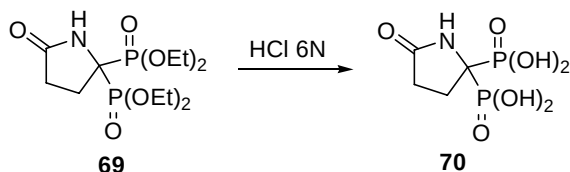
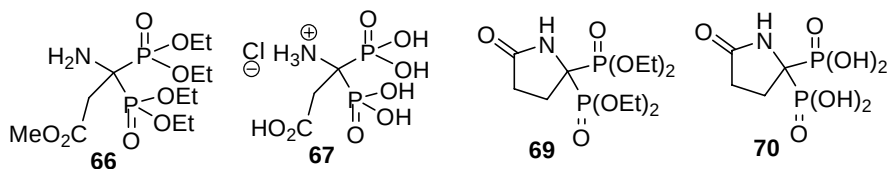


Schéma 188 : Hydrolyse des groupements phosphonates

L'hydrolyse est sélective vis-à-vis du lactame qu'elle ne touche pas. Le produit **70** est isolé de manière quantitative.

III.5. Evaluation biochimique

Les tests biochimiques ont été effectués au CIP sur des β -lactamases des classes A, B, C et D et l'enzyme R39. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle. La concentration en inhibiteur est égale à 100 μM sauf quand précisé (X : non déterminé). Les inhibiteurs ont été testés à pH physiologique et à pH 5. Le tableau suivant reprend les résultats des molécules **66**, **67**, **69** et **70**.



Enzymes (classe)	Activité résiduelle (%)			
	66 pH 5/pH 7	67 pH 5/pH 7	69 pH 5/pH 7	70 pH 5/pH 7
TEM-1 (A)	100/95	93/89	91/98	90/100
BS3 (A)	100/100	97/100	100/100	89/100
NMCA (A)	90/99	100/100	97/100	88/95
P99 (C)	100/100	100/98	91/100	100/86
Oxa-10 (D)	91/97	100/100	84/100	100/96
BcII (B)	99/100	89/100	100/X	96/100
VIM-4	X/96	X/93	X/100	X/94
R39 ^(a) 500μM 500μM BSA	X	X	95 ±9 X	94 ±10 X

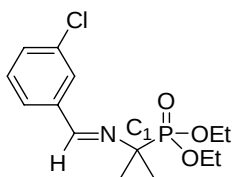
(a) Les produits sont testés à une concentration de 500 μM à pH 7,2

Tableau 22 : Activité résiduelle des enzymes en présence de **66**, **67**, **69** et **70**

Les molécules **66**, **67**, **69** et **70** n'ont pas d'activité intéressante sur les β-lactamases et la D,D-peptidase R39.

IV.Caractérisation des produits

Les produits peuvent être caractérisé par RMN ¹H, RMN ¹³C et RMN ³¹P. Le tableau suivant reprend les protons et carbones caractéristiques des imines synthétisées. Les différentes constantes reprises dans le tableau sont des constantes de couplage H-P pour les spectres RMN ¹H et des constantes C-P pour les spectres RMN ¹³C. Voici une représentation du carbone C₁ qui est en fait le carbone central de la molécule.



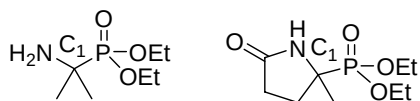
Composé	RMN 1H H imine	RMN 13C C imine	RMN 13C C ₁	RMN ³¹ P
39	8,23 d J=4,9 Hz	165,24 d J=16,39 Hz	57,55 d J=152,9 Hz	22,48
40	8,33 d J=4,8 Hz	164,44 d J=15,48 Hz	64,93 d J=157,74 Hz	22,92
41	8,39 d J=5 Hz	160,22 d J=12,91 Hz	64,06 d J=155,26 Hz	22,81
53	8,49 d J=4,65 Hz	160,98 d J=12,26 Hz	64,91 d J=150,14 Hz	25,62
58	8,49 d J=4,2 Hz	161,04 d J=12,55 Hz	64,82 d J=147,37 Hz	24,31
64	8,29 t J=4,27 Hz	165,92 t J=15,21 Hz	67,89 t J=148,22 Hz	15,90- 15,92
65	8,74 t J=3,7 Hz	164,35 t J=13,30 Hz	68,98 t J=150,14 Hz	17,38
68	8,76 t J=3,3 Hz	164,63 t J=12 Hz	68,02 t J=136,82 Hz	19,25

Tableau 23 : Déplacements caractéristiques des imines

Les déplacements chimiques des protons des imines alkylées **41**, **53**, **58**, **65** et **68** sont déblindés par rapport au déplacement chimique des imines de départ **39**, **40** et **64**. Le proton des imines sort sur le spectre sous forme d'un doublet dû au couplage de ce proton avec le phosphore et la constante de

couplage varie entre 3 et 5 Hz. Les déplacements chimiques des carbones des imines **41**, **53** et **58** sont blindés (autour de 160-161 ppm) par rapport aux imines de départ **39** et **40** (entre 164 et 166 ppm). La constante de couplage carbone-phosphore diminue aussi pour les imines **41**, **53** et **58** par rapport à celle des produits de départ passant de 16 Hz à 12 Hz. Les carbones des imines des dérivés bis-phosphoniques **64**, **65** et **68** sortent quant à eux aux alentours de 164-166 ppm. On assiste là encore à une diminution de la constante de couplage entre l'imine de départ **64** et les imines alkylées **65** et **70**. Les imines alkylées **40**, **41**, **53** et **58** ont des déplacements chimiques d'environ 64 ppm pour le carbone quaternaire C₁ alors que l'imine de départ **39** a un déplacement chimique blindé d'environ 58 ppm. Les constantes de couplage varient entre 147 et 158 Hz. Les déplacements chimiques en RMN ³¹P de **64**, **65** et **68** varient entre 15 et 20 ppm alors que les autres molécules ont des déplacements entre 22 et 26 ppm.

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage caractéristiques des amines et amides sont repris dans le tableau suivant. Voici une représentation du carbone C₁ qui est en fait le carbone quaternaire central de la molécule.



Composé	RMN ^{13}C C_1	RMN ^{31}P
47	53,18 d $J=158,32\text{ Hz}$	26,43
51	57,90 d $J=150,84\text{ Hz}$	25,34
54	53,74 d $J=158,62\text{ Hz}$	28,30
66	53,87 t $J=145,50\text{ Hz}$	21,61
55	57,84 d $J=164,69\text{ Hz}$	24,60
59	59,23 d $J=161,26\text{ Hz}$	26,20
69	58,75 t $J=152,5\text{ Hz}$	19,82-19,84

Tableau 24 : Déplacements chimiques caractéristiques

Les amines primaires **49**, **56** et **68** ont des déplacements chimiques autour de 53 ppm pour le carbone quaternaire C_1 alors que les dérivés amides **55**, **59** et **69** (lactames) ont des déplacements chimiques entre 57 et 60 ppm. Les constantes de couplage des amides **55** et **59** sont plus importantes que celles des amines **47**, **51** et **54** avec des valeurs entre 161 et 165 Hz pour les amides et entre 150 et 159 Hz pour les amines. Le carbone C_1 des molécules possédant deux groupements phosphonates **66** et **69** sort sur le spectre RMN ^{13}C sous la forme d'un triplet et les constantes de couplage sont plus faibles de l'ordre de 145 et 153 Hz par rapports aux autres molécules. Les déplacements chimiques en RMN ^{31}P de **66** et **69** sont entre

19 et 22 ppm alors que les autres molécules ont des déplacements entre 24 et 29 ppm.

V. Références

- [1] Seyferth D., Marmor R. S., Hilbert P., *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 10, 1379-1386.
- [2] Cullis P. M., Harger M. J. P., *J.Chem.Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 9, 1538-1543.
- [3] Xu L., Xia M., Cai J. C., *Chin. Chem. Lett.* **2002**, 13, 9, 818-819.
- [4] Ferrari M., Jommi G., Miglierini G., Pagliarin R., Sisti M., *Synth.Comm.* **1992**, 22, 1, 107-123.
- [5] Wu S.-H., Sun W.-Q., Zhang D.-W., Shu L.-H., Wu H.-M., Xu J.-F., Lao X.-F., *J. Chem.Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 10, 1733-1738.
- [6] Dehnel A., Lavielle G., *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1978**, 1-2, Pt. 2, 95-96.
- [7] Campbell M. M., Carruthers N. I., Mickel S. J., *Tetrahedron* **1982**, 38, 16, 2513-2524.
- [8] Chollet-Gravey A. M., Vo Quang L., Vo Quang Y., Le Goffic F., *Synth.Comm.* **1991**, 21, 18-19, 1847-1858.
- [9] Ferrari T., Vogel P., *Synlett* **1991**, 4, 233-234.
- [10] Hannour S., Roumestant M.-L., Viallefont P., Riche C., Martinez J., El Hallaoui A., Ouazzani F., *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 13, 2329-2332.
- [11] Cherenok S., Vovk A., Muravyova I., Shivanyuk A., Kukhar V., Lipkowski J., Kalchenko V., *Org. Lett.* **2006**, 8, 4, 549-552.
- [12] Kukhar V. P., *Russ. Chem. Rev.* **1987**, 56, 9, 859-874.
- [13] Syamala M., *Organic Preparations and Procedures International* **2005**, 37, 4, 409.
- [14] Cherkasov R. A., *Russ. Chem. Rev.* **1998**, 67, 10, 857-882.
- [15] Kukhar V. P., Hudson H. R., Editors, *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids: Chemistry and Biological Activity*. 2000; p 634 pp.
- [16] Heydari A., Karimian A., Ipaktschi J., *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 37, 6729-6732.
- [17] Manabe K., Kobayashi S., *Chem. Commun.* **2000**, 8, 669-670.
- [18] Ranu B. C., Hajra A., Jana U., *Org. Lett.* **1999**, 1, 8, 1141-1143.
- [19] Ranu B. C., Hajra A., *Green Chem.* **2002**, 4, 6, 551-554.
- [20] Matveeva E. D., Podrugina T. A., Tishkovskaya E. V., Tomilova L. G., Zefirov N. S., *Synlett* **2003**, 15, 2321-2324.

- [21] Mu X.-J., Lei M.-Y., Zou J.-P., Zhang W., *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 7, 1125-1127.
- [22] Kabachnik M. M., Zobnina E. V., Beletskaya I. P., *Synlett* **2005**, 9, 1393-1396.
- [23] Pudovik A. N., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1952**, 83, 865-868.
- [24] Chambers J. R., Isbell A. F., *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 4, 832-836.
- [25] Merrett J. H., Spurden W. C., Thomas W. A., Tong B. P., Whitcombe I. W. A., *J. Chem.Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 1, 61-67.
- [26] Guthrie J. P., *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 2, 236-239.
- [27] Smith A. B., III, Yager K. M., Taylor C. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 44, 10879-10888.
- [28] Yuan C., Li S., Wang G., Ma Y., *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1993**, 81, 1-4, 27-35.
- [29] Laschat S., Kunz H., *Synthesis* **1992**, 1-2, 90-95.
- [30] Haak E., Bytschkov I., Doye S., *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3, 457-463.
- [31] Afarinkia K., Rees C. W., Cadogan J. I. G., *Tetrahedron* **1990**, 46, 20, 7175-7196.
- [32] Prugh J. D., Deana A. A., *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1, 37-40.
- [33] Moonen K., Van Meenen E., Verwee A., Stevens C. V., *Angew.Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 45, 7407-7411.
- [34] Sturtz G., Guervenou J., *Synthesis* **1991**, 8, 661-662.
- [35] Oleksyszyn J., Gruszecka E., Kafarski P., Mastalerz P., *Monatsh. Chem.* **1982**, 113, 1, 59-71.
- [36] Kantoci D., Denike J. K., Wechter W. J., *Synth.Comm.* **1996**, 26, 10, 2037-2043.
- [37] Palacios F., Gil M. J., de Marigorta E. M., Rodriguez M., *Tetrahedron* **2000**, 56, 34, 6319-6330.
- [38] O'Donnell M. J., Wojciechowski K., Ghosez L., Navarro M., Sainte F., Antoine J. P., *Synthesis* **1984**, 4, 313-315.

CHAPITRE 5

ETUDE DE COMPLEXATION PAR

SPECTROMETRIE DE MASSE

I. Introduction

La spectrométrie de masse par électrospray est une technique suffisamment douce pour permettre l'étude des complexes non covalents. Un avantage de cette technique est qu'elle nécessite une quantité faible d'échantillons. La spectrométrie de masse permet de déterminer la stoechiométrie sur la base de la masse et de la forme de l'amas isotopique. Cette technique est une méthode d'ionisation douce et permet aux complexes d'être transférés de la solution en phase gazeuse[1].

En 2000, Blair et *al.* ont décrit la détection par microélectrospray de complexes L_2M entre une molécule éther-couronne et des cations alcalins (Li^+ , Na^+ et K^+)[2].

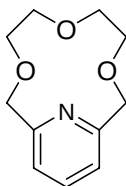


Schéma 189 : Molécule formant des complexes L_2M décrite par Blair

Wang *et al.* ont détecté des complexes de stoechiométrie LM_2 et LM_3 entre une molécule possédant plusieurs macrocycles et des métaux alcalins[3].

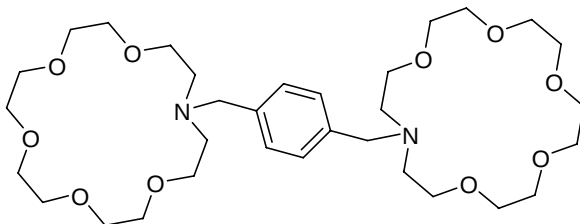


Schéma 190 : Molécule décrite par Wang

Williams *et al.* ont étudié la complexation de dérivés éthers-couronnes soufrés couplés à une structure cage par spectrométrie de masse. Le but était de déterminer la sélectivité de complexation de ces molécules vis-à-vis des ions plomb, cadmium et zinc. Les complexes formés sont de stoechiométrie LM et L_2M dans le cas du cadmium et du zinc et de stoechiométrie LM dans le cas du plomb[4].

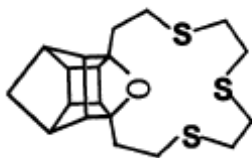


Schéma 191 : Macrocycle étudié par Williams

L'équipe de Jean-Louis Habib-Jiwan a utilisé la spectrométrie de masse pour avoir des information sur la stoechiométrie des complexes formés entre les molécules 3MN-crown et 6MN-dea et des cations métalliques[5].

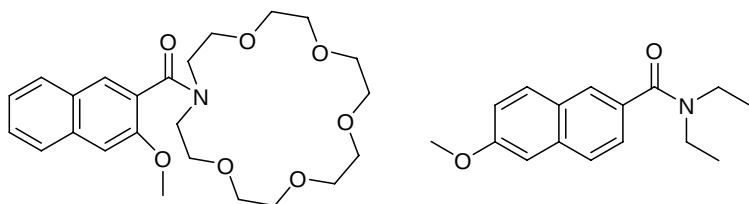


Schéma 192 : 3MN-crown et 6MN-dea

D'après les expériences de spectrométrie de masse, les complexes formés avec le magnésium ont une stoechiométrie 1 : 1 dans les deux cas. Le degré de solvation est par contre différent pour les deux molécules. En effet dans le cas de la première molécule, les complexes majoritaires sont $[\text{LMgCH}_3\text{CN}]^{2+}$ et $[\text{LMgClO}_4]^+$. Les espèces majoritaires dans le cas de la seconde molécule sont $[\text{LMg}(\text{CH}_3\text{CN})_4]^{2+}$ et $[\text{LMg}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{ClO}_4]^+$.

Des expériences de complexation ont été réalisées en collaboration le laboratoire de spectrométrie de masse de l'UCL afin de déterminer les propriétés complexantes des molécules synthétisées dans les chapitres précédents. Ne pouvant pas réaliser ces expériences sur toutes les molécules, nous avons choisi cinq molécules ayant des caractéristiques structurales communes. Les molécules choisies sont représentées ci-dessous.

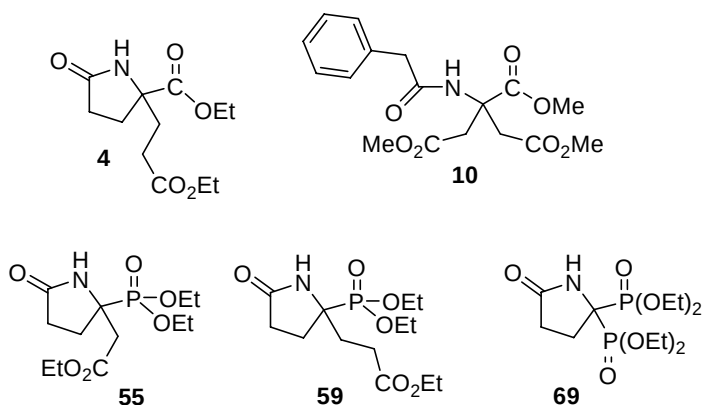


Schéma 193 : Molécules choisies pour l'étude par SM

Deux des molécules font partie de la famille des aminocitrates et les trois autres appartiennent aux aminophosphonates. Les ions utilisés dans l'étude de complexation sont le calcium et le zinc introduits sous forme de perchlorate. Le choix du calcium est guidé par le fait que des molécules complexant le calcium peuvent être potentiellement intéressantes dans le traitement des maladies des os, comme par exemple le pamidronate (cf introduction p71). Le zinc quant à lui est impliqué dans le mécanisme d'hydrolyse des β -lactames par les β -lactamases de la classe B. Nos molécules n'ont montré aucune activité inhibitrice des β -lactamases de cette classe. Est-ce dû au fait que celles-ci ne sont pas complexantes du zinc ? L'étude suivante devrait nous permettre de répondre à cette question.

II. Principe

A des solutions de ligands dans l'acétonitrile de concentration 10^{-4} mol/L, on ajoute des quantités de sels connues, sous forme solide, afin d'éviter les effets de dilution. Le choix de cette concentration en ligand devrait permettre la formation importante de complexes tout en évitant d'utiliser des quantités trop importantes de sels. En effet, lorsque la concentration en sel augmente, le signal du sel augmente et le signal des espèces complexées diminue car la source est à courant constant. Pour chaque ligand, quatre expériences sont réalisées à différentes concentrations correspondant à 0,5 équivalents de cations (solution 1), 1 équivalent de cations (solution 2), 2 équivalents (solution 3) et 5 équivalents de cations (solution 4). Après un temps de 20 minutes, les solutions sont injectées dans le spectromètre de masse et différents Source Collision-Induced Dissociation (SCID=0 eV, SCID=-20 eV, SCID=-40 eV) sont appliqués à la sortie de la source juste avant l'analyseur. Plus cette SCID est forte, plus les espèces vont se désolvater et les agrégats non spécifiques vont s'éliminer. Il faut toutefois éviter un SCID trop important afin de limiter la fragmentation des espèces.

Il y aura donc moins de pics sur le spectre de masse qui va dès lors se simplifier. Les 4 solutions ont été analysées aux trois tensions SCID=0, SCID=-20 eV et SCID=-40 eV. Les données telles que les intensités des différents pics ont ensuite été traitées dans le logiciel Excel. Les massifs dont l'intensité relative maximale est inférieure à 5% n'ont pas été pris en compte. Les pourcentages des différents complexes ont été calculés en sommant les intensités des différents pics d'un même complexe et en divisant cette somme par la somme des intensités de tous les pics. La somme des pourcentages d'une même colonne dans les tableaux (voir plus loin) n'est pas égale à 100% car les sels, fragments ou complexes inférieurs à 5% n'ont pas été repris dans les données. Les spectres de masse et les tableaux décrits par la suite ont été obtenus avec SCID=-20 eV sauf dans le cas de la molécule **69** (SCID=-40 eV). La première manipulation à effectuer est un test témoin c'est-à-dire injecter la molécule seule afin de pouvoir comparer son spectre de masse aux spectres de masse réalisées ensuite en présence de cations.

III.Etude du pouvoir complexant de molécules de la famille de l'aminocitrate

III.1.Etude de la molécule 4

III.1.1.Spectre de masse du ligand 4

Le spectre de masse de **4** réalisé dans l'acétonitrile est représenté à la figure 19. Le pic le plus intense est $[L+Na]^+$ à 279,7 m/z. Il y a encore deux pics de faible intensité $[L+H]^+$ et $[2L+Na]^+$ qui ont respectivement une masse de 257,7 m/z et de 536,7 m/z.

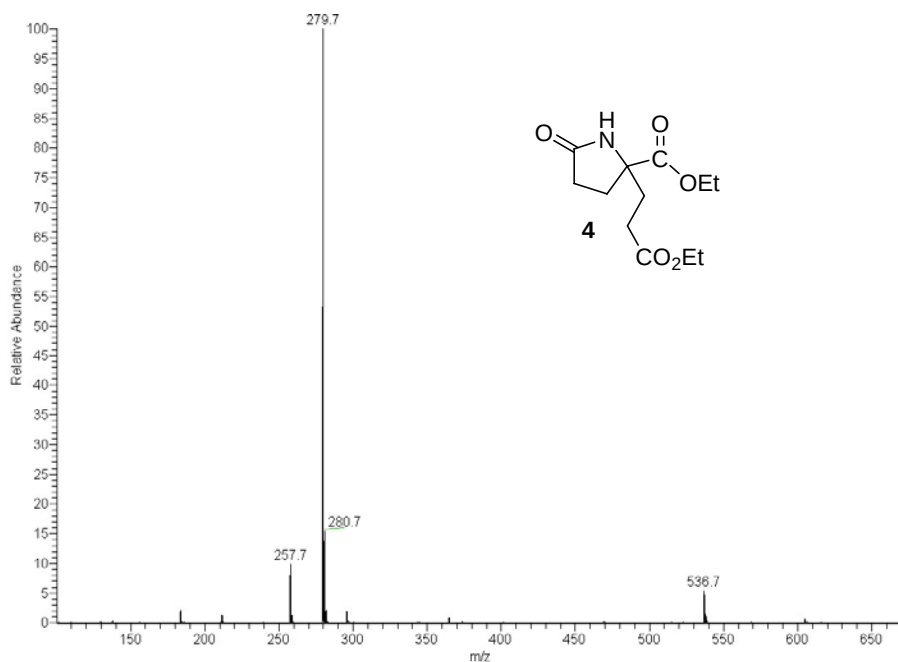


Figure 19 : Spectre de masse de **4** (SCID=-20 eV)

III.1.2.Complexes formés avec le calcium

Les spectres de masse des solutions 1 à 4 sont représentés à la figure 20.

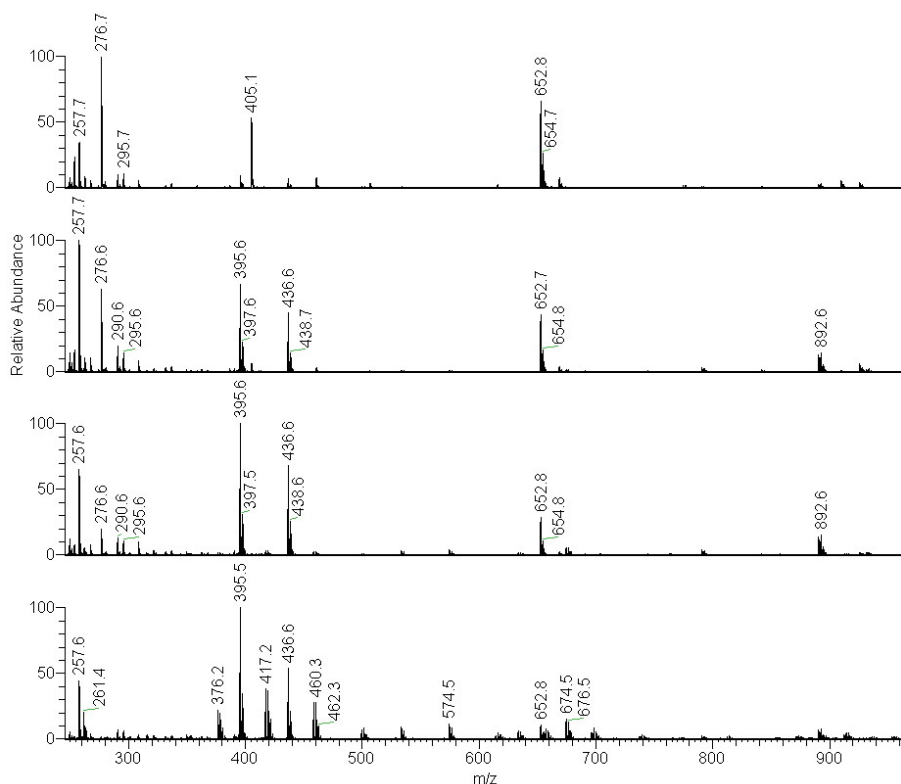


Figure 20 : Spectre de masse des solutions 1 à 4 (SCID=-20 eV)

Le dernier spectre de masse montré ci-dessus est celui de la solution 4 (ligand + 5 équivalents de sels). Sur ce spectre, il y a beaucoup de traces de sels de calcium à 376,2 m/z, à 417,2 m/z, à 460,3 m/z et à 654,5 m/z. Ces pics ont pu être attribués par comparaison avec le spectre de masse du sel de calcium seul en solution dans l'acétonitrile. Le tableau 25 reprend les différents complexes formés que l'on peut voir sur les spectres de la figure 2 selon la quantité de sels ajoutés, les masses des complexes et les pourcentages des espèces présentes. Les différences observées aux tensions autres que -20 eV seront mentionnées.

Espèces et Masses (m/z)	0,5 éq. de Ca^{2+}	1 éq. de Ca^{2+}	2 éq. de Ca^{2+}	5 éq. de Ca^{2+}
Sel de calcium	/	/	8%	55%
$[\text{L}+\text{H}]^+ 257,7$	7%	10%	6%	/
$[\text{L}_2\text{Ca}]^{2+} 276,7$	25%	8%	2%	/
$[\text{LCaClO}_4]^+ 395,6$	/	12%	14%	10%
$[\text{L}_3\text{Ca}]^{2+} 405,1$	17%	/	/	/
$[\text{LCaClO}_4\text{CH}_3\text{CN}]^+ 436,6$	/	8%	6%	6%
$[\text{L}_2\text{CaClO}_4]^+ 652,8$	31%	11%	10%	/
$[\text{L}_2\text{Ca}_2(\text{ClO}_4)_3]^+ 892,6$	/	5%	4%	/

Tableau 25 : Complexes formés avec **4** selon la concentration en ion calcium

Ce sont des complexes de structure générale L_2Ca (56%) et L_3Ca (17%) qui sont formés dans la solution 1. La quantité de L_2Ca diminue (19%) et le complexe $[\text{L}_3\text{Ca}]^{2+}$ disparaît dans la solution 2 au profit des complexes LCa qui apparaissent et représentent 20% des signaux. Un complexe de type L_2Ca_2 de formule $[\text{L}_2\text{Ca}_2(\text{ClO}_4)_3]^+$ fait son apparition dans le spectre de masse. Lorsque la quantité d'ions est augmentée (solution 3), la quantité des complexes LCa , et L_2Ca_2 reste la même tandis que celle de L_2Ca diminue un peu (12%). Les signaux provenant du sel dominent totalement le spectre (55%) de la solution 4. Les seuls complexes observés sont sous la forme LCa et représentent 16% des signaux. Les complexes L_2Ca sont mono et dichargés : $[\text{L}_2\text{CaClO}_4]^+$ et $[\text{L}_2\text{Ca}]^{2+}$. A $\text{SCID}=0$, les proportions des différents complexes sont les mêmes qu'à $\text{SCID}=-20$ eV à part pour le complexe $[\text{L}_2\text{Ca}_2(\text{ClO}_4)_3]^+$ qui n'apparaît pas sur le spectre de masse. A

SCID=0, les complexes L_2Ca et L_3Ca sont solvatés par une ou deux molécules d'acétonitrile : $[L_2CaCH_3CN]^{2+}$, $[L_2Ca(CH_3CN)_2]^{2+}$, $[L_3CaCH_3CN]^{2+}$. A SCID=-20 eV, les complexes LCa sont sous la forme $[LCaClO_4]^+$ et $[LCaClO_4CH_3CN]^+$ tandis qu'à SCID=0, ils sont sous la forme $[LCaClO_4CH_3CN]^+$ et $[LCaClO_4(CH_3CN)_2]^+$. A SCID=-40eV, les complexes ne comportent plus de molécules d'acétonitrile. Les complexes observés sont les suivants : $[L_2Ca]^{2+}$, $[L_2CaClO_4]^+$, $[LCaClO_4]^+$, $[L_2Ca_2(ClO_4)_3]^+$. La quantité des complexes L_2Ca diminue un peu au profit des complexes $[LCaClO_4]^+$ et $[L_2Ca_2(ClO_4)_3]^+$ par rapport à SCID=-20 eV.

III.1.3.Complexes formés avec le zinc

Le tableau 26 reprend les différents complexes formés selon les équivalents de sels ajoutés, les masses des complexes et les pourcentages des différentes espèces présentes.

Espèces et Masse (m/z)	0,5 éq. de Zn^{2+}	1 éq. de Zn^{2+}	2 éq. de Zn^{2+}	5 éq de Zn^{2+}
Sel de zinc	/	/	21%	51%
$[L+H]^+$ 257, 5	19%	16%	13%	6%
$[LZnClO_4]^+$ 419,4	/	11%	20%	17%
$[L_2ZnClO_4]^+ - 2x CO_2Et$ 530,8	14%	9%	5%	/
$[L_2ZnClO_4]^+ - HClO_4$ 576,8	19%	14%	7%	/
$[L_2ZnClO_4]^+$ 676,7	10%	7%	/	/
$[L_3ZnClO_4]^+$ 934,0	12%	13%	6%	/

Tableau 26 : Complexes formés avec **4** selon la concentration en ion zinc

Les spectres de masse des 4 solutions sont représentés à la figure 21.

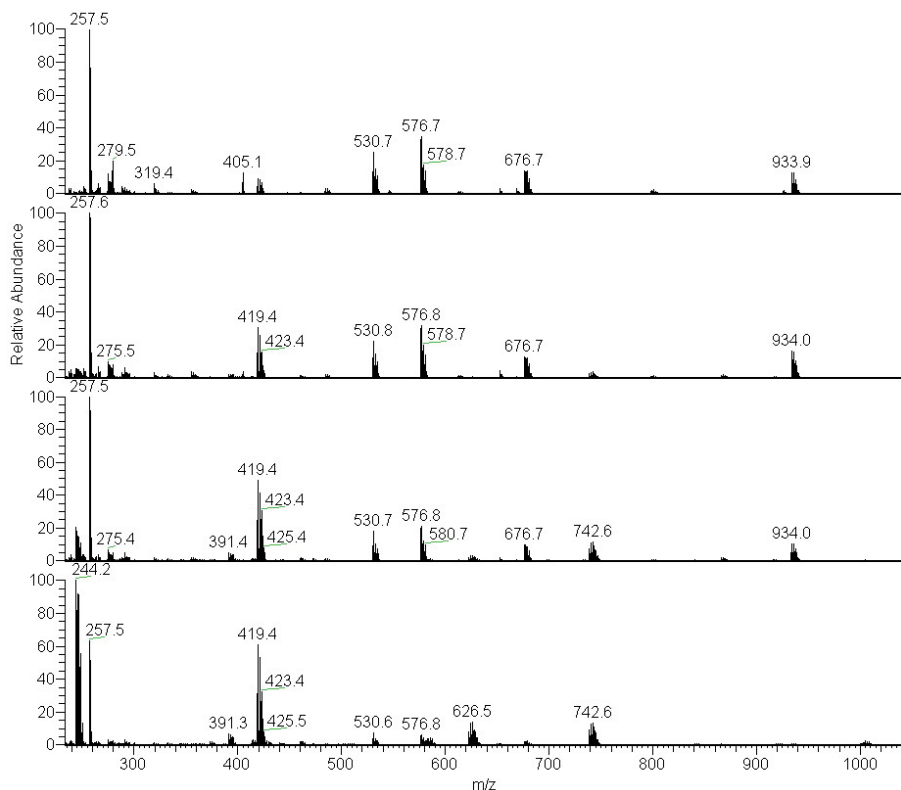
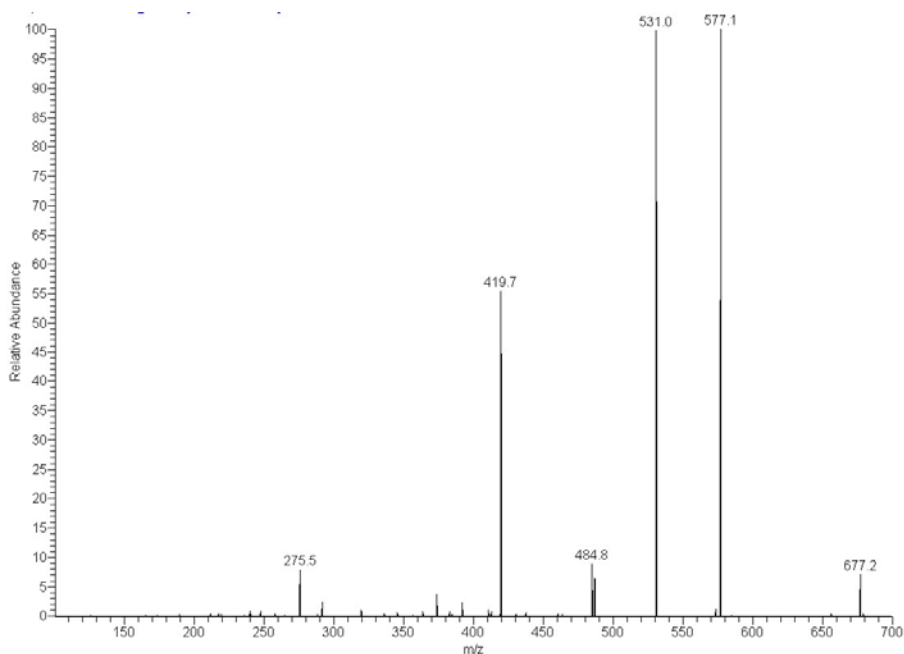
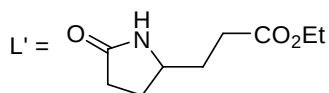


Figure 21 : Spectre de masse des solutions 1 à 4 (SCID=-20 eV)

Dans la solution 1, un pic appartenant au ligand représente 19% des signaux. Les complexes de forme L_2Zn représentent 43% des pics : $[L_2ZnClO_4]^+$, et deux autres complexes. Des expériences de fragmentation nous ont permis d'identifier les deux derniers complexes. Le spectre d'une expérience de fragmentation est repris à la figure 22.

Figure 22 : Expérience de fragmentation de $[L_2ZnClO_4]^+$

Le premier complexe est un complexe fille de $[L_2ZnClO_4]^+$ qui a une masse de 676,51. Il y a une perte de masse de 100 entre les deux complexes. Si la molécule perdait juste un ion perchlorate, la charge du complexe changerait mais l'amas isotopique du complexe montre que l'ion est toujours monochargé. Ceci peut s'expliquer par la perte d'une molécule d'acide perchlorique. Ce complexe est donc de la forme $[L_2ZnClO_4]^+ - HClO_4$. Le second complexe est aussi une fille de $[L_2ZnClO_4]^+$ d'après les expériences de fragmentations. D'après sa masse, il correspond au complexe $[L_2ZnClO_4]^+$ qui a perdu deux fonctions esters éthyliques. On peut aussi l'appeler $[L'_2ZnClO_4]^+$ où L' est la molécule initiale décarboxylée (schéma 194).

Schéma 194 : Fragment complexant de **4**

Le fait que la molécule **4** perde une fonction ester sans perdre sa capacité à complexer laisse à penser que cette fonction ne joue pas de rôle clef dans la complexation. Un autre complexe est aussi détecté : L_3Zn qui représente 12% des signaux. Dans la solution 2, la quantité des complexes L_2Zn diminue et ne représente plus que 30% des pics au profit d'un complexe LZn qui représente 11%. Il y a toujours le complexe $[L_3ZnClO_4]^+$ qui représente 13% des signaux. La quantité de complexe L_2Zn diminue (12%) encore dans la solution 3 au profit du complexe $[LZnClO_4]^+$ qui représente 20% des signaux. La quantité du complexe $[L_3ZnClO_4]^+$ diminue elle aussi (6%). Le seul complexe encore présent dans la solution 4 est $[LZnClO_4]^+$ et représente 17% des signaux. Lorsque $SCID=0$, dans la solution 1, 54% des pics appartiennent au ligand. Un seul complexe $[L_2ZnClO_4]^+ - HClO_4$ est détecté et représente 14%. Lorsque la concentration en cation est augmentée, la quantité de L_2Zn diminue et celle de LZn augmente mais il y a toujours beaucoup de pics qui appartiennent au ligand. Lorsque $SCID=-40$ eV, la quantité de complexe L_2Zn diminue au profit de LZn . Cette tendance s'accroît lorsque la concentration en cation augmente. Un autre complexe a fait son apparition à 738,47 m/z mais son attribution n'est pas évidente. Une possibilité est $[L_2Zn_2(ClO_4)_3]^+ - 2HClO_4$. En effet, nous avons déjà observé une perte d'acide perchlorique avec le complexe $[L_2ZnClO_4]^+$. La formation de ce complexe peut aussi s'expliquer par sa fragmentation. La quantité de ce complexe augmente dans la solution 3.

III.2. Etude de la molécule **10**

III.2.1. Spectre de masse du ligand **10**

Le spectre de masse de **10** réalisé dans l'acétonitrile est représenté à la figure 23. Le pic le plus intense est $[L+Na]^+$ à 373,9 m/z. Il y a encore trois pics de faible intensité à 242,0 m/z, à 351,8 m/z. et à 431,7 m/z. Le premier est un fragment de la molécule. Les deux autres peuvent être attribués respectivement à $[L+H]^+$ et $[L+K+CH_3CN]^+$.

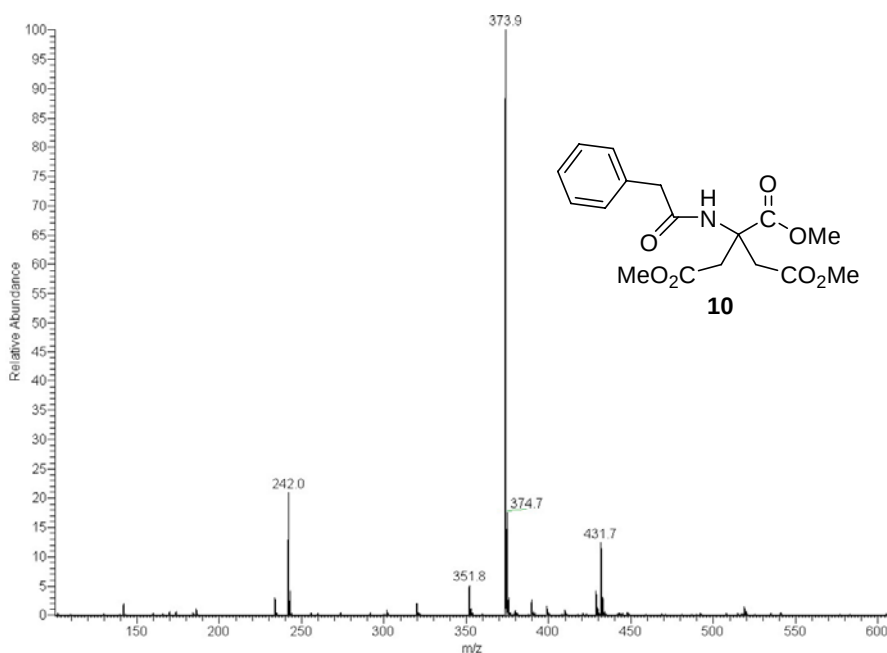


Figure 23 : Spectre de masse de **10** (SCID=-20 eV)

III.2.2. Complexes formés avec le calcium

Le tableau 27 reprend les différents complexes formés selon la quantité de sels ajoutés, les masses des complexes et les pourcentages des différentes espèces présentes sur les spectres de masses (spectres non montrés).

