

2m11.2526.3

Université de Montréal

Synthèse de dérivés d'acides aminés comme inhibiteurs de l'intégrase
du VIH-1 et synthèse de dérivés triaminés comme inhibiteurs de la
protéase du VIH-1

par

François Deschamps

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès science (M.Sc.)

en chimie

(septembre 1997)



© François Deschamps, 1997

①

3

U54

1998

V.009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Synthèse de dérivés d'acides aminés comme inhibiteurs de
l'intégrase du VIH-1 et synthèse de dérivés triaminés comme
inhibiteurs de la protéase du VIH-1

Présenté par

François Deschamps

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

William Lubell
Denis Gravel
Gilles Sauvé
Stephen Hanessian

président-rapporteur
directeur de recherche
co-directeur
membre du jury

Mémoire accepté le: 02.03.1998

À ma compagne Barbara
et à tous mes proches...

Sommaire

Ce mémoire se divise en deux parties, soit la synthèse de dérivés d'acides aminés substitués d'aryles hydroxylés comme inhibiteurs potentiels de l'intégrase du VIH-1, et en second lieu la synthèse de dérivés d'un composé triaminé comme inhibiteurs de la protéase du VIH-1.

L'intégrase et la protéase du VIH-1 jouent un rôle essentiel dans le cycle de réplication du virus. Bloquer de façon efficace l'action de ces enzymes permettrait de stopper la réplication du virus dans l'organisme hôte et ultimement d'arrêter la progression du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Le VIH fait d'énormes ravages dans notre société et il n'existe encore aucun moyen efficace de guérir une personne atteinte du SIDA.

Dans le cas des inhibiteurs de l'intégrase, notre approche consiste en une étude de structure-activité qui nous permettra d'évaluer le potentiel d'inhibition de nos produits synthétisés en fonction de leur structure et des groupements fonctionnels qu'ils comportent. La conception des produits préparés a été basée sur un composé actif connu de la littérature, mais en introduisant différents substituants en position N-terminale et C-terminale sur divers acides aminés. De façon générale, la partie C-terminale de l'acide aminé servira à introduire la dopamine et l'extrémité N-terminale différents groupements benzoyles hydroxylés. Les schémas de synthèse, les analyses spectrométriques et physiques et les valeurs d'inhibition de ces nouveaux

composés seront présentés et discutés dans cette monographie, certains montrent une activité des plus intéressante et comparable à celles rapportées par la littérature.

Nous avons abordé le problème de l'inhibition de la protéase du VIH-1 de la même façon, par contre le type de composés synthétisés sera très différent. Ces derniers seront préparés à partir de la phénylalanine pour conduire à une structure générale comprenant un squelette triaminé. Divers substituants seront introduits sur les deux positions N-terminales et l'amine protégée en position centrale sera libérée pour être disponible à d'éventuelles interactions avec le site actif de la protéase. Également pour chacun des composés synthétisés dans cette section, des schémas de synthèses, des analyses spectrométriques et physiques, certains mécanismes de réaction ainsi que des valeurs d'inhibition seront rapportés et discutés dans ce travail. Nous avons synthétisé des produits qui possèdent une activité inhibitrice appréciable, et pour cette nouvelle famille de composés triaminés, nous croyons qu'il serait d'intérêt de poursuivre éventuellement les recherches dans cette voie pour obtenir des produits avec un très haut potentiel d'inhibition.

Table des matières

	Page
Sommaire.....	V
Liste des symboles et abréviations.....	XII
Liste des figures.....	XVII
Liste des schémas.....	XIX
Liste des tableaux.....	XX

Chapitre 1: VIH-1

1.1	Qu'est-ce que le VIH-1.....	1
-----	-----------------------------	---

Chapitre 2: Intégrase du VIH-1

2.1	Données générales.....	9
2.2	Réactions et mécanisme d'intégration.....	10
	2.2.1 Clivage du brin d'ADN viral (<i>3' processing</i>).....	11
	2.2.2 Réaction d'intégration.....	12
	2.2.3 Réaction de désintégration.....	14
2.3	Structure de l'intégrase du VIH-1.....	14
	2.3.1 La région N-terminale de l'intégrase du VIH-1.....	15
	2.3.2 Le domaine catalytique.....	16
	2.3.3 Le domaine C-terminal.....	18

2.4	Inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1 rapportés dans la littérature..	18
2.4.1	Inhibiteurs organo-métalliques.....	19
2.4.2	Inhibiteurs peptidiques.....	20
2.4.3	Inhibiteurs oligonucléotidiques.....	22
2.4.4	Inhibiteurs aryles hydroxylés.....	24

Chapitre 3: Synthèse d'inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1

3.1	Inhibiteurs de l'intégrase.....	27
3.2	Synthèses de dérivés d'acides aminés phényles hydroxylés.....	28
3.2.1	Synthèse de dérivés de la tyrosine comme inhibiteurs de l'intégrase...	30
3.2.2	Synthèse de dérivés de la phénylalanine comme inhibiteurs de l'intégrase.....	33
3.2.3	Synthèse de dérivés de la glycine et de l'acide glutamique comme inhibiteurs de l'intégrase.....	36
3.2.4	Synthèse de dérivés urée de la tyrosine et de l'inhibiteur témoin 5.....	41
3.2.5:	Discussion.....	45
3.3	Mécanismes de réaction.....	49
3.3.1	Couplage avec HOBt/EDC.....	49
3.4	Enzymologie des inhibiteurs de l'intégrase.....	50

Chapitre 4: Protéase du HIV-1

4.1	Données générales.....	57
4.2	Mécanisme d'action de la protéase.....	59
4.3	Structure de la protéase du VIH-1.....	61
4.4	Inhibiteurs de la protéase du VIH-1 rapportés par la littérature..	63

Chapitre 5: Synthèse d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1

5.1	Idée générale.....	70
5.2	Synthèse des composés triaminés comme inhibiteurs de la protéase du VIH-1.....	71
	5.2.1 Synthèse de la portion centrale de nos composés triaminés.....	71
	5.2.2 Protection de l'amine centrale du composé 64	76
	5.2.3 Synthèse d'analogues du tricarbamate 65	79
	5.2.4 Déprotection du groupement Fmoc des analogues N-protégés.....	86
5.3	Mécanismes de réactions.....	89
	5.3.1 Amination réductive.....	89
	5.3.2 Mécanisme de formation de la fonction urée.....	90
	5.3.3 Mécanisme de clivage du fluorénylméthoxy-carbonyle (Fmoc).....	91
5.4	Pureté diastéréoisomérique de notre synthon chiral.....	92
5.5	Enzymologie de nos composés sur la protéase du VIH-1.....	94

Chapitre 6: Partie expérimentale

6.1	Instrumentation.....	101
6.2	Chromatographie.....	103
	6.2.1 Chromatographie sur couche mince.....	103
	6.2.2 Chromatographie éclair.....	103
	6.2.3 Les révélateurs.....	104
	6.2.4 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	105
6.3	Purification des solvants.....	106
	6.3.1 Les solvants usuels.....	106
	6.3.2 Les solvants anhydres.....	106
6.4	Réactions effectuées sous conditions anhydres.....	107
6.5	Réactions et généralités.....	108

Chapitre 7: Réactions chimiques

7.1	Procédures générales.....	109
	7.1.1 Procédure générale A (couplage peptidique).....	109
	7.1.2 Procédure générale B (couplage peptidique).....	110
	7.1.3 Procédure générale C (clivage acide de groupements protecteurs)....	111
	7.1.4 Procédure générale D (hydrogénation catalytique).....	112
	7.1.5 Procédure générale E (formation de carbamates et urées).....	112
	7.1.6 Procédure générale F (déprotection du Fmoc).....	113

7.2	Descriptions des produits synthétisés.....	114
	7.2.1 Inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1.....	114
	7.2.2 Inhibiteurs de la protéase du VIH-1.....	142
	Conclusion.....	180
	Remerciements.....	182
	Bibliographie.....	184

Annexes

Annexe 1: Test d'inhibition de l'intégrase du VIH-1.....	XXI
Annexe 2: Test d'inhibition de la protéase du VIH-1.....	XXIV
Annexe 3: Chromatographie (HPLC).....	XXVII

Liste des symboles et abréviations

α	: Valeur mesurée de la rotation optique
A	: Adénosine
AA	: Acide aminé
AcOEt	: Acétate d'éthyle
ADN	: Acide désoxyribonucléique
Ala	: Alanine
Arg	: Arginine
arom.	: Aromatique
ARN	: Acide ribonucléique
(aq)	: Solution aqueuse
Asn	: Asparagine
Asp	: Acide aspartique
Boc	: <i>tert</i> -Butoxycarbonyle
c	: Concentration (g/100 mL)
C	: Cytosine
°C	: Degré Celsius
¹³ C	: Carbone isotopique 13
Cbz	: Benzyloxycarbonyle
ccm	: Chromatographie sur couche mince

cm ⁻¹	: 1/centimètre (unité de nombre d'onde)
coll.	: Collaborateurs
COSY	: <i>Correlation spectroscopy</i> (corrélation proton-proton)
Cys	: Cystéine
δ	: Déplacements chimiques
d	: Doublet
1D	: Une dimension
2D	: Deux dimensions
DCQA	: <i>Dicaffeoylquinic acid</i>
DMF	: Diméthylformamide
DMSO-d ₆	: Diméthylsulfoxyde deutérié
%ed	: Pourcentage d'excès diastéréoisomérique
EDC	: 3-éthyl-1-(3-diméthylamino)propyl-carbodiimide
équiv	: Équivalent
FDA	: <i>Food and drugs administration</i>
fig.	: Figure
Fmoc	: Fluorènylméthoxy-carbonyle
dd	: Doublet de doublet
g	: Gramme
G	: Guanine
gem	: Géminial

Gln	: Glutamine
Glu	: Acide glutamique
Gly	: Glycine
gp	: Glycoprotéine
^1H	: Proton, hydrogène isotopique 1
HMQC	: <i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i> (corrélation proton-carbone)
HOBt	: 1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	: Chromatographie liquide à haute performance
His	: Histidine
Hz	: Hertz (unité de fréquence)
IC ₅₀	: Concentration pour inhiber 50% de l'activité
Ile	: Isoleucine
IN	: Intégrase du VIH-1
Int.	: Réaction d'intégration
IR	: Infrarouge
J	: Constantes de couplage
K _i	: Constante d'inhibition
Leu	: Leucine
LTR	: <i>Long terminal repeat</i>
Lys	: Lysine
m	: Multiplet

μM	: Micromolaire (unité de concentration)
nM	: Nanomolaire (unité de concentration)
MeOH	: Méthanol
Met	: Méthionine
MHz	: Mégahertz (unité de fréquence)
ν	: Nombre d'onde
$p\text{-NO}_2\text{-PhO}^-$: <i>para</i> -Nitrophénoxyde
Pd/C	: Palladium sur charbon
Phe	: Phénylalanine
ppm	: Partie par million
Pr	: Protéase du VIH-1
Pro	: Proline
3'pro.	: <i>3'processing</i>
q	: Quadruplet
quint	: Quintuplet
Rend.	: Rendement
R_f	: Migration relative
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
RNaseH	: Ribonucléase-H du VIH-1
RT	: <i>Reverse transcriptase</i>
s	: Singulet

S ₁ /S ₁ '	: Sous-sites 1 et 1' de la protéase
S ₂ /S ₂ '	: Sous-sites 2 et 2' de la protéase
Ser	: Sérine
SIDA	: Syndrome d'immunodéficience acquise
t	: Triplet
T	: Thymine
TFA	: Acide trifluoroacétique
THF	: Tétrahydrofurane
Thr	: Thréonine
TMS	: Tétraméthylsilane
Trp	: Tryptophane
Tyr	: Tyrosine
UV	: Ultraviolet
Val	: Valine
VIH-1	: Virus d'immunodéficience humaine de type 1

Liste des figures

	Page
Figure 1: Génome et principales protéines du VIH-1.....	2
Figure 2: Cycle de réplication du VIH-1.....	4
Figure 3: Structure d'inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	6
Figure 4: Mode d'action de l'intégrase du VIH-1.....	11
Figure 5: Mécanisme proposé d'intégration.....	13
Figure 6: Domaines d'activité de la chaîne polypeptidique de l'intégrase..	15
Figure 7: Structure de la région HH CC de l'intégrase du VIH-1.....	16
Figure 8: Représentation tridimensionnelle du domaine catalytique de l'intégrase.....	17
Figure 9: Structures d'inhibiteurs organo-métalliques de l'intégrase du VIH-1.....	20
Figure 10: Structure de l'inhibiteur peptidique de l'intégrase, His-Cys-Lys-Phe-Trp-Trp.....	21
Figure 11: Structure du T30177, inhibiteur de l'intégrase du VIH-1.....	23
Figure 12: Structures d'inhibiteurs phényles hydroxylés de l'intégrase du VIH-1.....	24

Figure 13: Structures variées de phényles polyhydroxylés (Pommier et al.).....	26
Figure 14: Structure générale de dérivés d'acides aminés phényles hydroxylés.....	28
Figure 15: Portion du spectre COSY du composé 38	46
Figure 16: Portion du spectre HMQC du composé 38	47
Figure 17: Représentation de la structure tridimensionnelle d'un complexe protéase-inhibiteur.....	58
Figure 18: Chaîne polypeptidique de la protéase du VIH-1.....	59
Figure 19: Mécanisme d'hydrolyse d'une liaison Tyr-Pro par la protéase.....	60
Figure 20: Principales interactions inhibiteur-enzyme.....	61
Figure 21: Première génération d'inhibiteurs de la protéase.....	64
Figure 22: Inhibiteurs de la protéase du VIH-1 en essais cliniques ou approuvés par la FDA.....	67
Figure 23: Interactions proposées de nos inhibiteurs avec la protéase.....	71
Figure 24: Chromatogramme (HPLC) du composé 66 et calcul du %ed....	93

Liste des schémas

	Page
Schéma 1: Synthèse de dérivés de la tyrosine.....	31
Schéma 2: Synthèse de dérivés de la phénylalanine.....	35
Schéma 3: Synthèse de dérivés de la glycine et de l'acide glutamique... 38	
Schéma 4: Synthèse d'un dérivé urée de la tyrosine phényles hydroxylés et de l'inhibiteur témoin 5	43
Schéma 5: Schémas explicatifs des rendements.....	48
Schéma 6: Mécanisme de couplage peptidique avec HOBt/EDC.....	49
Schéma 7: Synthèse de la portion centrale des composés triaminés.....	73
Schéma 8: Introduction du groupement Fmoc sur l'amine 64	78
Schéma 9: Synthèse des analogues Fmoc-triaminés.....	80
Schéma 10: Mécanisme d'amination réductive.....	90
Schéma 11: Mécanisme de formation d'une fonction urée.....	91
Schéma 12: Mécanisme de clivage du Fmoc.....	92

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1: Résultats d'inhibition de l'intégrase par les dérivés de la tyrosine et de la phénylalanine.....	51
Tableau 2: Résultats d'inhibition de l'intégrase par les autres composés préparés.....	52
Tableau 3: Quelques fonctions isostères d'inhibiteurs rapportées dans la littérature.....	68
Tableau 4: Synthèse des intermédiaires Fmoc.....	81
Tableau 5: Synthèse des intermédiaires Fmoc (suite).....	82
Tableau 6: Synthèse des réactifs <i>p</i> -nitrophénoxy-carbamates.....	85
Tableau 7: Rendements de déprotection du groupement Fmoc.....	86
Tableau 8: Résultats d'inhibition de dérivés carbamates, urées et amides sur la protéase du VIH-1.....	95
Tableau 9: Résultats d'inhibition des dérivés sulfonamide et CbzVal sur la protéase du VIH-1.....	96

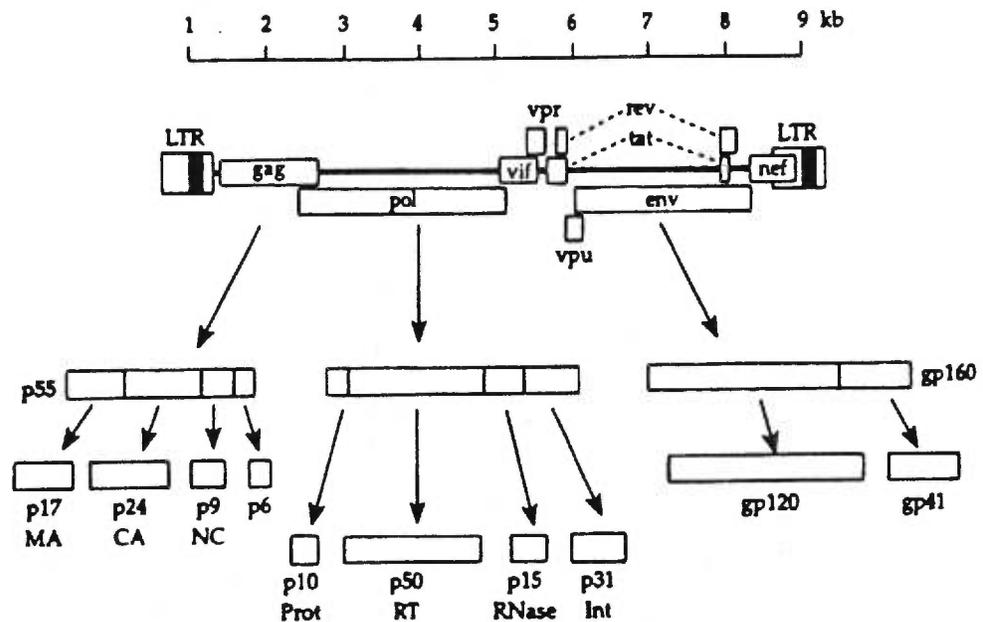
Chapitre 1

VIH-1

1.1 Qu'est-ce que le VIH-1

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est un membre de la famille des rétrovirus qui comprend, en plus du VIH-2 et d'autres virus d'immunodéficience de type félin, bovin et simien, toute une gamme d'agents infectieux très répandus chez les vertébrés^{1,2}. Il fait aussi partie d'un sous-groupe de rétrovirus qu'on appelle les lentivirus, ce terme signifiant un développement lent de la maladie après infection¹, comme cela est constaté chez les sidéens, où les symptômes liés à la maladie peuvent prendre cinq à dix années avant d'être observés. Ces rétrovirus ont la propriété d'infecter et de détruire certains lymphocytes du corps humain, affaiblissant ainsi le système immunitaire¹. L'hôte est désormais vulnérable à des infections habituellement bénignes mais qui lui sont maintenant fatales. Un schéma montrant le génome du VIH-1 ainsi que ses principales protéines est représenté dans la figure 1.