Espèces et Masses (m/z)	0,5 éq. de Ca^{2+}	1 éq. de Ca^{2+}	2 éq. de Ca^{2+}	5 éq. de Ca^{2+}
Sel de calcium	/	/	/	40%
$[\text{L}_2\text{Ca}]^{2+}$ 370,7	55%	16%	6%	
$[\text{LCaClO}_4]^+$ 489,7	11%	26%	35%	40%
$[\text{L}_2\text{CaClO}_4]^+$ 840,6	28%	17%	10%	/
$[\text{L}_2\text{Ca}_2(\text{ClO}_4)_3]^+$ 1080,5	/	14%	18%	/

Tableau 27 : Complexes formés avec **10** selon la concentration en ion calcium

Dans la solution 1, les complexes L_2Ca représentent 83% des signaux. Le complexe $[\text{LCaClO}_4]^+$ est détecté et représente 11% des signaux. Dans la solution 2, la quantité des complexes L_2Ca diminue et ne représente plus que 33% au profit du complexe $[\text{LCaClO}_4]^+$ dont la quantité augmente (26%) et d'un complexe $[\text{L}_2\text{Ca}_2(\text{ClO}_4)_3]^+$ (14%). Cette dernière tendance se confirme dans la solution 3. Les complexes L_2Ca représentent 16% des signaux alors que les complexes $[\text{LCaClO}_4]^+$ et $[\text{L}_2\text{Ca}_2(\text{ClO}_4)_3]^+$ représentent respectivement 35% et 18% des signaux. La quantité du complexe $[\text{LCaClO}_4]^+$ augmente encore pour atteindre 40%. Lorsque $\text{SCID}=0$, les complexes LCa , L_2Ca et L_2Ca_2 sont aussi présents mais en quantités moins importantes. Le complexe LCa comporte une molécule d'acétonitrile : $[\text{LCaClO}_4\text{CH}_3\text{CN}]^+$. Lorsque $\text{SCID}=-40$ eV, la quantité de complexes L_2Ca (52%) diminue au profit du complexe $[\text{LCaClO}_4]^+$ (28%). Cette tendance s'accroît lorsque la concentration en cation augmente. La quantité de $[\text{LCaClO}_4]^+$ représente 50% des signaux dans la solution 2 et 65% des

signaux dans la solution 4. Le complexe $[\text{L}_2\text{Ca}_2(\text{ClO}_4)_3]^+$ est aussi présent en quantité plus importante à $\text{SCID}=-40$ eV.

III.2.3.Complexes formés avec le zinc

Le tableau 28 reprend les différents complexes formés selon la quantité de sels ajoutés à $\text{SCID}=-20$ eV, les masses des complexes et les pourcentages des différentes espèces présentes sur les spectres de masse (spectres non montrés).

Espèces et Masses (m/z)	0,5 éq. de Zn^{2+}	1 éq. de Zn^{2+}	2 éq. de Zn^{2+}	5 éq de Zn^{2+}
Sel de zinc	/	/	/	43%
$[\text{L}+\text{H}]^+$ 351,7	9%	8%	10%	/
$[\text{L}+\text{Na}]^+$ 373,6	15%	9%	/	/
$[\text{L}_2\text{Zn}]^{2+}$ 382,5	10%	8%	/	/
$[\text{LZnClO}_4]^+$ 513,6	20%	23%	37%	31%
$[\text{L}_2\text{ZnClO}_4]^+$ 866,8	17%	21%	19%	4%

Tableau 28 : Complexes formés avec **10** selon la concentration en ion zinc

Dans la solution 1, 24% des signaux appartiennent au ligand. Les complexes mono et dichargés L_2Zn représentent 27% des signaux. Le complexe LZn représente 20% des signaux. La quantité de ligand restant dans la solution 2 diminue et passe à 17%. La quantité des complexes L_2Zn et LZn augmente un tout petit peu. La quantité de complexe L_2Zn diminue (19%) dans la solution 3. La quantité du complexe $[\text{LZnClO}_4]^+$ augmente pour atteindre 37%. Le complexe $[\text{LZnClO}_4]^+$ représente 31% des signaux

et une trace du complexe $[L_2ZnClO_4]^+$ est aussi présente (4%). Lorsque SCID=0, les quantités des différents complexes sont un peu plus faibles. Mais la tendance est la même c'est-à-dire que les complexes L_2Zn diminuent au profit des complexes LZn quand la concentration en cation augmente. Le complexe LZn comporte une molécule d'acétonitrile : $[LZnClO_4CH_3CN]^+$ lorsque SCID=0 alors que le complexe correspondant a perdu sa molécule d'acétonitrile lorsque SCID=-20 eV : $[LZnClO_4]^+$. Lorsque SCID=-40 eV, le complexe majoritaire est $[LZnClO_4]^+$ qui représente 46% des signaux. Une trace du complexe L_2Zn est présente (6%). Lorsque la concentration en sel augmente, les quantités de complexes LZn et L_2Zn restent similaires. Un nouveau complexe apparaît sur le spectre de masse et représentent 13% des signaux. Une possibilité d'attribution de ce complexe est $[LZnClO_4]^+ - HClO_4$. La perte d'acide perchlorique a déjà été observée plusieurs fois avec le ligand

III.3.Etude de la molécule **55**

III.3.1.Spectre de masse de **55**

Le spectre de masse de **55** réalisé dans l'acétonitrile est représenté à la figure 24. Le pic le plus intense est $[L+Na]^+$ à 329,7 m/z. Il y a encore quatre pics de plus faibles intensités $L-P(O)(OEt)_2$, $[L+H]^+$, $[L+K]^+$ et $[2L+Na]^+$ qui ont respectivement une masse de 169,7, 307,7 et de 636,8 m/z.

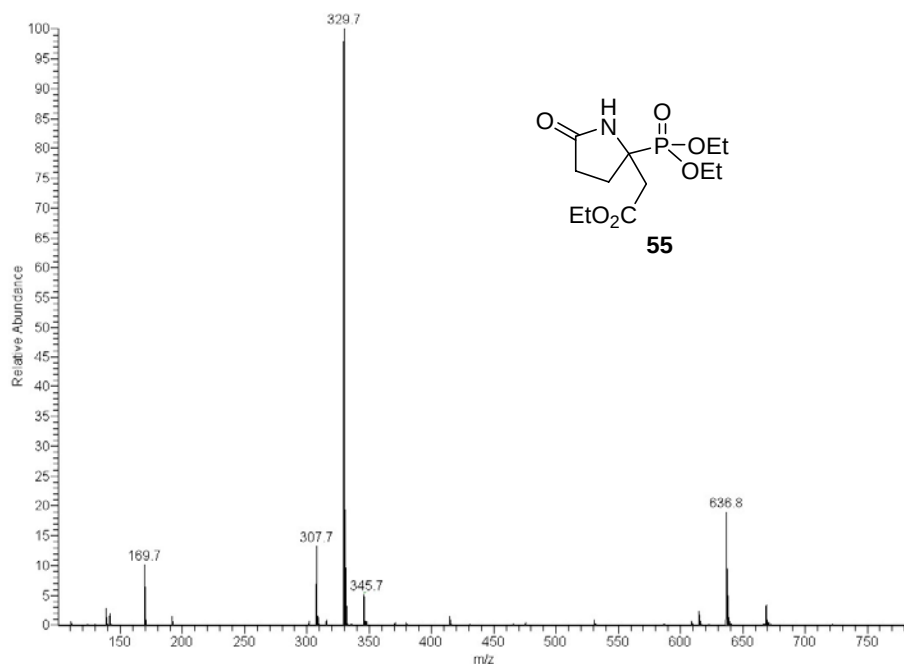


Figure 24 : Spectre de masse de 55 (SCID=-20 eV)

III.3.2.Complexes formés avec le calcium

Le tableau 29 reprend les différents complexes formés selon la quantité de sels ajoutés à SCID=-20eV, les masses des complexes et les pourcentages des différentes espèces présentes sur les spectres de masse (spectres non montrés).

Les complexes L_2Ca représentent 85% des signaux. Ils sont donc majoritaires dès 0,5 équivalents de calcium. Un complexe dichargé $[L_3Ca]^{2+}$ est aussi détecté et représente 6% des signaux. Dans la solution 2, les complexes L_2Ca ne représentent plus que 40% des signaux. Des complexes LCa sont maintenant détectés et représentent 23% des signaux. Les complexes $[L_2Ca_2(ClO_4)_3]^+$ et $[L_3Ca_2(ClO_4)_3]^+$ sont détectés et représentent respectivement 8% et 7% des signaux.

Espèces et Masses (m/z)	0,5 éq. de Ca^{2+}	1 éq. de Ca^{2+}	2 éq. de Ca^{2+}	5 éq de Ca^{2+}
Sel de calcium	/	/	/	41%
$[\text{L}_2\text{Ca} - \text{P}(\text{O})(\text{OEt})_2]^{2+}$ 257,6	9%	7%	/	/
$[\text{L}_2\text{Ca}]^{2+}$ 326,7	35%	11%	/	/
$[\text{L}_3\text{Ca}]^{2+}$ 480,2	6%	/	/	/
$[\text{LCaClO}_4]^+$ 445,6	/	14%	28%	24%
$[\text{LCaClO}_4\text{CH}_3\text{CN}]^+$ 486,6	/	9%	19%	17%
$[\text{L}_2\text{CaClO}_4]^+$ 752,7	41%	22%	9%	/
$[\text{L}_2\text{Ca}_2(\text{ClO}_4)_3]^+$ 990,6	/	8%	11%	/
$[\text{L}_3\text{Ca}_2(\text{ClO}_4)_3]^+$ 1300,0	/	7%	/	/

Tableau 29 : Complexes formés avec 55 selon la concentration en ion calcium

Dans la solution 3, la quantité de $[\text{L}_2\text{CaClO}_4]^+$ diminue jusqu'à ne plus représenter que 9% des signaux. La quantité de complexe LCa augmente et représente 47% des signaux. La quantité du complexe L_2Ca_2 reste similaire. Les complexes LCa observés représentent 41% des signaux dans la solution 4. Lorsque SCID=0, les quantités des complexes LCa et L_2Ca sont plus faibles. Lorsque la concentration en cation augmente, la quantité de complexe L_2Ca diminue et celle de complexe LCa augmente. Les complexes L_2Ca_2 et L_3Ca ne sont pas détectés à cette tension. Lorsque SCID=-40 eV, la quantité de complexes L_2Ca diminue dès le départ au profit du complexe $[\text{LCaClO}_4]^+$ qui est déjà présent à 0,5 équivalents de calcium (solution 1). Cette tendance s'accroît lorsque la concentration en

cation augmente. Les complexes $[L_2Ca_2(ClO_4)_3]^+$ et $[L_3Ca_2(ClO_4)_3]^+$ sont toujours présents. Les complexes LCa observés à SCID=-20eV sont les suivants: $[LCaClO_4]^+$ et $[LCaClO_4CH_3CN]^+$. Lorsque SCID=0, les complexes LCa contiennent une ou deux molécules d'acétonitrile: $[LCaClO_4CH_3CN]^+$ et $[LCaClO_4(CH_3CN)_2]^+$. Les complexes LCa ne contiennent plus de molécule d'acétonitrile lorsque SCID=-40eV.

III.3.3.Complexes formés avec le zinc

Le tableau 30 reprend les différents complexes formés selon la quantité de zinc ajoutés à SCID=-20eV, les masses des complexes et les pourcentages des différentes espèces présentes sur les spectres de masse.

Espèces et Masses (m/z)	0,5 éq. de Zn^{2+}	1 éq. de Zn^{2+}	2 éq. de Zn^{2+}	5 éq de Zn^{2+}
Sel de zinc			10%	43%
L-P(O)(OEt) ₂ 169,5	7%	19%		
$[L+Na]^+$ 329, 7	55%	11%	/	/
$[LZnClO_4]^+$ 469,6	/	7%	14%	25%
$[L_2ZnClO_4]^+$ - HClO ₄ -P(O)(OEt) ₂ 538,7	/	9%	5%	/
$[L_2ZnClO_4]^+$ - HClO ₄ 676,8	30%	30%	13%	9%
776,8 $[L_2ZnClO_4]^+$	/	7%	/	/
$[L_2Zn_2(ClO_4)_3]^+$ - 2 HClO ₄ 840,7	/	/	25%	10%

Tableau 30 : Complexes formés avec 55 selon la concentration en ion zinc

Dans la solution 1, 62% des signaux appartiennent au ligand. Un seul complexe L_2Zn , $[L_2ZnClO_4]^+ - HClO_4$, est détecté et représente 30% des signaux. La perte d'acide perchlorique a déjà été observée avec les dérivés aminocitrate. La quantité et le nombre de complexes L_2Zn augmentent et représentent 46% des signaux dans la solution 2. Les complexes L_2Zn observés sont les suivants : $[L_2ZnClO_4]^+$, $[L_2ZnClO_4]^+ - HClO_4$ et $[L_2ZnClO_4]^+ - HClO_4 - P(O)(OEt)_2$. La perte d'un groupement phosphonate est courante avec les dérivés aminophosphonates en spectrométrie de masse. Ceci s'est aussi produit sur le ligand (13%). Dans la solution 2, il y a 30% des signaux qui appartiennent au ligand. Le complexe $[LZnClO_4]^+$ est détecté et représente 7% des signaux. La quantité de complexes L_2Zn diminue (18%) et la quantité de complexes LZn augmente (14%) dans la solution 3. Le complexe $L_2Zn_2(ClO_4)_3]^+ - 2 HClO_4$ est apparu et représente 25% des signaux. Il y a beaucoup de sels dans la solution 4 (43%). La quantité de complexe L_2Zn diminue encore (9%) et la quantité de LZn augmente (25%). La quantité du complexe L_2Zn_2 diminue et représente 10% des signaux. Lorsque $SCID=0$, la quantité des complexes L_2Zn est plus faible. Les complexes LZn et L_2Zn_2 n'apparaissent que dans la solution 3. Lorsque la concentration en cations augmente jusqu'à 2 équivalents de calcium, la quantité de complexe L_2Zn diminue et celle de complexe LZn augmente. Lorsque $SCID=-40eV$, la quantité de complexes L_2Zn est plus importante (45%) et celle de ligand non complexé est un peu plus faible (45%). Lorsque la concentration en cation augmente, la quantité de complexe L_2Zn diminue et celle de complexes LZn et L_2Zn_2 augmente. La quantité de ligand non complexé diminue aussi fortement.

III.4. Etude de la molécule **59**

III.4.1. Spectre de masse du ligand **59**

Le spectre de masse de **59** réalisé dans l'acétonitrile est représenté à la figure 25. Le pic le plus intense est $[L+Na]^+$ à 343,8 m/z. Il y a encore deux pics de faible intensité $[L+K]^+$ et $[2L+Na]^+$ qui ont respectivement une masse de 359,8 et de 665,0 m/z.

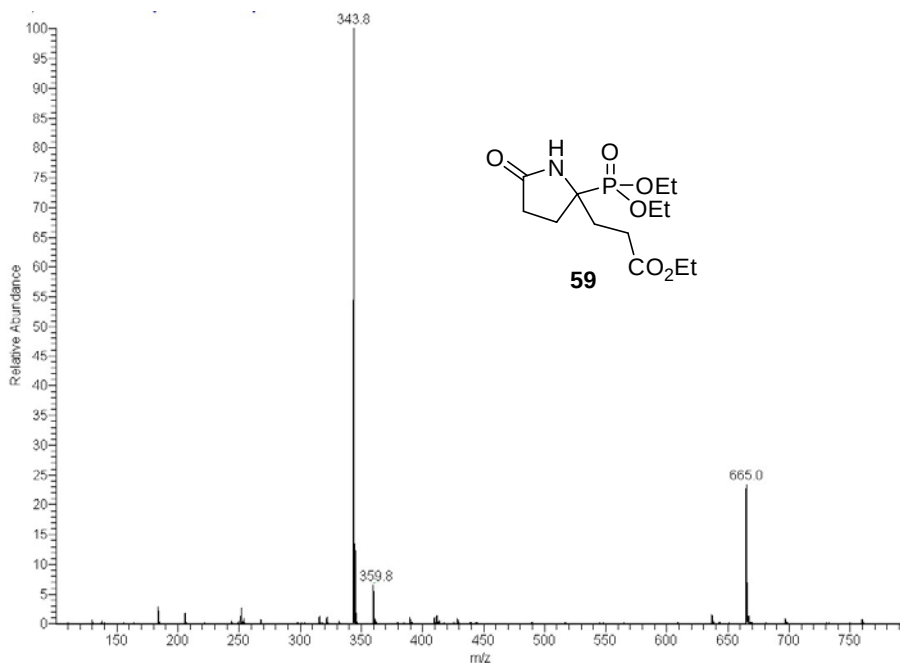


Figure 25 : Spectre de masse de **59** (SCID=-20eV)

III.4.2. Complexes formés avec le calcium

Le tableau 31 reprend les différents complexes formés selon la quantité de sels de calcium ajoutés à SCID=-20eV, les masses des complexes et les pourcentages des différentes espèces présentes sur les spectres de masse (spectres non montrés).

Espèces et Masses (m/z)	0,5 éq. de Ca^{2+}	1 éq. de Ca^{2+}	2 éq. de Ca^{2+}	5 éq de Ca^{2+}
Sel de calcium	/	/	23%	42%
L-P(O)(OEt) ₂ 183,7	5%	4%	/	/
$[\text{L}_2\text{Ca}]^{2+}$ 340,5	8%	/	/	/
$[\text{LCaClO}_4]^+ - \text{P(O)(OEt)}_2$ 321,6	/	8%	12%	12%
$[\text{LCaClO}_4\text{CH}_3\text{CN}]^+ - \text{P(O)(OEt)}_2$ 362,7	/	8%	7%	5%
$[\text{LCaClO}_4]^+$ 459,7	4%	13%	18%	18%
$[\text{LCaClO}_4\text{CH}_3\text{CN}]^+$ 500,7	/	9%	12%	10%
$[\text{L}_3\text{Ca}]^{2+}$ et $[\text{LCaClO}_4\text{CH}_3\text{CN}]^+$ 501,3	6%	/	/	/
$[\text{L}_2\text{CaClO}_4]^+$ 780,8	35%	16%	7%	/
$[\text{L}_2\text{Ca}_2(\text{ClO}_4)_3]^+$ 1018,6	/	6%	7%	/

Tableau 31 : Complexes formés avec **59** selon la concentration en ion calcium

Les complexes formés dans la solution 1 sont majoritairement sous la forme L_2Ca (43%). Les pics des complexes $[\text{L}_3\text{Ca}]^{2+}$ et $[\text{LCaClO}_4\text{CH}_3\text{CN}]^+$ sont entremêlés et représentent 6% des signaux. La quantité de complexe L_2Ca diminue dans la solution 2 et ne représente plus que 16%. Les complexes majoritaires sont maintenant sous la forme LCa (38%). Le groupement phosphonate ne semble pas indispensable à la complexation car la moitié des complexes LCa formés ont perdu le groupement

phosphonate sans perdre leur capacité à complexer. Ces complexes peuvent aussi être nommés $[L'CaClO_4CH_3CN]^+$ et $[L'CaClO_4(CH_3CN)_2]^+$ où L' est la molécule **59** déphosphorylée (schéma 195), soit le même fragment complexant que dans le cas de la molécule **4** (schéma 194).

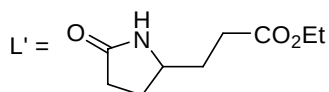


Schéma 195 : Fragment complexant de **59**

Le complexe $[L_2Ca_2(ClO_4)_3]^+$ est présent en petite quantité (6%). Dans la solution 3, une accumulation de sels commence à apparaître sur le spectre de masse. La quantité de complexe L_2Ca (7%) diminue encore au profit des complexes LCa qui représentent maintenant 49% des signaux. Le complexe $[L_2Ca_2(ClO_4)_3]^+$ est toujours présent en quantité comparable. Les signaux du sel sont trop importants dans la solution 4 (42%). Les seuls complexes formés sont sous la forme LCa avec un pourcentage de 45%. Lorsque $SCID=0$, les quantités des complexes LCa et L_2Ca sont plus faibles. Lorsque la concentration en cation augmente, la quantité de complexe L_2Ca diminue et celle de complexe LCa augmente. Les complexes LCa sont les suivants : $[LCaClO_4CH_3CN]^+$, $[LCaClO_4(CH_3CN)_2]^+$, $[L'CaClO_4CH_3CN]^+$ et $[L'CaClO_4(CH_3CN)_2]^+$. Aucun complexe L_2Ca_2 n'est détecté à cette tension. Lorsque $SCID=-40\text{eV}$, les quantités des complexes LCa et L_2Ca sont plus importantes à 0,5 équivalents de calcium. Lorsque la concentration en cation augmente, la quantité de complexe L_2Ca diminue et celle de complexe LCa augmente. Le complexe $[L_2Ca_2(ClO_4)_3]^+$ est toujours présent.

III.4.3. Complexes formés avec le zinc

Le tableau 32 reprend les différents complexes formés selon la quantité de sels de zinc ajoutés à $SCID=-20\text{eV}$, les masses des complexes et les

pourcentages des différentes espèces présentes sur les spectres de masse (spectres non montrés).

Espèces et Masses (m/z)	0,5 éq. de Zn^{2+}	1 éq. de Zn^{2+}	2 éq. de Zn^{2+}	5 éq de Zn^{2+}
Sel de zinc	/	/	28%	35%
L-P(O)(OEt)_2 183,7	11%	22%	10%	/
$[\text{L}+\text{Na}]^+$ 343,7	68%	5%	/	/
$[\text{LZnClO}_4]^+$ 483,7		6%	15%	13%
649,5 [?] ⁺	/	/	/	12%
$[\text{L}_2\text{ZnClO}_4]^+ - \text{HClO}_4$ 704,8	21%	26%	8%	/
$[\text{L}_2\text{ZnClO}_4]^+$ 804,8	/	17%	5%	/
$[\text{L}_2\text{Zn}_2(\text{ClO}_4)_3]^+ - 2 \text{HClO}_4$ 870,7	/	/	10%	7%

Tableau 32 : Complexes formés avec **59** selon la concentration en ion zinc

Environ 79% des signaux appartiennent au ligand et 21% au complexe L_2Zn , $[\text{L}_2\text{ZnClO}_4]^+ - \text{HClO}_4$, dans la solution 1. La perte d'acide perchlorique a déjà été observée avec la molécule **55**. Dans la solution 2, 27% des signaux appartiennent au ligand et davantage de complexes se sont formés : 43% de L_2Zn et 6% de LZn . La quantité de complexes L_2Zn diminue dans la solution 3 (13%) et celle de LZn augmente (15%). Le complexe $[\text{L}_2\text{Zn}_2(\text{ClO}_4)_3]^+ - 2 \text{HClO}_4$ est aussi formé et représente 10% des

signaux. Dans la solution 4, il y a beaucoup de sel (35%). Les complexes observés sont sous la forme LZn , L_2Zn_2 et un complexe monochargé n'a pu être identifié. Lorsque $SCID=0$, les seuls complexes observés sont L_2Zn . Dès que la concentration atteint 2×10^{-4} mol/L (solution 3), les complexes n'apparaissent plus sur le spectre ; ils sont noyés dans les signaux du sel de zinc et du ligand qui n'est pas complexé. Lorsque $SCID=-40$ eV, la quantité de complexes L_2Zn est plus importante (26%) et celle de ligand non complexé est un peu plus faible (62%). Lorsque la concentration en cation augmente, la quantité de complexe L_2Zn augmente puis diminue et celle du complexe $[LZnClO_4]^+$ augmente. La quantité de ligand non complexé diminue aussi fortement. Un complexe L_2Zn_2 apparaît à plus forte concentration à partir de la solution 3.

III.5. Etude de la molécule **69**

III.5.1. Spectre de masse de **69**

Le spectre de masse de **69** réalisé dans l'acétonitrile à $SCID=-40$ eV est représenté à la figure 26. Le pic le plus intense est $[L+Na]^+$ à 379,73 m/z. Il y a encore quatre pics de faible intensité à 219,7, 357,8, 395,7 m/z et à 736,9 qui peuvent être attribués respectivement à un fragment de la molécule, à $[L+H]^+$, à $[L+K]^+$ et $[2L+Na]^+$.

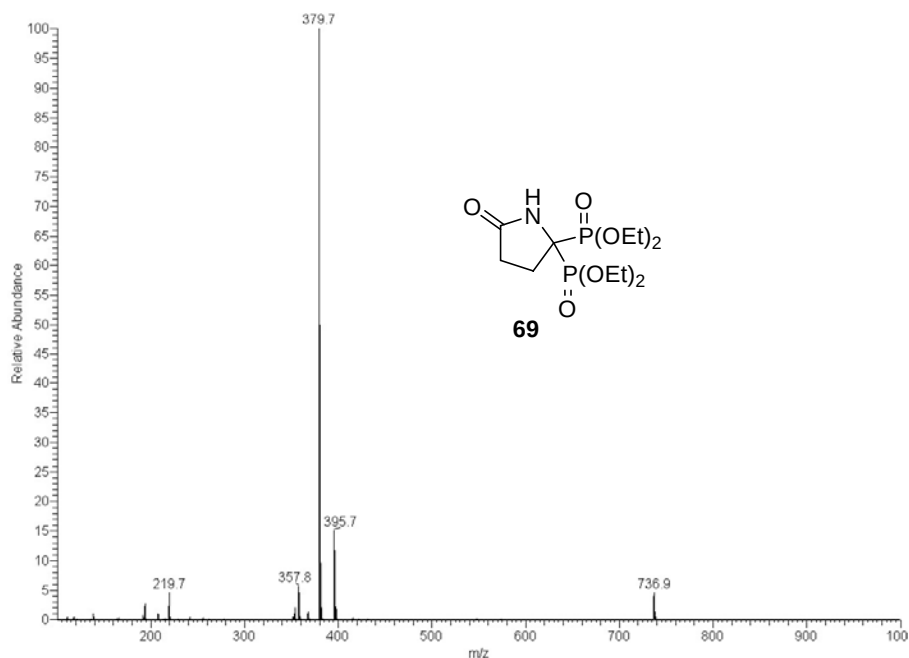


Figure 26 : Spectre de masse de **69**

III.5.2.Complexes formés avec le calcium

Lorsque la solution 1 (0,5 équivalents de $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ + solution de ligand) est injectée, aucun complexe n'est détectée. Les seuls pics présents appartiennent au ligand. Le tableau 33 reprend les différents complexes formés selon les équivalents de sels ajoutés à $\text{SCID}=-40\text{eV}$, les masses des complexes et les pourcentages des différentes espèces présentes sur les spectres de masse (spectres non montrés).

Espèces et Masse (m/z)	1 éq. de Ca ²⁺	2 éq. de Ca ²⁺	5 éq. de Ca ²⁺
[L ₂ Ca] ²⁺ 376,4	9%	/	/
[LCaClO ₄] ⁺ 495,2	6%	49%	65%
[L ₂ CaClO ₄] ⁺ 852,2	73%	30%	/
[L ₂ Ca ₂ (ClO ₄) ₃] ⁺ 1090,4	/	10%	/

Tableau 33 : Complexes formés avec **69** selon la concentration en ion calcium

Dans la solution 2, les complexes formés sont majoritairement sous la forme L₂Ca (82%). Le complexe [LCaClO₄]⁺ est présent sous forme de trace car il correspond à 6% des signaux. La quantité du complexe [LCaClO₄]⁺ augmente et représente 49% des signaux tandis que la quantité de [L₂CaClO₄]⁺ diminue et ne représente plus que 30% des signaux dans la solution 3. Le complexe [L₂Ca₂(ClO₄)₃]⁺ représente quant à lui 10% des signaux. Lorsque 5 équivalents de calcium sont présents en solution, le seul complexe qu'on obtient est [LCaClO₄]⁺ (65%). Lorsque SCID=0 et SCID=-20eV, les quantités des complexes LCa et L₂Ca sont plus faibles. Lorsque la concentration en cations augmente, la quantité de complexe L₂Ca diminue et celle de complexe LCa augmente. Aucun complexe L₂Ca₂ n'est détecté à ces tensions.

III.5.3.Complexes formés avec le zinc

Lorsque 1 équivalent de zinc est ajouté au ligand, aucun complexe ne se forme. Les seuls pics présents sur le spectre de masse appartiennent au ligand. Le tableau 34 reprend les différents complexes formés selon la quantité de sels ajoutés à SCID=-40eV, les masses des complexes et les

pourcentages des différentes espèces présentes sur les spectres de masse (spectres non montrés).

Espèces et Masses (m/z)	2 éq. de Zn^{2+}	5 éq. de Zn^{2+}
Sel de zinc	5%	22%
$[\text{L}+\text{Na}]^+ 379,3$	3%	/
$[\text{LZnClO}_4]^+ 519,1$	30%	62%
$[\text{LZnClO}_4\text{CH}_3\text{CN}]^+ 557,6$	3%	/
$[\text{L}_2\text{ZnClO}_4]^+ -\text{HClO}_4 776,3$	22%	/
$[\text{L}_2\text{ZnClO}_4]^+ 876,3$	12%	/
$[\text{L}_2\text{Zn}_2(\text{ClO}_4)_3]^+ 1138,5$	6%	/

Tableau 34 : Complexes formés avec **69** selon la concentration en ion zinc

A cette tension, plus importante, moins de sel de zinc est détecté. Dans la solution 3, la même proportion de LZn et de L_2Zn est retrouvée sur le spectre de masse (33-34%) et un complexe L_2Zn_2 s'est aussi formé en faible quantité (6%). Les complexes LZn observés sont les suivants : $[\text{LZnClO}_4]^+$ et $[\text{LZnClO}_4\text{CH}_3\text{CN}]^+$. Il est étonnant d'observer un complexe comportant une molécule d'acétonitrile à cette tension. Dans la solution 4, il y a 22% de sel de zinc et un seul complexe est détecté : $[\text{LZnClO}_4]^+$ qui représente 62% des signaux. Lorsque SCID=0, les quantités des complexes formés L_2Zn et LZn sont plus faibles. Lorsque la concentration augmente (solution 4), le seul complexe observé $[\text{LZnClO}_4\text{CH}_3\text{CN}]^+$ représente 21% des signaux. Lorsque SCID=-20 eV, la quantité des complexes LZn et L_2Zn est un peu plus faible dans la solution 3 que pour SCID=-40 eV. Dans la

solution 4, les complexes observés sont LZn (43%) et une trace de L_2Zn_2 (5%). C'est la seule molécule aminophosphonate parmi la série des trois qui forme un complexe de zinc solvaté avec l'acétonitrile.

III.6. Structure des complexes

III.6.1. Introduction

Des hypothèses de structures peuvent être proposées pour nos complexes en se basant sur les données cristallographiques de complexes connus dans la littérature, bien que nous ne pouvons pas affirmer que les structures cristallines reflètent ce qui se passe en solution. Pour cette étude, la base de données CCDCQuest version 1.9. a été utilisée. Seulement une des molécules étudiées dans le cadre de cette thèse est connue dans la littérature et il n'existe pas de structure RX pour cette molécule (**4**). Nous n'avons pas trouvé de structures de complexes associés à ces molécules dans la base de données. Nous avons donc élargi notre recherche à la pyrrolidinone, aux fonctions ester, amide, à l'acétonitrile, au perchlorate et finalement au phosphonate. En effet, toutes ses fonctions sont bien complexantes vis-à-vis du calcium et du zinc et beaucoup plus de résultats ont d'ailleurs été obtenus avec le zinc

Tout d'abord intéressons-nous au cas du calcium. La recherche informatique effectuée avec la pyrrolidinone n'a pas permis de trouver des complexes intéressants avec le calcium en relation avec notre étude. La recherche s'est donc orientée vers des structures plus simples telles que des amides et des esters.

La diffraction des rayons X du complexe décrit par Cole et *al.* a montré que le calcium est coordonné de manière octaédrique à six atomes d'oxygène,

dont quatre proviennent de molécules d'eau et deux de la fonction carbonyle du groupement amide de deux molécules différentes d'isonicotinamide[6].

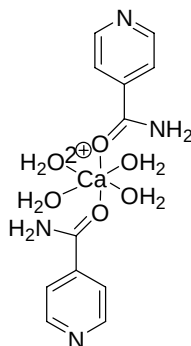


Schéma 196 : Complexe L_2M décrit par Cole

Fromm *et al.* ont décrit la structure d'un complexe entre l'acétate d'éthyle et le calcium. Le nombre de coordination autour du calcium est 6 avec deux molécules d'eau en position axiale et quatre molécules d'acétate d'éthyle en position équatoriale d'une bipyramide tétragonale[7].

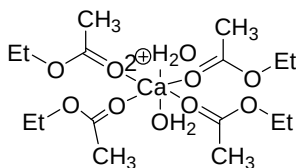


Schéma 197 : Complexe L_4M

La diffraction des rayons X d'un complexe entre le calcium et l'acétonitrile a été décrite par Perruchas[8]. Le nombre de coordination du calcium est de 7 avec quatre molécules d'acétonitrile et trois molécules de tétrahydrofurane. La géométrie est un prisme trigonale.

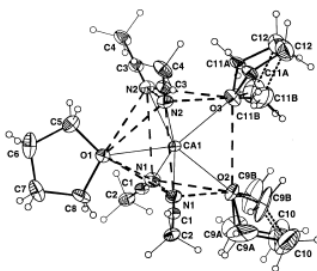


Figure 27 : Complexe $[\text{Ca}(\text{MeCN})_4(\text{THF})_3]^{2+}$

La formation d'un complexe entre le dioxazaphosphocane et un atome de calcium a été confirmée par infra rouge et par RMN ^{31}P . L'analyse élémentaire est consistante avec une stoechiométrie 1/2 (1 atome de calcium pour deux hétérocycles)[9].

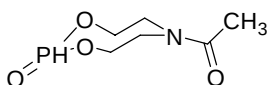


Schéma 198 : Dioxazaphosphocane

Ces résultats ont permis de proposer une structure de type sandwich, avec l'atome de calcium localisé entre deux molécules dioxazaphosphocane. L'analyse de la diffraction des rayons X a confirmé que la complexation implique le groupement carbonyle et phosphoryle. Cependant, le calcium n'est pas localisé entre deux hétérocycles mais est ponté par quatre hétérocycles. L'atome de calcium est coordonné par six atomes d'oxygène, quatre des quatre différents hétérocycles et deux des anions perchlorates.

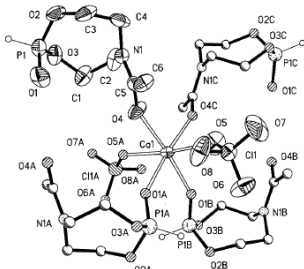


Figure 28 : Structure du complexe

Une dernière recherche dans la base de données sur les complexes entre des dérivés d'acides-amino protégés et l'atome de calcium a été effectuée mais est restée sans résultat.

Beaucoup plus de complexes de zinc ont été analysés par diffraction des rayons X. Un complexe entre un atome de zinc et plusieurs pyrrolidinones a attiré notre attention[10]. La stoechiométrie du complexe est la suivante $[Zn(ebpyrr)_3](ClO_4)_2 \cdot 2MeCN$. Le ligand est la N,N'-éthylènebis(pyrrolidin-2-one) (ebpyrr).

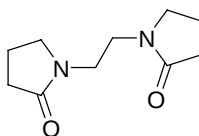


Schéma 199 : Ligand ebpyrr

L'atome de zinc est coordonné de manière octaédrique par six atomes d'oxygène, provenant des ligands ebpyrr. Les liaisons en zigzag représentent une liaison vers un ligand ebpyrr ou du ligand vers un atome de zinc.

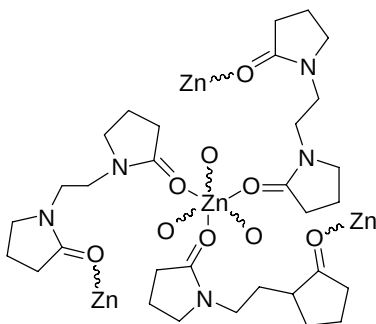


Schéma 200 : Complexe L_3M

Rivas et *al.* ont utilisé la diffraction des rayons X afin de comprendre la réaction de clivage des liaisons amides dans les complexes de zinc(II)[11]. Voici un des complexes qu'ils ont analysés lors de cette étude. La

géométrie du centre métallique est un octaèdre tordu avec un contre-ion perchlorate qui est faiblement coordonné.

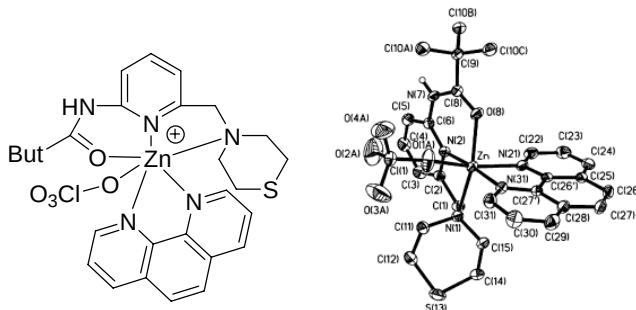


Figure 29 : Schéma et structure du complexe $[LZnL'ClO_4]$ par RX

Palkina et *al.* ont rapporté la structure d'un complexe entre le zinc et l'acétamide[12]. Le centre métallique a une géométrie octaédrique régulière avec les quatre atomes d'oxygène des quatre acétamides en position équatoriale et les atomes d'oxygène des deux molécules d'eau en position axiale.

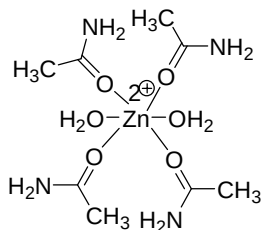


Schéma 201 : Complexe L_4M

L'analyse par diffraction des rayons X du complexe entre les esters méthyliques de l' EDTA et le chlorure de zinc(II) a montré que le complexe implique un motif de coordination *cis-α* octaédrique et chiral[13]. Les ions chlorures et les amines sont coordonnés dans le plan équatorial tandis que les groupements carbonyles des fonctions esters occupent les positions axiales.

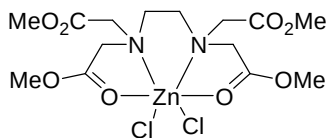


Schéma 202 : Complexe LM

Ferrari et *al.* ont analysé le complexe entre le méthylthiosemicarbazone pyruvate et l'ion zinc[14]. Le complexe est pentacoordiné avec une géométrie intermédiaire entre la bipyramide carrée et la bipyramide trigonale.

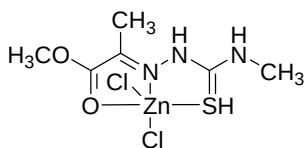


Schéma 203 : Complexe décrit par Ferrari

La structure d'un carbène a été confirmée par diffraction des rayons X par Charrette et *al.*[15]. L'atome de zinc central réside dans un carré bipyramidal tordu.

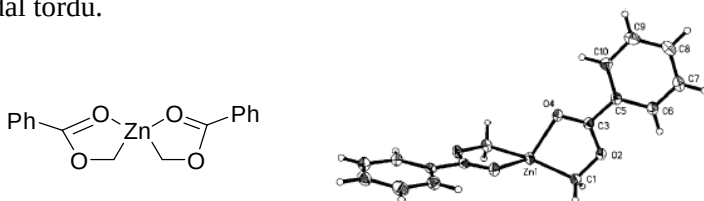


Figure 30 : Schéma et structure du complexe par RX

Bulychev et *al.* ont montré que la réaction du chlorure de zinc anhydre avec un éther couronne 18-6 dans un solvant aprotique comme le tétrahydrofurane ou l'acétonitrile a conduit à la formation d'un complexe de zinc avec l'acétonitrile[16]. Aucun complexe entre le zinc et l'éther couronne n'a pu être détecté. La géométrie autour de l'atome de zinc est tétraédrique.

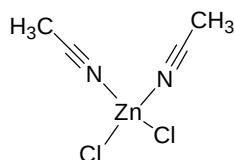


Schéma 204 : Complexe ayant une géométrie tétraédrique

Lors de l'étude de l'oxydation des phosphanes par le dioxyde de soufre par Roesky, un complexe zincique de coordination octaédrique a été analysé par diffraction des rayons X.

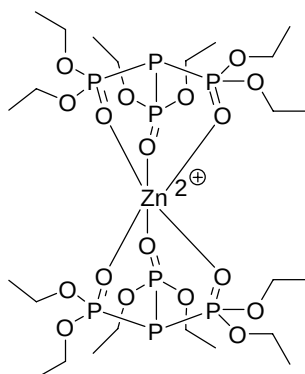


Schéma 205 : Complexe L₂M

Oms et al. ont décrit un complexe obtenu par réaction du chlorure de zinc et du diéthyle ferrocenylphosphonate[17]. Deux atomes de chlore et deux atomes d'oxygène définissent un arrangement tétraédrique tordu autour du centre métallique.

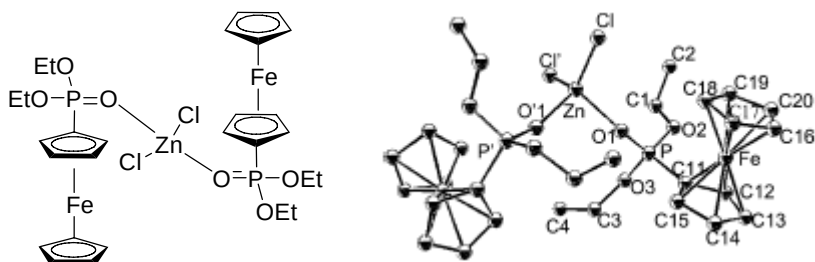
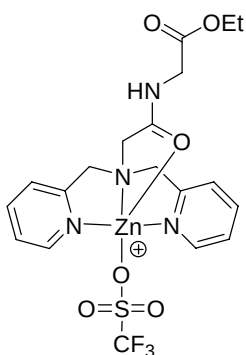


Schéma 206 : Complexe L₂M de géométrie tétraédrique et structure RX



On peut remarquer que seule la fonction amide de l'acide complexe le zinc, la fonction ester n'étant pas impliquée.

D'après les structures retrouvées dans la littérature, les complexes de calcium ont majoritairement six sites de coordination et occasionnellement sept et les géométries sont variables. Par contre, dans le cas du zinc, les complexes ont six, cinq ou quatre sites de coordination. Cette étude bibliographique va nous permettre de proposer des structures pour les complexes que nous avons observés en spectrométrie de masse.

III.6.2.Hypothèses de structure

Pour chaque ligand, nous n'allons proposer qu'une structure pour un des complexes formés majoritairement en spectrométrie de masse.