Figure 1: Génome et principales protéines du VIH-1²

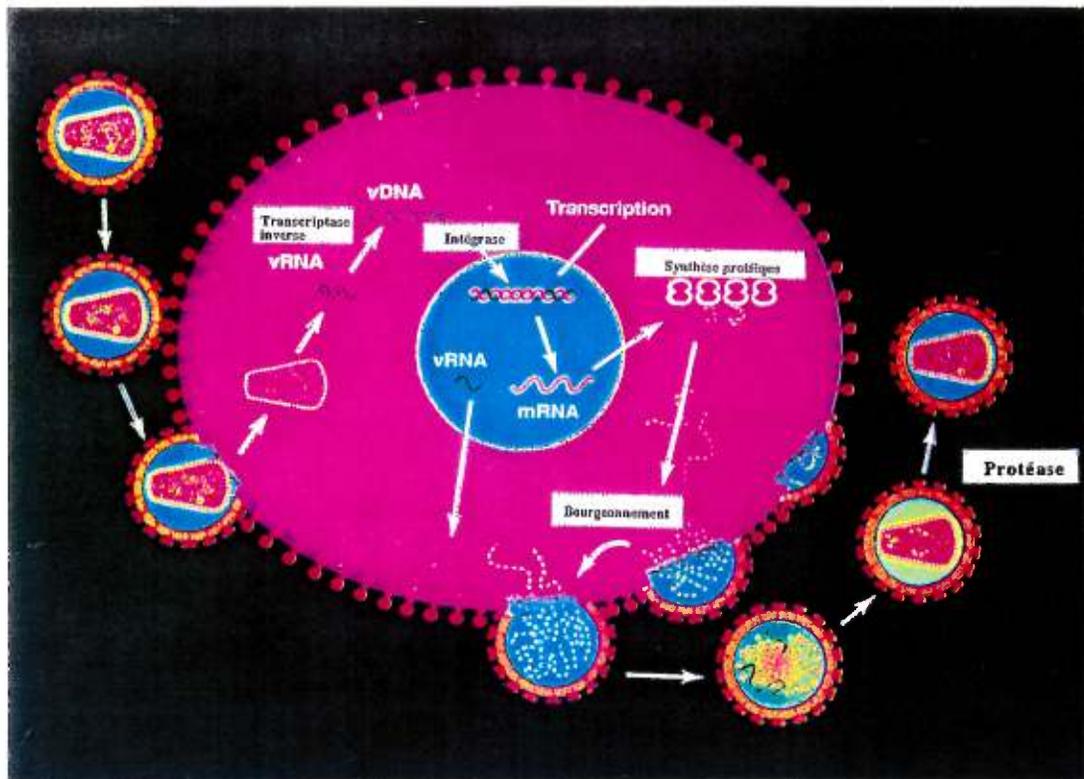


Ce schéma du génome du VIH-1 contient beaucoup d'informations, mais de façon sommaire, nous ne décrivons que les trois gènes les plus importants dans le cadre de ce travail, soit *gag*, *pol* et *env*. Premièrement, le génome du VIH-1 présente à chacune de ses extrémités une séquence appelée *Long Terminal Repeat* (LTR: séquence nucléotidique nécessaire pour la réplication du génome viral, voir chapitre 2). La ligne en gras, entre les deux LTR, représente un double brin d'acide désoxyribonucléique (ADN) viral révélant l'association des précurseurs protéiques avec chacune des portions du code génétique du virus. Autrement dit, au début du génome, se situe le gène *gag* qui exprime les protéines associées à la structure interne d'une particule virale. Suivi du gène *pol*, celui qui nous intéresse tout

particulièrement et qui exprime les protéines précurseurs des quatre enzymes virales, soit la transcriptase inverse (RT), la RNaseH, et les deux dernières pour lesquelles nous avons préparé de nouveaux composés pour tenter d'inhiber leur action, l'intégrase (IN) et la protéase (Pr). Il est à noter que la RNaseH du VIH-1 travaille en association avec la transcriptase inverse et qu'elle n'est pas considérée comme une cible thérapeutique intéressante parce que d'autres RNasesH ayant des fonctions similaires à celle du VIH-1 existent déjà dans la cellule. Pour terminer, le gène *env* exprime les protéines retrouvées sur l'enveloppe extérieure des particules virales (glycoprotéines: gp 120 et gp 41)^{1,2}.

Une caractéristique intéressante du VIH-1 est qu'il ne transporte pas son génome (code génétique) sous forme d'ADN mais plutôt sous forme de deux simples brins identiques d'acide ribonucléique (ARN). Il a aussi la propriété d'incorporer, sous forme d'ADN proviral, son génome ARN dans les chromosomes d'une cellule, lui permettant ainsi de devenir une partie intégrale du bagage génétique de la cellule¹⁻³. Pour mieux discerner le tout, examinons maintenant le cycle de réplication du VIH-1 (fig. 2).

Figure 2: Cycle de réplication du VIH-1³



La figure 2 résume les différentes étapes du cycle de réplication du VIH et tout particulièrement celles faisant intervenir les enzymes du VIH. Le VIH est un parasite qui a besoin de l'ingénierie de la cellule humaine pour se reproduire. Cette dernière servira donc d'usine de production du VIH, laquelle sera envahie par le parasite. Celui-ci prendra un certain contrôle des processus biochimiques intracellulaires, entre autres il forcera la cellule infectée à produire le génome et les protéines du VIH. Ceci lui permettra de se reproduire et finalement de tuer la cellule par son éclatement dû à la très grande quantité de virions présents dans la cellule. Les virions migreront

alors vers d'autres cellules pour les coloniser de nouveau. Le cycle de réplication du VIH-1 se caractérise par les étapes suivantes:

1) L'attachement du virus sur les récepteurs CD4 de la cellule

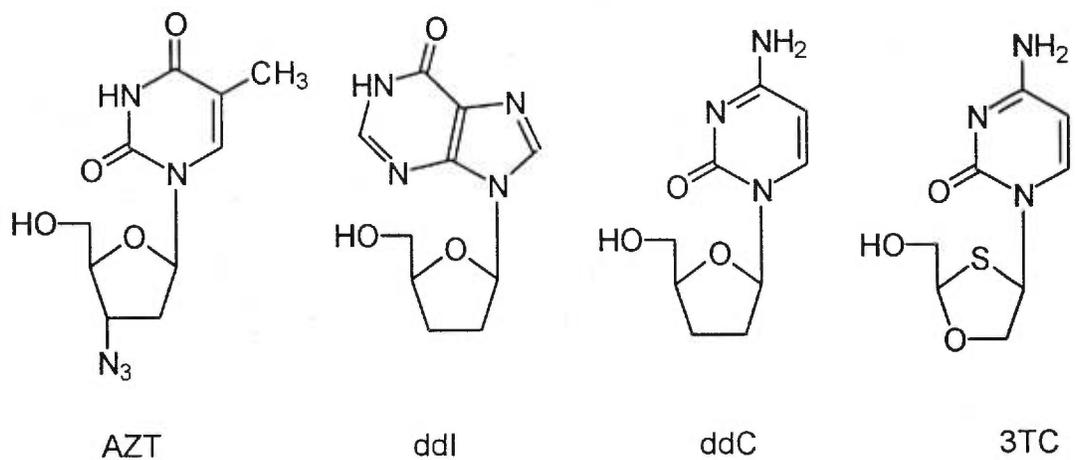
Pour permettre la fusion des membranes cellulaire et virale et la libération dans le cytoplasme entre autres du génome viral (sous forme de deux simples brins d'ARN) et d'un matériel protéique important (produit de *gag, pol*)¹⁻⁴, une glycoprotéine (gp) de l'enveloppe structurale virale, la gp 120, doit se lier aux récepteurs CD4 de la cellule hôte, par un mécanisme de reconnaissance moléculaire¹⁻⁴. Il est à noter que les récepteurs CD4 ne sont pas responsables à eux seuls de la fusion cellulaire, d'autres co-récepteurs jouent un rôle essentiel à ce niveau comme les fusines et CC-CKR-5, ainsi que la gp 41 virale. Mais nous ne discuterons pas davantage sur cette étape du cycle de réplication du VIH-1 étant donné qu'elle ne fait pas l'objet de notre étude dans ce travail.

2) La synthèse de l'ADN proviral

Parmi le matériel protéique introduit dans la cellule, il se trouve une enzyme appelée la transcriptase inverse du VIH-1. Celle-ci agit dans un premier temps dans la synthèse d'un premier brin d'ADN complémentaire à l'ARN viral. Par la suite, la RNaseH du VIH-1 a pour fonction de dégrader le brin d'ARN, et la RT synthétise alors un second brin d'ADN complémentaire au premier pour donner une double hélice¹⁻⁴. Cette enzyme fut d'ailleurs la

première cible thérapeutique vers laquelle les chercheurs se sont orientés pour synthétiser des inhibiteurs. Quelques molécules actives, des inhibiteurs de la RT (fig.3), sont utilisées depuis un certain temps sur des patients atteints par le VIH-1, dont l'AZT, la ddi, la ddC, le 3TC et autres⁵.

Figure 3: Structure d'inhibiteurs de la transcriptase inverse



La double hélice d'ADN viral qui demeure complexée à la protéine virale p17 (voir fig.1) est ensuite acheminée vers le noyau de la cellule par une protéine de transport cellulaire.

3) L'intégration

L'intégrase du VIH-1 est une autre enzyme clé dans le cycle de réplication du VIH-1. Celle-ci nous intéresse plus particulièrement, car nous décrivons dans ce projet la synthèse de nouveaux composés qui ont pour objectif d'inhiber son action. Son rôle est l'intégration du génome viral dans

le noyau de la cellule, plus exactement son incorporation au génome humain. Pour ce faire, l'intégrase du VIH-1 doit à la fois couper l'ADN cellulaire humain et intégrer le double brin d'ADN viral au génome humain. Les mécanismes de ces deux modes d'action seront discutés plus en détails au chapitre 2.

4) La maturation

C'est l'action de la protéase du VIH qui permettra de compléter le cycle de réplication du VIH-1 tout en conduisant les virions à leur stade de maturité, en produisant des particules infectieuses capables de se reproduire. Précédant la maturation, tout le bagage génétique et protéique des nouveaux virions produits par la cellule est assemblé et expulsé du cytoplasme par un phénomène appelé bourgeonnement (*budding*)¹⁻⁴. La protéase agit en hydrolysant les précurseurs protéiques (*gag* et *gag-pol*), synthétisés initialement *en vrac* par la cellule, pour donner des protéines fonctionnelles¹⁻⁴. Autrement dit, les nouvelles particules virales matures posséderont désormais des enzymes actives (RT, RNaseH, IN, Pr), une gp120 (produite par le clivage de son précurseur gp160) capable de reconnaître un récepteur CD4, et seront en mesure d'amorcer un nouveau cycle de réplication. Le mécanisme d'action de la protéase sera discuté plus en détails dans le chapitre 4.

Cette brève présentation nous renseigne sur le cycle de réplication du VIH-1 avec ses différentes étapes impliquant les enzymes virales, en

particulier l'intégrase et la protéase du VIH-1, les deux enzymes virales pour lesquelles de nouveaux composés ont été préparés, comme inhibiteurs potentiels dans le cadre de ce mémoire. Les chapitres 2 et 3 porteront sur l'intégrase du VIH-1, tandis les chapitres 4 et 5 concerneront la protéase du VIH-1. Les chapitres 2 et 4, se concentrant respectivement sur l'intégrase et la protéase du VIH-1, traiteront de l'information générale connue sur ces enzymes, comme leur mécanisme d'action, les données cristallographiques disponibles et les inhibiteurs connus de la littérature. Tandis que les chapitres 3 et 5 de ce mémoire porteront sur les plans de synthèse, les conditions et mécanismes de réaction qui ont permis de préparer les nouveaux composés projetés pour inhiber l'intégrase et la protéase du VIH-1.

Chapitre 2

Intégrase du HIV-1

2.1 Données générales

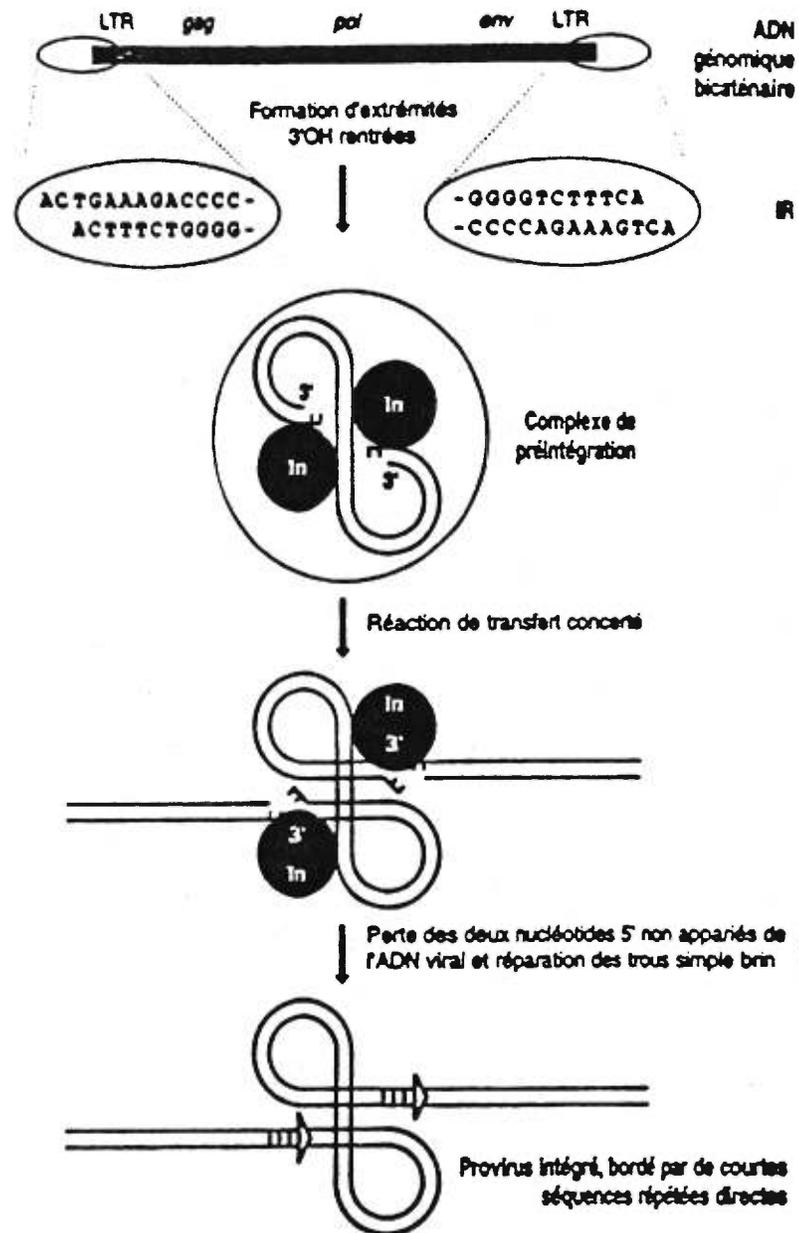
L'intégrase du VIH-1 est l'enzyme responsable de l'intégration du génome viral au génome humain¹⁻⁷. Elle a été relativement peu caractérisée jusqu'à maintenant à cause de son identification récente, de la complexité de son mécanisme d'action et des difficultés techniques dans l'obtention de sa structure tridimensionnelle, comparativement à la protéase ou la transcriptase inverse du VIH-1. Par contre, étant donné qu'elle est impliquée dans une étape essentielle du cycle de réplication du VIH-1, l'intégrase est considérée actuellement comme une cible thérapeutique virale très prometteuse. Un avantage sur le plan thérapeutique qui devrait réduire en principe les effets secondaires potentiels, vient du fait que les cellules humaines ne possèdent aucune enzyme connue avec une activité similaire à l'intégrase du VIH-1⁸. Cette enzyme est une protéine de 288 acides aminés possédant une activité enzymatique qui permet l'hydrolyse et la formation de liaisons phosphodiester, telles qu'on les retrouve dans un double brin d'ADN (voir mécanisme d'intégration, section 2.2.2). Les recherches menées jusqu'à maintenant semblent démontrer que l'intégrase du VIH-1 ne posséderait qu'un seul site catalytique⁸. Il est à noter qu'elle ne peut

catalyser les réactions *in vitro* qu'en présence de Mg^{+2} ou de Mn^{+2} , comme cofacteur. Sans doute ceux-ci favorisent-ils le repliement de l'enzyme dans sa structure active⁷⁻⁸. Il est reconnu aussi que l'intégrase du VIH-1 se retrouve au moins sous forme d'un dimère (deux monomères de 288 AA) et certains chercheurs proposent même un tétramère ou un ordre plus élevé pour la forme active de l'enzyme^{3,8}.

2.2 Réactions et mécanisme d'intégration

L'intégrase du VIH-1 peut effectuer trois réactions (fig. 4) soit, le clivage d'un brin d'ADN aux deux extrémités 3' de la double hélice (3' *processing*), l'intégration de l'ADN viral dans un site choisi de l'ADN cellulaire humain, et la dernière réaction possible est la "désintégration" de ce brin d'ADN viral hors de l'ADN humain⁷⁻¹¹. Cette dernière réaction n'est observée que dans des conditions *in vitro* et il semble peu probable qu'elle se produise à l'intérieur d'une cellule.

Figure 4: Mode d'action de l'intégrase du VIH-1⁶



2.2.1 Clivage du brin d'ADN viral (3' processing)

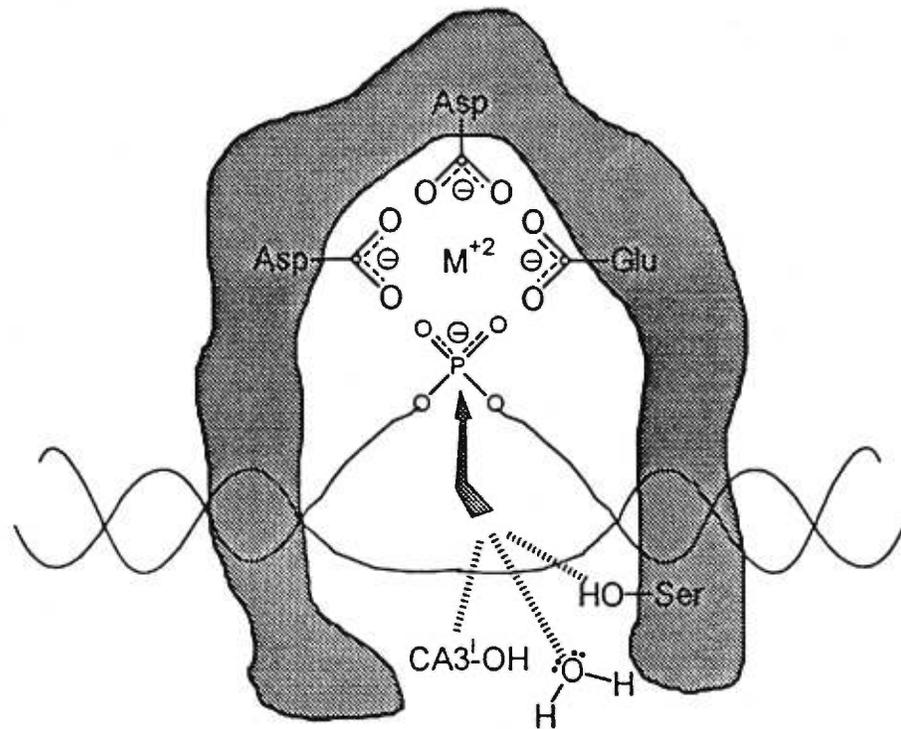
Comme déjà mentionné au chapitre 1, il existe de chaque côté de l'ADN génomique viral des séquences répétées de nucléotides appelées

LTR. Ces dernières se terminent par une courte séquence bien conservée d'une douzaine de nucléotides, en particulier chez le VIH par la séquence -CAGT qui est absolument nécessaire pour l'intégration du matériel génétique viral dans l'ADN cellulaire. Ces LTR sont aussi très importants car ils portent les signaux pour la transcription du provirus. L'intégrase du VIH-1 clive les deux extrémités 3'-OH de ces LTR pour éliminer deux nucléotides qui sont toujours la guanine et la thymine (-GT)⁹⁻¹¹. Ce clivage permet d'obtenir une séquence finale sur les deux brins de l'hélice se terminant par une cytosine et une adénosine (CA-), un motif commun à tous les rétrovirus⁶. Cette réaction semble impliquer uniquement l'intégrase du VIH-1 et se déroule principalement dans le cytoplasme (hors du noyau). Un complexe de préintégration est ensuite formé et migre vers le noyau de la cellule. Le complexe de préintégration est représenté à la figure 4 sous forme d'un dimère.

2.2.2 Réaction d'intégration

Par une réaction concertée de transestérification, aussi appelée réaction de transfert d'oligonucléotides ou encore transfert de brin d'ADN, les extrémités 3'-OH des LTR de l'ADN viral sont liées de manière covalente aux extrémités 5'-OH phosphate de l'ADN humain⁶⁻¹¹. Les sites d'insertion sur chacun des deux brins d'ADN humain sont espacés par cinq nucléotides (fig. 5)¹¹.

Figure 5: Mécanisme proposé d'intégration⁷



Un mécanisme d'intégration a été proposé, où deux résidus d'acide aspartique et un d'acide glutamique viennent complexer un ion métallique divalent⁷. Le complexe métal/intégrase/ADN alors formé, est nécessaire pour positionner l'atome de phosphore qui sera la cible d'une attaque par une molécule d' H_2O et par l'extrémité 3'-OH de l'ADN viral. La possibilité qu'un résidu sérine soit aussi impliqué dans cette réaction a également été proposée. Ensuite, des enzymes cellulaires de réparation viendront compléter l'appariement des cinq nucléotides au site d'insertion et cliver les deux CA en position 5' terminale, pour faire la jonction finale entre l'ADN viral et l'ADN humain. Globalement le procédé d'intégration comporte

la perte de deux nucléotides à chacune des extrémités de l'ADN viral, la réaction de transestérification joignant les deux brins d'ADN viral et cellulaire, et la duplication de cinq paires de base au site d'intégration dans l'ADN humain.

2.2.3 Réaction de désintégration

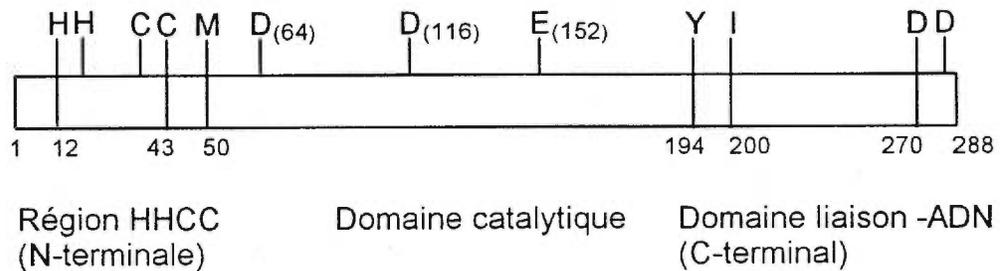
De façon générale, la réaction de désintégration est mise en évidence par l'expérience qui consiste à prendre un substrat d'ADN (mimant le génome viral) déjà intégré dans une cible (mimant l'ADN cellulaire) sous forme d'intermédiaire d'intégration. En présence de cette forme incomplète d'intégration, l'intégrase peut effectuer la réaction inverse à celle d'intégration, de façon à séparer le substrat et l'ADN cible. Il est presque certain que cette réaction de désintégration est un phénomène se produisant seulement *in vitro* car elle n'est pas avantageuse pour la réplication du VIH. Son étude a tout de même permis d'obtenir des informations supplémentaires en relation avec des études sur la structure-activité de l'intégrase⁸⁻¹¹.

2.3 Structure de l'intégrase du VIH-1

Bien que l'intégrase reste encore peu comprise, les quelques données cristallographiques disponibles⁸ et les avancements de la biologie

moléculaire ont quand même permis d'éclaircir certains aspects de la structure de l'enzyme^{2,10} (fig. 6).

Figure 6: Domaines d'activité de la chaîne polypeptidique de l'intégrase

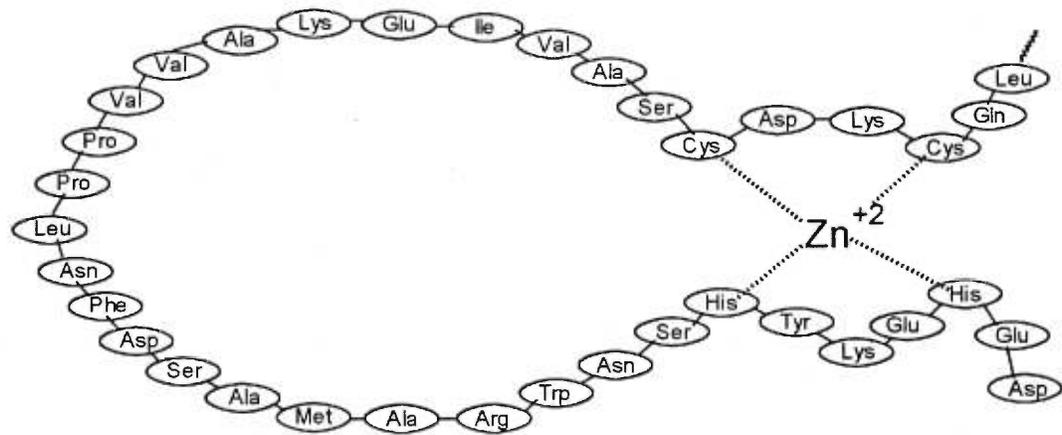


Sur la chaîne d'acides aminés de l'intégrase (de 1 à 288), trois secteurs ont été identifiés comme ayant un rôle important au niveau de l'activité ou de la conformation de l'enzyme: soit la région N-terminale, le domaine catalytique et le domaine responsable de la reconnaissance moléculaire et de la liaison avec l'ADN (C-terminal)¹².

2.3.1 La région N-terminale de l'intégrase du VIH-1

Cette portion de l'enzyme contient un motif histidine-histidine cystéine-cystéine (HH CC) qui est impliqué dans la formation d'un "doigt de zinc" (*zinc finger*, fig. 7)⁸.

Figure 7: Structure de la région HH CC de l'intégrase du VIH-1



Région HHCC de l'intégrase du VIH-1 (N-terminale)

La présence du chélate de zinc vient sans doute stabiliser la conformation active de ce domaine, responsable de la reconnaissance moléculaire des séquences terminales LTR sur le génome viral. Il est aussi accepté que la structure HH CC joue un rôle critique lors de la dimérisation de l'enzyme.

2.3.2 Le domaine catalytique

Il existe une étude cristallographique d'une partie de l'intégrase, montrant seulement le domaine catalytique de l'enzyme⁸. À notre connaissance, ce sont les seules données cristallographiques disponibles. Aussi, la protéine étudiée comporte en fait une mutation, la phénylalanine₁₈₅ étant remplacée par une lysine afin de contourner les problèmes de

solubilité. Certains acides aminés ont également été éliminés en positions N- et C-terminales pour permettre la cristallisation. Cette partie de l'enzyme est considérée comme active puisqu'elle est encore capable d'effectuer la réaction de désintégration (*in vitro*).

Figure 8: Représentation tridimensionnelle du domaine catalytique de l'intégrase*



* Obtenue par le traitement des données cristallographiques de Davies et coll.⁷, par le logiciel de modélisation Biosym™

Ces données ont montré que les résidus acides aspartiques₆₄ et ₁₁₆ et acide glutamique₁₅₂ sont essentiels pour obtenir une activité enzymatique (structure en bâtonnets sur la figure 8). Ce résultat concorde aussi avec les observations faites sur d'autres intégrases de différents rétrovirus. De plus, la mutation d'un seul de ces acides aminés résulte en une perte d'activité.

2.3.3 Le domaine C-terminal

Dans la portion de ce domaine située près de la région catalytique, on retrouve, séparés par une distance caractéristique de sept acides aminés, une répétition de groupements hydrophobes¹¹. Cette organisation structurale correspond à un motif de *zipper* de leucine que l'on retrouve dans certaines protéines de régulation. Plus loin sur la chaîne, on retrouve une région contenant plusieurs résidus d'acides aminés chargés positivement.

Ce genre de motif ressemble à un signal de localisation souvent utilisé par des protéines de transport cellulaire, mais ce n'est pas du tout le cas ici parce que plusieurs évidences indiquent que cette région est nécessaire pour se lier à l'ADN.

2.4 Inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1 rapportés dans la littérature

Il n'existe aucune donnée cristallographique de l'intégrase complète ou d'un complexe enzyme-inhibiteur qui aurait permis, par des études de modélisation moléculaire, d'orienter les recherches sur la mise au point d'inhibiteurs. La conception de telles molécules est donc faite présentement par des méthodes de criblage de banques de produits ou d'évaluation de produits inhibant des enzymes d'activité similaire à l'intégrase du VIH-1. Puis à partir des candidats les plus actifs obtenus de

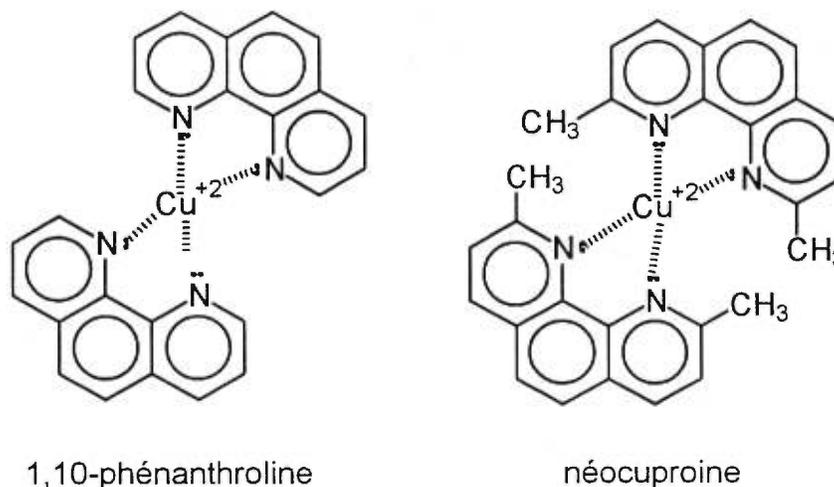
ces méthodes, des synthèses de dérivés sont effectuées. Parallèlement, des études d'activité de ces dérivés en relation avec leur structure sont menées, ce qui conduit souvent à des composés d'activité appréciable. Par exemple, la présence de certains groupements pharmacophores aux propriétés similaires dans plusieurs composés révélant une activité inhibitrice, nous conduira à des rationalisations. On pourrait anticiper que ces groupements permettent au composé d'interagir avec l'enzyme et que leur utilisation comme élément structural sur de nouvelles molécules à synthétiser devrait guider les chercheurs dans la conception de molécules originales anti-intégrase du VIH-1 avec une activité élevée.

Les inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1 qui ont été rapportés jusqu'à maintenant ont des structures des plus variées. Le potentiel d'inhibition de l'enzyme est rapporté sous forme d'une valeur de IC_{50} , qui représente la concentration d'inhibiteur requise pour inhiber 50% de l'activité de l'enzyme. Il va de soi que plus cette valeur sera petite, meilleur sera l'inhibiteur.

2.4.1 Inhibiteurs organo-métalliques

Il y a peu d'inhibiteurs organo-métalliques qui ont été testés sur l'intégrase mais citons entre autres les complexes de Cu^{+2} de la phénanthroline et de la néocuproïne (fig. 9)¹³.

Figure 9: Structures d'inhibiteurs organo-métalliques de l'intégrase du VIH-1



Ces composés ont un IC_{50} variant de 1 à 10 μM pour la réaction du 3' *processing* et le transfert de brin d'ADN. Aucune sélectivité ne peut être observée vis-à-vis ces deux réactions. Il a été démontré que ces complexes n'empêchent pas la liaison de l'intégrase sur l'ADN aux concentrations correspondant à leurs IC_{50} . Aussi, ces inhibiteurs n'interagissent pas avec les régions N-terminale (HH CC, *zinc finger*) et C-terminale (liaison à l'ADN). Le mécanisme d'inhibition implique donc probablement une liaison de l'inhibiteur avec le site catalytique de l'enzyme ou à l'interface entre l'ADN (substrat) et l'intégrase lors de la réaction d'intégration¹³.

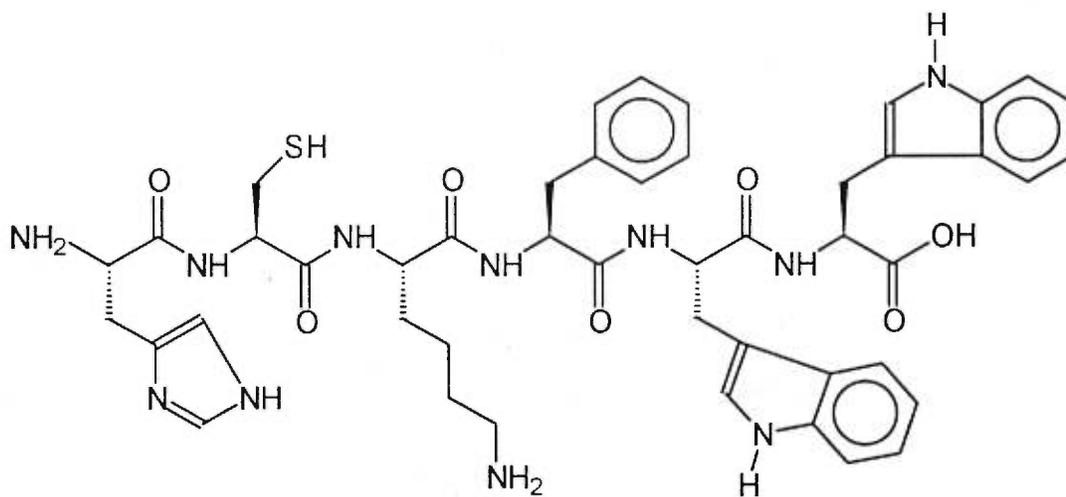
2.4.2 Inhibiteurs peptidiques

Il y a peu d'inhibiteurs de l'intégrase de nature peptidique rapportés dans la littérature¹⁴. C'est un peu compréhensible, puisque le

substrat naturel de l'intégrase est de nature nucléotidique, et que plusieurs inhibiteurs d'enzymes connus dérivent souvent de leur substrat, ce dernier étant naturellement reconnu au site actif. À première vue, on pourrait croire que les peptides ne soient pas appropriés pour la conception d'inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1 puisqu'ils ont des conformations assez différentes de celles des oligonucléotides. Cependant, il existe un hexapeptide ayant la capacité d'inhiber l'intégrase du VIH-1 de façon efficace avec un IC_{50} de 2 μ M (fig. 10).