III.6.2.a.Ligand 4

Nos expériences en spectrométrie de masse ont montré que la fonction ester en α de l'amide n'était pas indispensable pour la complexation. De plus, le dernier exemple de complexe présenté dans l'introduction nous a également montré que cet ester ne participait pas à la complexation. Nous avons aussi pu relever que le calcium a en général six sites de coordination tandis que le zinc peut en avoir quatre, cinq ou six. Ces données ont été utilisées pour proposer une structure dans le cas du complexe $[L_3Ca]^{2+}$.

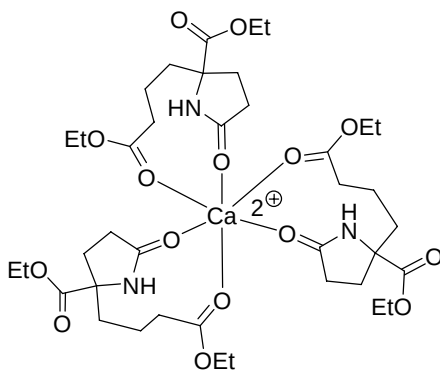


Schéma 208 : Hypothèse de structure pour L_3Ca

Le calcium a six sites de coordination avec une des positions axiales occupée par l'oxygène de l'amide et l'autre par l'oxygène du groupement carbonyle de l'ester d'un autre ligand. Les positions équatoriales sont occupées par les oxygènes de deux esters et de deux amides.

Pour le complexe $[L'ZnClO_4]^+$ avec $L'=L-CO_2Et$, nous proposons une structure où le zinc a cinq sites de coordination. Les positions axiales sont

occupées par les atomes d'oxygène des amides tandis que les deux fonctions ester et un perchlorate sont coordonnés dans le plan équatorial.

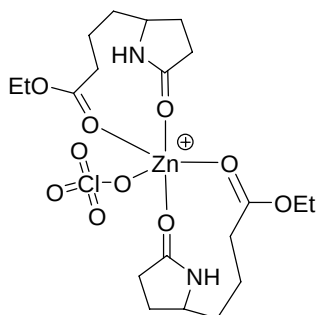


Schéma 209 : Hypothèse de structure de L'_2Zn

III.6.2.b.Ligand 10

Dans l'introduction précédente, nous avons vu que l'ester méthylique de la glycine n'intervenait pas dans la complexation. Nous avons utilisé cette donnée pour proposer une structure pour les complexes $[L_2Ca]^{2+}$ et $[L_2Zn]^{2+}$.

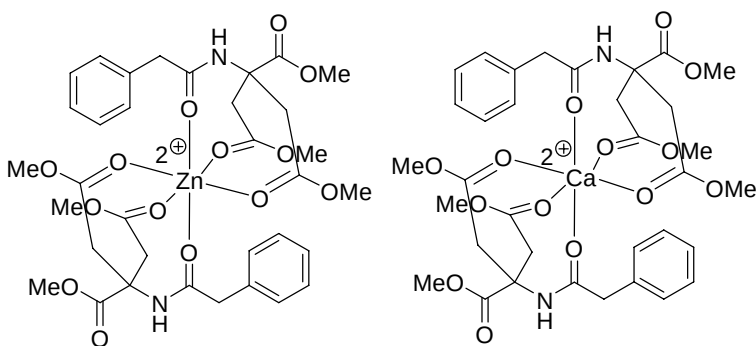


Schéma 210 : Hypothèse de structure des complexes L_2M ($M=Zn$ ou Ca)

Les atomes de calcium et de zinc ont six sites de coordination. La géométrie autour des centres métalliques est une bipyramide tétragonale. Les groupements carbonyles des amides sont en position axiale tandis que les positions équatoriales sont occupées par les quatre fonctions esters.

III.6.2.c.Ligand 55

Les groupements phosphonates sont des groupements complexants du calcium et du zinc par interaction avec l'oxygène de la double liaison P=O. Cette donnée ainsi que les propriétés complexantes des amides et des esters ont permis de proposer les hypothèses de structure suivantes pour les complexes $[L_2Ca]^{2+}$ et $[L_2ZnClO_4]^+ - HClO_4$.

Le calcium a six sites de coordination dans la première structure. Les phosphonates et les esters sont coordonnés dans le plan équatorial tandis que les groupements carbonyles des lactames occupent les positions axiales.

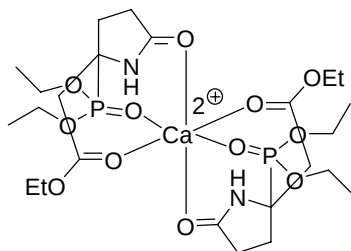


Schéma 211 : Hypothèse de structure de L_2Ca

Dans la seconde structure, le zinc a six sites de coordination avec les quatre atomes d'oxygène des deux phosphonates et des deux esters en position équatoriale et les atomes d'oxygène des deux lactames en position axiale.

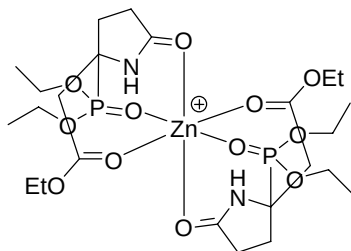


Schéma 212 : Hypothèse de structure du complexe $[L_2ZnClO_4]^+ - HClO_4$

III.6.2.d.Ligand 59

Les propriétés complexantes des amides, esters et phosphonates nous ont permis de proposer des hypothèses de structures pour les complexes $[L_2CaClO_4]^+$ et $[L_2ZnClO_4]^+ - HClO_4$.

Le calcium a sept sites de coordination avec deux esters, deux amides, deux phosphonates provenant de deux ligands et un contre-ion perchlorate.

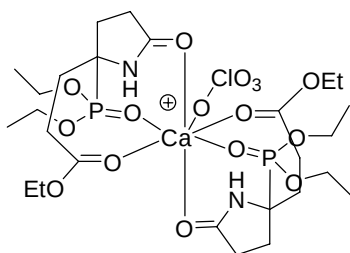


Schéma 213 : Complexe $[L_2CaClO_4]^+$

Le zinc a six sites de coordination avec deux atomes d'oxygène des lactames en position axiale, les positions équatoriales étant occupées par les atomes d'oxygène des deux esters et des deux phosphonates.

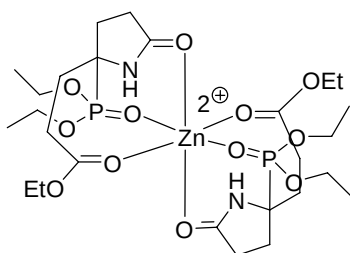


Schéma 214 : Hypothèse de structure L_2Zn

III.6.2.e.Ligand **69**

Comme nous l'avons vu expérimentalement, il y a beaucoup moins de complexes qui se sont formés avec le ligand **69**. Les données de la littérature nous ont permis de proposer les hypothèses de structure suivantes pour les complexes $[L_2CaClO_4]^+$ et $[LZnClO_4]^+$.

Dans la première structure, le calcium a sept sites de coordination. Les quatre groupements phosphonates et les deux lactames des deux ligands et l'ion perchlorate occupent la sphère de coordination.

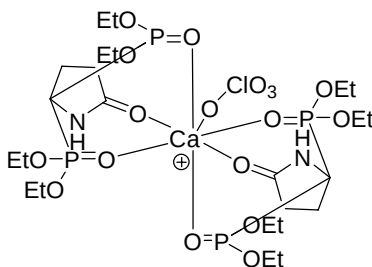


Schéma 215 : Hypothèse L_2Ca

Dans la deuxième structure, les deux groupements phosphonates, l'amide du ligand et un ion perchlorate définissent un arrangement tétraédrique tordu autour du centre métallique.

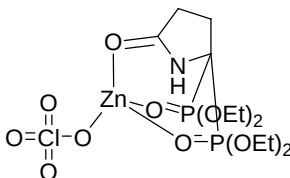


Schéma 216 : Complexe $[LZnClO_4]^+$

III.7.Conclusions

L'étude expérimentale par spectrométrie de masse a mis en évidence la formation de différents complexes avec le calcium et le zinc. Voici les tendances générales avec le sel de calcium. Dans la solution 1 de faible concentration en sel, les complexes formés sont des L_2Ca ou des L_3Ca majoritairement. Si la tension est plus forte, alors des complexes LCa peuvent aussi être détectés mais en quantités plus faibles. Lorsque la concentration en sel est augmentée, la quantité des complexes L_2Ca et éventuellement des complexes L_3Ca diminue et la quantité des complexes LCa augmente. Quand la tension est plus importante (20 ou 40), des complexes L_2Ca_2 sont détectés. Dans le cas de la molécule **4** à SCID=0, beaucoup de complexes sont solvatés par l'acétonitrile : $[L_2CaCH_3CN]^{2+}$, $[L_2Ca(CH_3CN)_2]^{2+}$, $[L_3CaCH_3CN]^{2+}$, $[LCaClO_4CH_3CN]^+$ et $[LCaClO_4(CH_3CN)_2]^+$. Nous avons proposé une structure pour le complexe L_3Ca non solvaté du ligand **4** (schéma 208). A SCID=-40 eV, les complexes ne comportent plus de molécules d'acétonitrile. Dans le cas de **10**, seulement une espèce solvatée par l'acétonitrile est détectée : $[LCaClO_4CH_3CN]^+$ à SCID=0. Aucune espèce solvatée n'est détectée à SCID=-20 eV et à SCID=-40 eV. Une structure possible du complexe L_2Ca non solvaté du ligand **10** est décrite au schéma 210. Dans le cas des ligands **55** et **59**, les complexes LCa observés à SCID=-20 eV sont $[LCaClO_4]^+$ et $[LCaClO_4CH_3CN]^+$, alors que pour SCID=0, les complexes LCa sont solvatés par une ou deux molécules d'acétonitrile : $[LCaClO_4CH_3CN]^+$ et $[LCaClO_4(CH_3CN)_2]^+$. Les complexes LCa ne contiennent plus de molécule d'acétonitrile lorsque SCID=-40 eV. Pour les complexes majoritaires L_2Ca identifiés à faible concentration en calcium, les structures proposées avec les ligands **55** et **59** sont illustrées dans les schémas 211 et 213. Enfin, les complexes entre **69** et le calcium ne comportent jamais de molécules

d'acétonitrile. Une structure L_2Ca avec le ligand **69** est dessinée au schéma 215.

Moins de complexes se forment avec le zinc et beaucoup de ligand reste non complexé. Cependant, le comportement de **4** et de **10** est différent vis-à-vis du sel de zinc. Les complexes formés avec **4** sont au départ de stoechiométrie L_2Zn et L_3Zn . Lorsque la concentration en zinc est plus importante, la quantité de L_2Zn et de L_3Zn diminue et la quantité de LZn augmente. La perte d'acide perchlorique et la perte d'un fragment (une fonction ester) de la molécule est observée avec le complexe $[L_2ZnClO_4]^+$. Cette perte n'empêche pas la molécule de complexer le cation. On peut donc en conclure que cette fonction ester n'est pas impliquée dans la complexation. Une proposition de complexe L'_2Zn après décarboxylation du ligand **4** est montrée au schéma 209. Dans le cas de la molécule **10**, les complexes L_2Zn et LZn sont observés dès le départ dans la solution 1 de plus faible teneur en cations. La quantité de complexes L_2Zn diminue quand on augmente la concentration en cation et celle des complexes LZn augmente. Une perte d'acide perchlorique est aussi observée mais cette fois-ci avec le complexe $[LZnClO_4]^+$. Une structure L_2Zn est proposée au schéma 210.

Le comportement des molécules **55** et **59** est comparable en présence de sels de zinc. Il y a beaucoup de ligand qui n'est pas complexé par le zinc, plus de 65% dans la solution 1. Les complexes formés au départ sont sous la forme L_2Zn comme illustré dans les schémas 212 et 214. La perte d'acide perchlorique et éventuellement d'un groupement phosphonate est observée avec le complexe $[L_2ZnClO_4]^+$. La perte d'acide perchlorique est un phénomène qui a déjà été rencontré avec les dérivés aminés du citrate. Quand la concentration en zinc augmente, la quantité de complexes L_2Zn

augmente puis diminue (à partir de 2 équivalents de zinc). Les complexes LZn et L_2Zn_2 sont détectés et leurs quantités augmentent. Dans la solution 4, le complexe majoritaire est de la forme LZn . La molécule **69** a un comportement différent avec le zinc. Il faut ajouter 2 équivalents de zinc au ligand pour voir la formation des premiers complexes. Ce sont des complexes L_2Zn et LZn . Une proposition de ce dernier complexe est illustré au schéma 216. Dans la solution 4, les seuls complexes observés sont de stoechiométrie LZn et beaucoup de sel de zinc s'est accumulé. Le complexe LZn est solvaté par une molécule d'acétonitrile : $[LZnClO_4CH_3CN]^+$. C'est la seule molécule parmi les aminophosphonates qui forme un complexe solvaté. Cette molécule semble être encore moins complexante vis-à-vis du zinc que les molécules **55** et **59**.

D'après les résultats obtenus, les dérivés aminés du citrate et les aminophosphonates semblent être de meilleurs complexants du calcium que du zinc. En effet, très peu de ligand n'est pas complexé dans le cas du calcium alors que jusqu'à 50% du ligand peut ne pas être complexé dans la solution 1, et il n'y a pas de complexes dans les solutions 1 et 2 pour la molécule **69** dans le cas du zinc. Beaucoup de complexes solvatés par l'acétonitrile sont observés avec le calcium alors qu'avec le zinc, un seul complexe solvaté est observé avec **10** et aucun avec **4**. Une des fonctions esters de **4** n'est pas ou peu impliqué dans la complexation. Dans le cas de la molécule **59**, Le groupement phosphonate ne semble pas impliqué dans la complexation au calcium car sa perte n'empêche pas la formation de complexes. L'amide ou les esters peuvent jouer le rôle de fonctions complexantes de ces molécules. Des hypothèses de structure ont été proposées pour les complexes majoritairement formés. Ces complexes ont pour la plupart six sites de coordination et impliquent les groupements

carbonyles des amides ou lactames et des esters, la double liaison P=O des phosphonates et dans certains cas le contre-ion perchlorate.

IV. Références

- [1] Schalley C. A., *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, 20, 5, 253-309.
- [2] Blair S. M., Brodbelt J. S., Marchand A. P., Chong H. S., Alihodzic S., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, 11, 10, 884-891.
- [3] Wang K., Gokel G. W., *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 14, 4693-4697.
- [4] Williams S. M., Brodbelt J. S., Marchand A. P., Cal D., Mlinaric-Majerski K., *Anal. Chem.* **2002**, 74, 17, 4423-4433.
- [5] Maton L., Taziaux D., Soumillion J.-P., Habib Jiwan J.-L., *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 27-28, 2928-2937.
- [6] Cole L. B., Holt E. M., *Inorg. Chim. Acta* **1989**, 162, 2, 291-295.
- [7] Fromm K. M., Bernardinelli G., Mayor-Lopez M. J., Goesmann H., *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2000**, 626, 7, 1685-1691.
- [8] Perruchas S., Simon F., Uriel S., Avarvari N., Boubekeur K., Batail P., *J. Organomet. Chem.* **2002**, 643-644, 301-306.
- [9] Sutra E., Lamande L., Gornitzka H., Bellan J., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 10, 2727-2729.
- [10] Doyle G. A., Goodgame D. M. L., Hill S. P. W., Menzer S., Sinden A., Williams D. J., *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 11, 2850-2860.
- [11] Rivas J. C. M., Salvagni E., Parsons S., *Dalton Trans.* **2004**, 24, 4185-4192.
- [12] Palkina K. K., Kuz'mina N. E., Orlova V. T., Kondakova I. V., *Zh. Neorg. Khim.* **1996**, 41, 10, 1656-1658.
- [13] Buschhaus B., Hampel F., Grimme S., Hirsch A., *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 12, 3530-3540.
- [14] Belicchi Ferrari M., Bisceglie F., Pelosi G., Tarasconi P., Albertini R., Pinelli S., *J. Inorg. Biochem.* **2001**, 87, 3, 137-147.
- [15] Charette A. B., Beauchemin A., Francoeur S., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 33, 8139-8140.
- [16] Bel'skii V. K., Strel'tsova N. R., Bulychev B. M., Storozhenko P. A., Ivankina L. V., Gorbunov A. I., *Inorg. Chim. Acta* **1989**, 164, 2, 211-220.
- [17] Oms O., Maurel F., Carre F., Le Bideau J., Vioux A., Leclercq D., *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 16, 2654-2661.
- [18] Niklas N., Walter O., Hampel F., Alsfasser R., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 17, 3367-3373.

CHAPITRE 6

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre travail est une contribution au processus de « lead discovery » dans le domaine des inhibiteurs non- β -lactamiques des PBPs, un sujet bien d'actualité vu l'ampleur grandissante du phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques classiques.

I. Bilan des synthèses

I.1. Synthèse de dérivés aminés du citrate et de l'iso-citrate

Après avoir défini une famille d'intérêt dérivée du bioisostère aminé de l'acide citrique, une voie de synthèse efficace et versatile basée sur la dialkylation de la glycine a été mise au point. Plusieurs composés avec amine libre ou acylée, et fonctions carboxyliques masquées ou partiellement déprotégées ont été obtenus. A la suite de ce travail, nous pouvons proposer une excellente synthèse de l'acide 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylique, un produit utilisé comme agent de séquestration biodégradable de métaux lourds (traitements détoxifiants).

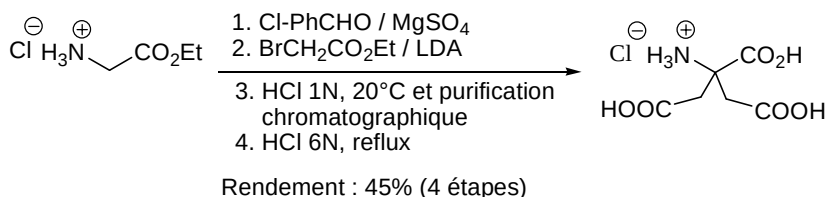
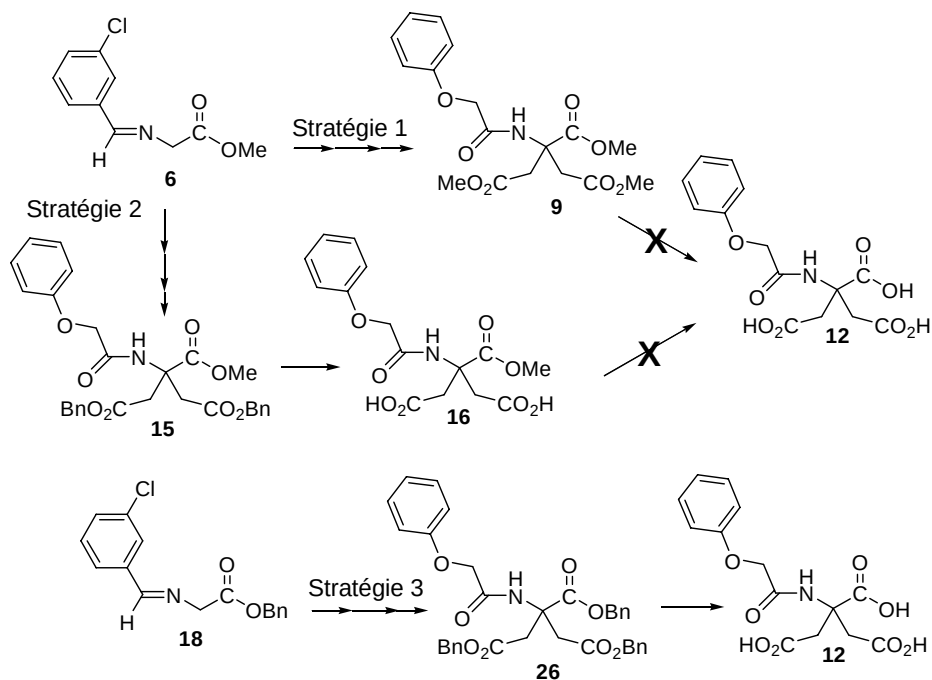


Schéma 217 : Synthèse de l'acide 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylique

La synthèse de l'amide **12** a été difficile et plusieurs changements de stratégie ont été nécessaires. En effet, la première stratégie n'a pas abouti car la récupération de l'amide **12** après la déprotection finale des trois esters méthyliques a posé des problèmes. La seconde stratégie a permis de récupérer un produit intermédiaire, l'amide **16**. La déprotection de l'ester méthylique pose là encore un problème.

Schéma 218 : Stratégies 1,2 et 3 pour la synthèse de l'amide **12**

La stratégie 3, qui n'utilise que l'hydrogénation comme méthode de déprotection, a finalement conduit à l'obtention de l'amide **12**.

Cette méthodologie nous a aussi permis de synthétiser le dérivé homologue de l'aminocitrate **31** et le bioisostère aminé de l'iso-citrate **36**. L'hydrolyse acide de la pyrrolidinone **4** a conduit au mélange **31** alors que d'après la littérature le seul produit isolé devrait être le composé ouvert. Notre résultat est donc en contradiction avec la littérature[1].

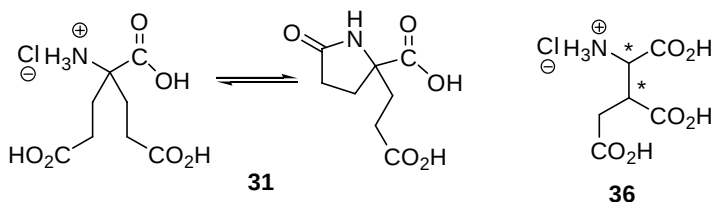


Schéma 219 : Synthèse des molécules **31** et **36**

I.2.Dérives aminophosphoniques

La synthèse du bioisostère phosphonique de l'aminocitrate s'est avérée plus compliquée que celle de l'aminocitrate. Plusieurs stratégies ont été envisagées. La première est l'adaptation de la méthode développée pour la synthèse des dérivés aminés du citrate c'est-à-dire la dialkylation d'une imine. Ceci a permis la synthèse du produit attendu mais avec un rendement global de 12% et des étapes de purification difficiles. La seconde stratégie envisagée (la réaction Kabachnik-Fields) n'a pas permis la synthèse de ce bioisostère[2]. Finalement, la réaction de Pudovik a permis d'obtenir l'amine **43**, intermédiaire clé dans la synthèse du bioisostère phosphonique de l'aminocitrate, en moins d'étapes et avec un meilleur rendement global de 20%. L'étape clef de cette dernière synthèse est l'addition du phosphite activé sur l'énamine disubstituée.

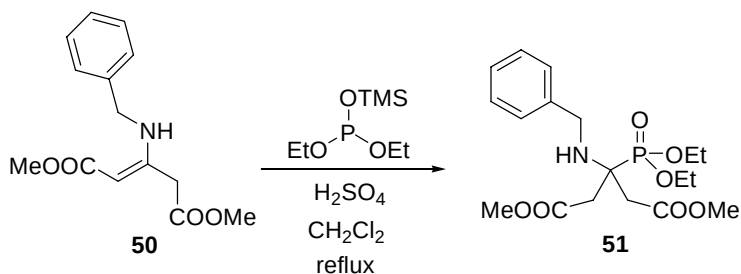


Schéma 220 : Addition de phosphite sur l'énamine **50**

L'amine **51** est isolée avec un rendement faible de 30%. L'hypothèse mécanistique la plus probable est présentée au schéma 221.

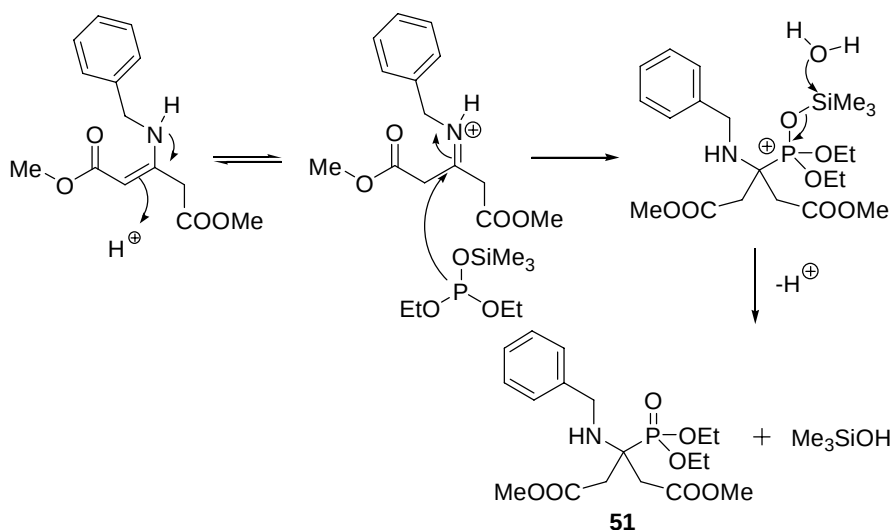


Schéma 221 : Hypothèse mécanistique

La synthèse des dérivés homologues et bisphosphoniques a été réalisée avec des rendements bons à moyens en utilisant la méthode développée lors de la synthèse de la première famille de molécules (alkylation d'imine). L'hydrolyse acide de la pyrrolidinone **55** a conduit à un mélange en équilibre des formes ouvertes et fermées. Ce phénomène a apparemment déjà été rencontré dans la littérature avec des molécules similaires[3].

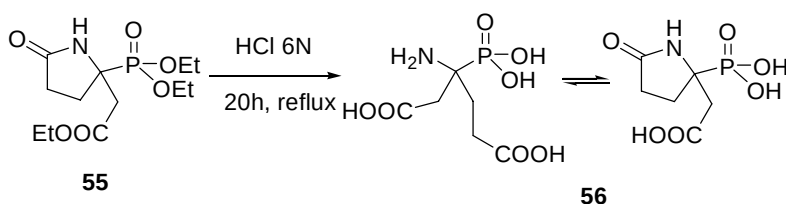


Schéma 222 : Hydrolyse acide du γ -lactame **55**

Par contre l'hydrolyse acide de la pyrrolidinone **59** a conduit exclusivement au lactame **60**. Le lactame a résisté aux conditions d'acidité forte et de température car il n'est pas hydrolysé.

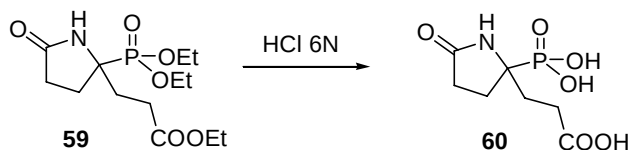


Schéma 223 : Hydrolyse des esters éthyliques de la pyrrolidinone **59**

L'ensemble des molécules synthétisées au cours de cette thèse est rassemblé dans un formulaire p 247 à 251.

II. Bilan des activités biologiques

II.1. Dérivés aminés du citrate et de l'iso-citrate

Le tableau 35 reprend les pourcentages d'activité résiduelle des différentes enzymes après incubation avec les inhibiteurs potentiels (tests effectués au centre d'ingénierie des protéines de l'ULg). La concentration en inhibiteur est égale à 100 μ M sauf si précisé (*concentration = 0,2 μ M, **concentration = 1mM, # concentration = 2 mM, \$ concentration = 5 mM). X : impossible à déterminer ou non déterminé.

L'activité de l'enzyme NMCA en présence de **3** et **14** est diminuée de manière significative. L'activité résiduelle de BS3 en présence de **12** est réduite de 30%. La molécule **29** inhibe l'enzyme P99 avec une activité résiduelle de l'enzyme de 73% à pH 5. Le produit **31** est un inhibiteur de la β -lactamase TEM-1 avec une constante d'inhibition de 106 μ M.

L'aminocitrate **27** est un meilleur inhibiteur que le citrate et l'iso-citrate pour les β -lactamases BS3 et TEM-1 et inhibe de manière compétitive les β -lactamases BS3, TEM-1 et Oxa-10 avec des constantes d'inhibition (K_i) de 250, 150 et 200 μ M respectivement. Notre hypothèse de travail est donc validée par l'observation de l'activité inhibitrice de l'acide 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylique sur les β -lactamases de la classe A et l'analyse par diffraction des rayons X d'un complexe BS3-aminocitrate.

Enzymes	Classe A														Classe C		Classe D		Classe B			
	TEM		BS3		NMCA		P99		OXA-10		BclI		VIM-4									
pH	5	7	5	7	5	7	5	7	5	7	5	7	5	7								
3	X	71 ⁺	X	82	X	60	X	87	X	98	93	92	X	X								
4	80	94	96	85	100	100	100	100	98	97	100	X	X	96								
10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	X	X								
12	100	96	70	80	85	96	100	97	82	84	100	X	X	100								
14	X	81 ⁺	X	100	X	63	X	100	X	100	93	100	X	X								
15	X	X	X	X	X	X	X	X	X	10	X	X	X	X								
16	X	98 ⁵	X	96	X	66	X	85	X	100	100	86	X	100								
22	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	100	X	X	X								
23	X	100	X	100	X	X	X	X	X	10	90	X	X	X								
25	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	X	X	X	X								
26	X	X	X	X	X	X	X	X	X	10	X	X	X	X								
27	X	95 ⁺	X	88	X	94	X	81	X	100	100	83	X	100								
28	92	99	97	96	96	94	93	100	83	96	90	100	X	100								
29	87	99	100	95	99	95	73	100	79	100	100	100	X									
31	69	88	100	100	97	100	81	100	100	100	93	100	X	96								
35A	80	94	100	100	98	100	99	100	88	82	79	X	X	100								
35B	86	100	100	100	93	100	100	100	87	91	100	X	X	94								
36	90	100	97	85	86	100	94	100	85	92	100 ⁺⁺	X	X	94								

Tableau 35 : Activité résiduelle des enzymes

L'activité résiduelle d'Oxa-10 (β -lactamase de la classe D) est seulement de 10% en présence de **23** à pH 7. Ce résultat est vraiment très intéressant et nous avons donc décidé de tester les dérivés **15** et **26** sur l'enzyme Oxa-10.

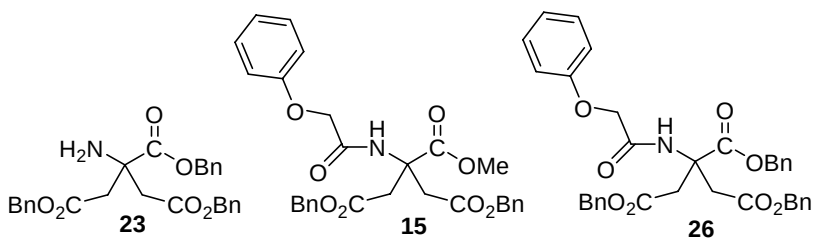


Schéma 224 : Molécules inhibitrices de l'enzyme Oxa-10

L'inhibition des dérivés amides **15** et **26** vis-à-vis de l'enzyme Oxa-10 est aussi très importante avec seulement 10% d'activité résiduelle. Par contre, les amines **14** et **25** ne sont pas des inhibiteurs. La découverte de ces inhibiteurs est d'autant plus intéressante que peu d'inhibiteurs des β -lactamases de la classe D sont décrits dans la littérature. Le docking de la molécule **26** dans la cavité enzymatique a été effectué en se basant sur la position de la liaison amide de la benzylpénicilline. Les groupements aromatiques se logent bien dans les poches hydrophobes du site actif.

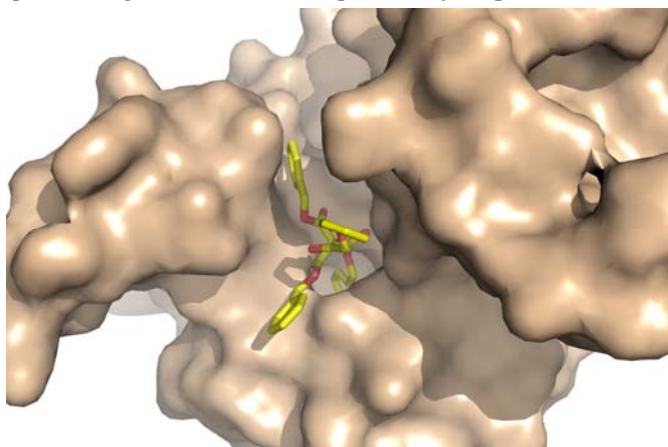


Figure 31 : Docking de la molécule 26 dans Oxa-10

Les molécules **4**, **31**, **35** et **36** ont été testées sur l'enzyme R39 qui est une DD-transpeptidase/carboxypeptidase. Les composés **4**, **31** et **35** n'ont pas montré d'activité intéressante. La molécule **36** a induit une activité résiduelle de l'enzyme de 54% mais ce résultat n'a pas été confirmé lors de l'ajout de BSA. Cette protéine permet de vérifier qu'il n'y a pas d'interaction non spécifique de l'inhibiteur et dès lors qu'il interagit bien avec le site actif de l'enzyme ; **36** semble bien se comporter comme un inhibiteur non sélectif de R39.

Molécules	Activité résiduelle [%]	Activité résiduelle [%]	Activité résiduelle [%]
	500µM	500µM	500µM BSA(a)
4	88±6	nd	nd
31	75±9	nd	nd
35A	81±17	nd	nd
35B	98±7	nd	nd
36	54±10	80±15	80±15

(a) BSA : 1 mg/ml

Tableau 36 : Activité résiduelle de R39 avec **4**, **31**, **35** et **36**

L'activité agoniste/antagoniste de l'aminocitrates **27** a été testée sur les récepteurs ionotropiques NMDA, AMPA, Kainate, PCP, glycine_A et glycine_B, dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut de recherches SERVIER. Les résultats sont repris dans le tableau 3. Ils sont sous la forme de pourcentages d'inhibition du binding d'un ligand marqué au moyen d'un isotope radioactif.

Récepteur	Inhibition (%)	
	10^{-5} M	10^{-7} M
NMDA	0	0
AMPA	0	0
Kainate	14	18
PCP	0	0
Glycine A	34	5
Glycine B	34	5

Tableau 37 : Activité agoniste/antagonise de l'aminocitrate **27**

Plus le pourcentage d'inhibition est grand, plus le produit est affin pour le récepteur. L'aminocitrate a une activité faible sur les deux récepteurs glycine. L'activité de l'aminocitrate sur ces deux récepteurs peut s'expliquer par le fait que la structure de la glycine est retrouvée dans l'aminocitrate. Cette activité est trop faible pour poursuivre les investigations.

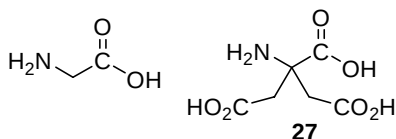


Schéma 225 : Glycine et aminocitrate

II.2.Dérivés aminophosphoniques

Les tests biochimiques ont été effectués au Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP) sur des β -lactamases des classes A, B, C et D. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle. La concentration en inhibiteur est égale à 100 μ M sauf quand précisé (X : non déterminé). Les inhibiteurs ont été testés à pH physiologique et à pH 5. Le tableau 38 reprend les pourcentages d'activité résiduelle des différentes enzymes.

Enzymes	Classe A						Classe C		Classe D		Classe B			
	TEM		BS3		NMCA		P99		OXA-10		BclI		VIM-4	
pH	5	7	5	7	5	7	5	7	5	7	5	7	5	7
43	83	96	97	89	83	100	98	100	100	92	100	X	X	97
48	89	100	100	100	83	100	100	99	96	89	100	X	X	99
49	92	100	98	100	76	100	97	100	91	88	100	X	X	100
51	88	80	100	100	95	100	97	93	97	100	95	100	X	100
54	87	100	100	100	99	100	93	100	96	85	87	X	X	99
55	84	100	100	100	83	91	97	100	98	93	92	X	X	100
56	94	100	98	99	64	98	100	92	92	87	100	X	X	95
57	100	95	100	100	100	100	100	100	87	99	85	97	X	100
59	92	100	100	99	97	100	95	100	92	85	100	X	X	100
60	97	100	97	100	92	100	100	95	92	88	88	X	X	96
61	100	90	99	100	100	100	100	98	96	100	95	100	X	91
66	100	95	100	100	90	99	100	100	91	97	99	100	X	96
67	93	89	97	100	100	100	100	98	100	100	99	100	X	96
69	91	98	100	100	97	100	91	100	96	84	100	X	X	100
70	90	100	89	100	88	95	100	86	100	96	96	100	X	89

Tableau 38 : Activité résiduelle des enzymes

En général, les dérivés aminophosphoniques synthétisés ne sont malheureusement pas des inhibiteurs des β -lactamases. L'absence d'activité sur les β -lactamases à zinc est particulièrement décevante. Les seuls résultats d'inhibition positifs sont les suivants. L'amine **49** inhibe la β -lactamase NMCA à pH 5 avec une activité résiduelle de 76% et une constante d'inhibition de 800 μ M. L'activité résiduelle de NMCA à pH 5 est de 64 % en présence de **56** avec une constante d'inhibition de 360 μ M.

Certaines des molécules aminophosphoniques ont été testées sur l'enzyme R39 (DD-transpeptidase/carboxypeptidase).

Molécules	Activité résiduelle R39 [%] 500μM	Activité résiduelle R39 [%] 500μM	Activité résiduelle R39 [%] 500μM BSA
43	97 $\pm$ 9	nd	nd
48	36$\pm$3	47$\pm$5	52$\pm$4
49	71 $\pm$ 5	nd	nd
54	98 $\pm$ 7	nd	nd
55	91 $\pm$ 5	nd	nd
56	56$\pm$5	66$\pm$4	73$\pm$5
59	100 $\pm$ 15	nd	nd
60	69$\pm$6	67$\pm$8	72$\pm$9
69	95 $\pm$ 9	nd	nd
70	94 $\pm$ 10	nd	nd

Tableau 39 : Activité résiduelle de R39

L'activité résiduelle de l'enzyme est fortement diminuée en présence de l'amine **48** (36%). L'ajout de BSA a permis de confirmer l'effet

inhibiteur sélectif de l'amine **48**. La molécule **56** est un inhibiteur de la D,D-peptidase R39 avec une activité résiduelle de 56%. L'activité résiduelle de l'enzyme est légèrement diminuée en présence de l'amine **60** (69%). Ce résultat pourrait indiquer que dans le cas du composé **56**, c'est la forme cyclique qui est active sur R39.

L'activité agoniste/antagoniste de la molécule **56** a été testée sur les récepteurs ionotropiques NMDA, AMPA, Kainate, PCP, glycine_A et glycine_B, dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut de recherches SERVIER. Malheureusement, cette molécule n'a aucune activité identifiable dans le cadre des tests réalisés par l'entreprise.

III.Evaluation de la capacité complexante des ligands

Nos molécules complexent le calcium (Ca^{2+}). Les dérivés aminés du citrate et les aminophosphoniques semblent avoir un comportement similaire. Les complexes détectés en spectrométrie de masse sont de stoechiométrie L_2Ca et/ou L_3Ca . Lorsque la concentration en sel est augmentée, des complexes LCa sont aussi observés. Nos molécules complexent bien moins le zinc. Les complexes L_2Zn , L_3Zn et LZn sont détectés en spectrométrie de masse. D'après nos résultats expérimentaux, les dérivés de l'aminocitrate et les aminophosphonates semblent être de meilleurs complexants du calcium que du zinc. En effet, très peu de ligand n'est pas complexé dans le cas du calcium alors qu'au minimum 50% du ligand peut ne pas être complexé dans la solution 1 dans le cas du zinc. La perte d'acide perchlorique est un phénomène observé avec les deux familles de molécules lors des expériences réalisées avec le zinc. Une des fonctions esters de **4** n'est pas ou peu impliquée dans la complexation au zinc. Dans le cas de la molécule **59**, le groupement phosphonate ne semble pas impliqué dans la complexation car sa perte n'empêche pas la formation

de complexes avec le calcium. Lors de la perte de l'ester de la molécule **4** et du groupement phosphonate de la molécule **59**, le même fragment complexant est retrouvé. L'amide, les esters, les phosphonates et éventuellement le contre-ion perchlorate peuvent jouer le rôle de fonctions complexantes dans ces molécules. Sur base de recherche bibliographique dans la base de données de structures RX existantes, des hypothèses de structure ont été proposées pour les complexes de calcium et de zinc formés majoritairement. Finalement, l'absence d'activité de nos molécules sur les β -lactamases à zinc pourrait s'expliquer, en partie, par leur faible aptitude à complexer le zinc.

IV.Perspectives

L'amélioration de la synthèse du bioisostère phosphonique de l'aminocitrate est envisagée. L'utilisation du phosphite de triméthylsilyldiéthyle en présence d'une catalyse acide (H_2SO_4) a permis d'obtenir le produit avec un rendement faible de 30%. L'utilisation d'un autre système catalytique peut être une alternative. Heydari *et al.* ont décrit une nouvelle approche pour la synthèse de dérivés N-hydroxy- α -aminophosphonates avec des bons rendements en utilisant une solution de perchlorate de lithium étherée (LPDE) comme catalyseur[4].