Figure 10: Structure de l'inhibiteur peptidique de l'intégrase, His-Cys-Lys-

Phe-Trp-Trp¹⁴



His-Cys-Lys-Phe-Trp-Trp

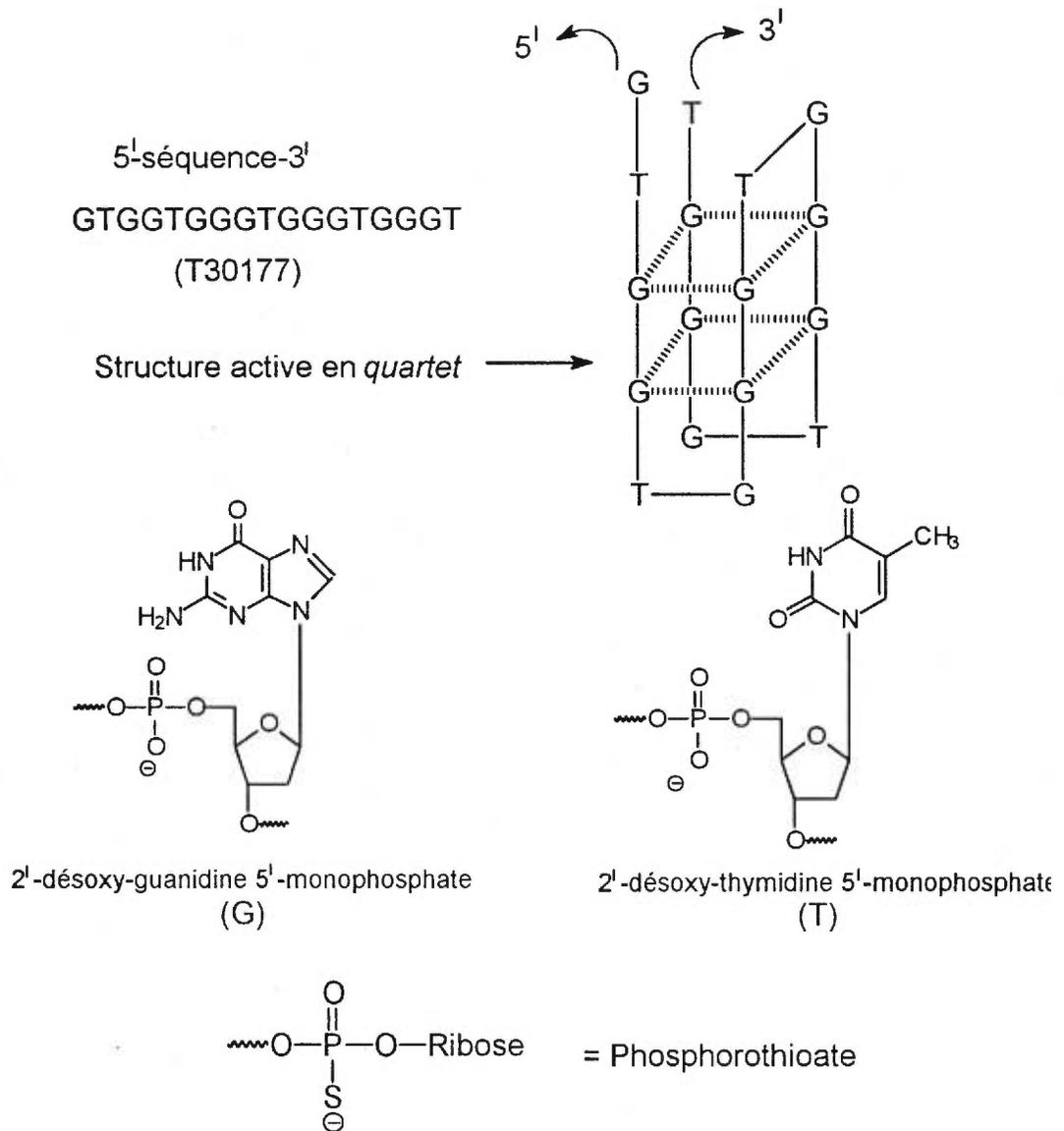
Une particularité intéressante de ce composé en plus de son activité c'est la façon dont il a été obtenu, soit à partir d'une librairie de produits générés par chimie combinatoire.

2.4.3 Inhibiteurs oligonucléotidiques

Quelques inhibiteurs de l'intégrase de nature nucléotidique ont été rapportés dans la littérature. Parmi ceux-ci mentionnons un oligonucléotide de 17 bases capable d'inhiber l'intégrase¹⁵. Celui-ci possède une structure particulière uniquement composée de résidus déoxyguanines et thymines, comprenant aussi deux groupements phosphorothioates aux extrémités de la chaîne pour augmenter sa stabilité *in vivo* (fig.11).

Il est à noter que cette séquence oligonucléotidique n'est complémentaire à aucune séquence du génome viral et n'agit donc pas comme une molécule antisens. Cet oligonucléotide est connu pour inhiber le *3'* processing à une concentration (IC_{50}) de 92 nM et le transfert d'ADN à 46 nM. Il inhibe aussi la RT avec un IC_{50} de 1 à 10 μ M mais ne semble pas avoir d'activité inhibitrice contre la protéase du VIH-1. Cet inhibiteur a aussi la caractéristique intéressante de ne pas interagir avec le site actif mais plutôt avec la portion N-terminale de l'enzyme, soit celle contenant le *zinc finger*. L'interaction avec le *zinc finger* est présumée responsable de l'activité inhibitrice de l'oligonucléotide.

Figure 11: Structure du T30177, un inhibiteur de l'intégrase du VIH-1



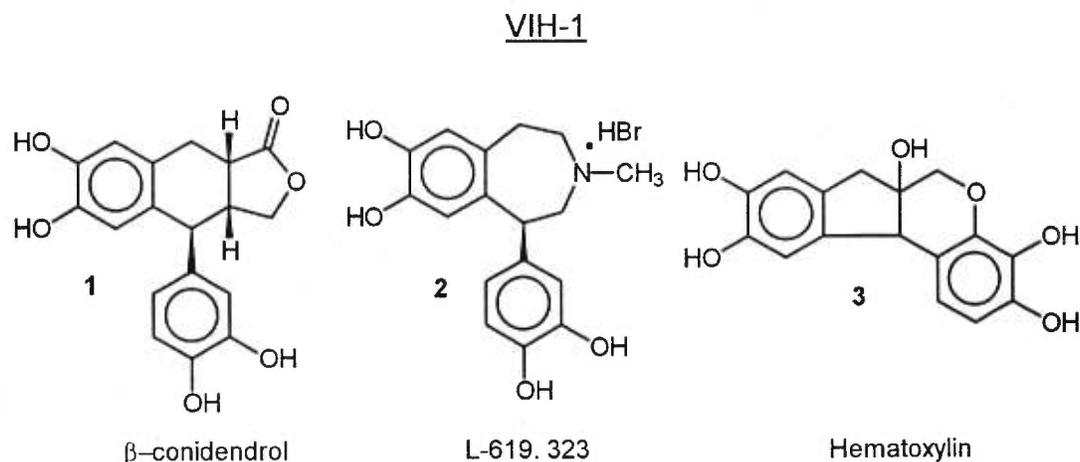
Le T30177 adopte aussi en solution une structure particulière (*quartet*, fig. 11). Ce repliement sur lui-même est d'ailleurs essentiel pour observer une activité inhibitrice¹⁵. Ce composé possède une très bonne activité (IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire) mais on peut tout de suite prévoir des problèmes de biodisponibilité lors de l'utilisation de ce produit dans un

traitement éventuel. En effet, le produit comporte des liaisons phosphodiesteres qui pourront être clivées par certaines enzymes (nucléases) de l'organisme humain, empêchant ainsi le produit de se rendre intact dans une cellule infectée. La taille élevée du composé représente aussi un handicap majeur pour une bonne distribution dans l'organisme. Néanmoins, cet inhibiteur de l'intégrase du VIH-1 est quand même le plus actif identifié jusqu'à maintenant *in vitro*. Il est présentement testé en phase clinique II par la compagnie Aronex sous le nom AR-177.

2.4.4 Inhibiteurs aryles hydroxylés

Plusieurs composés dans la littérature ayant un ou plusieurs phényles hydroxylés ont été évalués pour leur capacité d'inhiber l'intégrase du VIH-1 (fig. 12)¹⁶.

Figure 12: Structures d'inhibiteurs phényles hydroxylés de l'intégrase du



Les groupements phényles hydroxylés sont, semble-t-il, des pharmacophores importants pour ces molécules (**1**, **2** et **3**). Le reste de la molécule sert probablement à orienter ceux-ci dans la bonne conformation.

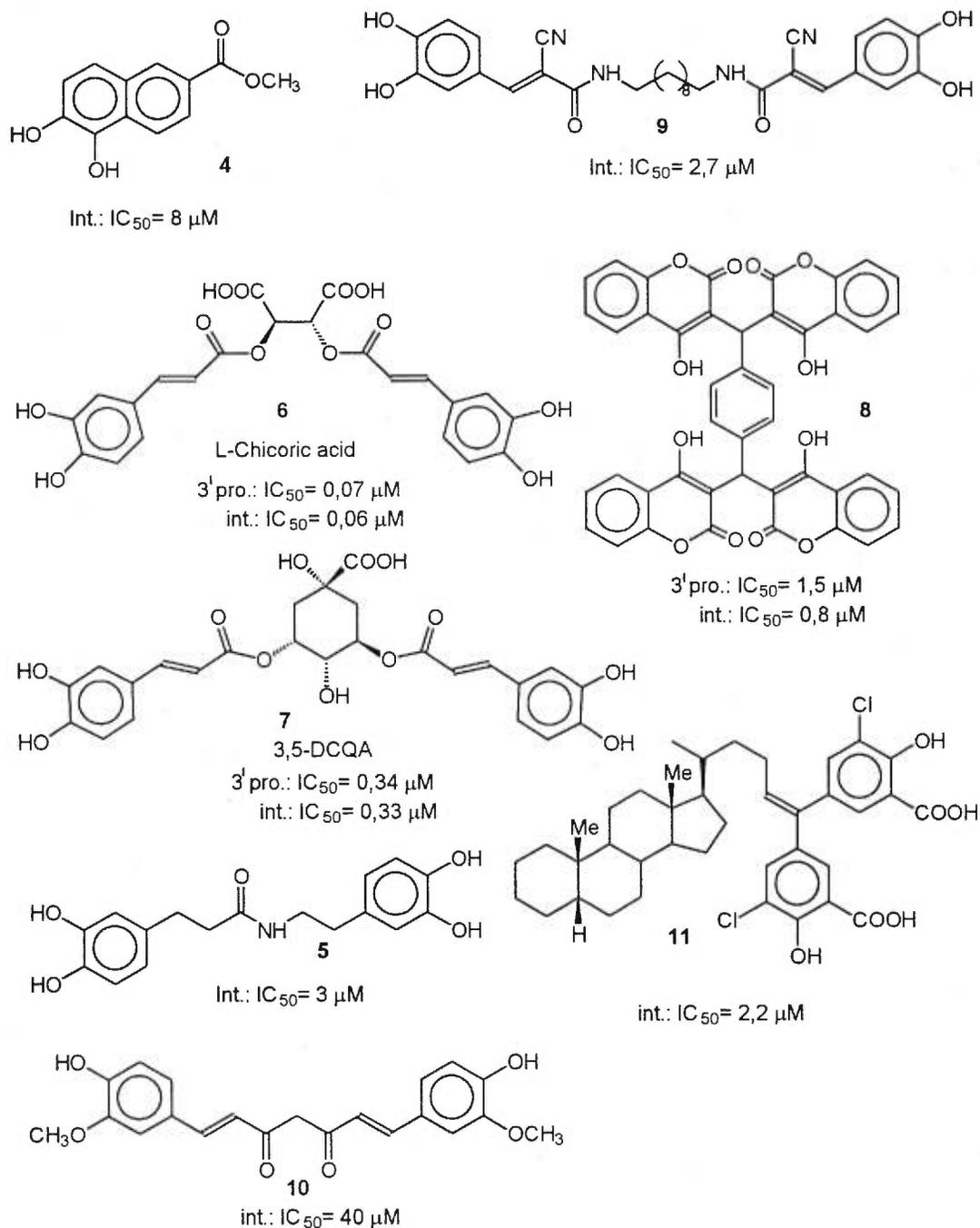
Plusieurs autres études de type structure-activité ont été menées par Pommier et coll¹⁷⁻²¹. Celles-ci rapportent plusieurs structures d'inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1 avec des groupements phényles hydroxylés (fig. 13).

Ces composés ont des motifs structuraux variés avec aussi des caractéristiques intéressantes. Par exemple le composé **10**, qui se replie sur lui-même, pour permettre l'alignement des deux phényles (*stacking*)¹⁷. De façon générale, on peut remarquer que l'activité du transfert de l'ADN (intégration) est plus inhibée que celle du *3' processing*. Il est intéressant de voir que l'activité de l'acide L-chicorique est plus élevée que celle du 3,5-DCQA, avec une structure beaucoup plus simple. Aussi, ces structures semblent interagir au site actif de l'intégrase et non sur les parties N-terminale ou C-terminale.

Mais le résultat le plus intéressant pour nous demeure la capacité d'inhibition du composé **5**, un dérivé de l'acide caféique chez lequel la dopamine a été introduite sur la fonction acide carboxylique par l'intermédiaire d'un lien amide. C'est un inhibiteur ayant une structure très simple et il possède aussi une activité appréciable, $IC_{50}=3\mu M$. Nous le nommerons inhibiteur témoin et il nous servira de référence pour fin de comparaison. C'est à partir de ce résultat, en vue d'améliorer l'activité et

éventuellement leur spécificité, que nous nous sommes inspirés pour la conception de nos molécules dans le cadre de ce mémoire.

Figure 13: Structures variées de phényles polyhydroxylés¹⁷⁻²¹



Chapitre 3

Synthèse d'inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1

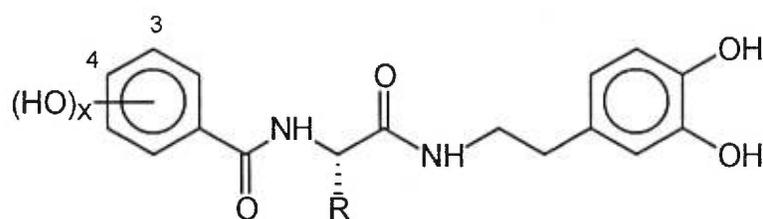
3.1 Inhibiteurs de l'intégrase

Nous avons choisi de faire des dérivés d'acides aminés (phénylalanine, tyrosine, glycine et acide glutamique) en introduisant des groupements phényles hydroxylés pour évaluer leur capacité à inhiber l'intégrase du VIH-1. Ce choix repose sur la grande variété des acides aminés commercialement disponibles, de même que sur la présence d'un centre chiral et sur la possibilité d'avoir trois fonctions (en position N-, C-terminale et chaîne latérale) pour introduire nos groupements phényles hydroxylés (pharmacophores) désirés. Ces composés préparés seront comparés entre eux et à l'inhibiteur connu **5** (fig.13). Ceci nous permettra d'évaluer leurs caractéristiques structurales, *i.e.* l'espacement, le nombre et la nature des pharmacophores (phényles hydroxylés) de même que la présence d'une ou plusieurs fonctions amide dans le squelette de la molécule et la présence d'un centre chiral, sur l'activité anti-intégrase du VIH-1 et éventuellement sur la sélectivité de ces composés. Ainsi, un espacement approprié des pharmacophores dans un composé donné pourrait résulter en interactions plus efficaces avec le site actif suivant un positionnement optimal. De plus, comparativement au composé **5**, la présence d'une fonction amide supplémentaire pourrait éventuellement créer

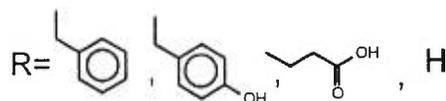
une liaison hydrogène avec des résidus de l'intégrase, stabilisant davantage le composé au site actif. Aussi, la présence d'un centre chiral pourrait rendre plus spécifiques certains composés en restreignant certaines de leurs conformations et en réduisant ainsi les possibilités de reconnaissance par d'autres enzymes. De plus, l'introduction de groupements benzoyles hydroxylés sur la partie N-terminale de l'acide aminé et de la dopamine sur l'extrémité C-terminale, nous permettra de faire un examen systématique de la relation structure-activité en fonction de la diversité des groupements introduits (fig. 14).

Figure 14: Structure générale de dérivés d'acides aminés phényles

hydroxylés



X= 0, (aucun -OH)
 1, en position 4
 2, en position 3,4



3.2 Synthèses de dérivés d'acides aminés phényles hydroxylés

Les conditions de réaction douces utilisées, pour synthétiser ces composés, ont permis l'introduction des groupements phényles hydroxylés

par le biais d'une liaison amide, de même que l'utilisation de groupements protecteurs^{22,23}. La littérature fait état de l'usage de nombreux agents de couplage pour la formation de liaison amide tout particulièrement pour la synthèse peptidique²⁴⁻²⁵. Dans notre cas, nous avons utilisé le réactif de couplage 3-éthyl-1-(3-diméthylamino)propyl-carbodiimide (EDC) en présence du 1-hydroxybenzotriazole (HOBt). Il a été démontré que l'utilisation du HOBt lors des réactions de couplage réduit la racémisation qui peut se produire sur le carbone en position α (centre chiral de l'acide aminé) du groupement carbonyle²⁶. Le mécanisme de formation d'une liaison amide sera discuté plus en détails à la section 3.3.1.