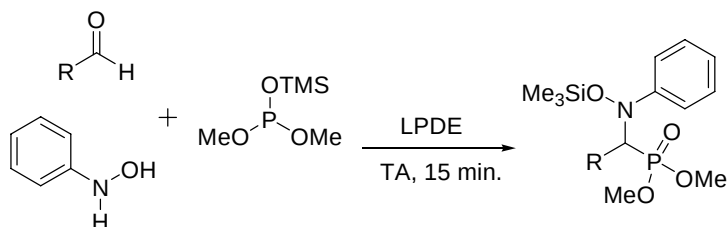


Schéma 226 : Système catalytique décrit par Heydari *et al.*

Des résultats biologiques intéressants ont été obtenus avec les dérivés aminés du citrate. Les molécules **15**, **23** et **26** sont de très bons inhibiteurs de la β -lactamase de la classe D, Oxa-10. Afin de mieux comprendre

l'inhibition importante d'Oxa-10 par cette famille de composés, des tentatives de cristallisation du complexe entre la molécule **23** et l'enzyme Oxa-10 sont actuellement en cours au centre d'ingénierie des protéines de l'université de Liège.

Les résultats les plus intéressants obtenus avec les dérivés aminophosphoniques concernent la D,D-peptidase/carboxypeptidase R39. Le bioisostère phosphonique de l'aminocitrate **48** est le meilleur inhibiteur de notre seconde famille. Des tentatives de cristallisation du complexe entre la molécule **48** et l'enzyme R39 sont en cours au centre d'ingénierie des protéines de l'université de Liège.

Les molécules **31**, **36** et **70** sont actuellement testées sur les récepteurs métabotropiques du système nerveux central dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut de recherches SERVIER. Les récepteurs glutamiques métabotropiques (mGluRs) sont couplés aux protéines G et sont responsables entre autre de l'activation de la phospholipase. Ces récepteurs jouent un rôle clef dans de nombreux processus fondamentaux incluant le développement des neurones, l'apprentissage et la mémoire.

Un dernier projet est actuellement en cours en collaboration avec l'équipe du professeur Yann Garcia de l'université catholique de Louvain. Ce projet concerne la synthèse de triazoles fonctionnalisés ayant des propriétés magnétiques. La première étape est la formation du précurseur hydrochloré N,N-diméthylformamide azine par réaction entre la diméthylformamide et le chlorure de thionyle dans un premier temps suivie de l'ajout d'hydrazine et de la précipitation du sel hydrochloré. Ce sel hydrochloré est ensuite traité avec de l'éthanolate de sodium afin d'obtenir l'azine libre.

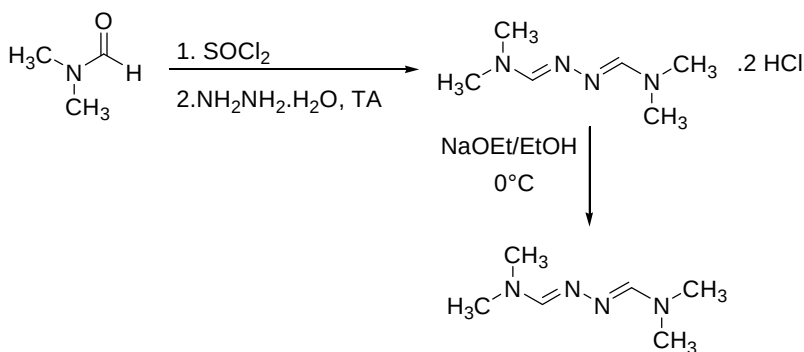


Schéma 227 : Formation de N,N-diméthylformamide azine

L'étape suivante est la condensation de l'azine avec différentes amines commerciales ou synthétisées lors de cette thèse. Les premiers tests ont été effectués avec des amines commerciales : le glycinate d'éthyle et l'aminomalonate d'éthyle.

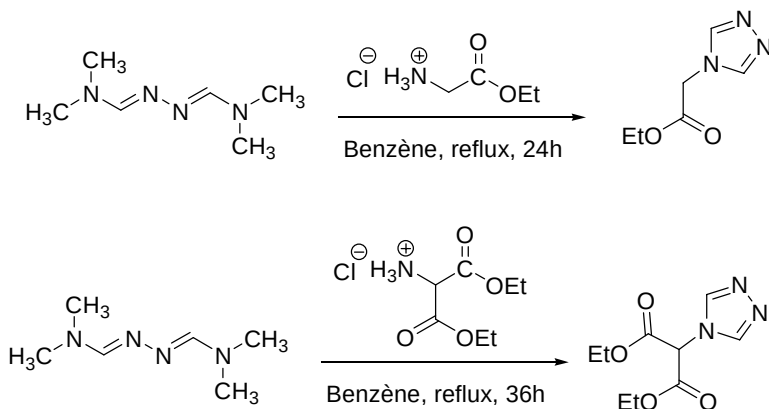


Schéma 228 : Synthèse des premiers triazoles

Les triazoles ont été obtenus respectivement après purification par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 65% et de 60%. Afin de comparer les propriétés complexantes des esters éthyliques par rapport aux acides correspondants, l'hydrolyse acide du premier triazole a été effectuée avec de l'acide chlorhydrique 6N.

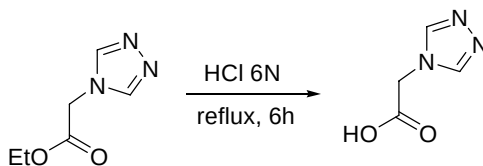


Schéma 229 : Hydrolyse acide de l'ester éthylique

La diffraction des rayons X a confirmé la structure des deux produits schématisés précédemment. Un complexe entre le premier triazole et l'ion Fe(II) a été synthétisé et les premières études ont montré que ce complexe avait bien les propriétés d'un composé à transition de spins. L'investigation de l'effet Mössbauer est actuellement en cours.

Des essais ont ensuite été effectués avec les amines suivantes synthétisées dans le chapitre 4 de cette thèse : l'aminométhyle phosphonate de diéthyle **37** et l'aminométhylènediphosphonate de tétraéthyle **63**. Dans le premier cas, d'après les spectres RMN ^1H et ^{13}C et le spectre de masse, le produit est bien présent dans le brut réactionnel mais malheureusement, il n'a pas été possible de le purifier par chromatographie sur gel de silice.

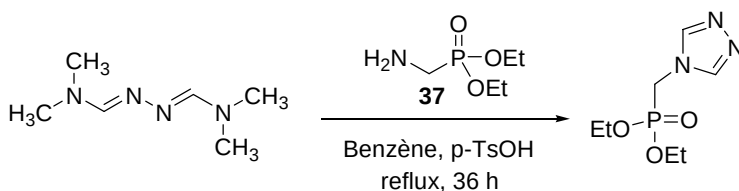


Schéma 230 : Synthèse d'un troisième triazole

Dans le cas de l'aminométhylènediphosphonate de tétraéthyle **63**, il n'a pas été possible d'identifier le produit, l'effet stérique très important a probablement empêché la formation du triazole.

Un dernier produit est actuellement en cours de test dans la réaction de formation du triazole. Il s'agit du triéthyle-2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylate **3**.

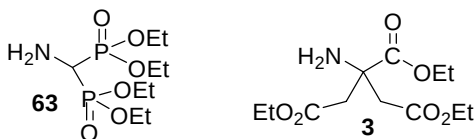


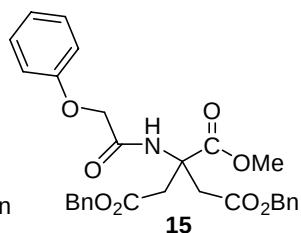
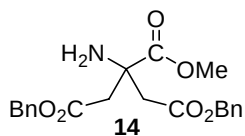
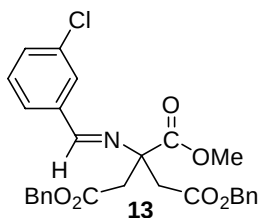
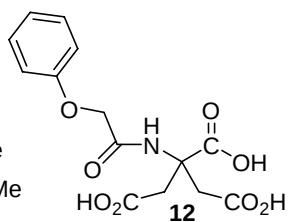
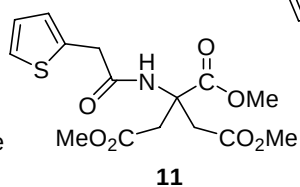
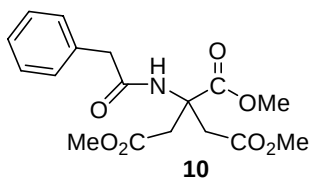
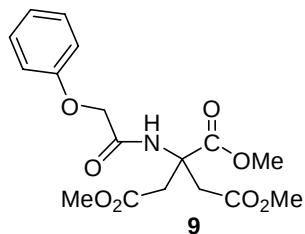
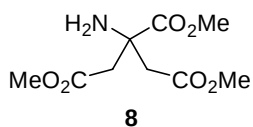
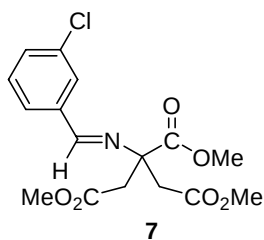
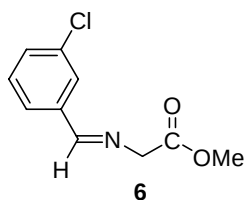
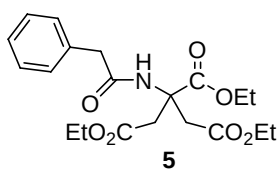
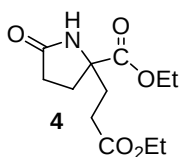
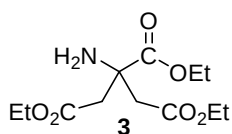
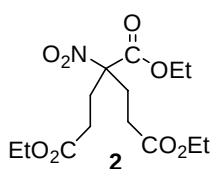
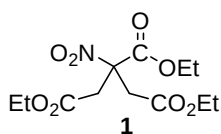
Schéma 231 : Amines **63** et **3**

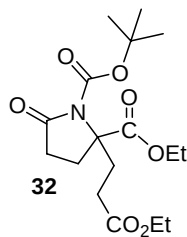
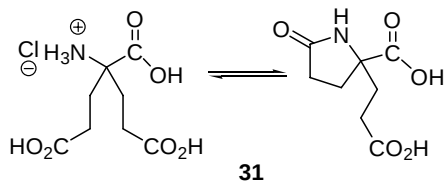
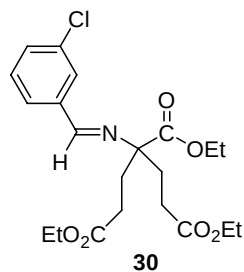
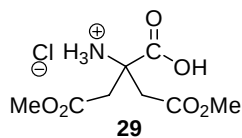
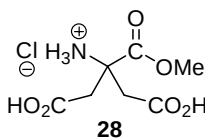
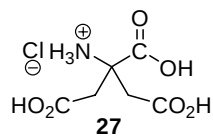
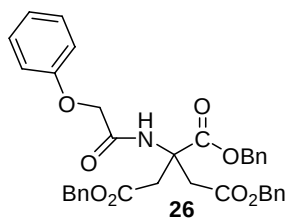
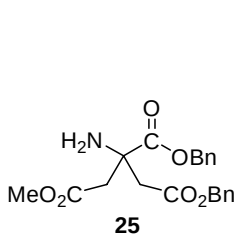
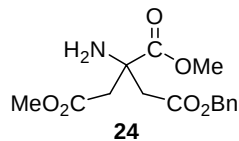
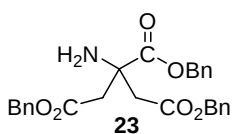
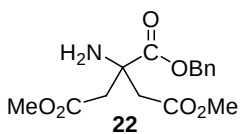
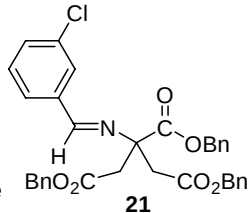
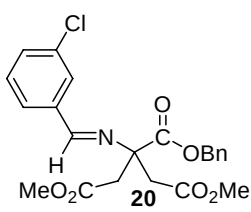
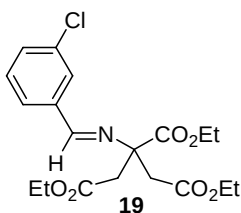
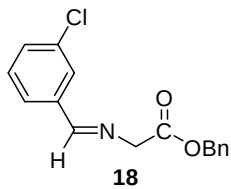
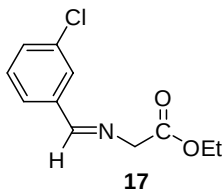
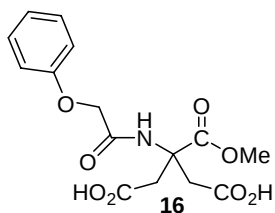
La vocation de tous ces triazoles portant des chaînes fonctionnalisées est l'élaboration de nouveaux matériaux à transition de spins qui peuvent trouver des applications en science des matériaux comme sondes et dispositifs d'affichage.

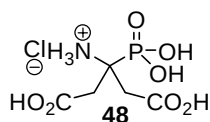
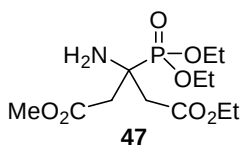
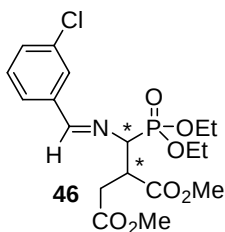
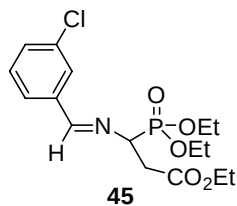
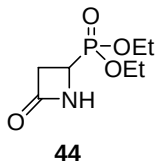
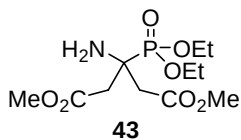
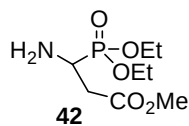
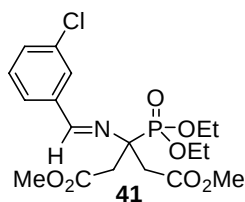
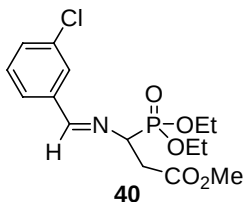
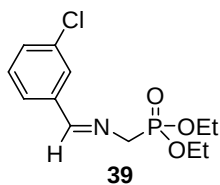
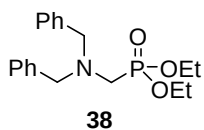
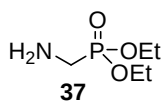
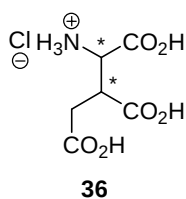
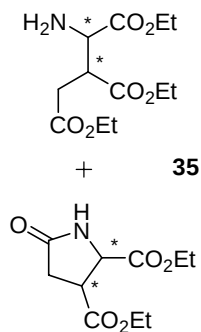
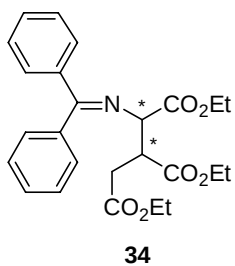
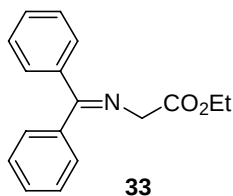
V. Références

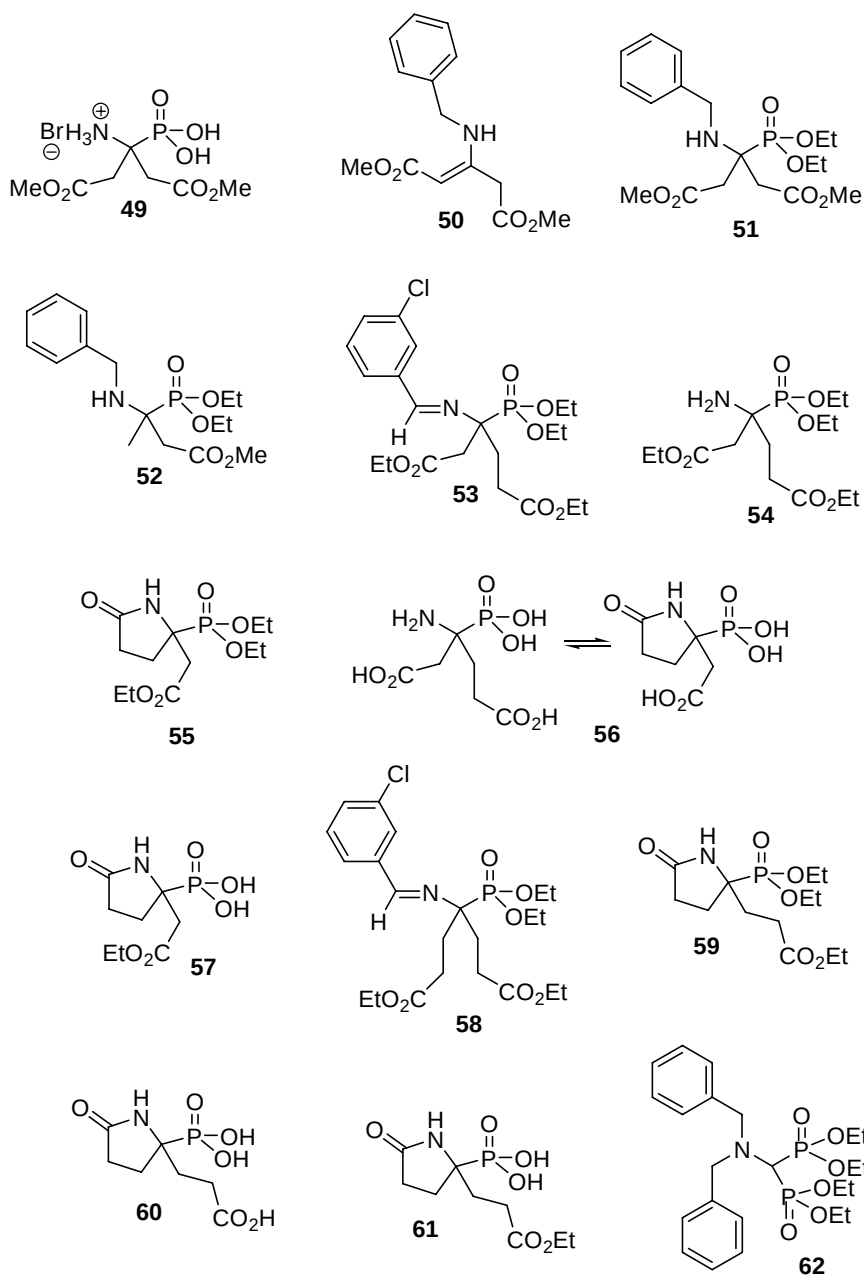
- [1] Smirnova A. A., Perekalin V. V., Shcherbakov V. A., *Zh. Org. Khim.* **1968**, 4, 12, 2245-2255.
- [2] Cherkasov R. A., *Russ. Chem. Rev.* **1998**, 67, 10, 857-882.
- [3] Oleksyszyn J., Gruszecka E., Kafarski P., Mastalerz P., *Monatsh. Chem.* **1982**, 113, 1, 59-71.
- [4] Heydari A., Zarei M., Alijanianzadeh R., Tavakol H., *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 21, 3629-3631.

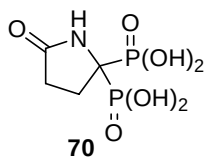
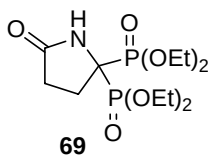
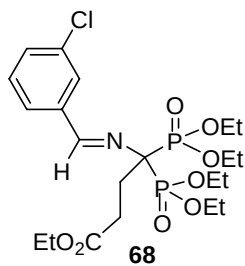
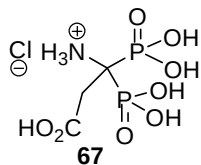
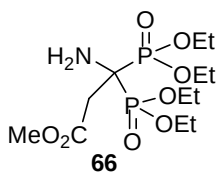
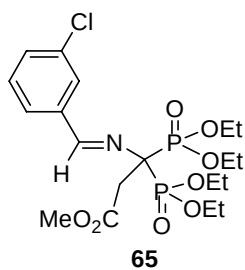
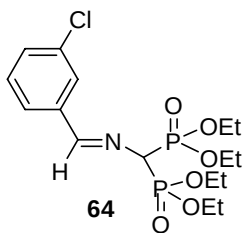
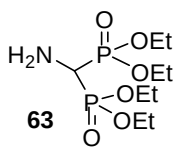
FORMULAIRE











CHAPITRE 7

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Généralités

I.1.Appareillages et analyses

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (^1H), du carbone (^{13}C) et du phosphore (^{31}P) ont été enregistrés sur un spectromètre VARIAN GEMINI-200 (à 200 MHz pour le proton et à 50 MHz sur le carbone), sur un spectromètre Bruker (à 250 et 300 MHz pour le proton à 62,5 et 75 mHz pour le carbone et à 121 MHz pour le phosphore) et sur un spectromètre Bruker (à 500 MHz pour le proton et à 125 MHz pour le carbone). Les spectres ont été réalisés dans le chloroforme deutéré ou le D_2O en utilisant le signal du chloroforme ou du D_2O comme référence interne. La référence pour les spectres ^{31}P est une sonde externe contenant de l'acide phosphorique. Les déplacements chimiques sont donnés en part par million (ppm) sur l'échelle delta (δ). Les abréviations s, sl, d, dd, t, td, q et m désignent respectivement les multiplications suivantes : singulet,

singulet large, doublet, doublet de doublet, triplet, triplet dédoublé, quadruplet et multiplet. Les constantes de couplage (J) sont indiquées en hertz (Hz).

Les spectres infrarouge (IR) ont été enregistrés sur un appareil SHIMADZU FTIR-8400S. Les produits ont été analysés sur un cristal de sélénium de zinc.

Les spectres de masse ont été réalisés sur un appareil Finnigan-LCQ au laboratoire de spectrométrie de masse de l'UCL. Le mode utilisé est l'ionisation par electrospray (ESI). Les études de complexation ont aussi été effectuées sur cet appareil.

Les spectres de masse haute résolution ont été réalisés au service de spectrométrie de masse de l'université Mons-Hainaut dans le laboratoire du Pr. Flammang.

I.2.Solvants et réactifs

Les réactifs commerciaux ont été fournis par Acros, Aldrich, Fluka , Sigma et Balsem. Les solvants anhydres tels que le tétrahydrofurane, le dichlorométhane, l'acétonitrile et le toluène proviennent de la société Fluka et le méthanol anhydre est obtenu par la société Roc.

Toutes les expériences décrites nécessitant des conditions anhydres ou inertes, ont été effectuées avec de la verrerie préalablement flambée sous le vide d'une pompe à palette et ensuite mise sous atmosphère d'argon.

I.3.Purification des produits

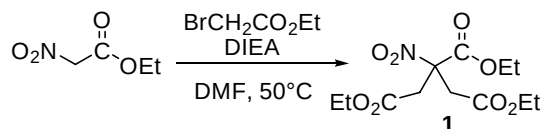
Les séparations par chromatographie sur gel de silice ont été effectuées à pression atmosphérique ou avec une pompe pour chromatographie-éclair.

La silice utilisée comme phase stationnaire est de la silice 60 (70-230 ou 230-400 Mesh ASTM).

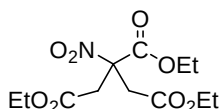
Les chromatographies sur couche minces (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice commerciale (Merck 60 F254) et révélés à l'UV à 254 nm et à l'aide d'une solution de permanganate de potassium ou d'acide phosphomolybdique. Les petites quantités de produit (révélant à l'UV) ont été purifiées par chromatographie préparative sur couches minces (grande plaque de verre recouverte de silice Merck 60 F254).

II. Synthèse de dérivés aminés du citrate et de l'iso-citrate

II.1. Synthèse du -2-nitropropane-1,2,3-tricarboxylate de triéthyle **1**



A une solution de nitroacétate d'éthyle (1g, 7,52 mmol) dans la diméthylformamide ($v=5$ ml) sont ajoutés 2,05 équivalents de bromoacétate d'éthyle ($v=1,8$ ml). Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C et 2,05 équivalents de diisopropyléthylamine sont ajoutés goutte à goutte (2,75 ml). Le milieu réactionnel est chauffé à 50°C pendant 24h puis dilué avec de l'éther et lavé successivement avec une solution d'HCl 1N, une solution saturée de carbonate de sodium, et de l'eau distillée. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et filtrée. Une huile jaune est obtenue après concentration à l'évaporateur rotatif et purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : Hexane/ AcOEt : 7/3). Une huile jaune est obtenue avec un rendement de 37%.



Registry Number : 156122-26-8

Référence : Diez-Barra E., de la Hoz A., Moreno A., *Synth.Comm.* **1994**, 24, 13, 1817-1821.

Formule brute : C₁₂H₁₉NO₈

Masse Molaire (g/mole) : 305,28

Aspect physique : huile jaune

Rf (Hexane/ AcOEt : 7/3) : 0,33

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) :

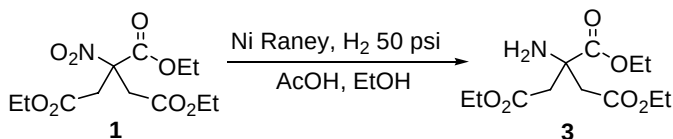
δ (ppm) : 1,28 (t, 9H, CH₃, J=7,1 Hz,) ; 3,42 (d, 2H, CH_{2A}, J=17,3Hz) ; 3,55 (d, 2H, J=17,3Hz, CH_{2B}) ; 4,18 (q, 4H, CH₂, J=7,12 Hz) ; 4,31 (q, 2H, CH₂, J=7,08 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) :

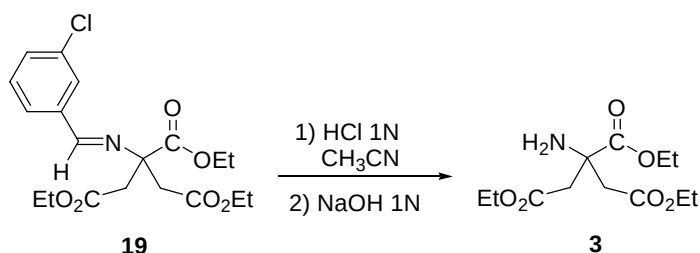
δ (ppm) : 13,30 (CH₃) ; 13,30 (CH₃) ; 38,16 (CH₂) ; 61,14 (CH₂), 63,3 (CH₂) ; 89,49 (Cq) ; 164,45 (CO₂Et) ; 168,00 (CO₂Et)

Masse (ESI) : 259,9 (M+H-NO₂) ; 214,9 (M+H-NO₂-OEt)

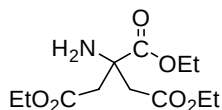
II.2.Synthèse du 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de triéthyle **3**



Méthode A : Dans un récipient adapté à l'hydrogénateur, on dissout le composé nitré **1** (450 mg, 1,33 mmol) dans l'éthanol (4 ml). Le Ni Raney (332 mg) et l'acide acétique (332 μ l) sont ensuite ajoutés. Le récipient est ensuite agité sous atmosphère d'hydrogène à une pression de 50 psi pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est filtré sur de la célite et concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans de l'acétate d'éthyle et lavé avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée puis avec une solution de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium puis concentré à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir une huile translucide. Le rendement de la réaction est de 52%.



Méthode B : L'imine **19** (857 mg, 2 mmol) est dissoute dans 2 ml d'acétonitrile et 1,5 équivalents d'HCl 1N sont ajoutés (3,2 ml). Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à température ambiante puis le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'éther. La phase étherée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Pendant ce temps, la phase aqueuse est neutralisée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et basifiée avec une solution de NaOH 1N (pH 10). La phase aqueuse est extraite cinq fois avec du dichlorométhane. La phase chlorée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir une huile jaune. Cette huile est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 -EtOAc, 1:1). L'amine est obtenue avec un rendement de 50%.



Formule brute : $C_{12}H_{21}NO_6$

Masse Molaire (g/mole) : 275,14

Aspect physique : huile jaune

R_F (CH₂Cl₂/EtOAc : 1/1)= 0,5

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) :

δ (ppm) : 1,30 (t, 9H, J = 7,13 Hz, CH₃) ; 2,56 (s, 2H, NH₂) ; 2,69 (d, 2H, J = 16,0Hz, CH_{2A}) ; 2,85 (d, 2H, J = 16,0Hz, CH_{2B}) ; 4.15 (q, 6H, J = 7,13 Hz, CH₂)

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz) :

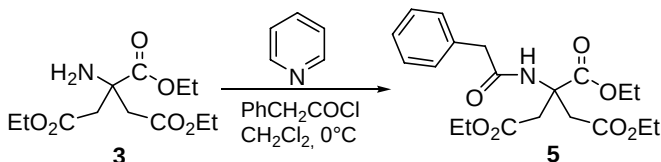
δ (ppm) : 14,3 (CH₃) 43,6 (CH₂), 55,8 (Cq), 61,0 (CH₂), 61,9 (CH₂), 170,5 (CO₂Et), 175,0 (CO₂Et)

Masse (ESI) : 276,16 (M+H)

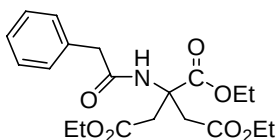
HRMS (ESI) : 276,1450 (calculé pour $C_{12}H_{21}NO_6 + 1$: 276,1447)

IR (cm⁻¹) : 3386 (NH₂), 1732 (CO₂Et, C=O), 1600 (NH₂), 1180 (CO₂Et, C-O-C)

II.3.Synthèse du 2-(2-phénylacetamido)aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de triéthyle **5**



A l'amine (185 mg, 0,67 mmol) en solution dans 3 ml de dichlorométhane anhydre sont ajoutés 1,2 équivalents de pyridine (55 μ l) à 0°C puis 1,2 équivalents de chlorure d'acyle (131 μ l). Le milieu réactionnel est agité pendant 5 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors lavé avec une solution d'HCl 3,3 M (10 ml), puis avec une solution de carbonate de sodium 10% (10 ml) et avec une solution saturée de chlorure de sodium (10 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous pression réduite. L'huile jaune est obtenue après purification sur gel de silice (éluant : Hexane/Acétate d'éthyle : 6/4) avec un rendement de 60%.



Formule brute : $C_{20}H_{27}NO_7$

Masse Molaire (g/mole) : 393,43

Aspect physique : huile jaune

Rf (Hexane/ AcOEt : 6/4) : 0,39

RMN ^1H ($CDCl_3$, 200 MHz) :

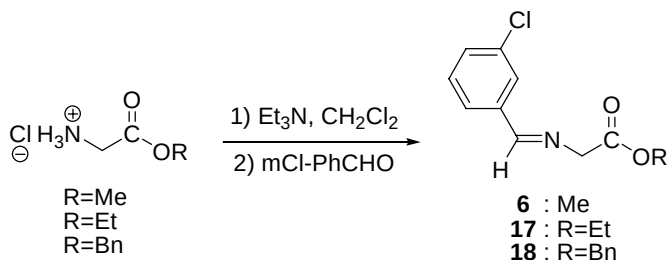
δ (ppm) : 1,17 (t, 6H, CH_3 , $J=7,1$ Hz) ; 1,24 (t, 3H, CH_3 , $J=7,1$ Hz) ; 2,83 (d, 2H, CH_2 , $J=15,5$ Hz) ; 3,54 (s, 2H, CH_2) ; 3,62 (d, 2H, CH_2 , $J=15,5$ Hz) ; 4,02 (q, 4H, CH_2 , $J=7,1$ Hz) ; 4,23 (q, 2H, CH_2 , $J=7,1$ Hz) ; 6,88 (sl, 1H, NH) ; 7,23-7,34 (m, 5H, Ar)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz) :

δ (ppm) : 13,79 (CH_3) ; 14,00 (CH_3) ; 39,73 (CH_2) ; 44,30 (CH_2 -Ph) ; 59,00 (Cq) ; 60,62 (CH_2) ; 62,34 (CH_2) ; 127,16 (CHAr) ; 128,75 (CHAr) ;

129,33 (CHAR) ; 134,60 (CHAR) ; 169,21 (NHCO) ; 170,48 (CO₂Et) ; 171,02 (CO₂Et)

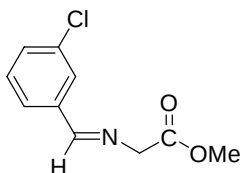
II.4.Synthèse des imines



Procédure générale :

A une suspension d'amine hydrochlorée (1g) dans le dichlorométhane (10 ml) sont ajoutés 1,15 équivalents de triéthylamine dissous dans 2 ml de dichlorométhane. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 6 heures. Ensuite 1,5g de sulfate de magnésium sont ajoutés et 0,95 équivalents de 3-chlorobenzaldéhyde sont additionnés goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est filtré. Le filtrat est lavé avec une solution saturée de chlorure de sodium, puis séché sur sulfate de magnésium. La phase organique est ensuite filtrée et concentrée sous pression réduite. Une huile jaune est obtenue après séchage pendant une journée sur la rampe à vide. Le produit doit être conservé au congélateur et solidifie à froid dans le cas 1 et 3. Il est utilisé tel quel dans la réaction suivante.

- *N*-3-chlorobenzylideneglycinate de méthyle **6**



Rendement : 90%

Registry Number : 866464-53-1

Référence : Gao W., Zhang X., Raghunath M., *Org. Lett.* **2005**, 7, 19, 4241-4244.

Formule brute : C₁₀H₁₀ClNO₂

Masse Molaire (g/mole) : 211,64

Aspect physique : solide blanc

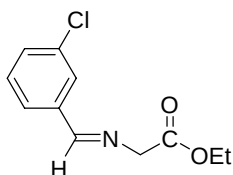
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) :

δ (ppm) : 3,79 (s, 3H, CH₃) ; 4,43 (s, 2H, CH₂) ; 7,34-7,45 (m, 2H, Ar) ; 7,63 (d, 1H, Ar, J=7,2 Hz) ; 7,83 (s, 1H, Ar) ; 8,26 (s, 1H, NCH)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) :

δ (ppm) : 52,43 (CH₃) ; 62,01 (CH₂) ; 127,04 (CHAr) ; 128,29 (CHAr) ; 130,08 (CHAr) ; 131,42 (CHAr) ; 135,06 (Car) ; 137,44 (Car) ; 164,14 (NCH) ; 170,48 (CO₂Me)

- N-3-chlorobenzylideneglycinate d'éthyle **17**



Rendement : 90%

Formule brute : C₁₁H₁₂ClNO₂

Masse Molaire (g/mole) : 225,67

Aspect physique : huile jaune

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) :

δ (ppm) : 1,32 (t, 3H, CH_3 , $J=7,14$ Hz) ; 4,26 (q, 2H, CH_2 , $J=7,14$ Hz) ; 4,41 (s, 2H, CH_2) ; 7,33-7,45 (m, 2H, Ar) ; 7,63 (d, 1H, Ar, $J=7,5$ Hz) ; 7,82(s, 1H, Ar) ; 8,25 (s,1H, NCH)

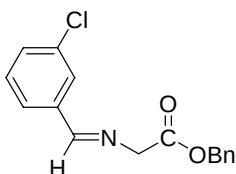
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) :

δ (ppm) : 14,36 (CH_3) ; 61,35 (CH_2) ; 62,07 (CH_2) ; 127,00 (CHAr) ; 128,23 (CHAr) ; 130,02 (CHAr) ; 131,31 (CHAr) ; 134,98 (CAr) ; 137,47 (CAr) ; 164,03 (NCH) ; 170,01 (CO_2Et)

Masse (ESI) : 226,22 (M+H) ; 248,14 (M+Na)

HRMS (ESI) : 226,0645 (calculé pour $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2+\text{H}$: 226,0635)

- *N*-3-chlorobenzylideneglycinate de benzyle **18**



Rendement : 90%

Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2$

Masse Molaire (g/mole) : 287,74

Aspect physique : solide blanc

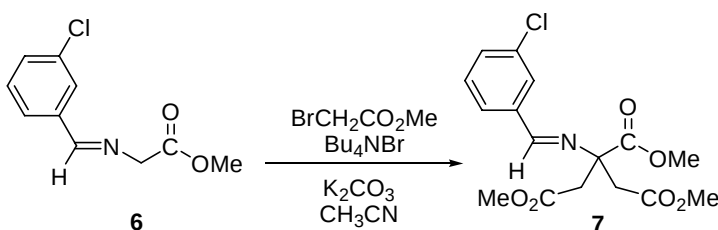
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) : 4,47 (s, 2H, CH_2) ; 5,24 (s, 2H, CH_2) ; 7,34-7,45 (m, 7H, Ar) ; 7,63 (d, 1H, Ar, $J=7,5$ Hz) ; 7,82 (s,1H,Ar) ; 8,26 (s,1H, NCH)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) : 61,93 (CH_2) ; 67,06 (CH_2) ; 127,02 (CHAr) ; 128,31 (CHAr) ; 128,60 (CHAr) ; 128,61 (CHAr) ; 128,79 (CHAr) ; 130,06 (CHAr) ; 131,41 (CHAr) ; 135,04 (CHAr) ; 135,69 (CAr) ; 137,45 (CAr) ; 164,25 (NCH) ; 169,91 (CO_2Bn)

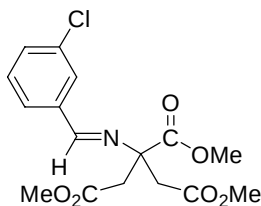
Masse (ESI) : 288,19 ($\text{M}+\text{H}$) ; 310,11 ($\text{M}+\text{Na}$)

HRMS (ESI) : 288,0781 (calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2+\text{H}$: 288,0791)

II.5.Synthèse de 2-(3-chlorobenzylideneamino)propane-1,2,3-tricarboxylate de triméthyle



A une solution d'imine (environ 1 mmol) dans l'acétonitrile fraîchement distillé (environ 2 ml) sont additionnés 2,2 équivalents d'acétate de bromométhyle (270 μl), 0,1 équivalent de bromure de tétrabutylammonium (40 mg) et 2,2 équivalents de carbonate de potassium (370 mg). Le mélange hétérogène est chauffé à 50 °C pendant 27 heures. Le milieu réactionnel est filtré et concentré sous pression réduite. Une huile brune est obtenue après séchage sur la rampe à vide. Ce produit est à conserver au frigo (0°C, délais maximum 1 semaine). Il est utilisé tel quel dans la réaction suivante.



Formule brute : $C_{16}H_{18}ClNO_6$

Masse Molaire (g/mole) : 355,74

Aspect physique : huile brune

Rf (Hexane/ AcOEt : 7/3) : 0,46

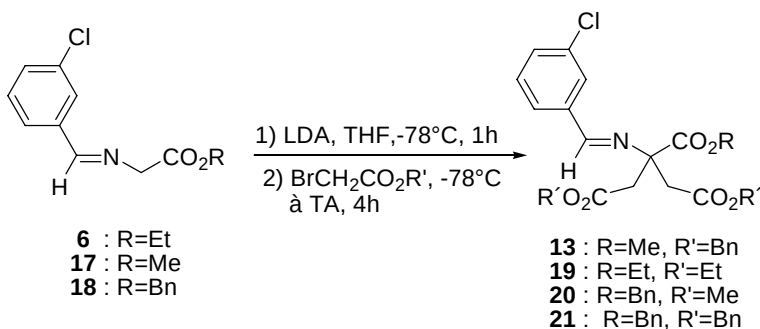
RMN ^1H ($CDCl_3$, 200 MHz) :

δ (ppm) : 3,13 (d, 2H, CH_2 , $J=15,92$ Hz); 3,31 (d, 2H, CH_2 , $J=15,92$ Hz); 3,68 (s, 6H, Me); 3,79 (s, 3H, Me); 7,25-7,5 (m, 2H, Ar); 7,52-7,62 (m, 1H, Ar); 7,72-7,8 (s, 1H, Ar); 8,25 (s, 1H, NCH)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz) :

δ (ppm) : 40,43 (CH_2) ; 51,70 (CH_3); 52,30 (CH_3) ; 58,00 (Cq) ; 127,00 (CHAr) ; 127,99 (CHAr) ; 129,80 (CHAr) ; 131,23 (CHAr) ; 134,92 (CAr) ; 138,00 (CAr) ; 144,00 (CAr) ; 159,58 (N=CH) ; 170,76 (CO_2Me)

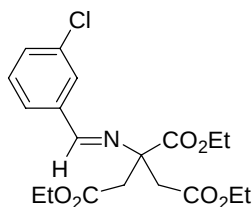
II.6.Dialkylation des imines : procédure améliorée



A l'imine (2,5 mmol) en solution dans le tétrahydrofurane (7 ml) sont ajoutés 2,1 équivalents de LDA (solution commerciale 2M dans l'hexane) goutte à goutte à $-78^\circ C$. Le milieu réactionnel est agité une heure à $-78^\circ C$, puis le bromo acétate est ajouté goutte à goutte (2 équivalents). Le milieu réactionnel est encore agité deux heures à $-78^\circ C$ puis on laisse remonter la

température du milieu. La réaction est suivie par CCM. Elle est terminée après quatre à cinq heures. Après addition d'eau, le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu huileux est dissous dans l'éther et la phase organique est lavée successivement avec une solution de chlorure d'ammonium et de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir une huile brune.