Il est important de faire un choix judicieux du type de groupements protecteurs et surtout l'ordre dans lequel est fait l'introduction des groupements phényles hydroxylés (position N- ou C-terminale), car les rendements de réaction s'en retrouvent grandement affectés. De façon générale pour l'obtention d'un rendement élevé, le couplage des acides benzoïques hydroxylés (surtout l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (**13**)) sur la fonction N-terminale de l'acide aminé est fait en premier, c'est-à-dire avant le couplage de la dopamine sur la partie C-terminale de l'acide aminé. Aussi, il faudra prendre certaines précautions lors du conclusif et la purification de ces composés, particulièrement dans le cas des composés avec plusieurs groupements phényles polyhydroxylés. C'est le cas par exemple avec le produit **19** (schéma 1), où cinq substituants hydroxyles (phénoliques) sont présents sur la molécule ce qui contribue à augmenter la polarité du

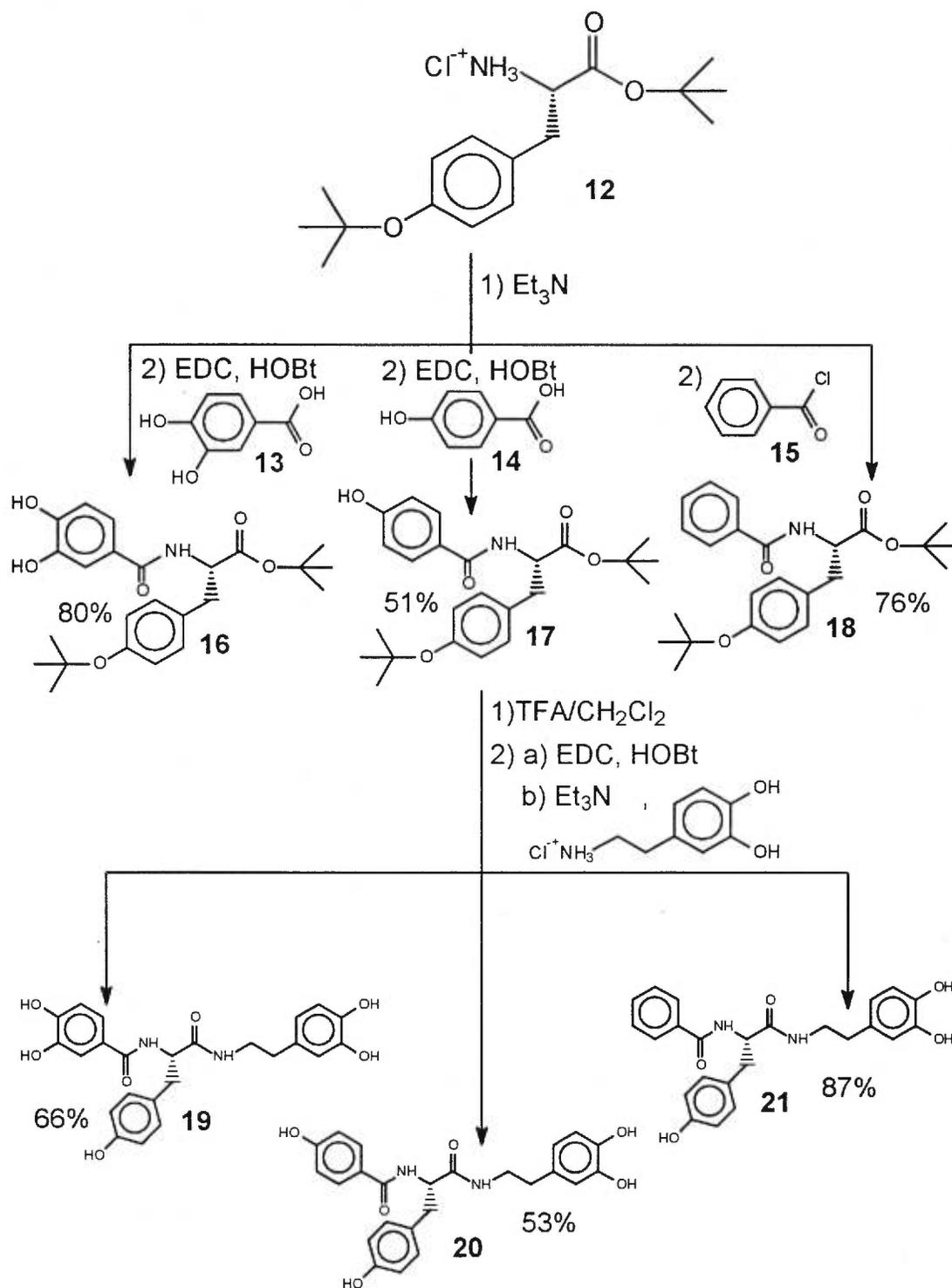
composé et le rend plus difficile à purifier par chromatographique sur gel de silice. Il est préférable alors d'utiliser 1% d'acide acétique (AcOH) dans l'éluant pour améliorer la résolution des séparations. Aussi la solubilité de ce composé est élevée dans l'eau ce qui augmente les risques de le perdre lors du conclusif.

3.2.1 Synthèse de dérivés de la tyrosine comme inhibiteurs de l'intégrase

La synthèse de dérivés de la tyrosine a été effectuée à partir du chlorhydrate de la tyrosine **12** protégée en position C-terminale et sur la fonction phénol, par des groupements *tert*-butyles (schéma 1).

D'abord, on traite le chlorhydrate **12** avec la triéthylamine pour générer une amine nucléophile. Cette dernière a réagi avec deux acides benzoïques hydroxylés (**13** et **14**) activés par le réactif de couplage EDC/HOBt pour donner les intermédiaires N-hydroxybenzoyles tyrosine **16** et **17**. L'intermédiaire **18** qui ne comprend aucun groupement phénol libre a par contre été préparé directement à l'aide du chlorure de benzoyle (**15**). Puis, les groupements protecteurs *tert*-butyles sont enlevés à l'aide d'une solution 50% d'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane (CH₂Cl₂). Enfin, la fonction acide carboxylique libérée est activée et couplée, à l'aide des mêmes réactifs (EDC/HOBt), avec la dopamine pour donner les dérivés de la tyrosine **19**, **20** et **21**.

Schéma 1: Synthèse de dérivés de la tyrosine



Il est à noter que dans ces trois cas, l'activation de la fonction acide carboxylique est faite à 0°C pour diminuer les chances de racémisation du centre chiral de la tyrosine lors de la réaction de couplage. De la même façon que précédemment, le chlorhydrate de la dopamine, forme sous laquelle elle est disponible, est traité avec la triéthylamine préalablement à l'ajout sur l'acide activé.

Nous avons obtenu des rendements de synthèses pour les composés **16**, **17** et **18** respectivement de 80, 51 et 76%. Les spectres RMN de ces composés montrent tous l'apparition d'un doublet caractéristique au nouveau proton amide formé respectivement à 6,82, 6,68 et 7,49 ppm. La région aromatique sur les spectres ^1H et ^{13}C montre l'apparition de nouveaux signaux provenant des groupements benzoyles en position N-terminale. Un nouveau signal carbonyle apparaît aussi sur le spectre en ^{13}C (à plus de 165 ppm) ce qui vient aussi prouver la formation de nos composés.

Le couplage de la dopamine (avec les réactifs EDC/HOBt) sur la position C-terminale des intermédiaires **16**, **17** et **18**, préalablement déprotégée avec une solution de 50% TFA/ CH_2Cl_2 , nous donne les composés **19**, **20** et **21** avec des rendements respectifs de 66, 53 et 87%. On remarque sur les spectres RMN de ces composés que deux signaux méthylènes caractéristiques de la dopamine à environ 2,6 et 3,4 ppm (en ^1H), et 35 et 41 ppm (en ^{13}C), se sont additionnés par rapport aux spectres des produits précurseurs. Les signaux $-\text{CH}_3$ provenant des groupements *tert*-

butyles des intermédiaires **16**, **17** et **18** ont également disparu, prouvant ainsi l'obtention des structures désirées.

Il est connu de la littérature que les rendements de couplage sont plus élevés lorsque les groupements phénols de composés similaires sont protégés^{27,28}. Étant donné que la synthèse de nos composés ne comporte que peu d'étapes (trois étapes de synthèse) et que nous n'avons pas besoin d'une grande quantité de composé (quelques milligrammes) pour l'évaluation enzymatique, ces conditions de réaction utilisées nous semblaient satisfaisantes pour obtenir rapidement les composés désirés sans qu'il soit nécessaire d'effectuer des étapes de protections/déprotections supplémentaires et l'optimisation des rendements de réaction.

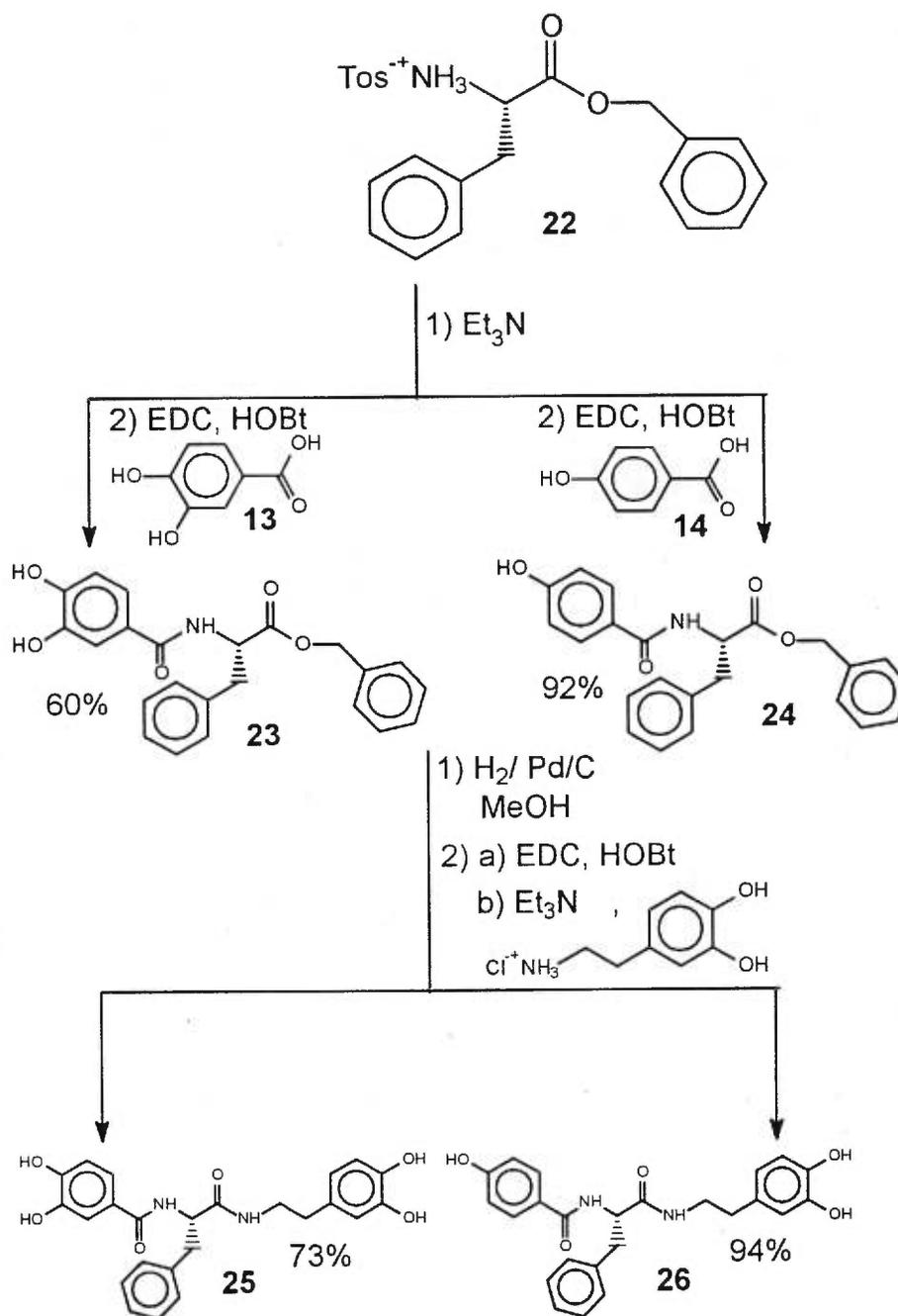
3.2.2 Synthèse de dérivés de la phénylalanine comme inhibiteurs de l'intégrase

La synthèse de dérivés de la phénylalanine a été effectuée à partir du sel tosylate de l'ester benzylique de la phénylalanine (**22**) tel que représenté dans le schéma 2. Comme dans le cas de la tyrosine, l'introduction d'acides benzoïques hydroxylés a été réalisée en activant ces derniers avec les réactifs de couplage EDC/HOBt pour donner les intermédiaires N-hydroxybenzoyles **23** et **24**. Par la suite, la déprotection de l'acide carboxylique est effectuée à partir de l'ester benzylique à l'aide d'une

hydrogénation catalytique ($H_2/Pd/C$), et celui-ci est utilisé sans purification pour la prochaine étape. De nouveau, nous avons utilisé le système de couplage EDC/HOBt pour introduire la dopamine en position C-terminale par la formation d'une liaison amide. Nous obtenons donc les deux dérivés *N*-hydroxybenzoyle et C-dopamine de la phénylalanine, **25** et **26**. Il est à noter que le dérivé de la phénylalanine substituée par l'acide benzoïque n'a pas été préparé car les deux meilleurs résultats d'inhibition ont été obtenus avec les dérivés de la tyrosine *N*-substituée par les 3,4- et 4-hydroxybenzoyle (**19** et **20**) (section 3.4), indiquant ainsi que les dérivés non hydroxylés ne seront probablement pas actifs.

Nous avons obtenu des rendements de synthèse pour les composés **23** et **24** de 60 et 92% respectivement. Les spectres RMN 1H de ces deux composés montrent l'apparition de signaux larges au-delà de 8,5 ppm caractéristiques de la présence de groupements phénols. La région aromatique sur les spectres 1H (de 7,2 à 7,9 ppm) et ^{13}C (115 à 138 ppm) montre également l'apparition de nouveaux signaux associés aux groupements benzoyles en position *N*-terminale. L'observation d'un nouveau signal caractéristique au carbonyle sur le spectre en ^{13}C (à plus de 166 ppm) vient aussi prouver la formation de nos composés.

Schéma 2: Synthèse de dérivés de la phénylalanine



Le couplage de la dopamine (avec les réactifs EDC/HOBT) sur la position C-terminale des intermédiaires **23** et **24**, préalablement déprotégés

par une hydrogénation catalytique (produit homogène par ccm), nous donne respectivement les composés **25** et **26** avec des rendements de 73 et 94%. Comme pour les dérivés de la tyrosine, on remarque sur les spectres RMN de ces composés que deux séries de signaux associés aux méthylènes de la dopamine, à environ 2,6 et 3,4 ppm (en ^1H), et 35 et 41 ppm (en ^{13}C), ont fait leur apparition, indiquant la formation de nos composés.

3.2.3 Synthèse de dérivés de la glycine et de l'acide glutamique comme inhibiteurs de l'intégrase

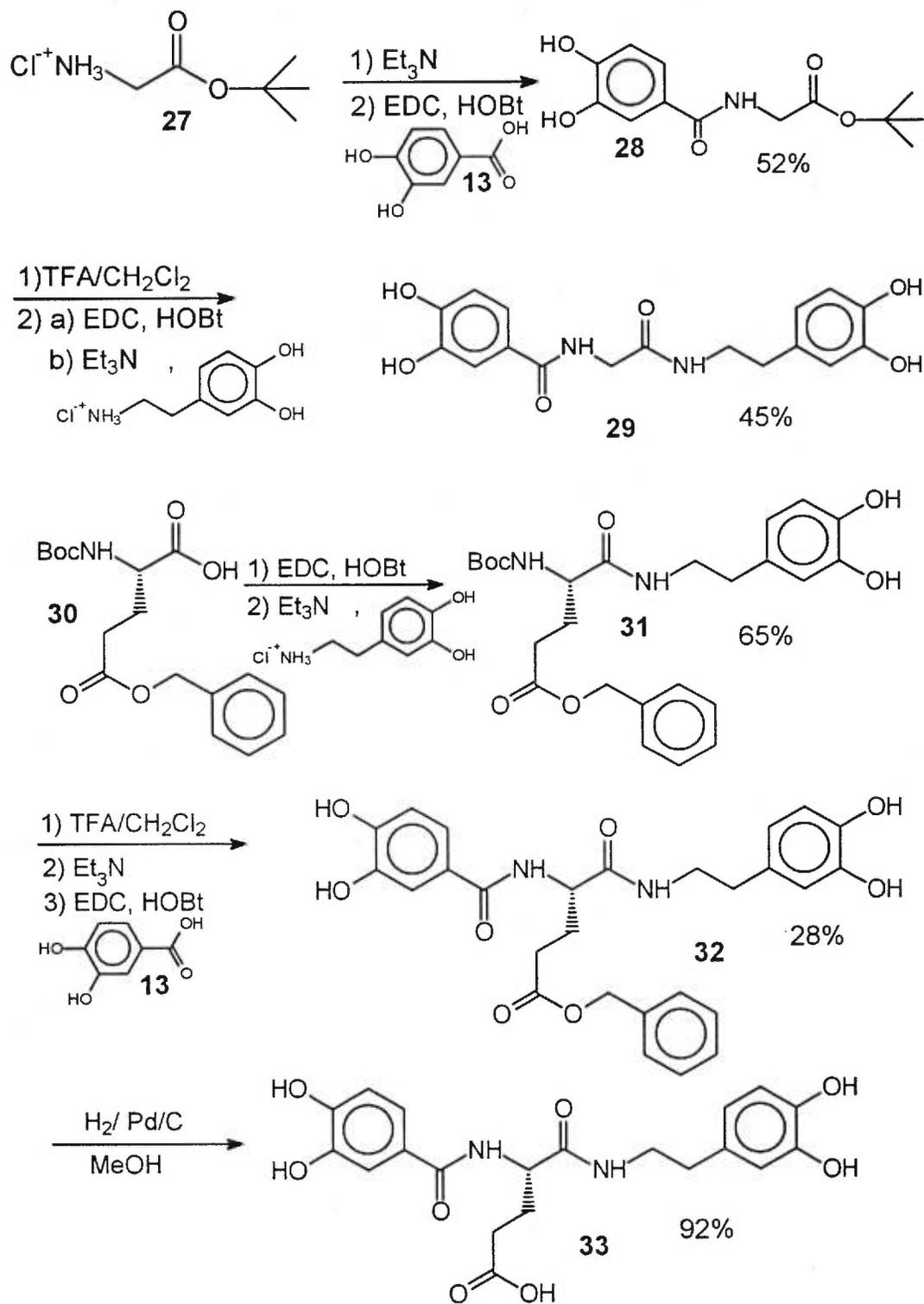
Puisque les résultats d'inhibition (voir section 3.4) de l'intégrase révèlent jusqu'à maintenant que le groupement en position N-terminale, qui assure une plus grande activité aux dérivés de la tyrosine et de la phénylalanine, est celui avec un groupement benzoyle dihydroxylé, seuls les dérivés de la glycine et de l'acide glutamique N-substitués avec le 3,4-hydroxybenzoyle ont été préparés.