- 2-(3-chlorobenzylideneamino)propane-1,2,3-tricarboxylate de triéthyle **19**



Rendement : quantitatif

Formule brute : $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClNO}_6$

Masse Molaire (g/mole) : 397,85

Aspect physique : huile brune

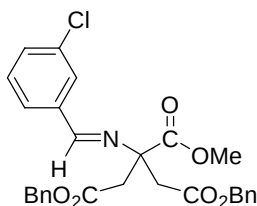
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,24 (t, 6H, CH_3 , $J=7,14\text{Hz}$) ; 1,29 (t, 3H, CH_3 , $J=7,16\text{Hz}$) ; 3,13 (d, 2H, CH_2 , $J=15,79\text{ Hz}$) ; 3,29 (d, 2H, CH_2 , $J=15,77\text{ Hz}$) ; 4,14 (q, 4H, CH_2 , $J=7,10\text{ Hz}$) ; 4,26 (q, 2H, CH_2 , $J=7,14\text{ Hz}$) ; 7,34 (dd, 1H, Ar, $J=8\text{ Hz}$ et $J=7,6\text{ Hz}$) ; 7,40 (ddd, 1H, Ar, $J=8\text{ Hz}$, $J=2,17\text{ Hz}$, $J=1,14\text{ Hz}$) ; 7,57 (dt, 1H, Ar, $J=7,6\text{ Hz}$ et $J=1,3\text{ Hz}$) ; 7,76 (s, 1H, Ar) ; 8,28 (s, 1H, NCH)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) :

δ (ppm) : 14,37 (CH_3) ; 40,83 (CH_2) ; 60,79 (CH_2) ; 61,94 (CH_2) ; 67,86 (Cq) ; 127,24 (CHAr) ; 128,19 (CHAr) ; 130,02 (CHAr) ; 131,39 (CHAr) ; 135,00 (CAr) ; 137,85 (CAr) ; 159,63 ($\text{N}=\text{CH}$) ; 170,65 (CO_2Bn) ; 171,00 (CO_2Me)

- 2-(3-chlorobenzylideneamino)propane-1,2,3-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle-2-méthyle **13**



Rendement : quantitatif

Formule brute : $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{ClNO}_6$

Masse Molaire (g/mole) : 507,96

Aspect physique : huile brune

Rf (Hexane/ AcOEt : 8/2) = 0,35

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) :

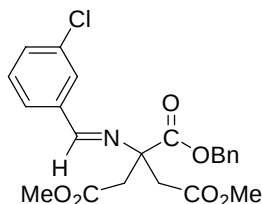
δ (ppm) : 3,18 (d, 2H, CH_2 , $J=15,82$ Hz); 3,36 (d, 2H, CH_2 , $J=15,82$ Hz); 3,68 (s, 6H, CH_3) ; 5,10 (s, 4H, CH_2); 7,27-7,46 (m, 2H, Ar); 7,87 (s, 1H, Ar) ; 8,20 (s, 1H, NCH)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) :

δ (ppm) : 40,94 (CH_2) ; 52,89 (CH_3); 59,00 (Cq) ; 66,68 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 127,23 (CHAr) ; 128,33 (CHAr) ; 128,60 (CHAr) ; 128,80 (CHAr) ; 130,00

(CHAr) ; 131,75 (CHAr) ; 134,85(CAr) ; 135,85 (CAr) ; 138,33 (CAr) ; 159,97 (N=CH) ; 170,34 (CO₂Bn) ; 171,75 (CO₂Me)

- 2-(3-chlorobenzylideneamino)propane-1,2,3-tricarboxylate de 2-benzyle-1,3-diméthyle **20**



Rendement : 75%

Formule brute : C₂₂H₂₂ClNO₆

Masse Molaire (g/mole) : 431,87

Aspect physique : huile brune

R_f (Hexane-EtOAc : 7/3)= 0,47

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) :

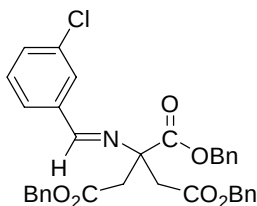
δ (ppm) : 3,17 (d, 2H, CH₂, J=15,95 Hz); 3,33 (d, 2H, CH₂, J=15,95 Hz); 3,64 (s, 6H, CH₃) ; 5,24 (s, 2H, CH₂); 7,13-7,43 (m, 2H, Ar); 7,47 (d, 1H, Ar, J=7,5 Hz); 7,64 (s, 1H, Ar) ; 8,11 (s, 1H, NCH)

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) :

δ (ppm) : 40,35 (CH₂) ; 51,88 (CH₃) ; 67,60 (CH₂-Ph) ; 67,90 (Cq) ; 127,12 (CHAr) ; 128,25 (CHAr) ; 128,70 (CHAr) ; 128,77 (CHAr) 129,97 (CHAr) ; 131,42 (CHAr) ; 134,92 (CAr) ; 135,53 (CAr) ; 137,59 (CAr) ; 159,73 (N=CH) ; 170,91 (CO₂Bn) ; 170,98 (CO₂Me)

Masse (ESI) : 432,19 (M+H) ; 454,19 (M+Na)

- 2-(3-chlorobenzylideneamino)propane-1,2,3-tricarboxylate de tribenzyle **21**



Rendement : 77%

Formule brute : C₂₂H₂₂ClNO₆

Masse Molaire (g/mole) : 431,87

Aspect physique : huile brune

Rf (Hexane-EtOAc : 8/2) = 0,64

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) :

δ (ppm) : 3,28 (d, 2H, CH₂, J=15,85 Hz); 3,38 (d, 2H, CH₂, J=15,85 Hz); 5,07 (s, 4H, CH₂); 5,22 (s, 2H, CH₂); 7,13-7,41 (m, 14H, Ar); 7,57 (s, 1H, Ar); 8,08 (s, 1H, NCH)

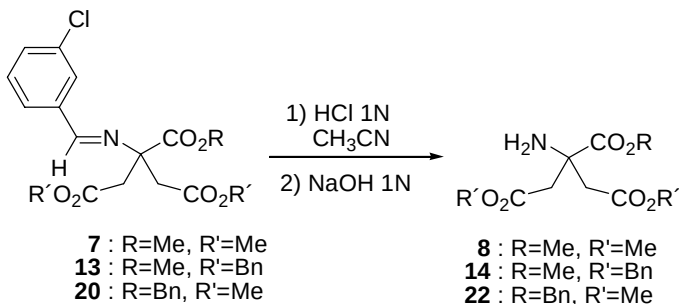
RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) :

δ (ppm) : 40,16 (CH₂) ; 57,92 (Cq) ; 66,64 (CH₂-Ph) ; 67,60 (CH₂-Ph) ; 127,17 (CHAr) ; 127,83 (CHAr) ; 128,42 (CHAr) ; 128,70 (CHAr) ; 129,92 (CHAr) ; 131,37 (CHAr) ; 134,85 (CAr) ; 135,49 (CAr) ; 135, 49 (CAr); 135,76 (CAr) ; 137,52 (CAr); 159,93 (N=CH) ; 170, 28 (CO₂Bn) ; 170,73 (CO₂Bn)

Masse (ESI) : 584,13 (M+H) ; 606,20 (M+Na)

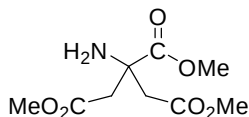
HRMS (ESI) : 606,1649 (calculé pour C₂₂H₂₂ClNO₆+Na : 606,1659)

II.7. Hydrolyse des imines : Procédure générale



L'imine (1,5 mmol) est dissoute dans le minimum d'acétonitrile et 1,5 équivalents d'HCl 1N sont ajoutés (2,3 ml). Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à température ambiante puis le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'éther. La phase étherée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Pendant ce temps, la phase aqueuse est neutralisée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et basifiée avec une solution de NaOH 1N (pH 10). La phase aqueuse est extraite cinq fois avec du dichlorométhane. La phase chlorée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir une huile jaune. Cette huile est purifiée par chromatographie sur gel de silice.

- 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de triméthyle **8**



Rendement : 50%

Formule brute : $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_6$

Masse Molaire (g/mole) : 233,22

Aspect physique : huile jaune

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) :

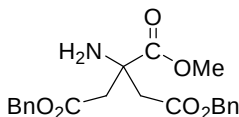
δ (ppm) : 2,35 (sl, 2H, NH_2) ; 2,69 (d, 2H, CH_2 , $J=15,74$ Hz); 2,88 (d, 2H, CH_2 , $J=15,76$ Hz); 3,69 (s, 6H, CH_3); 3,75 (s, 3H, CH_3)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) :

δ (ppm) : 43,29 (CH_2) ; 51,70 (CH_3); 52,60 (CH_3) ; 57,60 (Cq) ; 170,66 (CO_2Me) ; 174,98 (CO_2Me)

Masse (ESI) : 234,00 (M+H)

- 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle-2-méthyle
14



Rendement : 60%

Formule brute : $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_6$

Masse Molaire (g/mole) : 385,41

Aspect physique : huile jaune

R_F = 0,6 (Hexane-EtOAc, 3:7)

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) :

δ (ppm) : 2,0 (s, 2H, NH_2), 2,73 (d, 2H, $J = 15,9\text{Hz}$, $\text{CH}_{2\text{A}}$), 2,92 (d, 2H, $J = 15,9\text{Hz}$, $\text{CH}_{2\text{B}}$), 3,60 (s, 3H, CH_3), 5,11 (s, 4H, CH_2Ph), 7,34 (m, 10 H, Ph);

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz) :

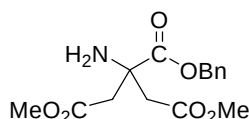
δ (ppm) : 43,8 (CH_2), 52,8 (CH_3), 57,9 (Cq), 66,9 (CH_2), 128,5 (CH_{Ar}), 135,6 (C_{Ar}), 170,3 (CO_2Bn), 175,0 (CO_2Me)

Masse (ESI) : 386,14 (M+H) ; 408,15 (M+Na)

HRMS (ESI) : 386,1596 (calculé pour $C_{21}H_{23}NO_6 + 1$: 386,1604)

IR (cm^{-1}) : 3386 (NH_2), 2950 (CHAr), 1732 (CO_2Me et CO_2Bn , C=O), 1604 (Ar, C=C), 1157 (CO_2Me et CO_2Bn , C-O-C)

- 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de 2-benzyle-1,3-diméthyle
22



Rendement : 40%

Formule brute : $C_{15}H_{19}NO_6$

Masse Molaire (g/mole) : 309,31

Aspect physique : huile jaune

$R_F = 0,44$ (CH_2Cl_2 -EtOAc, 2:8)

RMN ^1H ($CDCl_3$, 250 MHz) :

δ (ppm) : 2,60 (s, 2H, NH_2), 2,79 (d, 2H, $J = 15,9Hz$, CH_{2A}), 2,91 (d, 2H, $J = 15,9Hz$, CH_{2B}), 3,61 (s, 6H, CH_3), 5,17 (s, 2H, CH_2Ph), 7,36 (m, 5H, Ph)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,5 MHz) :

δ (ppm) : 43,4 (CH_2), 51,9 (CH_3), 57,8 (C), 67,7 (CH_2), 128,5 (CHAr), 135,6 (CAr), 170,9 (CO_2Me), 174,6(CO_2Bn)

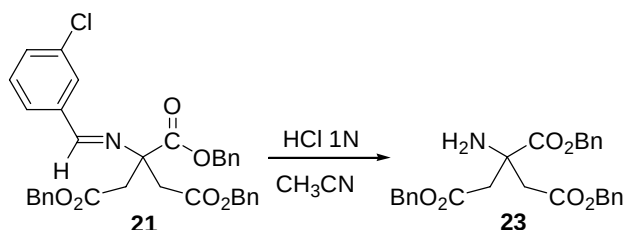
Masse (CH_4 - NO_2) : 310,3 (M+H)

HRMS (ESI) : 310,1277 (calculé pour $C_{15}H_{19}NO_6 + 1$: 310,1291)

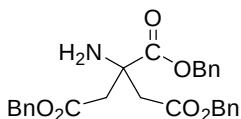
IR (cm⁻¹) : 3405 (NH₂), 2954 (CHAr), 1732 (CO₂Me et CO₂Bn, C=O), 1604 (Ar, C=C), 1168 (CO₂Me et CO₂Bn, C-O-C)

II.8.Synthèse de 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de tribenzyle

23



L'imine (460 mg, 0,79 mmol) est dissoute dans 1 ml d'acétonitrile et 1,5 équivalents d'HCl 1N sont ajoutés (1,2 ml). Le milieu réactionnel est agité pendant une nuit à température ambiante puis le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'éther. La phase étherée est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Cette huile brune est purifiée par chromatographie sur gel de silice (gradient d'éluant : Hexane/AcOEt : 7/3 puis 5/5). L'amine est obtenue avec un rendement de 52%.



Formule brute : C₂₇H₂₇NO₆

Masse Molaire (g/mole) : 461,51

Aspect physique : huile brune

R_F (Hexane/AcOEt : 7/3) = 0,15

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) :

δ (ppm) : 2,42 (sl, 2H, NH_2) ; 2,76 (d, 2H, CH_2 , $J=15,80$ Hz); 2,93 (d, 2H, CH_2 , $J=15,80$ Hz); 5,06 (s, 6H, CH_2); 7,27-7,37 (m, 15H, Ar)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) :

δ (ppm) : 43,66 (CH_2) ; 57,94 (Cq) ; 66,87 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 67,68 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 128,55 (CHAr) ; 128,72 (CHAr) ; 128,78 (CHAr) ; 135,57 (CAr) ; 170,30 (CO_2Bn) ; 174,56 (CO_2Bn)

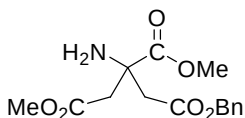
Masse (ESI) : 462,19 (M+H) ; 484,22 (M+Na) ; 944,80 (2M+Na)

HRMS (ESI) : 462,1914 (calculé pour $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{NO}_6\text{+H}$: 462,1917)

IR (cm^{-1}) : 3352 (NH_2), 2962 (CHAr), 1736 (CO_2Bn , C=O), 1596 (NH_2), 1164 (CO_2Bn , C-O-C)

II.9. Produits secondaires isolés lors des réactions d'hydrolyse

- 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de 1-benzyle-2,3-diméthyle
24



Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_6$

Masse Molaire (g/mole) : 309,12

Aspect physique : huile jaune

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) :

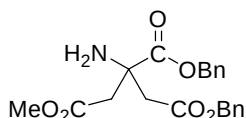
δ (ppm) : 1,80 (s, 2H, NH_2), 2,65-2,95 (m, 4H, CH_2), 3,67 (s, 6H, CH_3), 5,12 (s, 2H, CH_2Ph), 7,34 (m, 5H, Ph)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,5 MHz) :

δ (ppm) : 43,62 (CH_2), 52,03 (CH_3), 52,86 (CH_3), 57,82 (Cq), 66,86 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 128,74 (CHAr), 128,9 (CHAr), 135,56 (CAr), 170,33 (CO_2Me), 170,91 (CO_2Bn), 175,24 (CO_2Me)

Masse (ESI) : 310,20 (M+H) ; 332,20 (M+Na)

- 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de 1,2-dibenzyle-3-méthyle
25



Formule brute : $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_6$

Masse Molaire (g/mole) : 385,15

Aspect physique : huile jaune

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) :

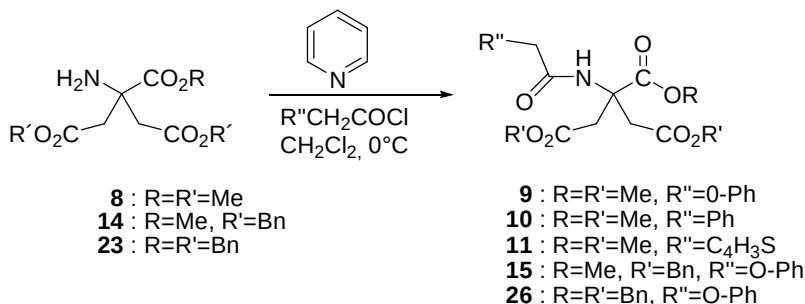
δ (ppm) : 2,27 (sl, 2H, NH_2) ; 2,68-2,97 (m, 4H, CH_2) ; 3,6 (s, 3H, CH_3), 5,06 (s, 4H, CH_2Ph) ; 7,31-7,36 (m, 10H, Ph)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) :

δ (ppm) : 43,47 (CH_2) ; 51,93 (CH_3) ; 57,80 (Cq) ; 66,79 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 67,59 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 128,48 (CHAr) ; 129,70 (CHAr) ; 135,52 (CAr) ; 170,26 (CO_2Bn) ; 170,77 (CO_2Bn) ; 174,55 (CO_2Me)

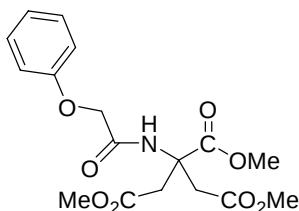
Masse (ESI) : 386,22 (M+H) ; 408,13 (M+Na)

II.10. Acylation des amines : Procédure générale



A l'amine en solution dans le dichlorométhane anhydre (concentration : 0,210g / 2 ml) sont ajoutés 1,2 équivalents de pyridine à 0°C puis 1,2 équivalents de chlorure d'acide. Le milieu réactionnel est agité pendant 5 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors lavé avec une solution d'HCl 3,3 M (10 ml), puis avec une solution de carbonate de sodium 10% (10 ml) et avec une solution saturée de chlorure de sodium (10 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous pression réduite. L'huile jaune est purifiée sur gel de silice (éluant : Hexane/Acétate d'éthyle : 6/4).

- 2-(2-phénoxyacetamido)aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de Triméthyle **9**



Rendement : 60%

Formule brute : $C_{17}H_{21}NO_8$

Masse Molaire (g/mole) : 367,35

Aspect physique : solide blanc

R_F (Hexane/Acétate d'éthyle : 6/4) = 0,22

Point de fusion (°C) : 86,9

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) :

δ (ppm) : 2,95 (d, 2H, CH₂, J=15,56 Hz); 3,58 (s, 6H, CH₃); 3,64 (d, 2H, CH₂, J=15,6 Hz); 3,84 (s, 3H, CH₃); 4,44 (s, 2H, CH₂); 6,9-7,05 (m, 3H, Ar); 7,25-7,4 (m, 2H, Ar); 8(sl, 1H, NH)

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) :

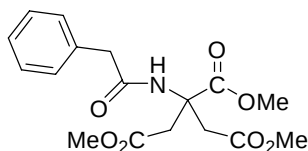
δ (ppm) : 39,85 (CH₂) ; 51,89 (CH₃) ; 53,43 (CH₃) ; 59,12 (Cq) ; 67,76 (CH₂-OPh) ; 115,13 (CHAr O-Ph) ; 122,25 (CHAr O-Ph) ; 129,80 (CHAr) ; 157,30 (CAr O-Ph); 168,29 (CO₂Me) ; 169,69 (CO₂Me) ; 171,15 (NHCO)

Masse (ESI) : 368,15 (M+H) ; 390,20 (M+Na) ; 756,74 (2M+Na)

HRMS (ESI) : 390,1169 (calculé pour $C_{17}H_{21}NO_8+Na$: 390,1165)

IR (cm⁻¹) : 3386 (NH), 2954 (CHAr), 1739 (CO₂Me, C=O), 1685 (NHCO), 1176 (CO₂Me, C-O-C)

- 2-(2-phénylacétamido)aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de triméthyle **10**



Rendement : 60%

Formule brute : $C_{17}H_{21}NO_7$

Masse Molaire (g/mole) : 351,35

Aspect physique : solide jaune

R_F (Hexane/Acétate d'éthyle : 6/4) = 0,25

Point de fusion (°C) : 65,8

RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) :

δ (ppm) : 2,85 (d, 2H, CH_2 , $J=15,54$ Hz); 3,53 (s, 2H, CH_2); 3,56 (s, 6H, Me); 3,63 (d, 2H, CH_2 , $J=15,60$ Hz); 3,79 (s, 3H, Me); 6,87 (sl, 1H, NH); 7,23-7,4 (m, 5H, Ar)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) :

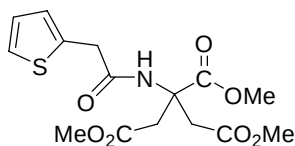
δ (ppm) : 39,68 (CH_2) ; 44,52 (CH_2 -Ph) ; 52,00 (CH_3) ; 53,56 (CH_3) ; 59,20 (Cq) ; 127,46 (CHAr) ; 129,03 (CHAr) ; 129,39 (CHAr) ; 134,75 (CHAr) ; 169,98 (CO_2Me) ; 170,96 (CO_2Me) ; 171,84 (NHCO)

Masse (ESI) : 352,17 (M+H) ; 374,22 (M+Na) ; 724,70 (2M+Na)

HRMS (ESI) : 374,1228 (calculé pour $C_{17}H_{21}NO_7+Na$: 374,1216)

IR (cm^{-1}) : 3375 (NH), 3028 (CHAr), 1736 (CO_2Me , C=O), 1675 (NHCO), 1176 (CO_2Me , C-O-C)

- 2-(2-thiophenacetamido)aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de triméthyle **11**



Rendement : 60%

Formule brute : C₁₅H₁₉NO₇S

Masse Molaire (g/mole) : 357,38

Aspect physique : solide brun

Rf: 0,28 (Hexane/Acétate d'éthyle : 6/4)

Point de fusion (°C) : 76,2

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) :

δ (ppm) : 2,87 (d, 2H, CH₂, J=15,57 Hz); 3,61 (s, 6H, Me) ; 3,64 (d, 2H, CH₂, J=15,60 Hz) ; 3,75 (s, 2H, CH₂) ; 3,80 (s, 3H, Me); 6,85-7,00 (m, 3H, Ar + NH); 7,24-7,26 (m, 1H, Ar)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) :

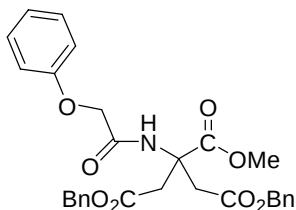
δ (ppm) : 38,29 (CH₂-Ar) ; 39,65 (CH₂); 52,10 (CH₃) ; 53,63 (CH₃) ; 59,25 (Cq) ; 125,67 (CHAr) ; 127,40 (CHAr) ; 127,43 (CHAr) ; 135,84 (CAr) ; 169,76 (CO₂Me) ; 169,96 (CO₂Me) ; 171,78 (NHCO)

Masse (ESI) : 358,15 (M+H) ; 380,22 (M+Na) ; 736,68 (2M+Na)

HRMS (ESI) : 358,0967 (calculé pour C₁₅H₁₉NO₇S+H : 358,0960)

IR (cm⁻¹) : 3371 (NH), 2954 (CHAr), 1736 (CO₂Me, C=O), 1674 (NHCO), 1176 (CO₂Me, C-O-C)

- 2-(2-phénoxyacetamido)aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de 1,3-dibenzyle-2-méthyle **15**



Rendement: 60%

Formule brute : C₂₉H₂₉NO₈

Masse Molaire (g/mole) : 519,54

Aspect physique : huile translucide

R_F (Hexane/Acétate d'éthyle : 7/3) = 0,34

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) :

δ (ppm) : 2,98 (d, 2H, CH₂, J=15,4 Hz); 3,66 (s, 3H, CH₃) ; 3,71 (d, 2H, CH₂, J=15,4 Hz) ; 4,24 (s, 2H, CH₂-OPh) ; 4,98 (d, 2H, CH₂, J=12,2 Hz) ; 5,05 (d, 2H, CH₂, J=12,2 Hz) ; 6,89 (d, 2H, CHAr, J=7,8 Hz) ; 7,03 (t, 1H, CHAr, J=7,35 Hz) ; 7,24-7,33 (m, 12H, Ar) ; 7,94 (sl, 1H, NH)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) :

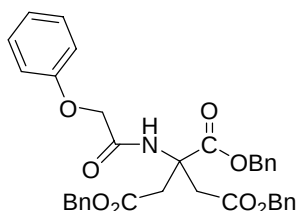
δ (ppm) : 40,22 (CH₂) ; 53,51 (CH₃) ; 59,27 (Cq) ; 66,96 (CH₂-Ph) ; 67,37 (CH₂-OPh) ; 115,06 (CHAr O-Ph) ; 122,24 (CHAr O-Ph) ; 128,58 (CHAr) ; 128,62 (CHAr) ; 128,73 (CHAr) ; 129,87 (CHAr O-Ph) ; 135,51 (CAr) ; 157,35 (CAr O-Ph); 168,21 (CO₂Me) ; 169,14 (CO₂Bn) ; 171,54 (NHCO)

Masse (ESI) : 520,01 (M+H) ; 541,99 (M+Na) ; 1060,87 (2M+Na)

HRMS (ESI) : 542,1782 (calculé pour $C_{29}H_{29}NO_8+Na$: 542,1791)

IR (cm^{-1}) : 3386 (NH), 2954 (CHAr), 1732 (CO_2Me et CO_2Bn , C=O), 1685 (NHCO), 1174 (CO_2Me et CO_2Bn , C-O-C)

- 2-(2-phénoxyacetamido)aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de tribenzyle **26**



Rendement : 88%

Formule brute : $C_{35}H_{33}NO_8$

Masse Molaire (g/mole) : 595,64

Aspect physique : huile légèrement jaune

R_F (Hexane/Acétate d'éthyle : 7/3)= 0,45

RMN ^1H ($CDCl_3$, 500 MHz) :

δ (ppm) : 3,00 (d, 2H, CH_2 , $J=15,4$ Hz); 3,74 (d, 2H, CH_2 , $J=15,45$ Hz); 4,23 (s, 2H, CH_2); 4,96 (d, 2H, CH_2 , $J=12,15$ Hz); 5,02 (d, 2H, CH_2 , $J=12,15$ Hz); 5,10 (s, 2H, CH_2); 6,83 (d, 2H, CHAr, $J=7,75$ Hz); 7,04 (t, 1H, CHAr, $J=7,35$ Hz); 7,27-7,36 (m, 17H, Ar); 8,01 (sl, 1H, NH)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) :

δ (ppm) : 40,22 (CH_2); 59,34 (Cq); 66,93 (CH_2-Ph); 67,27 (CH_2-OPh); 68,60 (CH_2-Ph); 115,03 (CHAr O-Ph); 122,57 (CHAr O-Ph); 128,56 (CHAr); 128,61 (CHAr); 128,73 (CHAr); 128,76 (CHAr); 128,79

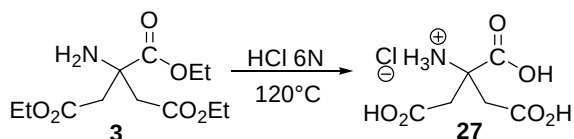
(CHAr) ; 129,83 (CHAr O-Ph) ; 134,97 (CAr) ; 135,52 (CAr) ; 157,29 (CAr O-Ph); 168,17 (CO₂Bn) ; 169,09 (CO₂Bn) ; 170,89 (NHCO)

Masse (ESI) : 596,08 (M+H) ; 618,28 (M+Na) ; 1213,87 (2M+Na)

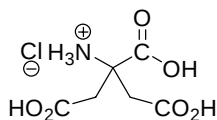
HRMS (ESI) : 618,2092 (calculé pour C₃₅H₃₃NO₈+Na : 618,2104)

IR (cm⁻¹) : 3386 (NH), 2958 (CHAr), 1736 (CO₂Bn, C=O), 1685 (NHCO), 1176 (CO₂Bn, C-O-C)

II.11.Synthèse de l'acide 2-aminopropane-1,2,3-tricarboxylique **27**



10 ml d'HCl 6N sont ajoutés à l'amine (100 mg) et le milieu réactionnel est mis à reflux pendant 2 jours. Après deux extractions au dichlorométhane, la phase aqueuse est lyophilisée afin de fournir un solide blanc. Le produit est obtenu avec un rendement de 90%.



Registry Number : 86883-54-7

Référence : Dornow A., Rombusch K., *Chem. Ber.* **1955**, 88, 1334-1340.

Formule brute : C₆H₁₀ClNO₆

Masse Molaire (g/mole) : 227,60

Aspect physique : solide blanc

RMN ^1H (D_2O , 250 MHz) :

δ (ppm) : 2,98 (s, 4H)

RMN ^{13}C (D_2O , 62.5 MHz) :

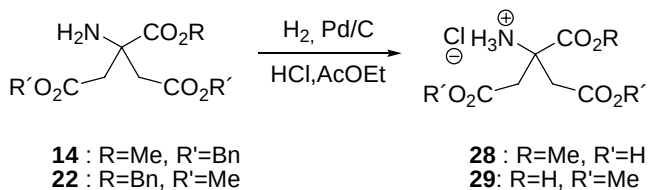
δ (ppm) : 39,9 (CH_2), 59,3 (Cq), 173,7 (CO_2H)

Masse (ESI) : 192,00 (M+H)

HRMS (ESI) : 192,0503 (calculé pour $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_6 + 1$: 192,0508)

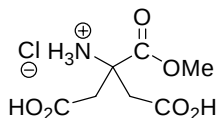
IR (cm^{-1}) : 2931 (CO_2H , C-OH), 2515 (NH_3^+Cl^-), 1716 (CO_2H , C=O), 1620 (NH_3^+Cl^-)

II.12. Hydrogénation des esters benzyliques des amines **14** et **22**



A l'amine en solution dans l'acétate d'éthyle (150 mg / 4 ml) sont ajoutés le Pd/C (100 mg) et 5 équivalents d'HCl concentré (150 μl). Le milieu réactionnel est mis sous atmosphère d'hydrogène et agité à température ambiante pendant 5h. Le milieu réactionnel est alors filtré avec un mélange 50/50 : $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$. L'éthanol du filtrat est évaporé puis le filtrat est lyophilisé afin d'obtenir un solide blanc.

- Acide 3-amino-3-(methoxycarbonyl)pentanoïque **28**



Rendement : 65%

Formule brute : $C_7H_{12}ClNO_6$

Masse Molaire (g/mole) : 241,63

Aspect physique : solide blanc

RMN ^1H (D_2O , 250 MHz) :

δ (ppm) : 3,01-3,10 (d, 2H, $J = 18$ Hz, CH_{2A}), 3,14-3,23 (d, 2H, $J = 18$ Hz, CH_{2B}), 3,81 (s, 3H, CH_3)

RMN ^{13}C (D_2O , 62,5 MHz) :

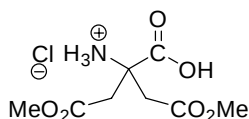
δ (ppm) : 40,0 (CH_2), 55,4 (CH_3), 59,0 (C), 171,5 (CO_2Me), 173,3 (CO_2H)

Masse (ESI) : 206,06 (M+H)

HRMS (ESI) : 206,0662 (calculé pour $C_7H_{11}O_6N + 1$: 206,0665)

IR (cm^{-1}) : 2920 (CO_2H , C-OH), 2515 ($NH_3^+Cl^-$), 1716 (CO_2H et CO_2Me , C=O), 1620 ($NH_3^+Cl^-$), 1249 (CO_2Me , C-O-C)

- Acide 2-amino-4-methoxy-2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-4-oxobutanoïque **29**



Rendement : 90%

Formule brute : $C_8H_{14}ClNO_6$

Masse Molaire (g/mole) : 255,65

Aspect physique : solide blanc

RMN ^1H (D_2O , 250 MHz) :

δ (ppm) : 3,05-3,12 (d, 2H, $J = 17,45$ Hz, CH_{2A}), 3,14-3,21 (d, 2H, $J = 17,45$ Hz, CH_{2B}), 3,74 (s, 6H, CH_3)

RMN ^{13}C (D_2O , 62,5 MHz) :

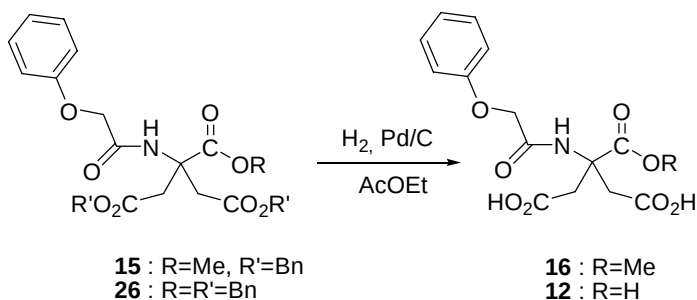
δ (ppm) : 42,5 (CH_2), 56,4 (CH_3), 61,8 (C), 174,7 (CO_2Me), 176,1 (CO_2H)

Masse (ESI) : 220,05 (M+H)

HRMS (ESI) : 220,0817 (calculated for $C_8H_{13}O_6N + 1$: 220,0821)

IR (cm^{-1}) : 2978 (CO_2H , C-OH), 2519 ($NH_3^+Cl^-$), 1743 (CO_2Me , C=O), 1716 (CO_2H , C=O), 1620 ($NH_3^+Cl^-$), 1242 (CO_2Me , C-O-C)

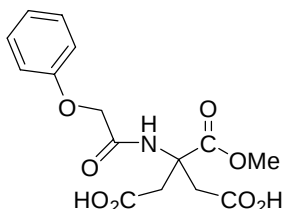
II.13. Hydrogénation des esters benzyliques des amides



A l'amide en solution dans l'acétate d'éthyle (71,9 mg / 4 ml) est ajouté le Pd/C (580 mg par gramme de substrat). Le milieu réactionnel est mis sous atmosphère d'hydrogène et agité à température ambiante pendant 5h. Le

milieu réactionnel est alors filtré sur célite avec un mélange 50/50 H₂O/EtOH. L'éthanol du filtrat est évaporé puis le filtrat est lyophilisé afin d'obtenir un solide blanc.

- Acide 3-(methoxycarbonyl)-3-(2-phenoxyacetamido)pentanoïque
16



Rendement : quantitatif

Formule brute : C₁₅H₁₇NO₈

Masse Molaire (g/mole) : 339,30

Aspect physique : solide blanc

RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) :

δ (ppm) : 3,00 (d, 2H, CH₂, J=15,4 Hz); 3,23 (d, 2H, CH₂, J=15,45 Hz); 3,75 (s, 3H, CH₃) ; 4,62 (s, 2H, CH₂); 6,98 (d, 2H, CHAr, J=7,97 Hz) ; 7,36 (m, 3H, CHAr)

RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz) :

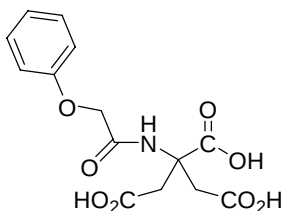
δ (ppm) : 41,14 (CH₂) ; 53,93 ; 59,57 (Cq) ; 66,96 (CH₂-OPh) ; 115,11 (CHAr O-Ph) ; 122,63 (CHAr O-Ph) ; 130,28 (CHAr O-Ph) ; 157,36 (CAr O-Ph); 170,84 (CO₂Me) ; 173,93 (NHCO) ; 174,82 (CO₂H)

Masse (ESI) : 339,99 (M+H) ; 361,97 (M+Na) ; 700,92 (2M+Na)

HRMS (ESI) : 362,0854 (calculé C₁₅H₁₇NO₈+Na : 362,0852)

IR (cm⁻¹) : 3375 (NH), 2954 (CHAr et CO₂H, C-H et C-OH), 1731 (CO₂Me et CO₂H, C=O), 1681 (NHCO), 1227 (CO₂Me, C-O-C)

- Acide 2-(2-phénoxyacetamido)aminopropane-1,2,3-tricarboxylique
12



Rendement : quantitatif

Formule brute : C₁₄H₁₅NO₈

Masse Molaire (g/mole) : 325,27

Aspect physique : solide blanc

RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) :

δ (ppm) : 3,04 (d, 2H, CH₂, J=15,75 Hz); 3,36 (d, 2H, CH₂, J=15,75 Hz); 4,62 (s, 2H, CH₂); 6,98 (d, 2H, CHAr, J=7,90 Hz) ; 7,06 (t, 1H, CHAr, J=7,40 Hz) ; 7,35 (dd, 2H, CHAr, J=7,40 Hz et 7,90 Hz)

RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz) :

δ (ppm) : 40,09 (CH₂) ; 59,26 (Cq) ; 67,05 (CH₂-OPh) ; 115,13 (CHAr O-Ph) ; 122,67 (CHAr O-Ph) ; 128,56 (CHAr O-Ph) ; 130,29 (CHAr O-Ph) ; 157,34 (CAr O-Ph); 170,88 (NHCO) ; 173,55 (CO₂H) ; 174,90 (CO₂H)

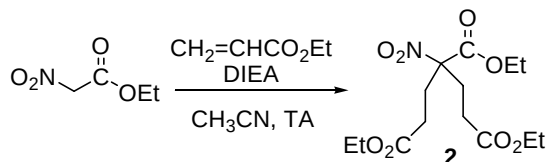
Masse (ESI) : 324,03 (M-H)

HRMS (ESI) : 348,0695 (calculé C₁₄H₁₅NO₈+Na : 348,0695)

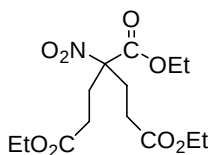
IR (cm⁻¹) : 3367 (NH), 2981-2939 (CHAr et CO₂H, C-H et C-OH), 1716 (CO₂H, C=O), 1651 (NHCO)

III.Synthèse d'un dérivé homologue du citrate

III.1.Synthèse de triéthyle-2-nitropentane-1,2,3-tricarboxylate **2**



A une solution de nitroacétate d'éthyle (330 µl, 3 mmol) dans l'acétonitrile (5 ml) sont ajoutés 2,05 équivalents de diisopropyléthylamine (1,06 ml) et 2,05 équivalents d'acrylate d'éthyle (667 µl). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 48h. Le milieu réactionnel est alors concentré à l'évaporateur rotatif et le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution de carbonate de potassium 10% puis séchée sur MgSO₄. Une huile jaune est obtenue après concentration à l'évaporateur rotatif. Le rendement de la réaction est de 85%.



Registry Number : 145839-80-1

Référence : Kornblum N., Eicher J. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 1494-1497.

Formule brute : C₁₄H₂₃NO₈

Masse Molaire (g/mole) : 333,33

Aspect physique : huile jaune

Rf (Hexane/ AcOEt : 7/3) : 0,31

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) :

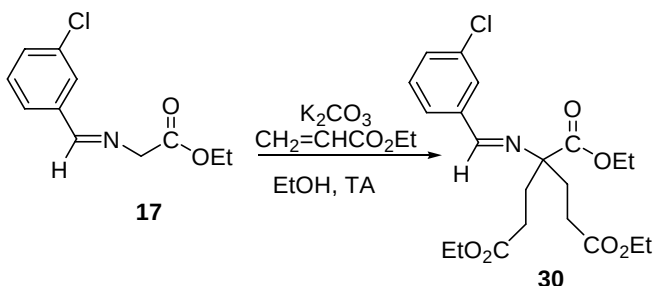
δ (ppm) : 1,23 (t, 6H, CH_3 , $J=7,3$ Hz,) ; 1,27 (t, 3H, CH_3 , $J=7,3$ Hz,) ; 2,28-2,40 (m, 4H, CH_2) ; 2,44-2,51 (m, 4H, CH_2) ; 4,11 (q, 4H, CH_2 , $J=7,3$ Hz) ; 4,25 (q, 2H, CH_2 , $J=7,3$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) :

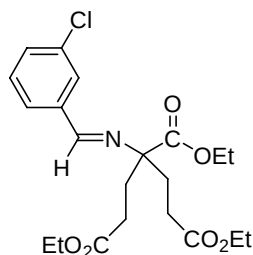
δ (ppm) : 13,93 (CH_3) ; 14,24 (CH_3) ; 28,90 (CH_2) ; 29,63 (CH_2) ; 61,10 (CH_2) ; 63,26 (CH_2) ; 94,33 (Cq) ; 166,06 (CO_2Et) ; 171,60 (CO_2Et)

Masse (ESI) : 356,09 (M+Na)

III.2.Synthèse de 3-(3-chlorobenzylideneamino)pentane-1,3,5-tricarboxylate de triéthyle **30**



A l'imine (1,47g, 6,52 mmol) en solution dans l'éthanol ($v=7\text{ml}$) sont ajoutés 0,2 équivalents de carbonate de potassium (180 mg) et 2,05 équivalents d'acrylate d'éthyle (1,45 ml). La réaction est exothermique. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures. Le milieu réactionnel est évaporé et le résidu est repris dans l'éther et filtré. Le filtrat étheré est séché sur MgSO_4 . Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 91%.