Le dérivé dihydroxybenzoyle de la glycine **29** a été synthétisé à partir du chlorhydrate de l'ester *tert*-butylique de la glycine (**27**, schéma 3) selon les mêmes conditions utilisées pour préparer les dérivés de la tyrosine et de la phénylalanine substitués de phényles hydroxylés. Ainsi le traitement du sel **27** par la triéthylamine suivi de l'ajout des réactifs EDC/HOBt et de

l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque, nous a permis d'obtenir l'intermédiaire **28**. Bien entendu, après la déprotection du groupement *tert*-butyle (50% TFA/CH₂Cl₂), l'introduction de la dopamine sur la fonction acide carboxylique s'effectue aussi en présence du EDC/HOBt pour donner le dérivé de la glycine **29**.

Contrairement aux autres dérivés préparés jusqu'ici, les dérivés d'hydroxyphényles de l'acide glutamique **32** et **33** ont été synthétisés, en introduisant d'abord la dopamine sur sa partie C-terminale, à partir de l'acide N-Boc-glutamique- γ -benzylique ester (**30**), activé par EDC/HOBt pour conduire à l'intermédiaire **31**. Ensuite, la fonction amine a été libérée du groupement protecteur *tert*-butyloxycarbonyle (Boc) à l'aide d'une solution de 50% TFA/CH₂Cl₂. L'acide 3,4-dihydroxybenzoïque activé par EDC/HOBt a alors été introduit sur la partie N-terminale de la molécule pour donner le dérivé ester benzylique **32**. L'acide carboxylique de la chaîne latérale (en position γ) protégé par un ester benzylique a ensuite été libéré par une hydrogénation catalytique (H₂/Pd/C) pour obtenir le composé **33**.

Schéma 3: Synthèse de dérivés de la glycine et de l'acide glutamique



Lors de la synthèse des dérivés de la glycine (**28** et **29**), nous escomptions obtenir des rendements plus élevés pour les réactions de couplage, étant donné que nous n'avions pas de substituant hydroxyle présent dans le produit de départ et qu'aucune fonction polaire n'était présente, l'acide aminé n'ayant aucune chaîne latérale. Les rendements sont respectivement de 52% et 45% et sont considérés comme modérés. Nous ne pouvons pas donner plus d'explication à ce moment-ci pour justifier pourquoi nous n'obtenons pas des rendements plus élevés, sauf qu'on observe des rendements de ce genre à chaque fois que nous avons utilisé l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (**13**). Les spectres RMN ^{13}C des composés **28** et **29** montrent la présence d'un carbonyle à plus de 165 ppm et sur le spectre RMN ^1H on peut observer entre 8,0 et 8,8 ppm deux signaux caractéristiques aux groupements phénols sur les molécules. Également, les spectres RMN ^1H et ^{13}C de **28** et **29** montrent l'apparition de nouveaux signaux dans la portion aromatique.

Pour préparer les dérivés de l'acide glutamique, nous n'avons pas suivi l'ordre habituel d'introduction des groupements phényles hydroxylés en position N- puis en C-terminale, tout simplement parce que nous avons à notre disposition dans le laboratoire, l'acide glutamique protégé en position N-Boc et γ -ester benzylique comme produit de départ. La dopamine fut couplée en premier avec un rendement de 65%, pour obtenir l'intermédiaire **31**. Le spectre RMN ^1H et ^{13}C de celui-ci montre deux signaux méthylènes caractéristiques de la dopamine à 2,68 et 3,38 ppm (en ^1H), et 35,03 et

41,12 ppm (en ^{13}C). Par la suite, nous avons préparé le dérivé **32** avec un rendement de 28%, par la déprotection du Boc et le couplage de l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque. Il s'agit d'un rendement faible, mais nous avons suffisamment de produit pour préparer le dérivé **33** et aussi faire l'évaluation de leur potentiel d'inhibition sur l'intégrase du VIH-1, sans que l'on soit obligé d'emprunter d'autres voies de synthèse comportant des étapes de protection et de déprotection. Ces étapes additionnelles auraient pu améliorer les rendements de réaction en particulier celui du couplage avec l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque mais cela demeure hypothétique à savoir si on aurait pu vraiment augmenter le rendement global de synthèse. Sur les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé **32**, on peut remarquer la disparition des signaux relatifs à la présence du groupement Boc et l'apparition de nouveaux signaux aromatiques. Sur le RMN ^1H uniquement, on peut remarquer le déplacement du signal du proton amide formé (anciennement un *tert*-butylcarbamate à 6,16 ppm) vers un plus bas champ, à environ 7,6 ppm. Le composé **33** obtenu par hydrogénation catalytique de l'ester benzylique est produit dans un rendement de 92% et les spectres RMN ^1H et ^{13}C ne montrent plus le signal associé au méthylène du groupe benzyle anciennement à 5,11 ppm (^1H) et 65,99 ppm (^{13}C).

3.2.4 Synthèse de dérivés urée de la tyrosine et de l'inhibiteur témoin 5

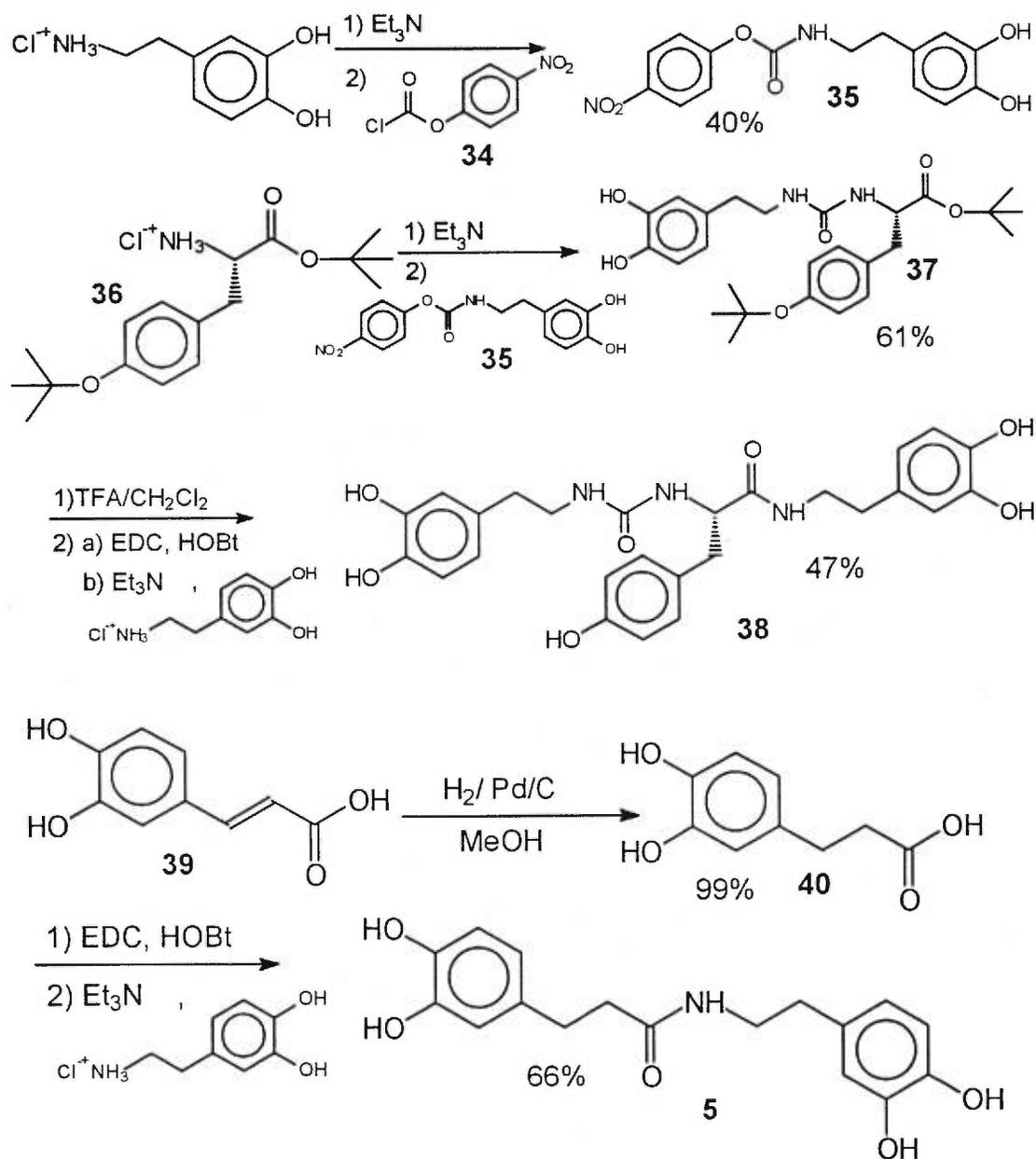
Nous avons voulu aussi introduire la dopamine sur la partie N-terminale de la tyrosine par l'intermédiaire d'une fonction urée (schéma 4). Pour ce faire, un groupement carbonyle, possédant d'un côté un groupement partant du type *p*-nitrophénoxy et de l'autre la dopamine, est introduit en traitant le chlorhydrate de dopamine par la triéthylamine suivie du chloroformate de *p*-nitrophénoxyde pour former le composé **35**. Ensuite l'amine libre du chlorhydrate de la tyrosine **36** (les fonctions C-terminale et phénols protégées par le groupement *tert*-butyle), générée par la triéthylamine, est utilisée comme nucléophile pour déplacer le *p*-nitrophénoxy (*p*-NO₂PhO) du composé **35** pour conduire à l'intermédiaire **37**. Durant cette réaction de substitution, on peut observer une coloration progressive en jaune du milieu réactionnel causée par la libération de l'espèce chargée, l'ion *p*-nitrophénoxyde, en solution. Par la suite, le clivage des groupements protecteurs *tert*-butyles de **37** s'effectue en milieu acide (50% TFA/CH₂Cl₂). Il est très important de suivre la progression de cette réaction par ccm et de l'arrêter dès qu'elle semble complète. Il n'est pas recommandé de laisser le produit de réaction inutilement dans ce milieu acide afin de ne pas affecter la fonction urée, reconnue pour être instable à un tel milieu acide. Néanmoins utilisant ces conditions, nous avons pu enlever les groupements protecteurs *tert*-butyles sans affecter la fonction

urée. Il semble donc que le clivage de l'urée soit plus lent comparativement à celui du groupement protecteur *tert*-butyle de l'ester et de l'éther.

Finalement, la fonction acide carboxylique libérée, obtenue de l'intermédiaire **37**, est activée avec les réactifs de couplage EDC/HOBt et la dopamine est introduite pour conduire au composé **38**.

En vue de valider les tests d'inhibition de l'intégrase du VIH-1 mis au point dans notre laboratoire de biologie moléculaire (en collaboration avec le Dr. Jocelyn Yelle) et pour fins de comparaisons avec les valeurs d'inhibition déjà publiées, la synthèse d'un inhibiteur connu **5** de la littérature a été entreprise (schéma 4). L'inhibiteur témoin **5** n'a pas été préparé suivant les conditions de réaction déjà rapportées¹⁹ mais plutôt à l'aide des conditions de couplage (EDC/HOBt) mentionnées précédemment. L'acide caféique (**39**) a été utilisé comme produit de départ pour conduire suite à la réduction de la double liaison par une hydrogénation catalytique ($H_2/Pd/C$) à l'intermédiaire **40**. L'activation de la fonction acide carboxylique de ce dernier par EDC/HOBt suivie de l'ajout de la dopamine a mené à l'inhibiteur témoin **5**.

Schéma 4: Synthèse d'un dérivé urée de la tyrosine phényles hydroxylés et de l'inhibiteur témoin 5



Le composé **35** est obtenu avec un rendement de 40%. Celui-ci est un peu plus faible, la littérature rapportant des rendements de plus de 85%

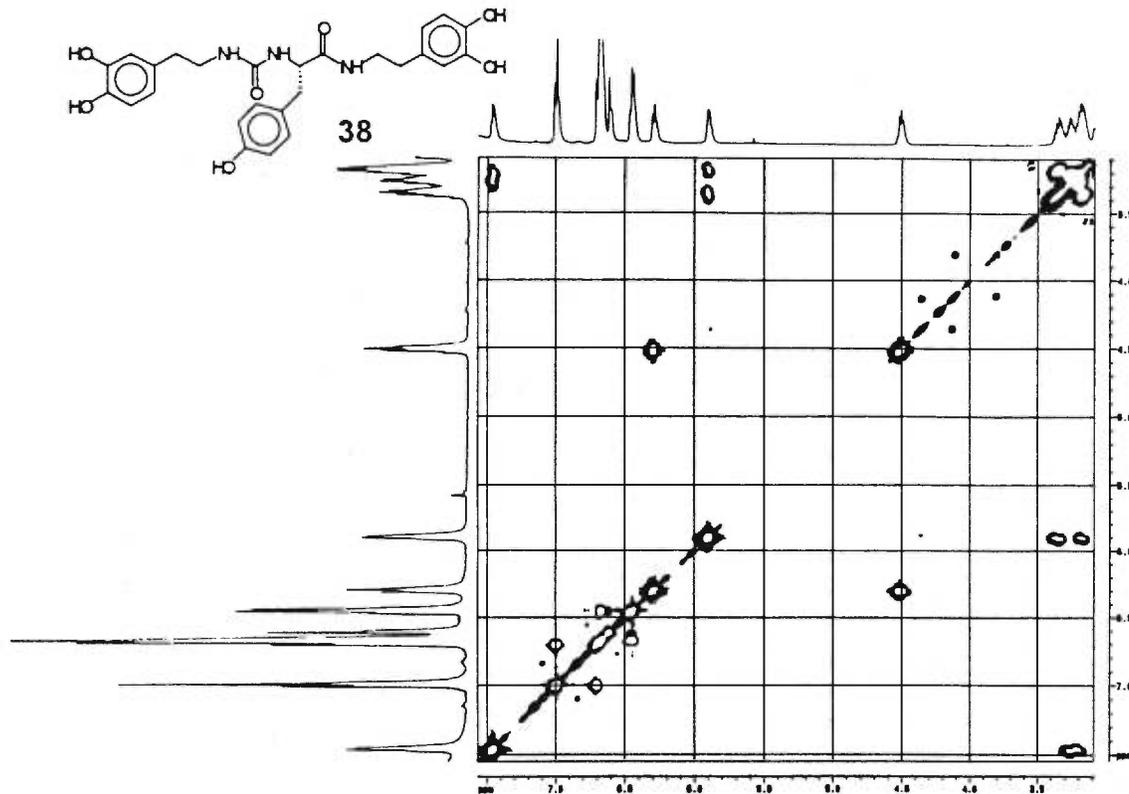
pour la réaction d'un chloroformate sur une amine⁵⁶, mais la présence de phénols dans notre cas affecte certainement la réaction. Le spectre RMN ^1H montre la présence d'un proton amide à 6,56 ppm, également l'apparition de signaux aromatiques peut être observée sur les spectres RMN ^1H et ^{13}C . Par la suite, le composé **37** est obtenu avec un rendement de 61%. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C de celui-ci montrent deux signaux méthylènes caractéristiques de la dopamine à 2,60 et 3,31 ppm (en ^1H), et 36,06 et 41,80 ppm (en ^{13}C). Pour terminer, le composé **38** obtenu avec 47% de rendement exhibe les signaux méthylènes caractéristiques des deux dopamines, lesquels se chevauchent sur le spectre de proton. Par contre sur le spectre RMN ^{13}C , cinq signaux méthylènes sont clairement identifiables en plus du $-\text{C}_\alpha\text{H}$, on retrouve donc au total les signaux des six carbones aliphatiques sur le spectre RMN ^{13}C .

Le composé **40** est obtenu de façon quantitative (99%) et le spectre RMN ^1H montre la présence des deux signaux méthylènes attendus à 2,56 et 2,78 ppm. L'inhibiteur témoin **5** est ensuite obtenu avec un rendement de 65%. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C de **5** montrent quatre signaux méthylènes caractéristiques à 2,41, 2,58, 2,75, 3,33 ppm (en ^1H), et 31,29, 35,09, 38,41 et 41,30 ppm (en ^{13}C), conformes à la structure du composé **5**.

3.2.5: Discussion

Tous les composés synthétisés possèdent les caractéristiques spectroscopiques en accord avec leur structure. En plus des expériences RMN de routine (1D: ^1H , ^{13}C), des expériences à deux dimensions: *Correlated Spectroscopy* (COSY: ^1H - ^1H) et *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation* (HMQC: ^1H - ^{13}C) ont été effectuées sur la plupart des composés. Cela nous a permis d'établir avec certitude l'assignation de tous les signaux RMN observés sur les spectres de proton (^1H) et de carbone (^{13}C). Par exemple, sur le spectre du proton de nos composés enregistrés dans l'acétone- d_6 (solvant), les signaux amides N-H se retrouvent souvent dans la même région que les signaux aromatiques. Une expérience COSY, permettant d'établir la corrélation (à 90°) entre deux protons qui partagent un couplage vicinal, précise dans notre cas la relation entre le proton du carbone- α et celui du N-H_(amide) (fig. 15). Nous pouvons donc distinguer clairement dans la région aromatique (approximativement de 6,5 à 8 ppm) du spectre RMN ^1H du composé **38**, les signaux correspondant aux protons amides de la molécule respectivement à 5,90, 6,29 et 7,46 ppm et leur couplage respectif avec les protons aliphatiques de 3,09 à 3,37 et à 4,50 ppm .