Formule brute : $C_{21}H_{28}ClNO_6$

Masse Molaire (g/mole) : 425,90

Aspect physique : huile jaune

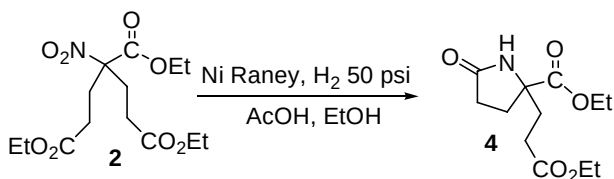
RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) :

δ (ppm) : 1,24 (t, 6H, CH_3 , $J=7,11$ Hz,) ; 1,30 (t, 3H, CH_3 , $J=7,11$ Hz,) ; 2,21-2,34 (m, 8H, CH_2) ; 4,10 (q, 4H, CH_2 , $J=7,11$ Hz) ; 4,24 (q, 2H, CH_2 , $J=7,11$ Hz) ; 7,28-7,40 (m, 2H, $CHAr$) ; 7,59 (d, 1H, $CHAr$, $J=7,35$ Hz) ; 7,79 (s, 1H, $CHAr$) ; 8,30 (s, 1H, $N=CH$)

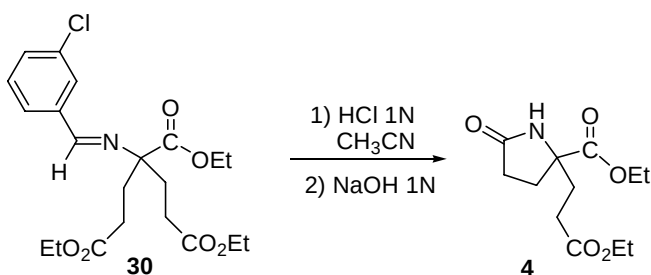
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) :

δ (ppm) : 13,93 (CH_3) ; 14,35 (CH_3) ; 29,50 (CH_2) ; 32,69 (CH_2) ; 60,71 (CH_2) ; 61,48 (CH_2) ; 69,89 (Cq) ; 127,14 ($CHAr$) ; 127,91 ($CHAr$) ; 129,98 ($CHAr$) ; 131,20 ($CHAr$) ; 134,97 (CAr) ; 138,11 (CAr) ; 159,70 ($N=CH$) ; 172,43 (CO_2Et) ; 173,28 (CO_2Et)

III.3.Synthèse de δ -carbethoxy- δ -(β -carbethoxyethyl)- α -pyrrolidinone **4**

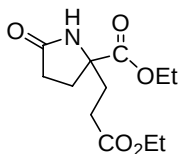


Méthode A : Dans un récipient adapté à l'hydrogénateur, on dissout le composé **2** dans l'éthanol (842 mg / 7 ml). Le Ni Raney (700 mg) et l'acide acétique (700 μ l) sont ensuite ajoutés. Le récipient est mis sous atmosphère d'hydrogène à une pression de 50 psi pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est filtré sur de la célite et concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans de l'acétate d'éthyle avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée puis avec une solution de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium puis concentré à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir une huile translucide. Le rendement de la réaction est de 77%.



Méthode B : L'imine (2,47 g, 5,81 mmol) est dissoute dans le minimum d'acétonitrile et 1,5 équivalents d'HCl 1N sont ajoutés (9 ml). Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à température ambiante puis le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'éther. La phase étherée est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Pendant ce temps, la phase aqueuse est neutralisée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et basifiée avec une solution de NaOH 1N (pH 10). La phase aqueuse est extraite cinq fois avec du dichlorométhane. La phase chlorée est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir une huile jaune. L'huile

jaune est purifiée par chromatographie sur gel de silice (gradient d'éluant : Hexane/AcOEt : 7/3 à 5/5). Le rendement de la réaction est de 52%.



Registry Number : 22049-94-1

Référence : Smirnova A. A., Perekalin V. V., Shcherbakov V. A., *Zh. Org. Khim.* **1968**, 4, 12, 2245-2255.

Formule brute : C₁₂H₁₉NO₅

Masse Molaire (g/mole) : 257,28

Aspect physique : solide blanc

R_F (Hexane/ AcOEt : 7/3) = 0,15

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) :

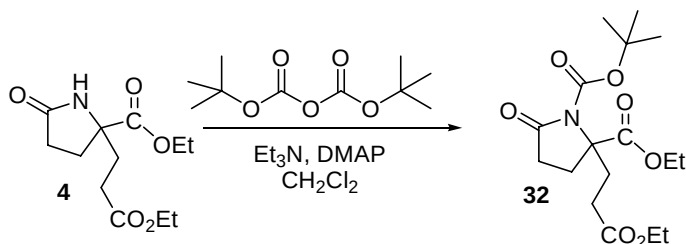
δ (ppm) : 1,23 (t, 3H, CH₃, J=7,3 Hz,) ; 1,30 (t, 3H, CH₃, J=7,3 Hz,) ; 2,05-2,11 (m, 2H, CH₂) ; 2,19-2,25 (m, 1H, CH₂) ; 2,31-2,35 (m, 2H, CH₂) ; 2,37-2,41 (m, 2H, CH₂) ; 2,45-2,51 (m, 1H, CH₂) ; 4,13 (q, 2H, CH₂, J=7,14 Hz) ; 4,22 (q, 2H, CH₂, J=7,14 Hz) ; 6,41 (sl, 1H, NH)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) :

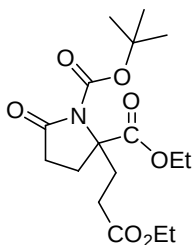
δ (ppm) : 14,34 (CH₃) ; 29,33 (CH₂) ; 29,80 (CH₂) ; 30,60 (CH₂) ; 33,79 (CH₂) ; 61,11 (CH₂) ; 62,20 (CH₂) ; 64,94 (Cq) ; 172,61 (CO₂Et) ; 173,19 (CO₂Et) ; 177,05 (NHCO)

Masse (ESI) : 258,3 (M+H)

III.4.Synthèse de *N*-tert-butyl- δ -carbethoxy- δ -(β -carbethoxyethyl)- α -pyrrolidinone **32**



A l'amide (192 mg, 0,75 mmol) en solution dans le dichlorométhane (5 ml) est ajouté 1 équivalent de triéthylamine (105 μ l). 2 Equivalents de (Boc)₂O (326 mg) et 1 équivalent de diéthylaminopyridine (91 mg) sont ensuite additionnés. Le milieu réactionnel est agité 18h à température ambiante. Le milieu réactionnel est évaporé et le résidu est repris avec du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution d' HCl 1N (4x), avec de l'eau distillée (3x) et séchée sur MgSO₄. Une huile jaune est obtenue après concentration à l'évaporateur rotatif. Cette huile est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : Hexane/ AcOEt : 7/3). Le produit est obtenu avec un rendement de 77%.



Formule brute : C₁₇H₂₇NO₆

Masse Molaire (g/mole) : 341,40

Aspect physique : huile translucide

R_F (Hexane/ AcOEt : 7/3) = 0,37

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,24 (t, 3H, CH_3 , $J=7,1$ Hz) ; 1,26 (t, 3H, CH_3 , $J=7,1$ Hz) ; 1,51 (s, 9H, CH_3) ; 1,97-2,03 (m, 1H, CH_2) ; 2,08-2,14 (m, 1H, CH_2) ; 2,23-2,37 (m, 3H, CH_2) ; 2,24-2,65 (m, 3H, CH_2) ; 2,45-2,51 (m, 2H, CH_2) ; 4,12 (q, 2H, CH_2 , $J=7,15$ Hz) ; 4,20 (q, 2H, CH_2 , $J=7,15$ Hz)

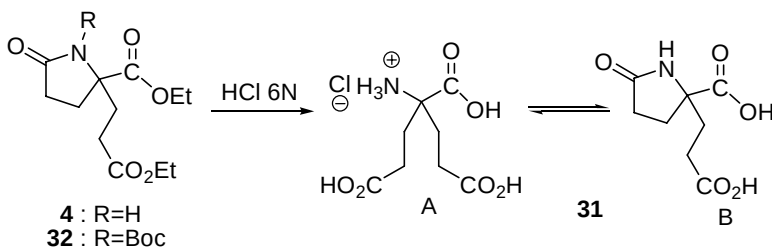
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) :

δ (ppm) : 14,31 (CH_3) ; 27,18 (CH_2) ; 28,01 (CH_3) ; 29,01 (CH_2) ; 30,37 (CH_2) ; 30,81 (CH_2) ; 60,99 (CH_2) ; 61,97 (CH_2) ; 67,51 (Cq) ; 84,13 (t-Bu) ; 149,30 (NHCO_2) ; 172,57 (CO_2Et) ; 172,79 (CO_2Et) ; 174,25 (NHCO)

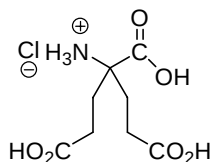
Masse (ESI) : 358,5 (M+H) ; 258,3 (M- CO_2tBu)

IR (cm^{-1}) : 2981-2939 (CH_2), 1790 (NCO), 1732 (NCO $_2$ et CO_2Et , C=O), 1299 (NCO $_2\text{tBu}$, C-O-C), 1153 (CO_2Et , C-O-C)

III.5.Synthèse de l'acide 3-aminopentane-1,3,5-tricarboxylique



10 ml d'HCl 6N sont ajoutés à l'amide (100 mg) et le milieu réactionnel est mis à reflux pendant 2 jours. Après deux extractions au dichlorométhane, la phase aqueuse est lyophilisée afin de fournir un solide blanc. L'amine est majoritaire. Le ratio A/B est variable avec A toujours supérieure à 80%.



Registry Number : 22050-05-1

Référence : Smirnova A. A., Perekalin V. V., Shcherbakov V. A., *Zh. Org. Khim.* **1968**, 4, 12, 2245-2255.

Formule brute : C₈H₁₄ClNO₆

Masse Molaire (g/mole) : 255,65

Aspect physique : solide blanc

RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) :

δ (ppm) : 2,21-2,36 (m, 4H, CH₂) ; 2,49-2,57 (m, 2H, CH₂) ; 2,60-2,67 (m, 2H, CH₂)

RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz) :

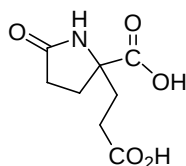
δ (ppm) : 28,64 (CH₂) ; 30,50 (CH₂) ; 62,62 (Cq) ; 176,40 (CO₂H) ; 177,42 (CO₂H)

Masse (ESI) : 218,11 (M-H)

HRMS (ESI) : 220,0821 (calculé C₈H₁₃NO₆+H : 220,0817)

IR (cm⁻¹) : 3816 (CO₂H, C-OH), 2405 (NH₃⁺Cl⁻), 1650 (CO₂H, C=O), 1573 (NH₃⁺Cl⁻)

- Acide 2-carboxy-5-oxo-2-pyrrolidinepropanoïque



Registry Number : 82386-73-0

Référence : Majer Z., Kajtar M., Tichy M., Blaha K., *Collect. Czech Chem. Commun.* **1982**, 47, 3, 950-960.

Formule brute : C₈H₁₁NO₅

Masse Molaire (g/mole) : 201,18

Aspect physique : solide blanc

RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) :

δ (ppm) : 2,13-2,36 (m, 4H, CH₂) ; 2,40-2,57 (m, 3H, CH₂) ; 2,59-2,67 (m, 1H, CH₂)

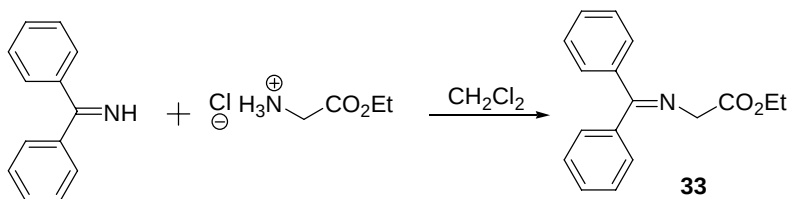
RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz) :

δ (ppm) : 29,24 (CH₂) ; 30,04 (CH₂) ; 30,35 (CH₂) ; 32,84 (CH₂) ; 66,16 (Cq) ; 172,60 (NHCO) ; 177,25 (CO₂H) ; 181,26 (CO₂H)

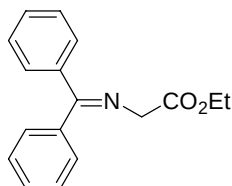
Masse (ESI) : 200,11 (M-H)

IV. Synthèse du dérivé aminé de l'iso-citrate

IV.1. Synthèse du *N*-(diphenylmethylene)glycinate d'éthyle **33**



A l'amine (845 mg, 5,96 mmol) en suspension dans le dichlorométhane anhydre (20 ml) est ajoutée l'imine de la benzophénone (5,96 mmol, 1 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures. Le milieu réactionnel devient trouble car un solide précipite. Il est filtré et le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif. L'huile est dissoute dans 20 mL d'éther. La phase organique est lavée avec de l'eau distillée puis séchée sur MgSO_4 . L'huile obtenue est mise au congélateur afin de solidifier. Le produit est purifié par recristallisation avec un mélange éther-hexane. Le produit est obtenu avec un rendement de 82%.



Registry Number : 69555-14-2

Référence : O'Donnell M. J., Polt R. L., *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 13, 2663-2666.

Formule brute : $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_2$

Masse Molaire (g/mole) : 267,32

Aspect physique : solide blanc

R_F (Hexane/ AcOEt : 8/2) = 0,57

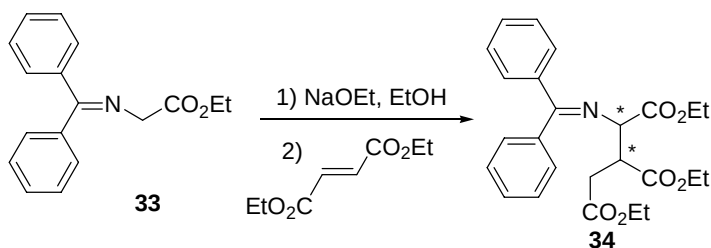
RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) :

δ (ppm) : 1,28 (t, 3H, CH_3 , $J=7,12$ Hz,) 4,16-4,25 (m, 4H, CH_2); 7,16-7,68 (m, 10H, CHAr)

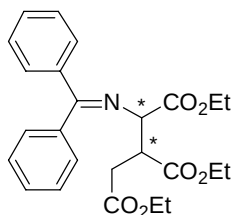
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) :

δ (ppm) : 14,39 (CH_3) ; 55,92 (CH_2) ; 61,04 (CH_2) ; 127,86 (CHAr) ; 128,90 (CHAr) ; 130,62 (CHAr) ; 136,19 (CAr) ; 139,46 (CAr) ; 170,82 (N=CH) ; 172,02 (CO_2Et)

IV.2.Synthèse du 1-(diphénylméthylamino)succinate de triéthyle **34**



L'imine (849 mg, 3 mmol) en solution dans l'éthanol (5 ml) est ajoutée à l'éthanolate de sodium (0,1éq., 115 μl) à 0°C. Le milieu réactionnel est agité pendant 10 minutes. Ensuite le diéthyle de fumarate (1,1éq., 500 μl) est additionné goutte à goutte à 0°C. On laisse maintenant remonter la température du milieu réactionnel. La réaction est suivie par CCM (éluant : Hexane/AcOEt : 8/2). La réaction est finie au bout d'une heure. Le milieu réactionnel est neutralisé avec une solution de NH_4Cl saturée et concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu est dissout dans le dichlorométhane et lavé avec une solution de NH_4Cl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO_4 . Une huile jaune est obtenue après évaporation du solvant. Le produit est obtenu avec un rendement de 92%.



Formule brute : $C_{25}H_{29}NO_6$

Masse Molaire (g/mole) : 439,50

Aspect physique : huile jaune

R_F (Hexane/ AcOEt : 8/2) : 0,45

Diastéréoisomère majoritaire : M

Diastéréoisomère minoritaire : m

RMN ^1H ($CDCl_3$, 500 MHz) :

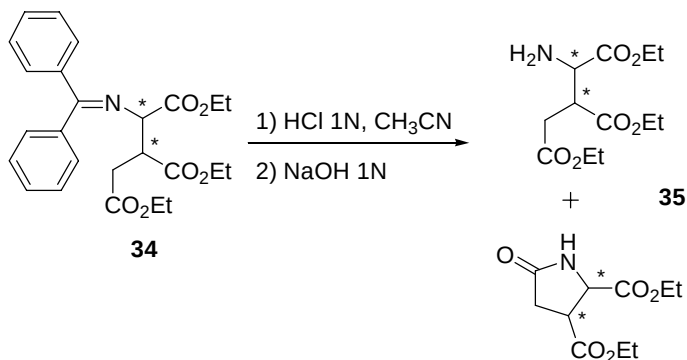
δ (ppm) : 1,15 (t, 3H, CH_3 , $J=7$ Hz,) ; 1,22 (t, 3H, CH_3 , $J=7$ Hz,) ; 1,26 (t, 3H, CH_3 , $J=7$ Hz) ; 2,48 (dd, 1H_m, CH_2 , $J=16,8$ Hz, $J=5,4$ Hz) ; 2,70 (dd, 1H_M, CH_2 , $J=17$ Hz, $J=4,1$ Hz) ; 2,83 (dd, 1H_m, CH_2 , $J=16,9$ Hz, $J=9,1$ Hz) ; 3,06 (dd, 1H_M, CH_2 , $J=17$ Hz, $J=9,4$ Hz) ; 3,62-3,65 (m, 1H_m, CH) ; 3,66-3,70 (m, 1H_M, CH) ; 3,96-4,25 (m, 6H, CH_2) ; 4,29 (d, 1H_m, CH, $J=3,7$ Hz) ; 4,55 (d, 1H_M, CH, $J=4,2$ Hz) ; 7,16-7,19 (m, 2H, CHAr) ; 7,31-7,34 (m, 2H, CHAr) ; 7,36-7,45 (m, 4H, CHAr) ; 7,61-7,63 (m, 2H, CHAr)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) :

δ (ppm) : 14,15 (CH_3 m) ; 14,15 (CH_3 M) ; 32,60 (CH_2 M) ; 33,12 (CH_2 m) ; 44,79 (CHM) ; 44,99 (CHm) ; 60,75 (CH_2) ; 61,06 (CH_2) ; 61,56 (CH_2) ; 65,64 (CHM) ; 66,02 (CHm) ; 128,05 (CHAr) ; 128,17 (CHAr) ; 128,57 (CHAr) ; 129,03 (CHAr) ; 129,20 (CHAr) ; 130,78 (CHAr) ; 136,00 (CAr) ; 139,44 (CAr) ; 170,35 (N=C(Ph)₂m) ; 170,42 (N=C(Ph)₂M) ; 171,85

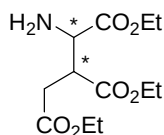
(CO₂EtM) ; 172,02 (CO₂EtM) ; 172,19 (CO₂EtM) ; 172,51 (CO₂EtM),
173,32 (CO₂EtM) ;

IV.3.Synthèse du mélange 35



L'imine (1,2g, 2,75 mmol) est dissoute dans 3 ml d'acétonitrile et 3,5 équivalents d'HCl 1N (10 ml) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à température ambiante puis l'acétonitrile est évaporé. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'éther. La phase étherée est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Pendant ce temps, la phase aqueuse est neutralisée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et basifiée avec une solution de NaOH 1N. La phase aqueuse est extraite cinq fois avec du dichlorométhane. La phase chlorée est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir une huile translucide. Cette huile est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/ AcOEt : 1/1). Le rendement de la réaction est de 66%. La première fraction de la colonne est l'amine qui est isolé sous forme de deux couples de diastéréoisomères (quatre stéréoisomères au total) avec environ 9% d'amide (2 stéréoisomères). La dernière fraction de la colonne est l'amide seul : un seul produit est visible sur le spectre. Il s'agit du mélange racémique. L'amine est très majoritaire avec très peu d'amide isolé en fin de colonne.

- 1-aminopropane-1,2,3-tricarboxylate de triéthyle ($\pm$)



Registry Number : 60930-44-1

Référence : Stork G., Leong A. Y. W., Touzin A. M., *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 21, 3491-3493.

Formule brute : C₁₂H₂₁NO₆

Masse Molaire (g/mole) : 275,30

Aspect physique : huile translucide

R_f (DCM/AcOEt : 1/1)= 0,5

Deux diastéréoisomères (quatre stéréoisomères) : A et B

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) :

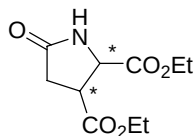
δ (ppm) : 1,21-1,3 (m, 9H, CH₃) ; 2,44 (dd, 1H_A, CH₂, J=16,8 Hz, J=4,8 Hz) ; 2,64 (dd, 1H_B, CH₂, J=16,8 Hz, J=6,4 Hz) ; 2,84 (dd, 1H_A, CH₂, J=8,7 Hz, J=7 Hz) ; 2,87 (dd, 1H_B, CH₂, J=8,7 Hz, J=7 Hz) ; 3,32 (td, 1H_A, CH, J= 9,3Hz, J= 4,8Hz) ; 3,44 (ddd, 1H_B, CH, J= 7,9Hz, J= 6,3Hz, J= 4,1Hz) ; 3,68 (d, 1H_A, CH, J=4,1 Hz) ; 3,89 (d, 1H_B, CH, J=4,7 Hz) ; 4,10-4,26 (m, 6H, CH₂)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) :

δ (ppm) : 14,31 (CH₃) ; 31,91 (CH₂A) ; 33,24 (CH₂B) ; 45,08 (CHA) ; 45,20 (CHB) ; 55,32 (CHA) ; 57,57 (CHB) ; 60,90 (CH₂) ; 60,92 (CH₂) ; 61,21 (CH₂) ; 61,35 (CH₂) ; 61,53 (CH₂) ; 61,63 (CH₂) ; 171,99 (CO₂Et) ; 172,05 (CO₂Et) ; 172,48 (CO₂Et) ; 173,80 (CO₂Et) ; 173,93 (CO₂Et)

Masse (APCI) : 276,10 (M+H)

- 3-Ethoxycarbonylpyrroglutamate d'éthyle



Registry Number : 104395-84-4

Référence : Cocolas G. H., Hartung W. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 5203-5205.

Formule brute : C₁₀H₁₅NO₅

Masse Molaire (g/mole) : 229,23

Aspect physique : huile translucide

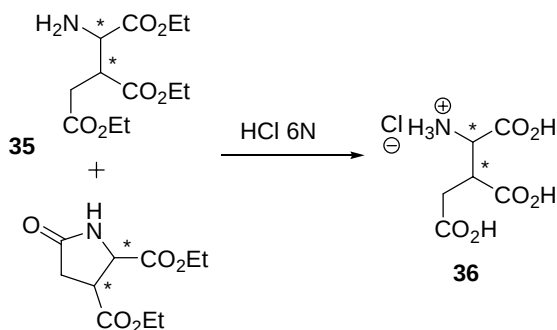
Rf (DCM/AcOEt : 1/1) : 0,38

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) : 1,27–1,29 (deux t, 6H, CH₃, J=7,2 Hz) ; 2,65 (dd, 1H, CH₂, J=17, 3 Hz, J=7,1 Hz) ; 2,71 (dd, 1H, CH₂, J=17, 3 Hz, J=9,8 Hz) ; 3,44 (ddd, 1H, CH, J=9,8 Hz, J=7,1 Hz, J=5,4 Hz) ; 4,20-4,26 (m, 4H, CH₂) ; 4,58 (d, 1H, CH, J=5,4 Hz) ; 6,68 (sl, 1H, NH)

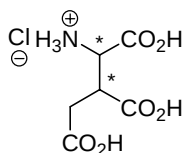
RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) :

δ (ppm) : 14,27 (CH₃) ; 14,30 (CH₃) ; 29,33 (CH₂) ; 33,40 (CH₂) ; 42,58 (CH) ; 57,76 (CH) ; 62,06 (CH₂) ; 62,32 (CH₂) ; 170,64 (CO₂Et) ; 171,85 (CO₂Et) ; 175,08 (NHCO)

Masse (APCI) : 230,04 (M+H)

IV.4.Synthèse de l'acide 1-aminopropane-1,2,3-tricarboxylique **36**

10 ml d'HCl 6N sont ajoutés à l'amide (100 mg) et le milieu réactionnel est mis à reflux pendant 2 jours. Après deux extractions au dichlorométhane, la phase aqueuse est lyophilisée afin de fournir un solide blanc avec un rendement de 80%. Deux diastéréoisomères sont visibles sur le spectre RMN ^1H dans un rapport 50/50.



Registry Number : 2393-15-9

Référence : Greenstein J. P., Izumiya N., Winitz M., Birnbaum S. M., *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 707-716.

Formule brute : $\text{C}_6\text{H}_8\text{ClNO}_6$

Masse Molaire (g/mole) : 225,58

Aspect physique : solide blanc

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) :

δ (ppm) : 2,81 (dd, 1H, CH_2 , $J=17,3$ Hz, $J=6,1$ Hz) ; 2,96 (dd, 1H, CH_2 , $J=17,7$ Hz, $J=7,7$ Hz) ; 3,50-3,54 (m, 1H, CH) ; 3,62-3,65 (m, 1H, CH) ; 4,36 (d, 1H, CH, $J=2,9$ Hz) ; 4,40 (d, 1H, CH, $J=4$ Hz)

RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz) :

δ (ppm) : 32,58 (CH_2) ; 33,25 (CH_2) ; 41,26 (CH) ; 41,63 (CH) ; 53,45 (CH) ; 53,58 (CH) ; 170,33(CO_2H) ; 170,37 (CO_2H) ; 173,88(CO_2H) ; 174,14 (CO_2H) ; 175,26 (CO_2H) ; 175,32 (CO_2H)

Masse (ESI) : 192,14 (M+H)

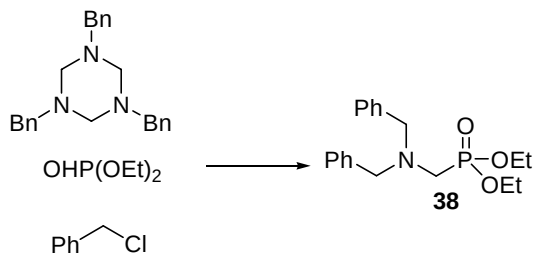
HRMS (ESI) : 192,0508 (calculé $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_6+\text{H}$: 192,0508)

IR (cm^{-1}) : 3047 (CO_2H , C-OH), 2358 (NH_3^+Cl^-), 1716 (CO_2H , C=O), 1606 (NH_3^+Cl^-)

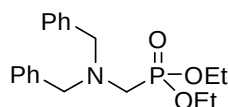
V. Synthèse des dérivés aminophosphoniques

V.1.Synthèse du bioisostère phosphonique de l'aminocitrate

V.1.1. Synthèse du (dibenzylamino)méthylphosphonate de diéthyle **38**



Un mélange de chlorure de benzyle (3,5 ml, 3 équivalents), de triazine (3,65g, 10,2 mmol) et de phosphite de diéthyle (3,99 ml, 3 équivalents) dans 10 ml d'éthanol absolu est chauffé à reflux pendant 6 heures. Après concentration du milieu réactionnel à l'évaporateur rotatif, 20 ml d'une solution saturée de bicarbonate de sodium est ajouté au résidu et la phase aqueuse est alors extraite trois fois à l'acétate d'éthyle. Les extraits sont rassemblés et séchés sur MgSO_4 , filtrés et concentrés à l'évaporateur rotatif. L'huile jaune obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (Eluant : Hexane/AcOEt : 5/5). Le produit est obtenu avec un rendement de 40%.



Registry Number : 78285-82-2

Référence : Ferrari M., Jommi G., Miglierini G., Pagliarin R., Sisti M., *Synth.Comm.* **1992**, 22, 1, 107-123.

Formule brute : $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{NO}_3\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 347,39

Aspect physique : huile jaune

R_F (Hexane/AcOEt : 5/5) = 0,45

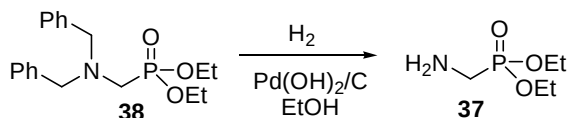
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz):

δ (ppm) : 1,30 (t, 6H, CH_3 , $J=7,05$ Hz) ; 2,89 (d, 2H, CH_2 , $J_{\text{H-P}}=10,41$ Hz) ; 3,79 (s, 4H, CH_2) ; 4,06 (q, 4H, CH_2 , $J=7,08$ Hz) ; 7,24-7,38 (m, 10H, CHAr)

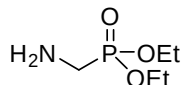
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz):

δ (ppm) : 16,20 (CH_3) ; 48,30 (CH_2 , d, $J_{\text{C-P}}=156,25$ Hz) ; 59,07 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 61,56 (CH_2) ; 126,92 (CHAr) ; 128,05 (CHAr) ; 128,82 (CHAr) ; 136,32 (CAr)

V.1.2. Synthèse de l'aminométhylphosphonate de diéthyle 37



L'amine (2,89 g) est dissoute dans 40 ml d'éthanol absolu et le $\text{Pd(OH)}_2/\text{C}$ (640 mg) est ajouté. Le milieu réactionnel est mis sous une atmosphère d'hydrogène. Le milieu réactionnel est agité pendant toute la nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est filtré, le filtrat est évaporé et une huile légèrement jaune est obtenue avec un rendement de 90%.



Registry Number : 50917-72-1

Référence : Seyferth D., Marmor R. S., Hilbert P., *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 10, 1379-1386.

Formule brute : $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}_3\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 167,14

Aspect physique : huile jaune

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) :

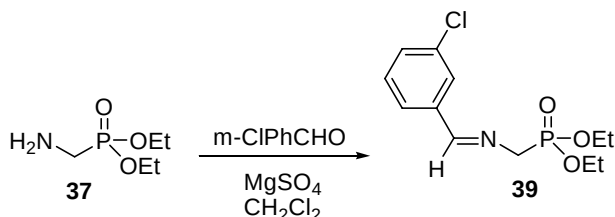
δ (ppm) : 1,26 (t, 6H, CH_3 , $J=7,08$ Hz) ; 1,96 (sl, 2H, NH_2) ; 2,94 (d, 2H, CH_2 , $J_{\text{H-P}}=10,41$ Hz) ; 4,04-4,09 (m, 4H, CH_2)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz):

δ (ppm) : 16,29 (CH_3) ; 37,45 (CH_2 , d, $J_{\text{C-P}}=148,75$ Hz) ; 61,84 (CH_2)

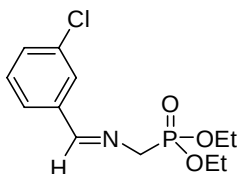
Masse (CH₄) : 167,9 (M+H)

V.1.3. Synthèse de l'imine **39**



A l'amine (1g, 6,34 mmol) dissoute dans 10 ml de dichlorométhane anhydre est ajouté le MgSO_4 (1g) et l'aldéhyde goutte à goutte (0,85 éq., 610 μl). Le milieu réactionnel est agité pendant une nuit. Le milieu réactionnel est filtré et le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif. L'huile orange obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : Hexane/AcOEt : 8/2). L'imine est obtenu avec un rendement de 76%.

- N-(3-chlorobenzylidène)aminomethylphosphonate de diéthyle



Formule brute : $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClNO}_3\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 289,7

Aspect physique : huile jaune

R_F (Hexane/AcOEt : 8/2) = 0,30

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz):

δ (ppm) : 1,31 (t, 6H, CH₃, J=7,05 Hz) ; 4,08 (d, 2H, CH₂, J_{H-P}=17,85 Hz) ; 4,14 (q, 4H, CH₂, J=7,05 Hz) ; 7,31 (t, 1H, CHAr, J=7,7 Hz) ; 7,37 (d,

1H, CHAr, J=8,05 Hz) ; 7,55 (d, 1H, CHAr, J=7,6 Hz) ; 7,73 (s, 1H, CHAr) ; 8,23 (d, 1H, N=CH, J_{H-P}= 4,9 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz):

δ (ppm) : 16,56 (CH₃, d, J_{C-P}=5,8 Hz) ; 57,55 (CH₂, d, J_{C-P}=152,9 Hz) ; 62,71 (CH₂, J_{C-P}= 6,61 Hz) ; 126,80 (CHAr) ; 127,98 (CHAr) ; 129,98 (CHAr) ; 131,17 (CHAr) ; 134,88 (CAr) ; 137,49 (CAr, d, J_{C-P}= 3,46 Hz) ; 165,24 (N=CH, J_{C-P}=16,39 Hz)

RMN ³¹P (CDCl₃, 121 MHz):

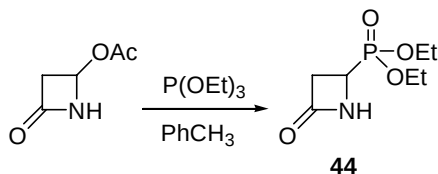
δ (ppm) : 22,48

Masse (ESI) : 290,11 (M+H) ; 312,09 (M+Na) ; 600,75 (2M+Na)

HRMS (ESI) : 312,0526 (calculé C₁₂H₁₇ClNO₃P+Na : 312,0532)

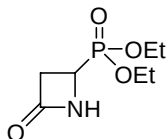
IR (cm⁻¹) : 2981 (CHAr), 1639 (C=N), 1242 (P(O)(OEt)₂, P=O), 1026 ((P(O)(OEt)₂, P-O-C)

V.1.4. Synthèse du 4-diéthoxyphosphonylazétidin-2-one **44**



A une solution d'azétidinone (642 mg, 4,83 mmol) dans le toluène (v=3 ml) est ajouté 1,1 équivalents de triéthylphosphite (910 µl). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant une nuit puis est concentré à l'évaporateur rotatif. Une huile orange est obtenue et 5 ml d'éther sont ajoutés et laissés évaporer ce qui provoque la solidification de l'huile. Le

produit est séché sur la rampe à vide. Un solide orange est obtenu avec un rendement de 84%.



Registry Number : 53390-18-4

Référence : Campbell M. M., Carruthers N. I., Mickel S. J., *Tetrahedron* **1982**, 38, 16, 2513-2524.

Formule brute : C₇H₁₄NO₄P

Masse Molaire (g/mole) : 207,16

Aspect physique : solide orange

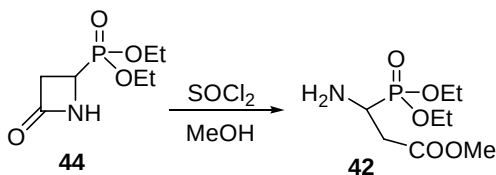
RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,34 (t, 3H, CH₃, J=6,85 Hz) ; 1,32 (t, 3H, CH₃, J=7,05 Hz) ;
3,15-3,21 (m, 1H, CH₂) ; 3,21-3,34 (m, 1H, CH₂) ; 3,75-3,79 (m, 1H, CH) ;
4,13-4,23 (m, 4H, CH₂) ; 6,72 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz):

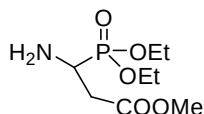
δ (ppm) : 16,68 (CH₃, J_{C-P}=5,62 Hz) ; 16,75 (CH₃, J_{C-P}=5,25Hz) ; 41,34
(CH₂, J_{C-P}=3,25Hz) ; 42,11 (CH, d, J_{C-P}=170,86 Hz) ; 62,96 (CH₂,
J_{C-P}=6,87Hz) ; 63,62 (CH₂, J_{C-P}=6,62Hz) ; 166,99 (NHCO, J_{C-P}=9,75Hz)

Masse (ESI) : 207,88 (M+H)

V.1.5. Synthèse de l'amine **42**

Une solution de β -lactame (800 mg, 3,87 mmol) dans le méthanol (10 ml) est refroidie à 0°C. Trois équivalents de chlorure de thionyle (850 μ l) sont ajoutés goutte à goutte. On laisse remonter la température du milieu réactionnel et il est ensuite agité à température ambiante pendant 24h avant d'être concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans le dichlorométhane et 5,6g de NaHCO_3 sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à température ambiante. Après vérification du pH (neutre), le milieu réactionnel est filtré et concentré à l'évaporateur rotatif. Le produit est séché sur la rampe à vide. Une huile orange est obtenue avec un rendement de 90%.

- 3-amino-3-diéthoxyphosphorylpropanoate de méthyle



Registry Number : 53390-18-4

Référence : Dehnel A., Lavielle G., *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1978**, 1-2, Pt. 2, 95-96.

Formule brute : $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{NO}_5\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 239,21

Aspect physique : huile orange

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) :

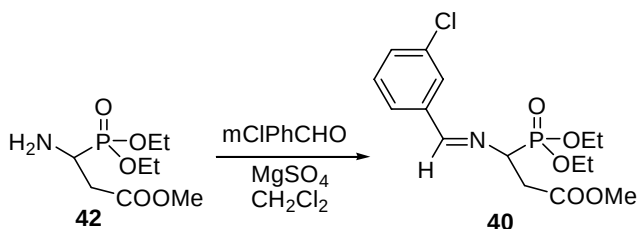
δ (ppm) : 1,36 (t, 6H, CH_3 , $J=6,93$ Hz) ; 2,54-2,65 (m, 1H, CH_2) ; 2,82-2,91 (m, 1H, CH_2) ; 3,56-3,65 (m, 1H, CH) ; 3,74 (s, 3H, CH_3) ; 4,19 (q, 4H, CH_2 , $J=6,87$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz):

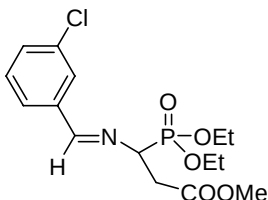
δ (ppm) : 16,6 (CH_3 , $J_{\text{C-P}}=5,52$ Hz) ; 36,87 (CH_2 , $J_{\text{C-P}}=2,34$ Hz) ; 45,82 (CH, d, $J_{\text{C-P}}=154,84$ Hz) ; 52,06 (CH_3) ; 62,60 (CH_2 , $J_{\text{C-P}}=6,42$ Hz) ; 171,82 (COOMe , $J_{\text{C-P}}=20,53$ Hz)

Masse (APCI) : 240,31 (M+H) ; 102,22 (M-P(O)(OEt) $_2$)

V.1.6. Synthèse de N-3-(3-chlorobenzylidène)amino-3-(diethoxyphosphoryl)propanoate de méthyl **40**



A l'amine (814 mg, 3,41 mmol) dissoute dans 10 ml de dichlorométhane anhydre est ajouté le MgSO_4 (1g) et l'aldéhyde goutte à goutte (0,85 équivalents, 328 μl). Le milieu réactionnel est agité pendant une nuit. Le milieu réactionnel est filtré et le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif. L'huile jaune obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : AcOEt). Le solide blanc est obtenu avec un rendement de 86%.



Formule brute : $C_{15}H_{21}ClNO_5P$

Masse Molaire (g/mole) : 361,76

Aspect physique : solide blanc

R_F (AcOEt) = 0,54

RMN ^1H ($CDCl_3$, 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,30 (t, 3H, CH_3 , $J=7,05$ Hz) ; 1,32 (t, 3H, CH_3 , $J=7,05$ Hz) ; 3,00 (m, 2H, CH_2) ; 3,62 (s, 3H, CH_3) ; 4,10-4,17 (m, 5H, CH_2+CH) ; 7,32 (dd, 1H, CH_{arom} , $J=8$ Hz, $J=7,6$ Hz) ; 7,40 (d, 1H, CH_{arom} , $J=8,05$ Hz) ; 7,57 (d, 1H, CH_{arom} , $J=7,6$ Hz) ; 7,76 (s, 1H, CH_{arom}) ; 8,33 (d, 1H, $N=CH$, $J_{H-P}=4,8$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz):

δ (ppm) : 16,64 (CH_3 , $J_{C-P}=5,69$ Hz) ; 35,41 (CH_2 , $J_{C-P}=2,36$ Hz) ; 53,02 (CH_3) ; 63,17 (CH_2 , $J_{C-P}=6,86$ Hz) ; 64,93 (CH , d, $J_{C-P}=157,74$ Hz) ; 127,21 (CH_{arom}) ; 128,15 (CH_{arom}) ; 129,99 (CH_{arom}) ; 131,31 (CH_{arom}) ; 134,94 ($Carom$) ; 137,53 ($Carom$) ; 164,44 ($N=CH$, $J_{C-P}=15,48$ Hz) ; 171,26 ($COOMe$, $J_{C-P}=21,12$ Hz)

RMN ^{31}P ($CDCl_3$, 121 MHz):

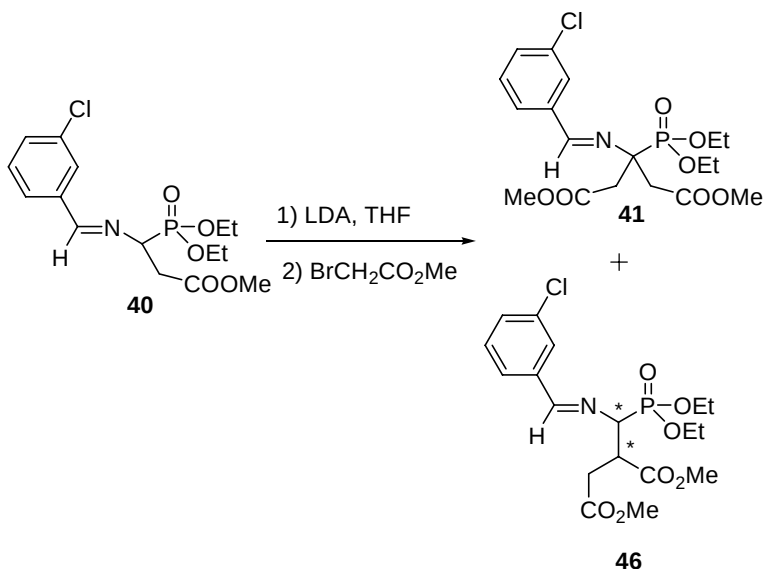
δ (ppm) : 22,92

Masse (ESI) : 362,19 ($M+H$), 384,14 ($M+Na$), 744,66 ($2M+Na$), 224,12 ($M-P(O)(OEt)_2$)

HRMS (ESI) : 384,0731 (calculé $C_{15}H_{21}ClNO_5P+Na$: 384,0744)

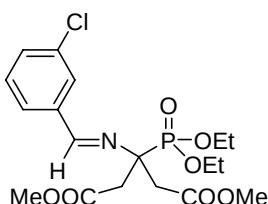
IR (cm^{-1}) : 2986 (CHAr), 1740 (CO_2Me , C=O), 1639 (C=N), 1250 ($P(O)(OEt)_2$, P=O), 1049 ($(P(O)(OEt)_2$, P-O-C)

V.1.7. Synthèse de N-3-(3-chlorobenzylidène)amino-3-(diethoxyphosphoryl)pentanedioate de diméthyle **41**



L'imine (413 mg, 1,14 mmol) dissoute dans 3 ml de tétrahydrofurane est ajoutée goutte à goutte à une solution de diisopropylamidure de lithium (1,1 ml, 1,4 équivalents) dans 2,5 ml de tétrahydrofurane et de DMPU (220 μ l, 1,6 équivalents) à $-78^\circ C$. Le milieu réactionnel est agité à $-78^\circ C$ pendant 1h. Ensuite, le bromo-acétate de méthyle (115 μ l, 1,05 éq.) est additionné goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à $-78^\circ C$ pendant 2h puis on laisse remonter la température et on agite le milieu réactionnel toute la nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est neutralisé avec un peu d'eau distillée et concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu huileux est repris avec du dichlorométhane. La phase organique est lavée

avec une solution de chlorure d'ammonium saturée (2x) puis avec une solution de chlorure de sodium saturée. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif afin de conduire à l'obtention d'une huile brune. Cette huile brune est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : AcOEt/ Hex : 8/2). La colonne doit être préalablement neutralisée avec de la triéthylamine. Le produit, une huile jaune, est isolé avec un rendement de 16%. Le produit secondaire **46** est isolé avec un rendement de 5%.