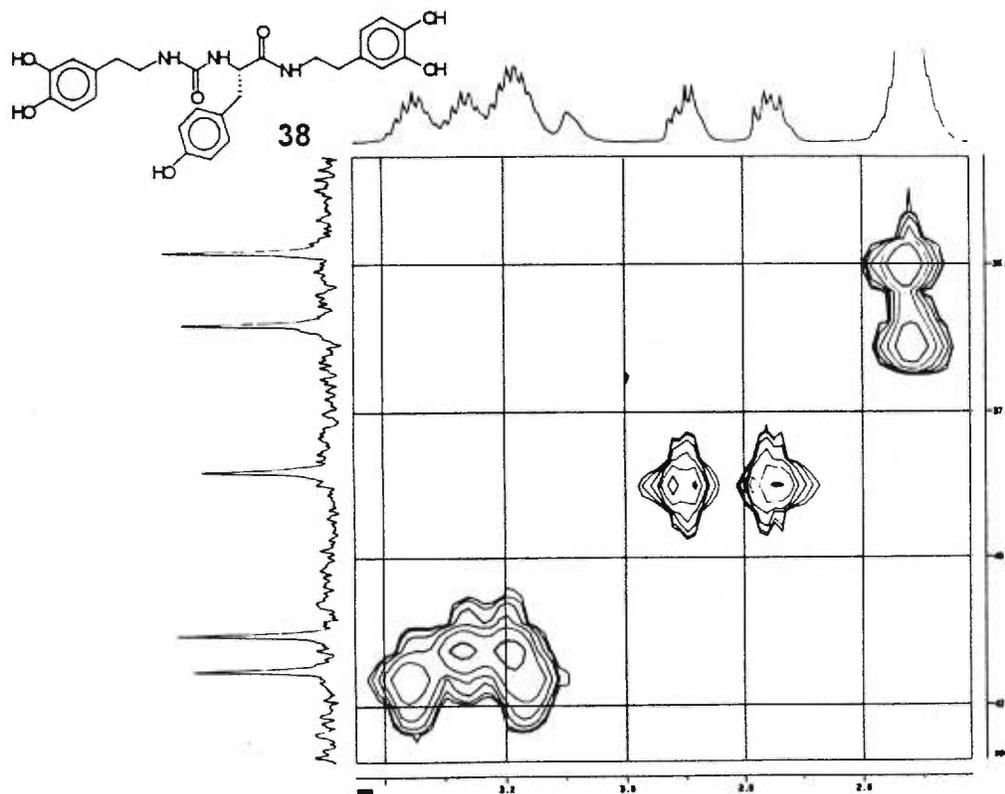
Figure 15: Portion du spectre COSY du composé 38



Les signaux du carbone- β de la tyrosine (ou de la phénylalanine) et des deux carbones aliphatiques de la dopamine apparaissent dans la même région sur les spectres de ^{13}C et il devient difficile d'effectuer leur assignation sans l'aide d'un spectre à deux dimensions HMQC. Ce dernier permet d'effectuer la corrélation entre un proton et le carbone sur lequel il est lié. À partir de l'assignation des signaux du spectre du proton, on peut donc établir à quel carbone appartient un signal donné. À l'inverse, une paire de multiplets observée en ^1H peut aussi être facilement associée à un même carbone, comme dans le cas d'un méthylène aux protons non-équivalents, tel qu'observé à plusieurs reprises avec les composés

préparés. Par exemple, dans le cas des cinq méthylènes (-CH₂-) du composé **38**, nous avons pu effectuer l'assignation de trois signaux tel qu'illustré à la figure 16.

Figure 16: Portion du spectre HMQC du composé **38**



Les spectres infrarouges de tous les produits synthétisés dans cette partie de projet (sauf le composé **18**) montrent une bande large et intense à environ 3300 cm⁻¹, caractéristique d'une liaison O-H (phénol). Lorsque ceux-ci ont plusieurs liaisons de ce type, la bande d'absorption peut masquer les signaux C-H_{aromatiques} et C-H_{aliphatiques} (respectivement aux alentours de 3010 et 2980 cm⁻¹). Des bandes caractéristiques des

groupements carbonyles (amides et esters) sont aussi présentes aux environs de 1600 à 1700 cm^{-1} .

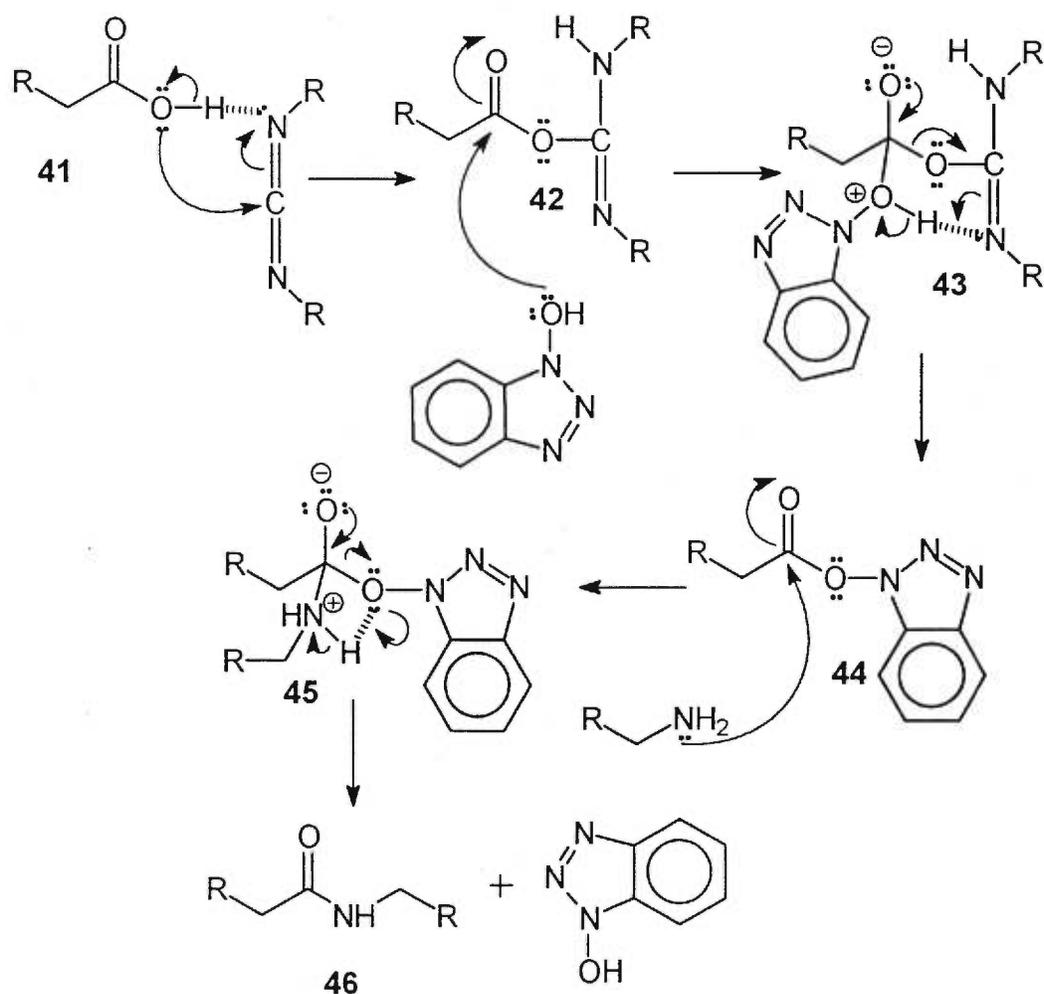
Il est à noter que lorsque la tyrosine protégée est utilisée, la libération des groupements protecteurs *tert*-butyles de l'ester et de l'éther avec une solution de 50%TFA/ CH_2Cl_2 , est réalisée sans sélectivité. L'introduction de la dopamine sur l'acide carboxylique libéré s'effectue donc en présence de l'hydroxyle (phénolique) libre de la tyrosine (schéma 1).

3.3. Mécanisme de réaction

3.3.1 Couplage avec HOBt/EDC

Bien que le mécanisme de réaction de couplage peptidique avec EDC/HOBt soit bien connu²⁵⁻²⁷, il est quand même intéressant de le rappeler puisqu'il s'agit d'une réaction importante utilisée à plusieurs reprises dans cette partie du projet.

Schéma 6: Mécanisme de couplage peptidique avec HOBt/EDC



Le mécanisme est présenté au schéma 6. D'abord il y a une attaque nucléophile de l'acide carboxylique (**41**) sur le carbone électrophile de la fonction carbodiimide du EDC pour former l'intermédiaire **42**. Parce que cet intermédiaire est plus sensible à la racémisation, car il y a possibilité d'élimination et de formation de cétène, le HOBt est présent dans le milieu réactionnel. Celui-ci est tout de suite additionné à **42** et en passant par l'intermédiaire **43**, on assiste à l'expulsion d'une urée et à la formation de l'acide activé **44**. Une amine nucléophile peut maintenant attaquer le groupement carbonyle en passant par l'intermédiaire **45**, pour donner finalement la liaison amide (**46**) et régénérer le HOBt.

3.4 Enzymologie des inhibiteurs de l'intégrase

Le test d'inhibition de la réaction d'intégration de l'intégrase du VIH-1 a servi à évaluer l'efficacité de nos produits. Celui-ci est plus simple et significatif comparativement au test d'inhibition de la réaction du 3' *processing*, qui n'a pas été employé²⁹. Une brève description du test d'inhibition de l'intégrase est faite en annexe 1 et les résultats d'inhibition de nos composés sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Ce sont les résultats d'inhibition des premiers composés synthétisés (les dérivés de la tyrosine) qui nous ont guidé pour le choix des autres composés à préparer, pouvant représenter un plus grand intérêt.

Tableau 1: Résultats d'inhibition de l'intégrase par les dérivés de la tyrosine
et de la phénylalanine

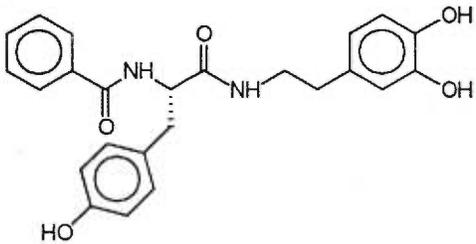
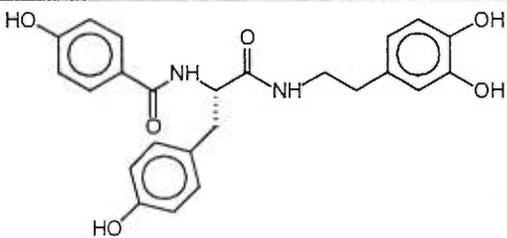
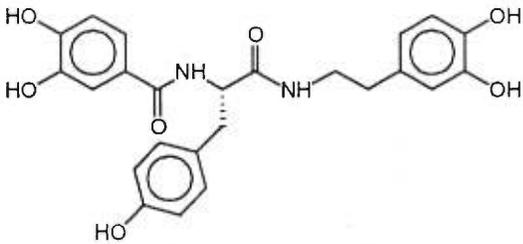
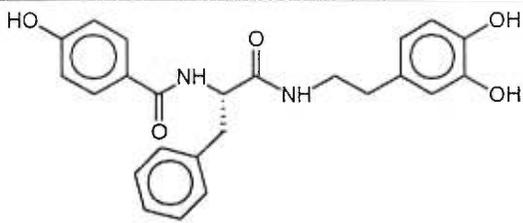
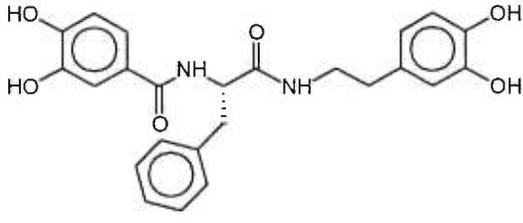
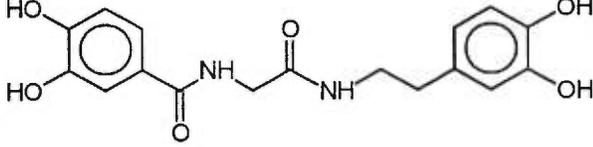
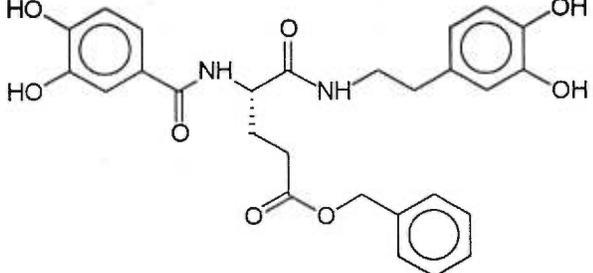
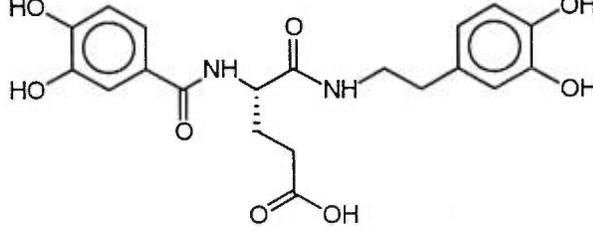
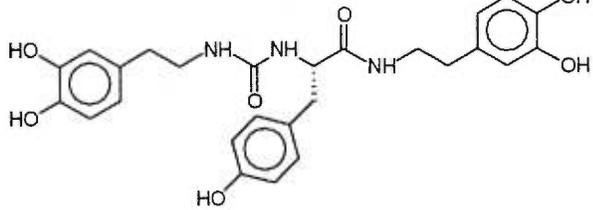
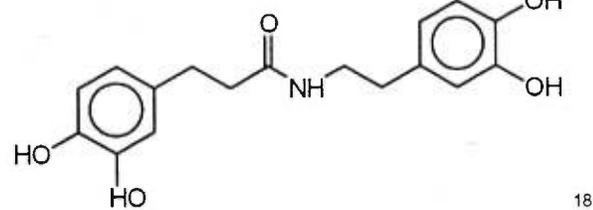
Numéro	Structure de l'inhibiteur	IC ₅₀ (μM)
21		> 200
20		88
19		5,8
26		> 200
25		45

Tableau 2: Résultats d'inhibition de l'intégrase par les autres composés préparés

Numéro	Structure de l'inhibiteur	IC ₅₀ (μM)
29		100
32		26
33		11
38		50
5		8,5

Dans un premier temps, les composés dérivés de la tyrosine **19**, **20** et **21** ont été synthétisés et ont montré une activité inhibitrice d'une valeur de IC_{50} de 5,8, 88 et $> 200 \mu\text{M}$ respectivement. Celui ayant le meilleur potentiel d'inhibition de cette série est le composé **19**, possédant une activité comparable aux inhibiteurs rapportés présentement dans la littérature¹⁶⁻²¹. Ce composé s'est révélé par la suite être le meilleur inhibiteur de tous les composés anti-intégrase synthétisés dans le cadre de ce projet. Par contre pour le composé **21**, aucune activité n'a été observée jusqu'à une concentration de $200 \mu\text{M}$, indiquant ainsi qu'il ne peut être considéré comme un inhibiteur à ces concentrations. Ce dernier ne possède aucun substituant hydroxyle (phénolique) sur le cycle *N*-benzoylé. Tandis que le composé **20**, avec le substituant *N*-4-hydroxybenzoylé montrant une valeur d'inhibition intermédiaire ($IC_{50} = 88 \mu\text{M}$) entre les composés **19** et **21**, représente un inhibiteur avec une faible activité. Ces résultats montrent que le substituant *N*-3,4-dihydroxybenzoylé est très important pour ce type de composé afin d'observer une activité inhibitrice appréciable.

Par la suite deux dérivés de la phénylalanine ont été synthétisés, soit les composés **25** et **26**. Ces derniers avec des activités de IC_{50} de 45 et $> 200 \mu\text{M}$ respectivement ont démontré une activité inhibitrice moindre que leurs analogues dans la série de la tyrosine, mais tout de même d'une activité appréciable dans le cas du dérivé *N*-3,4-dihydroxybenzoylé phénylalanine **25**. Ce résultat semble indiquer une interaction favorable de l'enzyme avec le groupement phénol de la chaîne latérale de la tyrosine,

d'après le IC_{50} de **19** et **25** (respectivement de 5,8 et 45 μ M). Il est à noter aussi que le dérivé *N*-benzoylé (sans substituant hydroxyle) de la phénylalanine n'a pas été synthétisé puisque son homologue de la série tyrosine (**21**) ne donnait pas d'activité anti-intégrase.

À la lumière de ces résultats, nous voulions déterminer l'importance de la chaîne latérale de l'acide aminé sur l'activité anti-intégrase de nos dérivés de la tyrosine et de la phénylalanine. Pour vérifier cela, nous avons préparé le dérivé *N*-3,4-dihydroxybenzoylé et *C*-dopamine de la glycine **29**. Ce dernier s'est révélé beaucoup moins actif respectivement d'un facteur de 17 et 2 par rapport à ses homologues de la série de la tyrosine (**19**) ou de la phénylalanine (**25**). Ceci suggère que le cycle phényle, monohydroxylé ou non, de la chaîne latérale de l'acide aminé joue un rôle important, soit par une interaction hydrophobe dans une cavité de l'intégrase, soit dans l'orientation de l'inhibiteur dans le site actif par des encombrements stériques.