Formule brute : $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{ClNO}_7\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 433,82

Aspect physique : huile jaune

R_F (AcOEt/Hexane : 8/2) = 0,55

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,30 (t, 6H, CH_3 , $J=7,05$ Hz) ; 3,34-3,38 (m, 4H, CH_2) ; 3,66 (s, 6H, CH_3) ; 4,10-4,18 (m, 4H, CH_2) ; 7,34 (dd, 1H, CH_{arom} , $J=8$ Hz, $J=7,5$ Hz) ; 7,38 (d, 1H, CH_{arom} , $J=8,1$ Hz) ; 7,60 (d, 1H, CH_{arom} , $J=7,6$ Hz) ; 7,78 (s, 1H, CH_{arom}) ; 8,39 (d, 1H, N=CH , $J_{\text{H-P}}=5,0$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz):

δ (ppm) : 16,59 (CH_3 , $J_{\text{C-P}}=5,6$ Hz) ; 36,41 (CH_2) ; 51,84 (CH_3) ; 64,06 (Cq, d, $J_{\text{C-P}}=155,26$ Hz) ; 63,72 (CH_2 , $J_{\text{C-P}}=7,12$ Hz) ; 127,22 (CH_{arom}) ; 128,13 (CH_{arom}) ; 130,03 (CH_{arom}) ; 131,28 (CH_{arom}) ; 134,98 (C_{arom}) ;

137,93 (Carom) ; 160,22 (N=CH, $J_{C-P}=12,91$ Hz) ; 170,80 (COOMe, $J_{C-P}=12,81$ Hz)

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz):

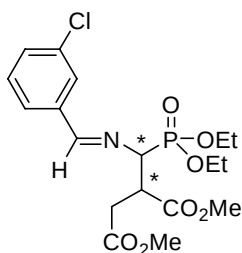
δ (ppm) : 22,81

Masse (ESI) : 434,16 (M+H), 456,20 (M+Na), 888,68 (2M+Na), 296,10 (M-P(O)(OEt)₂)

HRMS (ESI) : 456,0947 (calculé $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{ClNO}_7\text{P}+\text{Na}$: 456,0955)

IR (cm^{-1}) : 2985 (CHAr), 1732 (CO₂Me, C=O), 1643 (C=N), 1242 (P(O)(OEt)₂, P=O), 1095 (P(O)(OEt)₂, P-O-C)

- N-2-((3-chlorobenzylidèneamino)(diethoxyphosphoryl)méthyl)succinate de diméthyle **46**



46

Formule brute : $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{ClNO}_7\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 433,82

Aspect physique : huile jaune

R_F (AcOEt/Hexane : 8/2) = 0,50

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz):

δ (ppm) : 1,28 (t, 3H, CH_3 , $J=7$ Hz) ; 1,34 (t, 3H, CH_3 , $J=7$ Hz) ; 3,01 (dd, 1H, $\text{CH}_{2\text{A}}$, $J=17,1$ Hz, $J=9,5$ Hz) ; 3,11 (dd, 1H, $\text{CH}_{2\text{A}}$, $J=17$ Hz, $J=4$ Hz) ; 3,34-3,38 (m, 1H, CH) ; 3,67 (s, 3H, CH_3) ; 3,68 (s, 3H, CH_3) ; 4,05-4,21 (m, 4H, CH_2) ; 4,27 (dd, 1H, CH, $J_{\text{H-P}}=16$ Hz, $J=3,9$ Hz) ; 7,35 (dd, 1H, CHAr, $J=8$ Hz, $J=7$ Hz) ; 7,42 (d, 1H, CHAr, $J=8$ Hz) ; 7,58 (d, 1H, CHAr, $J=7$ Hz) ; 7,76 (s, 1H, CHAr) ; 8,28 (d, 1H, N=CH , $J_{\text{H-P}}=5,0$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz):

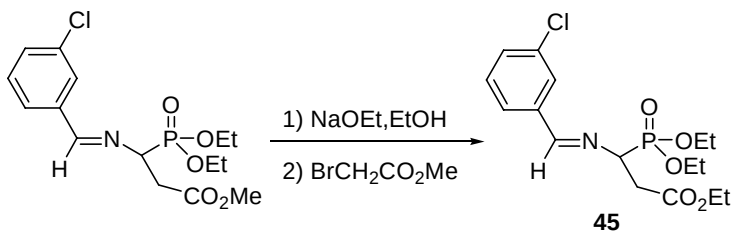
δ (ppm) : 16,67 (CH_3 , t, $J_{\text{C-P}}=2,61$ Hz) ; 32,45 (CH_2 , d, $J_{\text{C-P}}=4,19$ Hz) ; 42,74 (CH, d, $J_{\text{C-P}}=5,74$ Hz) ; 51,96 (CH_3) ; 52,48 (CH_3) ; 63,27 (CH_2 , d, $J_{\text{C-P}}=6,98$ Hz) ; 63,37 (CH_2 , d, $J_{\text{C-P}}=6,92$ Hz) ; 68,36 (CH, d, $J_{\text{C-P}}=151,52$ Hz) ; 127,24 (CHAr) ; 128,14 (CHAr) ; 130,05 (CHAr) ; 132,17 (CHAr) ; 135,05 (CAr) ; 137,36 (CAr, d, $J_{\text{C-P}}=3,34$ Hz) ; 160,77 (N=CH , $J_{\text{C-P}}=13,36$ Hz) ; 172,81 (CO_2Me) ; 172,91 (CO_2Me , d, $J_{\text{C-P}}=17,21$ Hz)

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz):

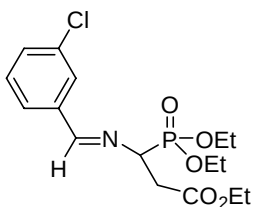
δ (ppm) : 21,56

Masse (ESI) : 434,10 (M+H), 456,15 (M+Na), 296,08 (M-P(O)(OEt)₂)

V.1.8. Synthèse de *N*-3-(3-chlorobenzylidèneamino)-3-(diethoxyphosphoryl)propanoate d'éthyle **45**



A l'imine (103 mg, 0,284 mmol) en solution dans l'éthanol (1 ml) est ajouté 160 µl d'une solution d'éthanolate de sodium dans l'éthanol (c = 2,68 mol/l). Le milieu réactionnel est agité pendant 10 minutes. Ensuite le bromoacétate d'éthyle (34 µl, 1,05éq.) est additionné goutte à goutte à 0°C. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant une nuit. Le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans le dichlorométhane et lavé avec une solution de NH₄Cl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO₄. Une huile jaune est obtenue après évaporation du solvant. Le produit est obtenu avec un rendement de 87%.



Formule brute : C₁₆H₂₃ClNO₅P

Masse Molaire (g/mole) : 375,78

Aspect physique : huile jaune

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,20 (t, 3H, CH₃, J=7,14 Hz) ; 1,32 (t, 3H, CH₃, J=7 Hz) ; 1,35 (t, 3H, CH₃, J=7 Hz) ; 3,01 (dd, 2H, CH₂, J=8 Hz, J=6,3 Hz) ; 4,04-4,28 (m, 7H, CH₂+CH) ; 7,35 (t, 1H, CH_{arom}, J=7,8 Hz) ; 7,41 (d, 1H, CH_{arom}, J=8,1 Hz) ; 7,59 (d, 1H, CH_{arom}, J=7,62 Hz) ; 7,79 (s, 1H, CH_{arom}) ; 8,35 (d, 1H, N=CH, J_{H-P}= 4,83 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz):

δ (ppm) : 14,21 (CH₃) ; 16,64 (CH₃, d, J_{C-P}=6,15 Hz) ; 35,54 (CH₂, J_{C-P}=2,47 Hz) ; 60,90 (CH₂) ; 62,98 (CH₂, J_{C-P}= 6,99 Hz) ; 63,13 (CH₂, J_{C-P}= 6,96 Hz) ; 64,92 (CH, d, J_{C-P}=158,05 Hz) ; 127,13 (CH_{Ar}) ; 128,05

(CHAr) ; 129,88 (CHAr) ; 131,13 (CHAr) ; 134,86 (CAr, $J_{C-P}=1,22$ Hz) ; 137,46 (CAr) ; 164,37 (N=CH, $J_{C-P}=17,09$ Hz) ; 170,76 (CO₂Et, $J_{C-P}= 21,3$ Hz)

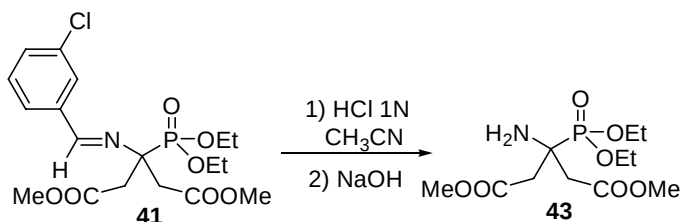
RMN ³¹P (CDCl₃, 121 MHz):

δ (ppm) : 23,02

Masse (ESI) : 376,18 (M+H), 398,15 (M+Na), 239,18 (M-P(O)(OEt)₂)

HRMS (ESI) : 398,0894 (calculé C₁₆H₂₃ClNO₅P+Na : 398,0900)

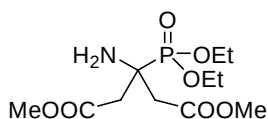
V.1.9. Synthèse de l'amine **43**



L'imine (158 mg, 0,37 mmol) est dissoute dans le minimum d'acétonitrile (0,5 ml) et 1 ml d'HCl 1N sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à température ambiante puis le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'éther. La phase étherée est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Pendant ce temps, la phase aqueuse est neutralisée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et basifiée avec une solution de NaOH 1N (pH 10). La phase aqueuse est extraite cinq fois avec du dichlorométhane. La phase chlorée est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir une huile jaune. Cette huile est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : AcOEt/iPrOH : 9/1). Une huile translucide est obtenue après purification

avec un rendement de 72%. Un produit secondaire **47** est isolé avec un rendement de 5%.

- 3-amino-3-(diéthoxyphosphoryl)pentanedioate de diméthyle



Formule brute : $C_{11}H_{22}NO_7P$

Masse Molaire (g/mole) : 311,27

Aspect physique : huile translucide

R_F (AcOEt/iPrOH : 9/1) = 0,44

RMN ^1H ($CDCl_3$, 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,31 (t, 6H, CH_3 , $J=7,05$ Hz) ; 2,19 (sl, 2H, NH_2) ; 2,81 (d, 4H, CH_2 , $J=12,05$ Hz) ; 3,67 (s, 6H, CH_3) ; 4,15 (q, 4H, CH_2 , $J=7,05$ Hz)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz):

δ (ppm) : 16,62 (CH_3 , $J_{C-P}=5,55$ Hz) ; 39,85 (CH_2 , $J=1,75$ Hz); 51,92 (CH_3) ; 53,18 (Cq, d, $J_{C-P}=158,32$ Hz) ; 63,36 (CH_2 , $J_{C-P}= 7,52$ Hz) ; 171,08 (COOMe, $J_{C-P}= 12,74$ Hz)

RMN ^{31}P ($CDCl_3$, 121 MHz):

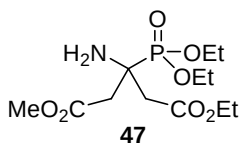
δ (ppm) : 26,43

Masse (ESI) : 312,02 (M+H), 334,14 (M+Na), 174,07 (M-P(O)(OEt)₂)

HRMS (ESI) : 334,1038 (calculé $C_{11}H_{22}NO_7P+Na$: 334,1032)

IR (cm⁻¹) : 3442 (NH₂), 1735 (CO₂Me, C=O), 1236 (P(O)(OEt)₂, P=O), 1020 (P(O)(OEt)₂, P-O-C)

- 3-amino-3-(diéthoxyphosphoryl)pentanedioate de 1-éthyl-5-méthyl
47



Formule brute : C₁₂H₂₄NO₇P

Masse Molaire (g/mole) : 325,3

Aspect physique : huile jaune

R_F (AcOEt/iPrOH : 9/1) = 0,58

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,27 (t, 3H, CH₃, J=7,15 Hz) ; 1,33 (t, 6H, CH₃, J=7,05 Hz) ; 2,21 (sl, 2H, NH₂) ; 2,81-2,85 (m, 4H, CH₂) ; 3,70 (s, 3H, CH₃) ; 4,17 (q, 4H, CH₂, J=7,00 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz):

δ (ppm) : 14,26 (CH₃) ; 16,68 (CH₃, J_{C-P}=5,47 Hz) ; 39,99 (CH₂, J=2,11 Hz) ; 51,95 (CH₃) ; 53,29 (Cq, d, J_{C-P}=158,34 Hz) ; 60,89 (CH₂) ; 63,36 (CH₂, J_{C-P}= 7,48 Hz) ; 170,70 (COOEt, J_{C-P}= 13,00 Hz) ; 171,16 (COOMe, J_{C-P}= 12,45 Hz)

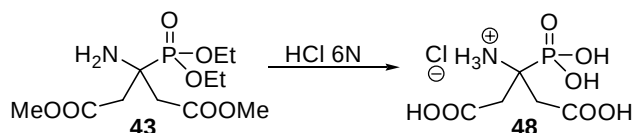
RMN ³¹P (CDCl₃, 121 MHz):

δ (ppm) : 26,08

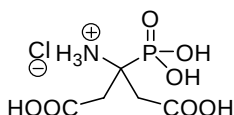
Masse (ESI) : 326,01 (M+H), 384,14 (M+Na), 188,16 (M-P(O)(OEt)₂)

HRMS (ESI) : 348,1202 (calculé $C_{12}H_{24}NO_7P+Na$: 348,1188)

V.1.10. Synthèse de l'acide 3-amino-3-phosphonopentanedioïque **48**



10 ml d'HCl 6N sont ajoutés à l'amine (47 mg) et le milieu réactionnel est mis à reflux pendant 2 jours. Après deux extractions au dichlorométhane, la phase aqueuse est lyophilisée afin de fournir un solide blanc. La réaction est quantitative.



Registry Number : 185745-21-5

Référence: Kiss E. E., Jezowska-Bojczuk M., Kiss T., *J. Coord. Chem.* **1996**, 40, 1-2, 157-166.

Formule brute : $C_5H_{11}ClNO_7P$

Masse Molaire (g/mole) : 263,57

Aspect physique : solide blanc

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) :

δ (ppm) : 2,94 (sl, 2H, CH_2) ; 2,97 (sl, 2H, CH_2)

RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz):

δ (ppm) : 36,91 (CH_2) ; 53,73 (Cq, d, $J_{\text{C-P}}=141,75\text{Hz}$) ; 173,67 (CO_2H , $J_{\text{C-P}}=10,1\text{Hz}$)

RMN ^{31}P (D_2O , 121 MHz):

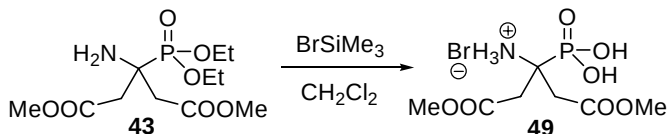
δ (ppm) : 12,45

Masse (ESI) : 226,08 (M-1), 208,02 (M- H_2O), 147,10 (M- PO_3H_2)

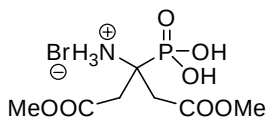
HRMS (ESI) : 226,0118 (calculé $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_7\text{P-H}$: 226,0117)

IR (cm^{-1}) : 3221 (CO_2H , C-OH), 2781 (PO_3H , P-OH), 2318 (NH_3^+Cl^-), 1651 (NH_3^+Cl^-), 1141(PO_3H , P=O)

V.1.11. Synthèse de l'acide 3-amino-1,5-dimethoxy-1,5-dioxopentan-3-ylphosphonique **49**



A l'amine (61 mg, 0,2 mmol) dissoute dans 3 ml de dichlorométhane est ajouté 4 équivalents de bromure de triméthylsilane (103 μl) goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures. Après concentration du milieu réactionnel, le résidu est repris dans 10ml de méthanol et la solution est chauffée à 50°C pendant 2 heures. Le milieu est concentré à l'évaporateur rotatif. La réaction est quantitative.



Formule brute : $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{BrNO}_7\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 336,07

Aspect physique : solide blanc-jaune

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) :

δ (ppm) : 2,96 (d, 4H, CH_2 , $J=8,05$ Hz) ; 3,67 (s, 6H, CH_3)

RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz):

δ (ppm) : 37,07 (CH_2) ; 53,11 (CH_3) ; 53,89 (Cq, d, $J_{\text{C-P}}=141,38\text{Hz}$) ; 172,33 (CO_2Me , $J_{\text{C-P}}=15,12\text{Hz}$)

RMN ^{31}P (D_2O , 121 MHz):

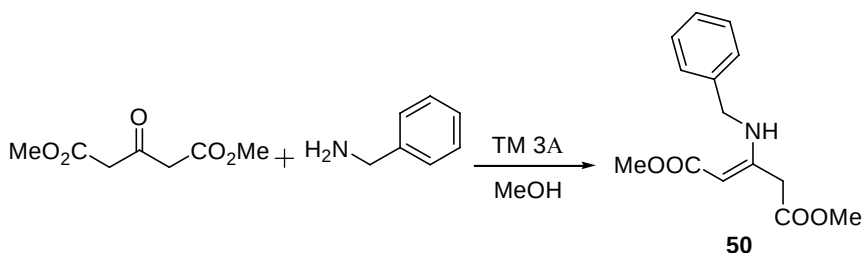
δ (ppm) : 12,38

Masse (ESI) : 254,08 (M-1)

HRMS (ESI) : 256,0589 (calculé $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}_7\text{P}+\text{H}$: 256,0586)

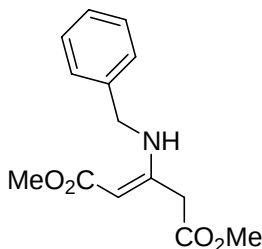
IR (cm^{-1}) : 2792 (PO_3H , P-OH), 2360 (NH_3^+Br^-), 1713 (CO_2Me , C=O), 1608 (NH_3^+Br^-), 1180 (PO_3H , P=O)

V.1.12. Synthèse de 3-(benzylamino)pent-2-ènedioate de diméthyle
50



A une solution de cétone (1 ml, 6,77 mmol) dans le méthanol ($v=15$ ml) est ajouté du tamis moléculaire 3Å et l'amine (740 μl , 1 équivalent) goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité toute la nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est filtré sur célite. Le solide brun obtenu est purifié

si nécessaire par chromatographie sur gel de silice (éluant : Hexane/AcOEt : 7/3). Le produit est obtenu avec un rendement de 67%. Le rapport E/Z est variable (cf chapitre 3).



Registry Number : 103930-94-5

Référence: Prugh J. D., Deana A. A., *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1, 37-40.

Formule brute : C₁₄H₁₇NO₄

Masse Molaire (g/mole) : 263,29

Aspect physique : solide blanc

R_F (éluant : Hexane/AcOEt : 7/3) = 0,47

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) :

δ (ppm) : 3,22 (s, 2H, CH₂, Z) ; 3,62 (s, 3H, CH₃, E) ; 3,65 (s, 3H, CH₃, Z) ; 3,68 (s, 3H, CH₃, Z) ; 3,74 (s, 3H, CH₃, E) ; 3,96 (s, 2H, CH₂, E) ; 4,24 (d, 2H, CH₂-Ph, J=5,4 Hz, E) ; 4,45 (d, 2H, CH₂-Ph, J=6,35 Hz, Z) ; 4,62 (s, 1H, CH, Z) ; 4,79 (s, 1H, CH, c) ; 5,17 (sl, 1H, NH, E) ; 7,27-7,37 (m, 5H, CHAr) ; 8,92 (sl, 1H, NH, Z)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz):

δ (ppm) : 36,90 (CH₂, Z) ; 38,82 (CH₂, E) ; 47,24 (CH₂-Ph, Z) ; 47,98 (CH₂-Ph, E) ; 50,46 (CH₃, Z) ; 50,57 (CH₃, E) ; 52,47 (CH₃, E) ; 52,69 (CH₃, Z) ; 85,35 (CH, E) ; 85,37 (CH, Z) ; 127,01 (CHAr, E) ; 127,03 (CHAr, E) ; 127,73 (CHAr, Z) ; 127,84 (CHAr, Z) ; 129,07 (CHAr, E) ; 129,08 (CHAr, Z) ; 136,94 (CAr, E) ; 138,45 (CAr, Z) ; 154,32 (CAr, E) ;

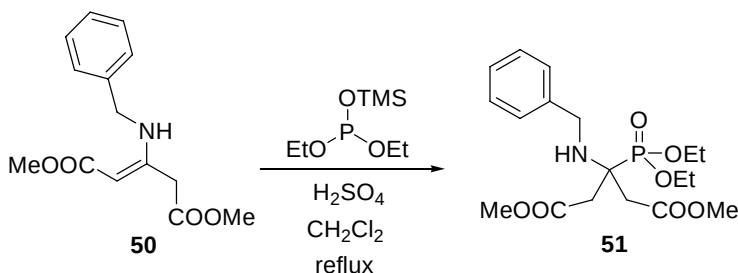
156,94 (C_{Ar}, Z) ; 169,14 (COOMe, E) ; 169,31(COOMe, Z) ; 170,94 (COOMe, E+Z)

Masse (ESI) : 264,24 (M+H), 286,12 (M+Na)

HRMS (ESI) : 286,1052 (calculé C₁₄H₁₇NO₄+Na: 286,1055)

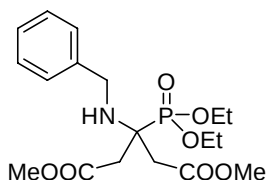
IR (cm⁻¹) : 3375 (NH), 2950 (CH_{Ar}), 1740 (CO₂Me, C=O), 1654 (C=C), 1601 (C=C)

V.1.13. Synthèse de l'amine **51**



A l'énamine (108 mg, 0,4 mmol) en solution dans le dichlorométhane (2ml) est ajouté 1,05 équivalent de phosphite de triméthylsilyldiéthyle (90 mg) et 0,5 équivalent d'acide sulfurique (11 µl). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 heures puis chauffé à reflux pendant 24 heures. La phase chlorée est lavée avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium et avec une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. L'huile jaune obtenu est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : Hexane/AcOEt : 7/3). Le produit est obtenu avec un rendement de 30%.

- 3-benzylamino-3-(diéthoxyphosphoryl)pentanedioate de diméthyle
51



Formule brute : C₁₈H₂₈NO₇P

Masse Molaire (g/mole) : 263,29

Aspect physique : solide blanc

R_F = 0,47 (éluant : Hexane/AcOEt : 7/3)

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,34 (t, 6H, CH₃, J=7,05 Hz) ; 2,97 (d, 2H, CH₂, J=15,05 Hz) ; 3,00 (d, 2H, CH₂, J=15,05 Hz) ; 3,68 (s, 6H, CH₃) ; 4,04 (s, 2H, CH₂) ; 4,19 (q, 4H, CH₂, J=7,10 Hz) ; 7,21-7,35 (m, 5H, CHAr)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz):

δ (ppm) : 16,71 (CH₃, d, J_{C-P}=5,7 Hz) ; 37,63 (CH₂, d, J_{C-P}=5,97 Hz) ; 47,89 (CH₂, d, J_{C-P} =1,72 Hz) ; 51,90 (CH₃) ; 57,90 (Cq, d, J_{C-P}=150,84 Hz) ; 62,89 (CH₂, J_{C-P}= 8,1 Hz) ; 127,08 (CHAr) ; 128,33 (CHAr); 128,53 (CHAr) ; 140,68 (CHAr) ; 171,08 (COOMe, J_{C-P}=12,57 Hz)

RMN ³¹P (CDCl₃, 121 MHz):

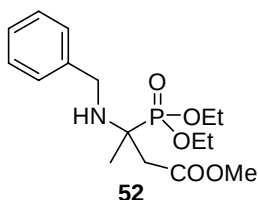
δ (ppm) : 25,34

Masse (ESI) : 424,05 (M+Na) ; 264,12 (M-P(O)(OEt)₂)

HRMS (ESI) : 424,1516 (calculé C₁₈H₂₈NO₇P+Na: 424,1501)

IR (cm⁻¹) : 3471 (NH), 2985 (CHAr), 1736 (CO₂Me, C=O), 1207 (P(O)(OEt)₂, P=O), 1018 (P(O)(OEt)₂, P-O-C)

- 3-(benzylamino)-3-(diethoxyphosphoryl)butanoate de méthyle **52**



Formule brute : C₁₇H₂₈NO₅P

Masse Molaire (g/mole) : 357,38

Aspect physique : huile jaune

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) :

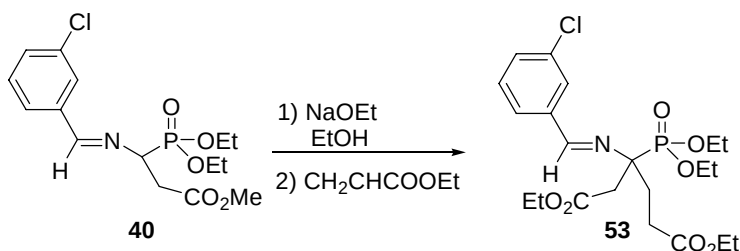
δ (ppm) : 1,35 (t, 6H, CH₃, J=7,10 Hz) ; 1,49 (d, 3H, J_{H-P}=16 Hz) ; 2,63 (dd, 1H, CH₂, J=14,2 Hz et 10,9 Hz) ; 2,90 (dd, 1H, CH₂, J=14,2 Hz et 8,8 Hz) ; 3,70 (s, 3H, CH₃) ; 3,97 (s, 2H, CH₂) ; 4,20 (qd, 4H, CH₂, J=14,1 Hz et 7,1 Hz) ; 7,20-7,38 (m, 5H, CHAr)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz):

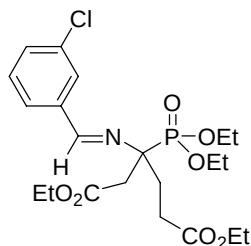
δ (ppm) : 16,82 (CH₃, d, J_{C-P}=2,8 Hz) ; 21,07 (CH₃) ; 39,37(CH₂, d, J_{C-P}=6,2 Hz) ; 47,85 (CH₂, d, J_{C-P}=3,6 Hz) ; 51,80 (CH₃) ; 55,93 (Cq, d, J_{C-P}=153,3 Hz) ; 62,48 (CH₂, J_{C-P}= 7,9 Hz) ; 127,05 (CHAr) ; 128,39 (CHAr); 128,51 (CHAr) ; 140,98 (CAr) ; 171,06 (COOMe, J_{C-P}=16,8 Hz)

Masse (ESI) : 366,12 (M+Na), 232,16

V.2.Synthèse de dérivés homologues

V.2.1. Synthèse de *N*-3-(3-chlorobenzylidèneamino)-3-(diethoxyphosphoryl)hexanedioate de diéthyle **53**

A l'imine (504 mg, 1,4 mmol) en solution dans l'éthanol (2 ml) sont ajoutés 0,2 équivalents d'une solution d'éthanolate de sodium dans l'éthanol (104 μl , $c=2,68 \text{ mol/l}$). Le milieu réactionnel est agité pendant 10 minutes. Ensuite l'acrylate d'éthyle (300 μl , 2éq.) est additionné goutte à goutte. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 4 heures. Le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans le dichlorométhane et lavé avec une solution de NH_4Cl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO_4 . Une huile violette est obtenue après évaporation du solvant. Le produit est obtenu avec un rendement de 92%.



Formule brute : $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{ClNO}_7\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 475,9

Aspect physique : huile jaune

R_F (AcOEt) = 0,68

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,20 (t, 3H, CH_3 , $J=7$ Hz) ; 1,21 (t, 3H, CH_3 , $J=7,15$ Hz) ; 1,32 (t, 6H, CH_3 , $J=7,05$ Hz) ; 2,43-2,61 (m, 3H, CH_2) ; 2,74 (d, 1H, CH_2 , $J=11$ Hz) ; 2,93 (dd, 1H, CH_2 , $J=14,65$ Hz et $J=7,7$ Hz) ; 3,12 (dd, 1H, CH_2 , $J=14,65$ et $J=13,6$ Hz) ; 4,06-4,23 (m, 8H, CH_2) ; 7,35 (dd, 1H, CHAr , $J=8$ Hz, $J=7,6$ Hz) ; 7,41 (d, 1H, CHAr , $J=8,05$ Hz) ; 7,61 (d, 1H, CHAr , $J=7,55$ Hz) ; 7,79 (s, 1H, CHAr) ; 8,49 (d, 1H, N=CH , $J_{\text{H-P}}=4,65$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz):

δ (ppm) : 14,33 (CH_3) ; 14,36 (CH_3) ; 16,61 (CH_3 , d, $J_{\text{C-P}}=5,03$ Hz) ; 29,11 (CH_2) ; 29,59 (CH_2 , d, $J_{\text{C-P}}=4,51$ Hz) ; 38,03 (CH_2) ; 60,57 (CH_2) ; 60,80 (CH_2) ; 63,44 (CH_2 , d, $J_{\text{C-P}}=7,30$ Hz) ; 63,46 (CH_2 , d, $J_{\text{C-P}}=7,10$ Hz) ; 64,91 (Cq, d, $J_{\text{C-P}}=150,14$ Hz) ; 127,19 (CHAr) ; 128,11 (CHAr) ; 130,00 (CHAr) ; 131,28 (CHAr) ; 134,94 (CAr) ; 138,04 (CAr, d, $J_{\text{C-P}}=3,41$ Hz) ; 160,98 (N=CH , $J_{\text{C-P}}=12,26$ Hz) ; 169,69 (CO_2Et , $J_{\text{C-P}}=16,09$ Hz) ; 173,41 (CO_2Et)

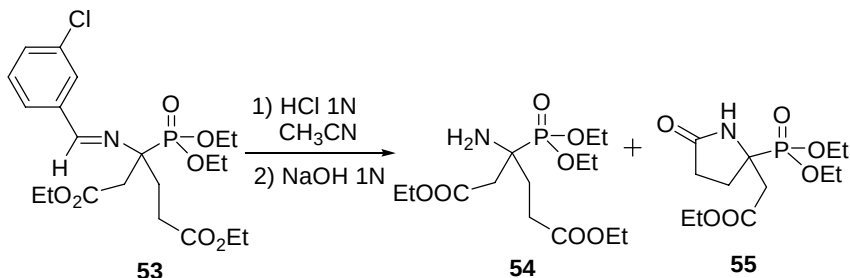
RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz):

δ (ppm) : 24,31

Masse (ESI) : 476,16 (M+H), 498,19 (M+Na), 972,81 (2M+Na), 338,16 (M-P(O)(OEt)₂)

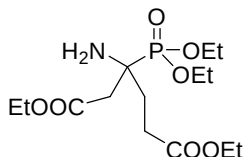
HRMS (ESI) : 498,1439 (calculé $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{ClNO}_7\text{P+Na}$: 498,1424)

IR (cm^{-1}) : 2981 (CHAr), 2931-2908 (CH_2), 1732 (CO_2Me , C=O), 1639 (C=N), 1242 (P(O)(OEt)_2 , P=O), 1022 (P(O)(OEt)_2 , P-O-C)

V.2.2. Synthèse des produits **54** et **55**

L'imine (676 mg, 1,42 mmol) est dissoute dans le minimum d'acétonitrile (1,5 ml) et 1,5 équivalents d'HCl 1N (2,2 ml) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à température ambiante puis le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'éther. La phase étherée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Pendant ce temps, la phase aqueuse est neutralisée avec une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium et basifiée avec une solution de NaOH 1N (pH 10). La phase aqueuse est extraite cinq fois avec du dichlorométhane. La phase chlorée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir une huile jaune. Cette huile est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : AcOEt/iPrOH : 14/1). L'amine est obtenue avec un rendement de 31% et l'amide avec un rendement de 29%.

- 3-amino-3-(diethoxyphosphoryl)hexanedioate de diéthyle **54**



Formule brute : $C_{14}H_{28}NO_7P$

Masse Molaire (g/mole) : 353,35

Aspect physique : huile translucide

R_F (AcOEt/iPrOH : 20/1) = 0,47

RMN ^1H ($CDCl_3$, 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,27 (t, 6H, CH_3 , $J=7,1$ Hz) ; 1,35 (t, 6H, CH_3 , $J=7,1$ Hz) ; 1,85 (sl, 2H, NH_2) ; 2,09 (td, 2H, CH_2 , $J=16,3$ Hz, $J=8,2$ Hz) ; 2,50-2,72 (m, 4H, CH_2) ; 4,10- 4,23 (m, 8H, CH_2)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz):

δ (ppm) : 14,29 (CH_3) ; 14,36 (CH_3) ; 16,61 (CH_3 , $J_{C-P}=1,025$ Hz) ; 29,06 (CH_2) ; 31,53 (CH_2) ; 39,7 (CH_2) ; 53,74 (Cq, d, $J_{C-P}=158,62$ Hz) ; 60,66 (CH_2) ; 60,91 (CH_2) ; 62,85 (CH_2 , d, $J_{C-P}= 9,12$ Hz) ; 63,24 (CH_2 , d, $J_{C-P}= 7,81$ Hz) ; 170,64 (COOEt, $J_{C-P}= 13$ Hz) ; 173,54 (COOEt)

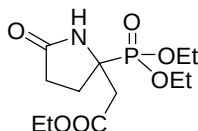
RMN ^{31}P ($CDCl_3$, 121 MHz):

δ (ppm) : 28,30

Masse (ESI) : 354,06 (M+H), 376,14 (M+Na), 216,18 (M-P(O)(OEt)₂)

HRMS (ESI) : 376,1508 (calculé $C_{14}H_{28}NO_7P+Na$: 376,1501)

- δ -(diethoxyphosphoryl)- δ -(β -carbethoxyethyl)- α -pyrrolidone **55**



Formule brute : $C_{12}H_{22}NO_6P$

Masse Molaire (g/mole) : 353,35

Aspect physique : huile translucide

R_F (AcOEt/iPrOH : 20/1) = 0,15

RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) :

δ (ppm) : 1,28 (t, 3H, CH_3 , $J=7,1$ Hz) ; 1,35 (td, 6H, CH_3 , $J=7,1$ Hz et $J_{H-P}=2,7$ Hz) ; 2,15-2,29 (m, 1H, CH_2) ; 2,33-2,40 (m, 1H, CH_2) ; 2,47-2,68 (m, 3H, CH_2) ; 2,90 (dd, 1H, CH_2 , $J=15,1$ Hz et $J=7,3$ Hz) ; 4,12-4,24 (m, 6H, CH_2) ; 6,21 (sl, NH)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz):

δ (ppm) : 14,24 (CH_3) ; 16,66 (CH_3 , $J_{C-P}=5,62$ Hz) ; 28,47 (CH_2) ; 29,71 (CH_2) ; 40,74 (CH_2 , $J_{C-P}= 9,45$ Hz) ; 57,84 (Cq, d, $J_{C-P}=164,69$ Hz) ; 61,26 (CH_2) ; 63,33 (CH_2 , d, $J_{C-P}= 7,57$ Hz) ; 63,76 (CH_2 , d, $J_{C-P}= 7,36$ Hz) ; 169,61 (CO_2Et , $J_{C-P}= 11$ Hz) ; 177,35 (NHCO, $J_{C-P}= 3,75$ Hz)

RMN ^{31}P ($CDCl_3$, 121 MHz):

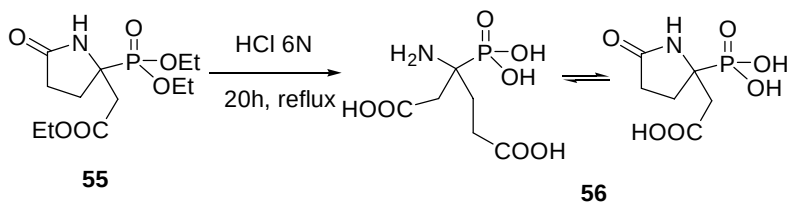
δ (ppm) : 24,60

Masse (ESI) : 308,18 (M+H), 330,20 (M+Na), 636,90 (2M+Na), 170,16 (M-P(O)(OEt)₂)

HRMS (ESI) : 330,1087 (calculé $C_{12}H_{22}NO_6P+Na$: 330,1082)

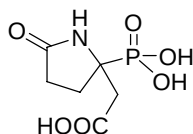
IR (cm^{-1}) : 3213 (NH), 2981 (CH_2), 1732 (CO_2Et , C=O), 1701(NHCO, C=O), 1238 (P(O)(OEt)₂, P=O), 1022 (P(O)(OEt)₂, P-O-C)

V.2.3. Synthèse du mélange 56



10 ml d'HCl 6N sont ajoutés à l'amide (100 mg) et le milieu réactionnel est mis à reflux pendant 2 jours. Après deux extractions au dichlorométhane, la phase aqueuse est lyophilisée afin de fournir un solide blanc. On obtient un mélange en équilibre de manière quantitative.

- Acide 2-(5-oxo-2-phosphonopyrrolidin-2-yl) acétique



Formule brute : $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NO}_6\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 223,12

Aspect physique : solide blanc

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) :

δ (ppm) : 2,25-2,28 (m, 1H, CH_2) ; 2,45-2,47 (m, 3H, CH_2) ; 2,74 (dd, 1H, CH_2 , $J=15,5$ Hz, $J=7,5$ Hz) ; 2,84 (dd, 1H, CH_2 , $J=15,5$ Hz, $J=8,1$ Hz)

RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz):

δ (ppm) : 26,91 (CH_2) ; 30,51 (CH_2) ; 39,74 (CH_2 , $J_{\text{C-P}}=8,5\text{Hz}$) ; 59,28 (Cq, d, $J_{\text{C-P}}=156,46$ Hz) ; 174,53 (CO_2H , $J_{\text{C-P}}=14,8$ Hz) ; 181,68 (NHCO, $J_{\text{C-P}}=4,9$ Hz)

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz):

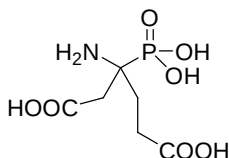
δ (ppm) : 20,81

Masse (ESI) : 224,04 (M+H), 447,00 (2M+H)

HRMS (ESI) : 224,0316 (calculé $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NO}_6\text{P}+\text{H}$: 224,0324)

IR (cm^{-1}) : 3333 (NH), 2923 (CO_2H et PO_3H , C-OH et P-OH), 1647 (CO_2H et NHCO , C=O), 1207 (PO_3H , P=O)

- Acide 3-amino-3-phosphonohexanedioïque



Formule brute : $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_7\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 241,14

Aspect physique : solide blanc

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) :

δ (ppm) : 2,07-2,18 (m, 2H, CH_2) ; 2,49-2,57 (m, 1H, CH_2) ; 2,58 (m, 1H, CH_2) ; 2,73-2,79 (m, 1H, CH_2) ; 2,87 (dd, 1H, CH_2 , $J=17,05$ Hz, $J=7,3$ Hz)

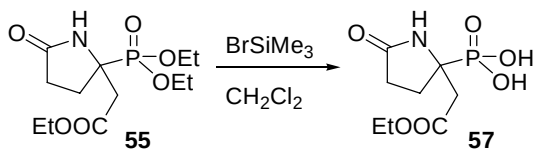
RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz):

δ (ppm) : 28,53 (CH_2) ; 29,10 (CH_2 , $J_{\text{C-P}}=2,8$ Hz) ; 35,93 (CH_2) ; 55,29 (Cq, d, $J_{\text{C-P}}=143,64$ Hz) ; 173,80 (CO_2H , d, $J_{\text{C-P}}=13,5$ Hz) ; 176,91 (CO_2H)

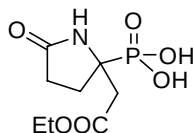
Masse (ESI) : 242,05 (M+H)

HRMS (ESI) : 242,0441 (calculé $C_6H_{12}NO_7P+H$: 242,0430)

V.2.4. Synthèse de l'acide 2-(2-ethoxy-2-oxoéthyl)-5-oxopyrrolidin-2-ylphosphonique **57**



A l'amine (45 mg, 0,15 mmol) dissoute dans 3 ml de dichlorométhane est ajouté 4 équivalents de bromure de triméthylsilane (77 μ l) goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures. Après concentration du milieu réactionnel, le résidu est repris dans l'eau milliQ et lyophilisé. Le rendement de la réaction est de 90%.



Formule brute : $C_8H_{14}NO_6P$

Masse Molaire (g/mole) : 251,17

Aspect physique : solide blanc hygroscopique

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,25 (t, 3H, CH_3 , $J = 7,2$ Hz); 2,23-2,61 (m, 4H, CH_2) ; 2,78 (ddd, 1H, CH_2 , $J = 14,9$ Hz, $J = 6,9$ Hz, $J = 5,1$ Hz) ; 2,91 (ddd, 1H, CH_2 , $J = 15,4$ Hz, $J = 8$ Hz, $J = 3,1$ Hz) ; 4,19 (q, 2H, CH_2 , $J = 7,1$ Hz)

RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz):

δ (ppm) : 14,80 (CH_3) ; 27,78 (CH_2) ; 31,38 (CH_2) ; 40,17 (CH_2 , d, $J_{\text{C-P}} = 9$ Hz) ; 59,73 (Cq, d, $J_{\text{C-P}} = 161$ Hz) ; 63,18 (CH_2) ; 173,50 (CO_2Et , d, $J_{\text{C-P}} = 15,63$ Hz) ; 182,07 (NHCO , d, $J_{\text{C-P}} = 5$ Hz))

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz):

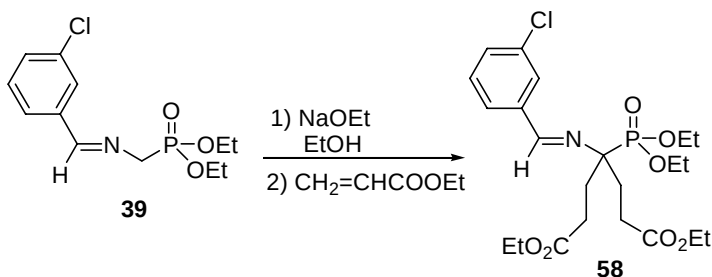
δ (ppm) : 22,30

Masse (ESI) : 252,06 (M+H), 170,13 (M- PO_3H_2)

HRMS (ESI) : 252,0632 (calculé $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}_6\text{P}+\text{H}$: 252,0637)

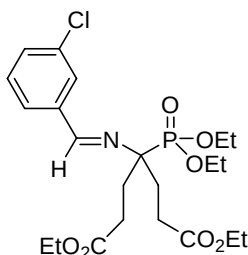
IR (cm^{-1}) : 3282 (NH et PO_3H , P-OH), 1712 (CO_2Et , C=O), 1651 (NHCO , C=O), 1207 (PO_3H , P=O)

V.2.5. Synthèse de N-4-(3-chlorobenzylidèneamino)-4-(diethoxyphosphoryl)heptanedioate de diéthyle **58**



A l'imine (280 mg, 1 mmol) en solution dans l'éthanol anhydre ($v=3\text{ml}$) est ajouté 100 μl d'une solution d'éthanolate de sodium dans l'éthanol (0,25 équivalent). Le milieu réactionnel est agité pendant 15 minutes. Ensuite l'acrylate d'éthyle (422 μl , 2éq.) est additionné goutte à goutte à 0°C . Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 24 heures. Le milieu

réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle et lavé avec une solution de NH_4Cl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir une huile brune. Cette huile est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$: 7/3) avec un rendement de 44%.



Formule brute : $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{ClNO}_7\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 489,93

Aspect physique : huile jaune

R_F ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$: 7/3) = 0,49

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz):

δ (ppm) : 1,26 (t, 6H, CH_3 , $J=7,05$ Hz) ; 1,32 (t, 6H, CH_3 , $J=7,1$ Hz) ; 2,22-2,36 (m, 4H, CH_2) ; 2,42-2,49 (m, 2H, CH_2) ; 2,55-2,61 (m, 2H, CH_2) ; 4, 2 (m, 8H, CH_2) ; 7,36 (dd, 1H, CHAr , $J=8,1$ Hz et $J=7,5$ Hz) ; 7,42 (d, 1H, CHAr , $J=8,1$ Hz) ; 7,61 (d, 1H, CHAr , $J=7,5$ Hz) ; 7,79 (s, 1H, CHAr) ; 8,49 (d, 1H, N=CH , $J_{\text{H-P}}=4,2$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz):

δ (ppm) : 14,37 (CH_3) ; 16,68 (CH_3 , d, $J_{\text{C-P}}=7,17$ Hz) ; 29,04 (CH_2 , d, $J_{\text{C-P}}=6,5$ Hz) ; 29,42 (CH_2) ; 64,82 (Cq, d, $J_{\text{C-P}}=147,37$ Hz) ; 60,71 (CH_2) ; 63,12 (CH_2 , $J_{\text{C-P}}=7,45$ Hz) ; 127,15 (CHAr) ; 127,85 (CHAr) ; 130,04

(CHAr) ; 131,25 (CHAr) ; 135,01 (CAr) ; 138,15 (CAr, d, J_{C-P} = 4,78 Hz) ; 161,04 (N=CH, J_{C-P} = 12,55 Hz) ; 173,50 (CO₂Et)

RMN ³¹P (CDCl₃, 121 MHz):

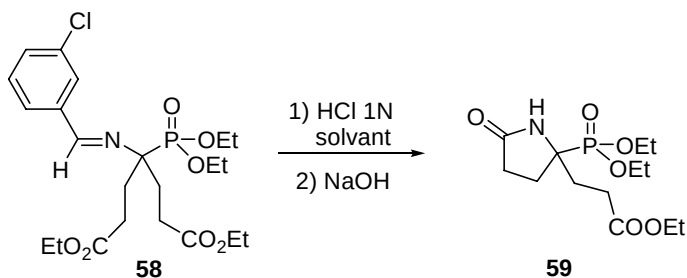
δ (ppm) : 25,62

Masse (ESI) : 490,03 (M+1) ; 512,08 (M+Na) ; 352,09 (M-P(O)(OEt)₂)

HRMS (ESI) : 512,1595 (calculé C₂₂H₃₃ClNO₇P+Na: 512,1581)

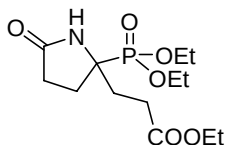
IR (cm⁻¹) : 2981 (CHAr), 2931-2908 (CH₂), 1732 (CO₂Me, C=O), 1639 (C=N), 1242 (P(O)(OEt)₂, P=O), 1022 (P(O)(OEt)₂, P-O-C)

V.2.6. Synthèse de δ-(diethoxyphosphoryl)-δ-(β-carbethoxypropyl)-α-pyrrolidone **59**



L'imine (206 mg, 0,42 mmol) est dissoute dans le minimum d'acétonitrile (0,6 ml) et 1 ml d'HCl 1N sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à température ambiante. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'éther. La phase étherée est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Pendant ce temps, la phase aqueuse est neutralisée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et basifiée avec une solution de NaOH 1N (pH 10). La phase aqueuse est

extraite cinq fois avec du dichlorométhane. La phase chlorée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir une huile jaune avec un rendement de 52%.



Formule brute : $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{NO}_6\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 321,31

Aspect physique : huile légèrement jaune

R_F ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$: 5/5) = 0,18

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz):

δ (ppm) : 1,25 (t, 3H, CH_3 , $J=7,1$ Hz) ; 1,34 (td, 6H, CH_3 , $J=7,1$ Hz et $J_{\text{H-P}}=2,3$ Hz) ; 1,86-2,09 (m, 2H, CH_2) ; 2,16-2,57 (m, 6H, CH_2) ; 4,10-4,23 (m, 6H, CH_2) ; 6,24 (sl, 1H, NH)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz):

δ (ppm) : 14,24 (CH_3) ; 16,61 (CH_3 , d, $J_{\text{C-P}}=5,30$ Hz) ; 27,30 (CH_2) ; 28,48 (CH_2 , d, $J_{\text{C-P}}=4,8$ Hz) ; 30,02 (CH_2) ; 30,75 (CH_2 , d, $J_{\text{C-P}}=9,10$ Hz) ; 59,23 (Cq, d, $J_{\text{C-P}}=161,26$ Hz) ; 60,81 (CH_2) ; 62,92 (CH_2 , $J_{\text{C-P}}=7,71\text{Hz}$) ; 63,50 (CH_2 , $J_{\text{C-P}}=7,71\text{Hz}$) ; 172,97 (CO_2Et) ; 177,97 (NHCO)

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz):

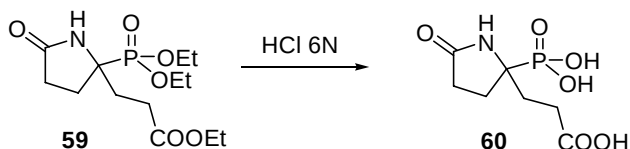
δ (ppm) : 26,20

Masse (ESI) : 322,06 ($\text{M}+1$) ; 344,18 ($\text{M}+\text{Na}$) ; 184,05 ($\text{M-P}(\text{O})(\text{OEt})_2$)

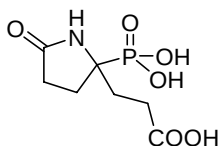
HRMS (ESI) : 344,1236 (calculé $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{NO}_6\text{P}+\text{Na}$: 344,1239)

IR (cm⁻¹) : 3321 (NH), 2982-2847 (CH₂), 1704 (NHCO et CO₂Et, C=O), 1242 (P(O)(OEt)₂, P=O), 1022 (P(O)(OEt)₂, P-O-C)

V.2.7. Synthèse de l'acide 3-(5-oxo-2-phosphonopyrrolidin-2-yl)propanoïque **60**



10 ml d'HCl 6N sont ajoutés à l'amine (70 mg) et le milieu réactionnel est mis à reflux pendant 2 jours. Après deux extractions au dichlorométhane, la phase aqueuse est lyophilisée afin de fournir un solide blanc. La réaction est quantitative.



Formule brute : C₇H₁₂NO₆P

Masse Molaire (g/mole) : 237,15

Aspect physique : solide blanc hygroscopique

RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) :

δ (ppm) : 1,85-2,12 (m, 4H, CH₂) ; 2,21-2,50 (m, 4H, CH₂)

RMN ¹³C (D₂O, 75 MHz):

δ (ppm) : 25,89 (CH₂) ; 28,23 (CH₂, J_{C-P}=9 Hz) ; 29,68 (CH₂, J_{C-P}=7,75 Hz) ; 30,42 (CH₂) ; 60,35 (Cq, d, J_{C-P}=156 Hz) ; 177,77 (CO₂H) ; 181,44 (NHCO)

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz):

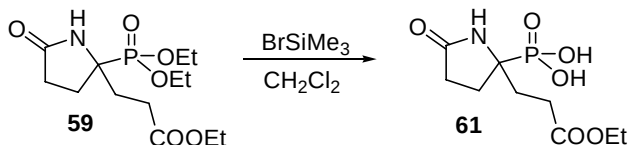
δ (ppm) : 22,46

Masse (ESI) : 236,16 (M-H), 218,01 (M-H₂O)

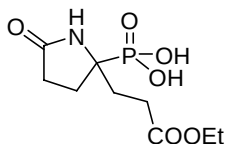
HRMS (ESI) : 238,0483 (calculé $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NO}_6\text{P}+\text{Na}$: 238,0481)

IR (cm^{-1}) : 3198 (NH), 3313 (CO_2H , C-OH), 2955 (CH_2), 2851 (PO_3H , P-OH), 1732 (CO_2H , C=O), 1701 (NHCO, C=O), 1207 (PO_3H_2 , P=O)

V.2.8. Synthèse de l'acide 2-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-5-oxopyrrolidin-2-ylphosphonique **61**



A l'amine (48 mg, 0,15 mmol) dissoute dans 2 ml de dichlorométhane est ajouté 4 équivalents de bromure de triméthylsilane (78 μl) goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures. Après concentration du milieu réactionnel, le résidu est repris dans l'eau milliQ et lyophilisé avec un rendement de 75%.



Formule brute : $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_6\text{P}$

Masse Molaire (g/mole) : 265,2

Aspect physique : solide blanc

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,09 (t, 3H, CH_3 , $J = 7,15$ Hz); 1,85-2,11 (m, 3H, CH_2) ; 2,23-2,44 (m, 5H, CH_2) ; 4,00 (q, 2H, CH_2 , $J = 7,15$ Hz)

RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz):

δ (ppm) : 13,62 (CH_3) ; 26,08 (CH_2) ; 28,59 (CH_2 , $J_{\text{C-P}} = 8,86$ Hz) ; 29,92 (CH_2 , $J_{\text{C-P}} = 8,36$ Hz) ; 30,50 (CH_2) ; 60,67 (Cq, d, $J_{\text{C-P}} = 158$ Hz) ; 62,37 (CH_2) ; 176,23 (CO_2Et) ; 181,52 (NHCO)

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz):

δ (ppm) : 24,63

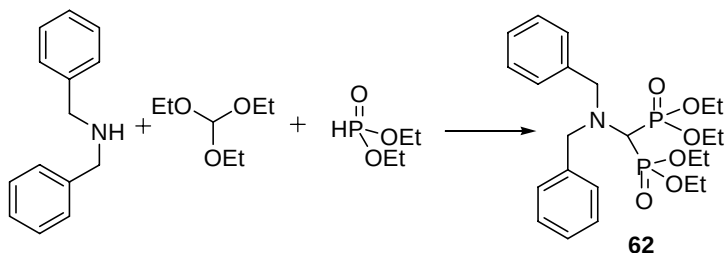
Masse (ESI) : 288,10 ($\text{M} + \text{Na}$), 530,99 ($2\text{M} + 1$), 552,96 ($2\text{M} + \text{Na}$), 184,04 ($\text{M} - \text{PO}_3\text{H}_2$)

HRMS (ESI) : 287,9703 (calculé $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_6\text{P} + \text{Na}$: 288,0613)

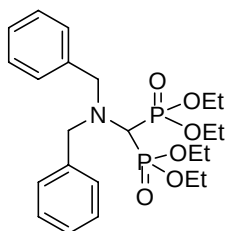
IR (cm^{-1}) : 3282 (NH), 2935 (PO_3H , P-OH), 2981 (CH_2), 1716 (CO_2Et , C=O), 1666 (NHCO , C=O), 1196 (PO_3H_2 , P=O)

VI. Synthèse de dérivés bisphosphoniques

VI.1. Synthèse de (dibenzylamino)méthyldiphosphonate de tétraéthyle **62**



La dibenzylamine (2,05 ml, 10,58 mmol), le triéthylorthoformate (2,11 ml, 1,2 éq.) et le diéthylphosphite (4,33 ml, 3,2 éq.) sont chauffés à reflux à 160°C pendant 42 heures. La réaction est suivie par CCM (éluant : AcOEt/Hexane/MeOH : 14/4/1). Le milieu réactionnel est dilué dans le dichlorométhane et est lavé une fois avec une solution de NaOH 2M et deux fois avec une solution de NaOH 1M puis deux fois avec une solution saturée de sel de sodium. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis concentrée à l'évaporateur rotatif. L'huile légèrement jaune est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : AcOEt/Hexane/MeOH : 14/4/1). Le produit est obtenu avec un rendement de 42%.



Registry Number : 80474-97-1

Référence : Kantoci D., Denike J. K., Wechter W. J., *Synth.Comm.* **1996**, 26, 10, 2037-2043.

Formule brute : $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NO}_6\text{P}_2$

Masse Molaire (g/mole) : 483,47

Aspect physique : huile jaune

R_F (AcOEt/Hexane/MeOH : 14/4/1) = 0,18

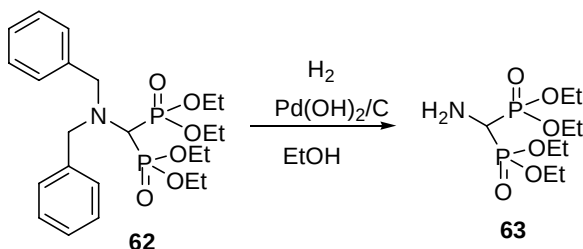
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) :

δ (ppm) : 1,33 (t, 12H, CH₃, J=7,8 Hz) ; 3,56 (t, 1H, CH, J_{H-P}=25,05 Hz) ; 3,95-4,17 (m, 12H, CH₂) ; 7,23-7,49 (m, 10H, CHAr)

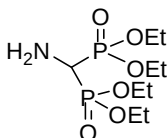
RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz):

δ (ppm) : 18,15 (CH₃) ; 45,82 (CH, t, J_{C-P}=140,84 Hz) ; 57,52 (CH₂) ; 62,14 (CH₂) ; 127,92 (CHAr) ; 128,55 (CHAr) ; 128,57 (CHAr) ; 128,73 (CHAr)

VI.2.Synthèse d'aminométhyldiphosphonate de tétraéthyle **63**



L'amine (743 mg, 1,54 mmol) est dissoute dans l'éthanol absolu (15 ml) et le Pd(OH)₂/C (100 mg) est ajouté. Le milieu réactionnel est mis sous une atmosphère d'hydrogène. Le milieu réactionnel est agité pendant toute la nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est filtré, le filtrat est évaporé et une huile légèrement jaune est obtenue avec un rendement de 97%.



Registry Number : 80474-99-3

Référence : Kantoci D., Denike J. K., Wechter W. J., *Synth.Commun.* **1996**, 26, 10, 2037-2043.

Formule brute : C₉H₂₃NO₆P₂

Masse Molaire (g/mole) : 303,23

Aspect physique : huile orange

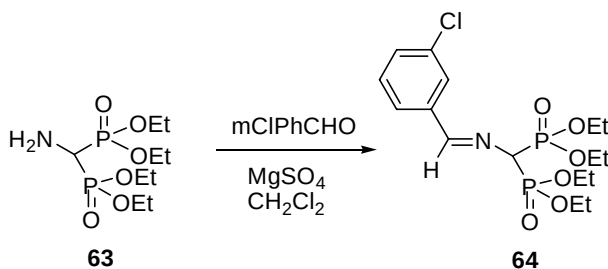
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) :

δ (ppm) : 1,36 (t, 12H, CH₃, J=7,02 Hz) ; 2,16 (sl, 2H, NH₂) ; 3,45 (t, 1H, CH, J_{H-P}=20,6 Hz) ; 4,20-4,28 (m, 8H, CH₂)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz):

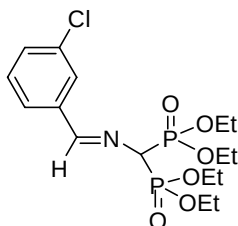
δ (ppm) : 16,21 (CH₃) ; 46,18 (CH, t, J_{C-P}=142,75 Hz) ; 63,41 (CH₂)

VI.3.Synthèse de l'imine **64**



A l'amine (546 mg, 1,8 mmol) dissoute dans le dichlorométhane anhydre (7 ml) est ajouté le MgSO₄ (1g) et l'aldéhyde (183 µl, 0,9 éq.) goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant une nuit. Le milieu réactionnel est filtré et le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif. L'huile orange est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : AcOEt/CH₂Cl₂ : 7/3). L'imine est obtenue avec un rendement de 80%.

- *N*-(3-chlorobenzylidene)aminomethyldiphosphonate de tétraéthyle
64



Formule brute : C₁₆H₂₆ClNO₆P₂

Masse Molaire (g/mole) : 425,78

Aspect physique : huile jaune

R_F (AcOEt/CH₂Cl₂ : 7/3)= 0,34

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,33 (t, 6H, CH₃, J=7,1Hz) ; 1,35 (t, 6H, CH₃, J=7,1Hz) ; 4,19-4,32 (m, 8H, CH₂) ; 4,38 (t, 1H, CH, J_{H-P}=18,27 Hz) ; 7,37 (dd, 1H, CHAr, J=8,3 Hz, J=7,4 Hz) ; 7,44 (d, 1H, CHAr, J=8,3 Hz) ; 7,63 (d, 1H, CHAr, J=7,4 Hz) ; 7,81 (s, 1H, CHAr) ; 8,29 (t, 1H, N=CH, J_{H-P}= 4,27 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz):

δ (ppm) : 16,30 (CH₃, J_{C-P}=5,6 Hz) ; 63,28 (CH₂, J_{C-P}= 3,5 Hz) ; 67,89 (CH, t, J_{C-P}=148,22 Hz) ; 126,90 (CHAr) ; 127,83 (CHAr) ; 129,82 (CHAr) ; 131,29 (CHAr) ; 134,67 (CAr) ; 137,02 (CAr, J_{C-P}= 2,75 Hz) ; 165,92 (N=CH, J_{C-P}=15,21 Hz)

RMN ³¹P (CDCl₃, 121 MHz):

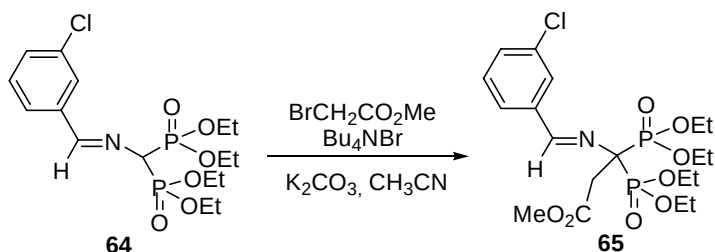
δ (ppm) : 15,90-15,92

Masse (ESI) : 426,13 (M+H)

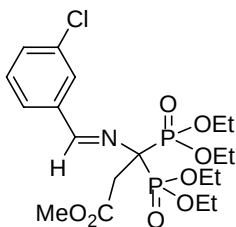
HRMS (ESI) : 448,0809 (calculé $C_{16}H_{26}ClNO_6P_2+Na$: 448,0822)

IR (cm^{-1}) : 2981 (CHAr), 1631 (C=N), 1253 (P(O)(OEt)₂, P=O), 1026 (P(O)(OEt)₂, P-O-C)

VI.3.1. Synthèse de N-(3-chlorobenzylideneamino)-3,3-bis(diethoxyphosphoryl)propanoate de méthyle **65**



A une solution d'imine (**64**) (70 mg, 0,16 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (1 ml) est ajouté 2 équivalents de carbonate de potassium (44 mg), 0,1 équivalent de bromure de tétrabutylammonium (5 mg) et 2 équivalents de bromométhylacetate (16 μ l). Le mélange hétérogène est chauffé à 50 °C pendant 18 heures. Le milieu réactionnel est filtré et concentré sous pression réduite à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans le dichlorométhane, lavé avec une solution saturée de chlorure de sodium et séché sur $MgSO_4$. Une huile jaune est obtenue après concentration à l'évaporateur rotatif et séchage sur la rampe à vide avec un rendement de 91%. Ce produit est utilisé tel quel dans la réaction suivante.



Formule brute : $C_{19}H_{30}ClNO_8P_2$

Masse Molaire (g/mole) : 497,84

Aspect physique : huile jaune

R_F (AcOEt/iPrOH : 9/1) = 0,48

RMN ^1H (CDCl₃, 500 MHz) :

δ (ppm) : 1,29 (t, 6H, CH₃, J=7,1 Hz) ; 1,30 (t, 6H, CH₃, J=7,1 Hz) ; 3,31 (dd, 2H, CH₂, J=14,4 Hz et J=11,1 Hz) ; 3,61 (s, 3H, CH₃) ; 4,12-4,25 (m, 8H, CH₂) ; 7,33 (dd, 1H, CHAr, J=7,5 Hz, J=8 Hz) ; 7,39 (d, 1H, CHAr, J=8 Hz) ; 7,64 (d, 1H, CHAr, J=7,5 Hz) ; 7,79 (s, 1H, CHAr) ; 8,74 (t, 1H, N=CH, J_{H-P} = 3,7 Hz)

RMN ^{13}C (CDCl₃, 125 MHz):

δ (ppm) : 16,55 (CH₃, d, J_{C-P}=6 Hz) ; 35,66 (CH₂) ; 51,95 (CH₃) ; 64,02 (CH₂, d, J_{C-P} = 7,52 Hz) ; 64,14 (CH₂, d, J_{C-P} = 6,91 Hz) ; 68,98 (Cq, t, J_{C-P}=144 Hz) ; 127,11 (CHAr) ; 128,20 (CHAr) ; 130,05 (CHAr) ; 131,37 (CHAr) ; 134,95 (CAr) ; 137,90 (CAr, t, J_{C-P}=3 Hz) ; 164,35 (N=CH, t, J_{C-P}=13,30 Hz) ; 169,65 (CO₂Me, t, J_{C-P}=11,65 Hz)

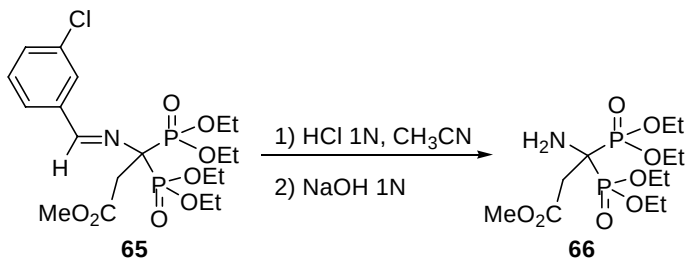
RMN ^{31}P (CDCl₃, 121 MHz):

δ (ppm) : 17,38

Masse (ESI) : 498,12 (M+1) ; 520,16 (M+Na) ; 1016,68 (2M+Na)

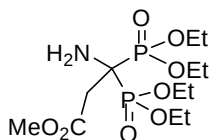
HRMS (ESI) : 498,1221 (calculé $C_{19}H_{30}ClNO_8P_2+H$: 498,1213)

IR (cm⁻¹) : 2981 (CHAr), 1740 (CO₂Me, C=O), 1639 (C=N), 1250 (P(O)(OEt)₂, P=O), 1022 (P(O)(OEt)₂, P-O-C)

VI.3.2. Synthèse de l'amine **66**

L'imine (152 mg, 0,30 mmol) est dissoute dans 0,5 ml d'acétonitrile et 1 ml d'HCl 1N sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à température ambiante puis le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'éther. La phase étherée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Pendant ce temps, la phase aqueuse est neutralisée avec une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium et basifiée avec une solution de NaOH 1N (pH 10). La phase aqueuse est extraite cinq fois avec du dichlorométhane. La phase chlorée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir une huile jaune. Cette huile est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : $\text{AcOEt}/i\text{PrOH}$: 9/1). Une huile jaune est obtenue après purification avec un rendement de 76%.

- 3-Amino-3,3-bis(diethoxyphosphoryl)propanoate de méthyle



Formule brute : $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{NO}_8\text{P}_2$

Masse Molaire (g/mole) : 375,29

Aspect physique : huile jaune

R_F (AcOEt/iPrOH : 9/1) = 0,21

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) :

δ (ppm) : 1,33 (t, 12H, CH₃, J=7,08Hz) ; 2,30 (sl, 2H, NH₂) ; 2,86 (d, 1H, CH₂, J=14,1 Hz) ; 2,91 (d, 1H, CH₂, J=14,1Hz) ; 3,69 (s, 3H, CH₃) ; 4,12-4,25 (m, 8H, CH₂)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz):

δ (ppm) : 16,62 (CH₃, d, J_{C-P}=2,92 Hz) ; 36,85 (CH₂, t, J_{C-P}=2,40 Hz) ; 52,07 (CH₃) ; 53,87 (Cq, t, J_{C-P}=145,50 Hz) ; 63,68 (CH₂, d, J_{C-P}= 3,58 Hz) ; 64,02 (CH₂, d, J_{C-P}= 3,40 Hz) ; 170,81 (CO₂Me, t, J_{C-P}=12,90 Hz)

RMN ³¹P (CDCl₃, 121 MHz):

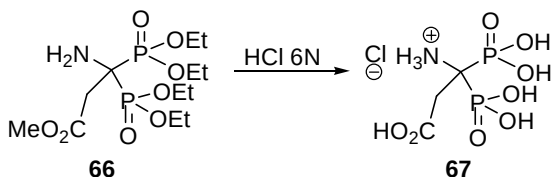
δ (ppm) : 21,61

Masse (ESI) : 376,00 (M+1) ; 398,16 (M+Na) ; 750,79 (2M+H) ; 772,74 (2M+Na), 238,11 (M-P(O)(OEt)₂)

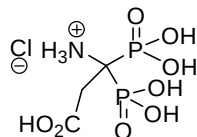
HRMS (ESI) : 398,1126 (calculé C₁₂H₂₇NO₈P₂+Na: 398,1110)

IR (cm⁻¹) : 3464 (NH₂), 1736 (CO₂Me, C=O), 1242 (P(O)(OEt)₂, P=O), 1022 (P(O)(OEt)₂, P-O-C)

VI.3.3. Synthèse de l'acide 3-amino-3,3-diphosphonopropanoïque



10 ml d'HCl 6N sont ajoutés à l'amine (54 mg) et le milieu réactionnel est mis à reflux pendant 2 jours. La phase aqueuse est lyophilisée afin de fournir un solide blanc. La réaction est quantitative.



Registry Number : 5745-48-2

Référence : Rao B. V., Palta N., Dubey S. N., Puri D. M., *Synth. React. Inorg. Met-Org. Chem.* **1985**, 15, 9, 1199-1217.

Formule brute : $\text{C}_3\text{H}_{10}\text{ClNO}_8\text{P}_2$

Masse Molaire (g/mole) : 263,57

Aspect physique : solide blanc

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) :

δ (ppm) : 3,00 (t, 2H, CH_2 , $J_{\text{H-P}}=11,55$ Hz)

RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz):

δ (ppm) : 35,14 (CH_2) ; 55,19 (Cq, t, $J_{\text{C-P}}=127,00\text{Hz}$) ; 174,50 (CO_2H , $J_{\text{C-P}}=10,32\text{Hz}$)

RMN ^{31}P (D_2O , 121 MHz):

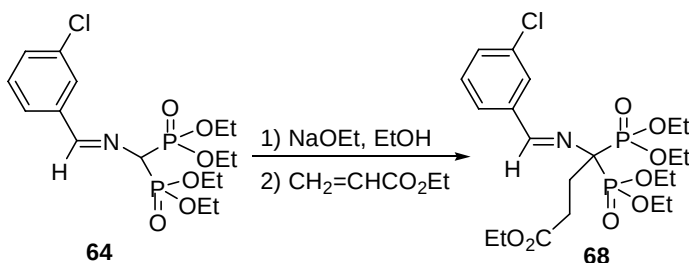
δ (ppm) : 11,59

Masse (ESI) : 248,05 (M-1)

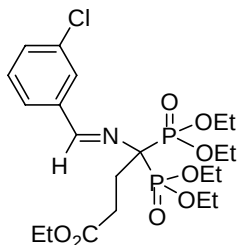
HRMS (ESI) : 249,9889 (calculé $\text{C}_3\text{H}_9\text{NO}_8\text{P}_2+\text{H}$: 249,9882)

IR (cm⁻¹) : 3055 (CO₂H, C-OH), 2762 (PO₃H, P-OH), 2360 (NH₃⁺Cl⁻), 1716 (CO₂H, C=O), 1508 (NH₃⁺Cl⁻), 1141(PO₃H, P=O)

VI.3.4. Synthèse de *N*-4-(3-chlorobenzylideneamino)-4,4-bis(diethoxyphosphoryl)butanoate d'éthyle **68**



A l'imine (1g, 2,5 mmol) en solution dans l'éthanol (8 ml) est ajoutée 0,25 équivalents d'éthanolate de sodium dans l'éthanol (240 µl, 2,68 mol/l) à température ambiante. Le milieu réactionnel est agité pendant 10 minutes. Ensuite l'acrylate d'éthyle (555 µl, 2 éq.) est additionné goutte à goutte à température ambiante. Le milieu réactionnel est chauffé à 80°C pendant deux heures. Le milieu réactionnel est neutralisé avec une solution de NH₄Cl saturée et concentré à l'évaporateur rotatif. Le résidu est dissous dans le dichlorométhane et lavé avec une solution de NH₄Cl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO₄. Une huile jaune est obtenue après évaporation du solvant. Le produit est obtenu avec un rendement de 98%.



Formule brute : C₂₁H₃₄ClNO₈P₂

Masse Molaire (g/mole) : 525,9

Aspect physique : huile jaune

R_F (AcOEt) = 0,35

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz):

δ (ppm) : 1,25 (t, 3H, CH_3 , $J=7$ Hz) ; 1,29 (t, 6H, CH_3 , $J=7$ Hz) ; 1,32 (t, 6H, CH_3 , $J=7$ Hz) ; 2,65-2,70 (m, 4H, CH_2) ; 4,14 (q, 2H, CH_2 , $J=7$ Hz) ; 4,17-4,36 (m, 8H, CH_2) ; 7,36 (t, 1H, CHAr , $J=7,5$ Hz) ; 7,41 (d, 1H, CHAr , $J=7,5$ Hz) ; 7,62 (d, 1H, CHAr , $J=7,5$ Hz) ; 7,78 (s, 1H, CHAr) ; 8,76 (t, 1H, N=CH , $J_{\text{H-P}}=3$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz):

δ (ppm) : 14,41 (CH_3) ; 16,66 (CH_3) ; 29,68 (CH_2 , t, $J_{\text{C-P}}=6,25$ Hz) ; 32,22 (CH_2) ; 60,68 (CH_2) ; 63,34 (CH_2 , $J_{\text{C-P}}=7,25$ Hz) ; 63,49 (CH_2 , $J_{\text{C-P}}=7$ Hz) ; 68,02 (Cq, d, $J_{\text{C-P}}=136,82$ Hz) ; 127,17 (CHAr) ; 127,98 (CHAr) ; 130,10 (CHAr) ; 131,46 (CHAr) ; 135,05 (CAr) ; 138,12 (CAr) ; 164,63 (N=CH , $J_{\text{C-P}}=12$ Hz) ; 173,53 (CO_2Et)

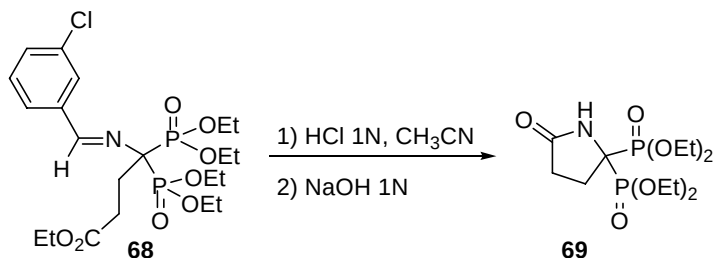
RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz):

δ (ppm) : 19,25

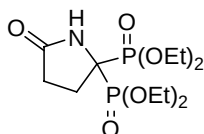
Masse (ESI) : 525,94 ($\text{M}+1$) ; 548,06 ($\text{M}+\text{Na}$) ; 1072,78 ($2\text{M}+\text{Na}$), 388,08 (M-P(O)(OEt)_2)

HRMS (ESI) : 548,1342 (calculé $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{ClNO}_8\text{P}_2+\text{Na}$: 548,1346)

IR (cm^{-1}) : 2981 (CHAr), 1740 (CO_2Me , C=O), 1639 (C=N), 1250 (P(O)(OEt)_2 , P=O), 1022 (P(O)(OEt)_2 , P-O-C)

VI.3.5. Synthèse de 2,2-bis(diethoxyphosphoryl)- α -pyrrolidone **69**

L'imine (758 mg, 1,6 mmol) est dissoute dans le minimum d'acétonitrile (1 ml) et 1,5 équivalents d'HCl 1N (4,8 ml) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à température ambiante puis le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'éther. La phase étherée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Pendant ce temps, la phase aqueuse est neutralisée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et basifiée avec une solution de NaOH 1N (pH 10). La phase aqueuse est extraite cinq fois avec du dichlorométhane. La phase chlorée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif afin d'obtenir un solide blanc avec un rendement de 53%.



Formule brute : $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NO}_7\text{P}_2$

Masse Molaire (g/mole) : 357,28

Aspect physique : solide blanc

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) :

δ (ppm) : 1,36 (t, 12H, CH_3 , $J=7,08$ Hz) ; 2,44-2,67 (m, 4H, CH_2) ; 4,22-4,27 (m, 8H, CH_2) ; 5,84 (sl, 1H, NHCO)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz):

δ (ppm) : 16,55 (CH_3) ; 24,76 (CH_2) ; 29,20 (CH_2) ; 58,76 (Cq, t, $J_{\text{C-P}}=152,5$ Hz) ; 177,70 (NHCO)

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121 MHz):

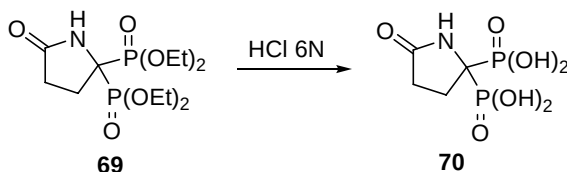
δ (ppm) : 19,82-19,94

Masse (ESI) : 358 (M+1) ; 380,14 (M+Na)

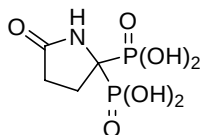
HRMS (ESI) : 380,0996 (calculé $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NO}_7\text{P}_2+\text{Na}$: 380,1004)

IR (cm^{-1}) : 3321 (NH), 2981-2847 (CH_2), 1701 (NHCO , C=O), 1246 (P(O)(OEt)_2 , P=O), 1161 (P(O)(OEt)_2 , P-O-C), 1018 (P(O)(OEt)_2 , P-O-C)

VI.3.6. Synthèse de l'acide 5-oxopyrrolidine-2,2-diylphosphonic
70



10 ml d'HCl 6N sont ajoutés à l'amide (91 mg) et le milieu réactionnel est mis à reflux pendant 2 jours. Après deux extractions au dichlorométhane, la phase aqueuse est lyophilisée afin de fournir un solide blanc. La réaction est quantitative.



Registry Number : 56269-30-8

Référence : Claessens R. A. M. J., Van der Linden J. G. M., *J. Inorg. Biochem.* **1984**, 21, 1, 73-82.

Formule brute : $C_4H_9NO_7P_2$

Masse Molaire (g/mole) : 245,06

Aspect physique : solide blanc

Point de fusion :

RMN ^1H (D_2O , 300 MHz):

δ (ppm) : 2,29-2,54 (m, 4H, CH_2)

RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz):

δ (ppm) : 23,47 (CH_2 , $J_{C-P}=2,67$ Hz) ; 28,56 (CH_2) ; 58,37 (Cq, t, $J_{C-P}=144,70$ Hz) ; 180,56 (NHCO)

RMN ^{31}P (D_2O , 121 MHz):

δ (ppm) : 18,86

Masse (ESI) : 244,07 (M+1)

HRMS (ESI) : 245,9941 (calculé $C_{12}H_{25}NO_7P_2+H$: 245,9933)

IR (cm^{-1}) : 3128 (NH), 3043 (CH_2), 2808 (PO_3H , P-OH), 1662 (NHCO, C=O), 1153 (PO_3H_2 , P=O)

VII.Evaluation biochimique

Mesure de l'activité résiduelle des différentes β -lactamases en présence d'inhibiteurs

Solutions :

- Tampon NaPi 50 mM, pH 7 et Tampon AcOH 50 mM, pH 5
- Solutions d'inhibiteurs 100 μ M dans le DMSO
- Solution de nitrocéfine 3 mM

Les différentes β -lactamases (0,1-1 nM) sont incubées pendant 30 minutes en présence des inhibiteurs. Le volume final de la solution est de 300 μ l. Puis 10 μ l de substrat sont ajoutés au milieu réactionnel et la vitesse d'hydrolyse de ce substrat est suivie par mesure de l'absorbance à 482 nm. L'activité résiduelle mesurée est exprimée en pourcentage d'activité résiduelle des β -lactamases des différents échantillons par rapport à un échantillon contrôle (enzyme incubé dans un tampon seul).

VIII.Etude de complexation par spectométrie de masse

Solutions :

- Solution de ligand 10^{-4} mol/L dans l'acétonitrile
- Solution de perchlorate de calcium $1,5 \times 10^{-2}$ mol/L dans la solution de ligand
- Solution de perchlorate de zinc $1,5 \times 10^{-2}$ mol/L dans la solution de ligand

A des solutions de ligands dans l'acétonitrile de concentration 10^{-4} mol/L, on ajoute des quantités de sels connues, sous forme solide, afin d'éviter les

effets de dilution. Pour chaque ligand, quatre expériences sont réalisées à différentes concentrations correspondant à 0,5 équivalents de cations (solution 1), 1 équivalent de cations (solution 2), 2 équivalents (solution 3) et 5 équivalents de cations (solution 4). Après un temps de 20 minutes, les solutions sont injectées dans le spectromètre de masse à différentes Source Collision-Induced Dissociation (SCID=0 eV, SCID=-20 eV, SCID=-40 eV). Les données telles que les intensités des différents pics ont ensuite été traitées dans le logiciel Excel. Les massifs dont l'intensité relative maximale est inférieure à 5% n'ont pas été pris en compte. Les pourcentages des différents complexes ont été calculés en sommant les intensités des différents pics d'un même complexe et en divisant cette somme par la somme des intensités de tous les pics. La première manipulation à effectuer est un test témoin c'est-à-dire injecter la molécule seule afin de pouvoir comparer son spectre de masse aux spectres de masse réalisées ensuite en présence de cations.