En examinant bien le site actif de l'intégrase (fig. 5 et 8), on peut imaginer qu'une fonction acide carboxylique, introduite sur un dérivé inhibiteur, pourrait venir se complexer avec l'ion métallique, reconnu cofacteur de l'enzyme, et ainsi permettre de fortes interactions avec le composé carboxylique de façon à le stabiliser efficacement au site actif de l'intégrase. D'ailleurs certains inhibiteurs de l'intégrase connus de la littérature possèdent des fonctions acides carboxyliques (voir fig. 13). C'est pour cette raison, que nous avons préparé un dérivé de l'acide glutamique

33, un analogue du composé le plus actif de la série de la tyrosine (**19**). Le précurseur de synthèse de l'acide carboxylique **33**, soit le composé protégé **32** sera aussi évalué comme inhibiteur et comparé au dérivé de la phénylalanine **25**. Le composé **32** possède une chaîne latérale plus longue entre le carbone- α et le groupement phényle (un atome de carbone pour la phénylalanine comparativement à cinq atomes d'espacement dont une fonction ester). Le composé ester benzylique **32** possède une activité ($IC_{50} = 26 \mu\text{M}$) moins élevée d'environ un facteur de 2 que celle obtenue avec l'acide carboxylique libre (**33**: $IC_{50} = 11 \mu\text{M}$). Il montre par contre une meilleure activité, soit deux fois plus élevée que le dérivé de la phénylalanine (**25**: $IC_{50} = 45 \mu\text{M}$). Il semble donc que ce groupement phényle contribue à des interactions avec l'enzyme, aussi dans une prochaine étude il serait intéressant de voir quel effet sur l'activité aurait la présence de divers substituants sur ce phényle benzylique de l'acide glutamique.

Par curiosité, nous avons aussi voulu faire un homologue de la structure active **19** en introduisant la dopamine en position N-terminale par l'intermédiaire d'une fonction urée. Cela avait pour but d'augmenter l'espace entre les deux groupements dihydroxyphényles, en plus d'évaluer l'effet sur l'activité de la présence de la fonction urée comparativement à celle d'une liaison amine. Malheureusement, le composé **38** ($IC_{50} = 50 \mu\text{M}$) résultant s'est révélé beaucoup moins actif d'un facteur d'environ 10 comparativement à son homologue **19** ($IC_{50} = 5,8 \mu\text{M}$).

Finalement, l'inhibiteur témoin **5** que nous avons préparé a donné une valeur de $IC_{50} = 8,5 \mu\text{M}$ alors que la littérature rapporte une activité de $3 \mu\text{M}$. Ceci montre un petit écart acceptable étant donné que nous avons quelque peu adapté le protocole de la littérature (Pommier et coll.³⁰⁻³¹) en fonction du type d'équipement disponible dans notre laboratoire. Aussi en considérant les incertitudes reliées à la technique expérimentale, il est normal de ne pas enregistrer exactement la même valeur.

En résumé, nous pouvons affirmer que nous avons préparé une nouvelle famille d'inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1 avec une activité élevée de l'ordre du μM . Le plus actif est le dérivé de la tyrosine **19** ($IC_{50} = 5,8 \mu\text{M}$) qui possède une activité 1,5 fois plus élevée que l'inhibiteur témoin **5** ($IC_{50} = 8,5 \mu\text{M}$). Ce résultat montre que certains dérivés d'acides aminés ont un potentiel anti-intégrase du VIH-1 et que la poursuite éventuelle de recherches dans cette direction serait pleinement justifiée pour exploiter davantage cette famille de composés et obtenir ainsi un dérivé encore plus actif.

Chapitre 4

La protéase du VIH-1

4.1 Données générales

La protéase du VIH-1 est l'enzyme responsable de la maturation des virions dès leur sortie de la cellule, dernière étape avant l'obtention de nouvelles particules virales matures prêtes à infecter d'autres cellules¹⁻⁴. Cette enzyme clive les précurseurs protéiques *gag* et *gag-pol* (section 1.1, fig. 2) pour produire, entre autres, des enzymes virales actives¹⁻⁴. Suite aux nombreux travaux réalisés, la protéase du VIH-1 est l'une des enzymes qui a été le plus étudiée, et par conséquent une multitude de données tant au niveau de l'activité qu'au niveau structural sont maintenant disponibles, facilitant ainsi la conception de nouveaux inhibiteurs³²⁻³⁶. La protéase du VIH-1 est considérée comme une petite enzyme, constituée par deux monomères protéiques de 99 acides aminés, ce qui a grandement facilité son étude en particulier l'élucidation de sa structure par cristallographie (fig. 17). Son activité enzymatique consiste à hydrolyser certaines liaisons peptidiques présentes dans les protéines.

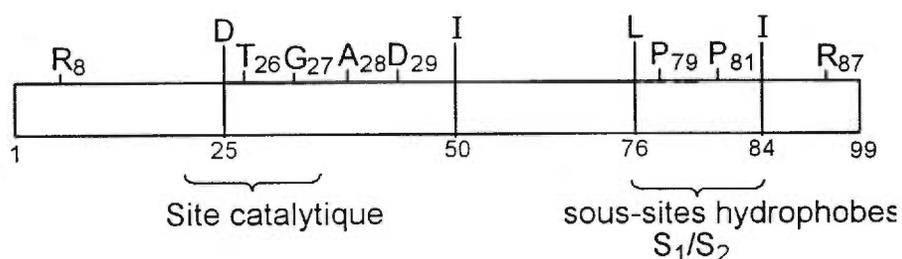
Figure 17: Représentation de la structure tridimensionnelle d'un complexe protéase-inhibiteur⁴⁵



Des études structurales par cristallographie ont permis d'établir les séquences d'acides aminés impliquées dans le mécanisme d'action de la protéase du VIH-1 (fig. 18)⁴⁶⁻⁴⁷. Celle-ci ne possède qu'un seul site catalytique, caractérisé par la présence d'un acide aspartique₂₅ qui est essentiel à l'activité de l'enzyme (section 4.2). Le motif Asp₂₅-Thr₂₆-Gly₂₇ retrouvé au site actif de la protéase est aussi présent chez d'autres protéases aspartiques connues. Suite à cette séquence, deux acides aminés, Ala₂₈-Asp₂₉ sont typiques du domaine catalytique des protéases de

rétrovirus. Également deux arginines en position 8 et 87, interagissent toutes deux avec l'acide aspartique en position 29 pour stabiliser la protéase dans sa forme dimérique *i.e.* sa forme active.

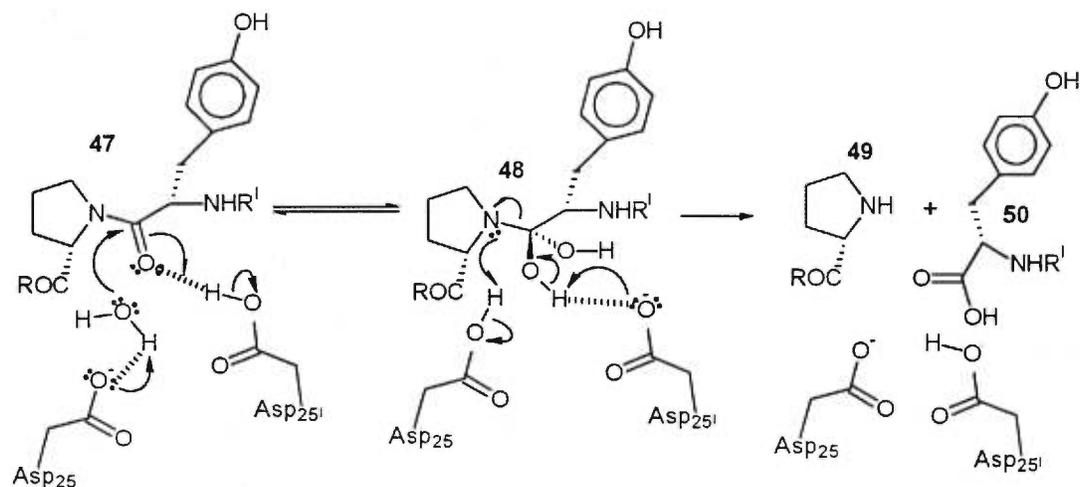
Figure 18: Chaîne polypeptidique de la protéase du VIH-1



4.2 Mécanisme d'action de la protéase

La protéase du VIH-1 n'effectue qu'un seul type de réaction mais sur plusieurs substrats protéiques⁴⁷. Tous les précurseurs protéiques (*gag* et *gag-pol*) qui mèneront à la formation des protéines structurales et des quatre enzymes du virus seront clivés par la protéase pour donner les formes fonctionnelles de celles-ci. Tous subiront l'hydrolyse d'un lien peptidique (liaison amide entre deux acides aminés) selon le mécanisme illustré à la figure 19. Comme la structure active de la protéase est un dimère, la numérotation des acides aminés comprend un chiffre ou un chiffre accompagné d'un signe prime ('), de façon à indiquer à quel monomère cet acide aminé appartient.

Figure 19: Mécanisme d'hydrolyse d'une liaison Tyr-Pro par la protéase

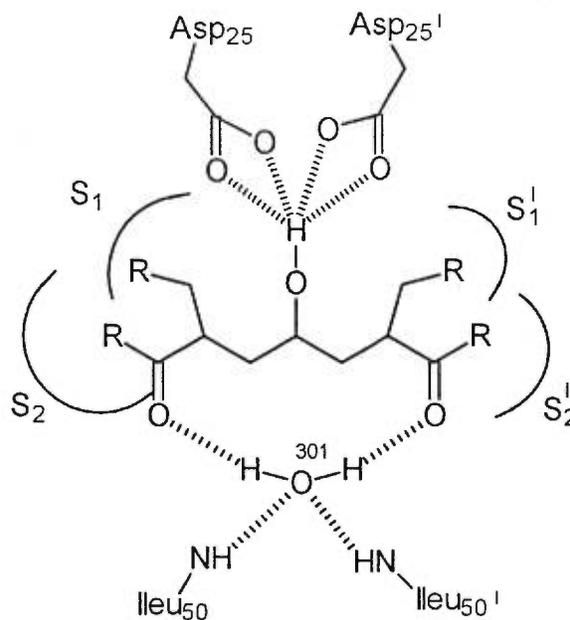


Chatfield et coll. ont proposé ce mécanisme d'hydrolyse par catalyse acide où deux résidus d'acide aspartique (un pour chaque monomère) viennent assister l'introduction d'une molécule d'eau sur une liaison amide⁴⁸. Le proton acide de l'acide aspartique en position 25' active le groupement carbonyle de l'amide (**47**), pendant que l'autre acide aspartique (sous forme de carboxylate) en position 25 permet l'introduction de la molécule d'eau sur celui-ci. Un équilibre entre l'amide et l'amide hydratée (l'intermédiaire tétraédrique **48**) est alors formé, mais la rupture de la liaison carbone-azote de l'intermédiaire **48** conduit aux fragments amine **49** et acide carboxylique **50**.

4.3 Structure de la protéase du VIH-1

À cause de sa taille relativement petite, les chercheurs ont rapidement étudié la protéase du VIH-1 et des expériences de cristallographie ont permis d'établir la structure tridimensionnelle de divers complexes protéase-inhibiteur. À partir de ces données, les interactions entre la protéase et l'inhibiteur ont été identifiées clairement. Cela a permis de déterminer quels groupements de l'inhibiteur sont essentiels, ainsi que leurs interactions au site actif de l'enzyme, en vue de développer de nouveaux inhibiteurs efficaces (fig. 20)⁴⁶⁻⁴⁷.

Figure 20: Principales interactions inhibiteur-enzyme



Ces nombreuses observations ont permis d'établir certaines règles générales qui doivent s'appliquer pour qu'un composé puisse interagir au site actif de la protéase et exercer une activité inhibitrice. Entre autres, le composé devrait avoir au moins un groupement polaire qui pourrait interagir avec les résidus Asp₂₅ et Asp_{25'} au site actif de la protéase. Par exemple dans la figure 20, l'inhibiteur porte un groupement hydroxyéthylène qui remplace l'amide du substrat normalement hydrolysée par l'enzyme. Cette fonction isostère non hydrolysable stabilise l'inhibiteur au site actif par une interaction polaire efficace, dans ce cas-ci, une liaison hydrogène. De plus, l'inhibiteur devrait posséder des groupements de nature hydrophobe pouvant occuper les cavités (sous-sites: S₁, S_{1'}, S₂ et S_{2'}) au voisinage immédiat du site catalytique de la protéase. Ceux-ci contribuent le plus souvent de façon déterminante à l'établissement d'interactions fortes (interactions principales) de l'inhibiteur au site actif. Bien qu'il existe aussi d'autres sous-sites (S₃, S_{3'}, S₄, S_{4'}, etc.) plus distants du site catalytique pouvant être aussi occupés par d'autres groupements hydrophobes, ces sous-sites contribuent habituellement de façon moins importante (interactions secondaires) aux interactions protéase-inhibiteur.

La première génération d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1, basée sur des substrats peptidiques, comportant 4 à 6 acides aminés modifiés, ont conduit à d'excellents inhibiteurs avec des constantes d'inhibition (K_i) inférieures à 1 nanomolaire (nM). Même si ces inhibiteurs se sont révélés efficaces contre le virus du VIH et ont permis d'améliorer

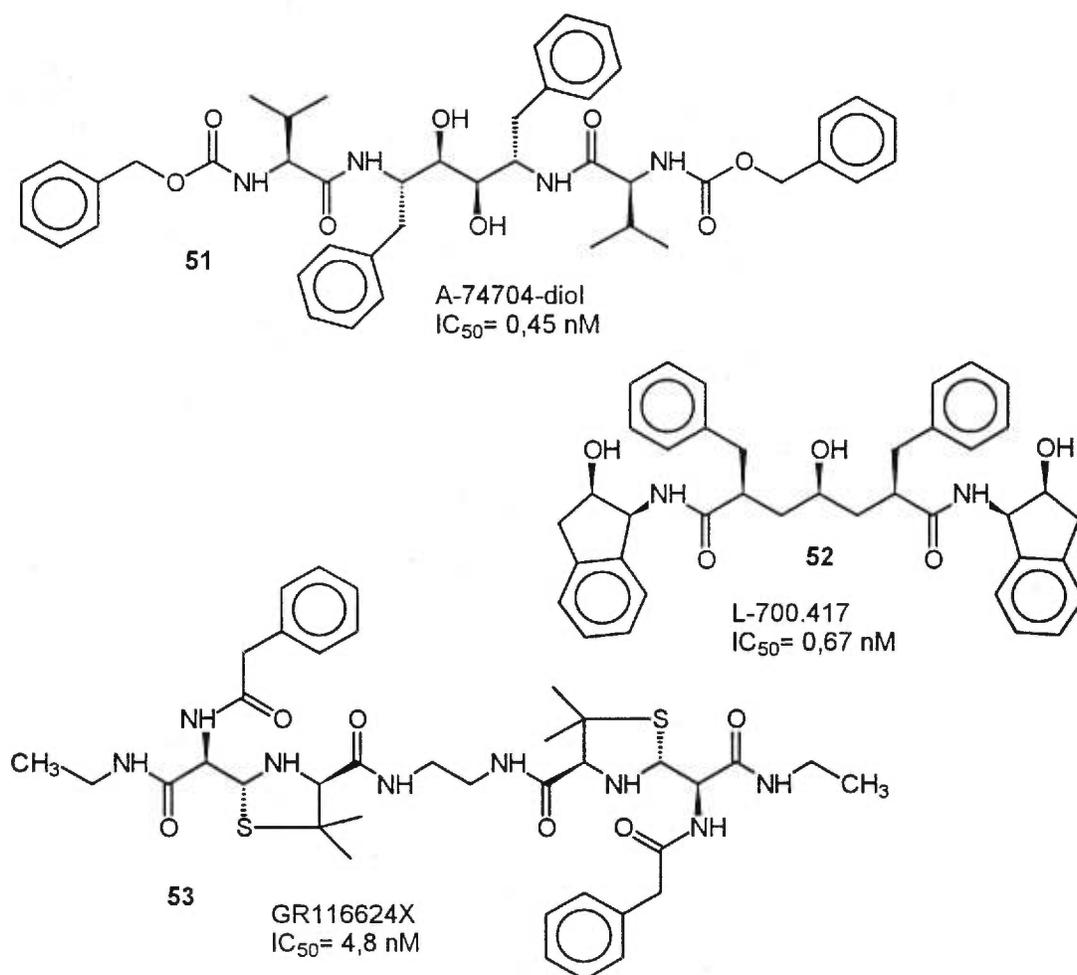
grandement le traitement des sidéens, ceux-ci demeurent de trop grande taille, ce qui occasionne des problèmes de distribution et de biodisponibilité⁴¹ dans l'organisme humain. C'est pourquoi les inhibiteurs de grande taille occupant plusieurs sous-sites (primaires et secondaires), utilisés présentement en thérapie seront remplacés éventuellement par des inhibiteurs de plus petite taille qui occuperont moins de sous-sites, par exemple seulement ceux correspondant à S_1 , S_1' , S_2 et S_2' , mais idéalement de façon plus efficace, pour conduire à de petits inhibiteurs performants anti-VIH avec des propriétés pharmacocinétiques améliorées. La molécule d'eau₃₀₁ (fig. 20) qui participe normalement à l'hydrolyse de la liaison amide d'un substrat, joue aussi un rôle important. La molécule d'eau en question sert de relais, par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, afin de permettre les interactions entre la partie supérieure très mobile de la protéase et l'inhibiteur. Cette molécule d'eau₃₀₁ est retenue par des liaisons hydrogène avec un ou deux groupements carbonyles de l'inhibiteur et deux résidus d'isoleucines₅₀ et _{50'} en refermant le plafond de l'enzyme.

4.4 Inhibiteurs de la protéase du VIH-1 rapportés par la littérature

Plusieurs inhibiteurs acycliques rapportés dans la littérature possèdent une fonction hydroxyéthylène, comme fonction isostère, pour interagir avec les deux acides aspartiques₂₅ et _{25'} du site actif de la protéase. La fonction isostère de ce type d'inhibiteurs mime l'amide hydratée (fig. 19)

de l'intermédiaire tétraédrique, normalement obtenu avec un substrat peptidique et qui conduira à l'hydrolyse du lien amide. D'autre part, tous ces composés possèdent au moins quatre groupements hydrophobes pour occuper les sous-sites S_1/S_1' et S_2/S_2' , et au moins un groupement carbonyle pour complexer la molécule d'eau₃₀₁ (fig. 21)⁴⁶. Ces composés consistent en la première génération d'inhibiteurs de la protéase du VIH.

Figure 21: Première génération d'inhibiteurs de la protéase

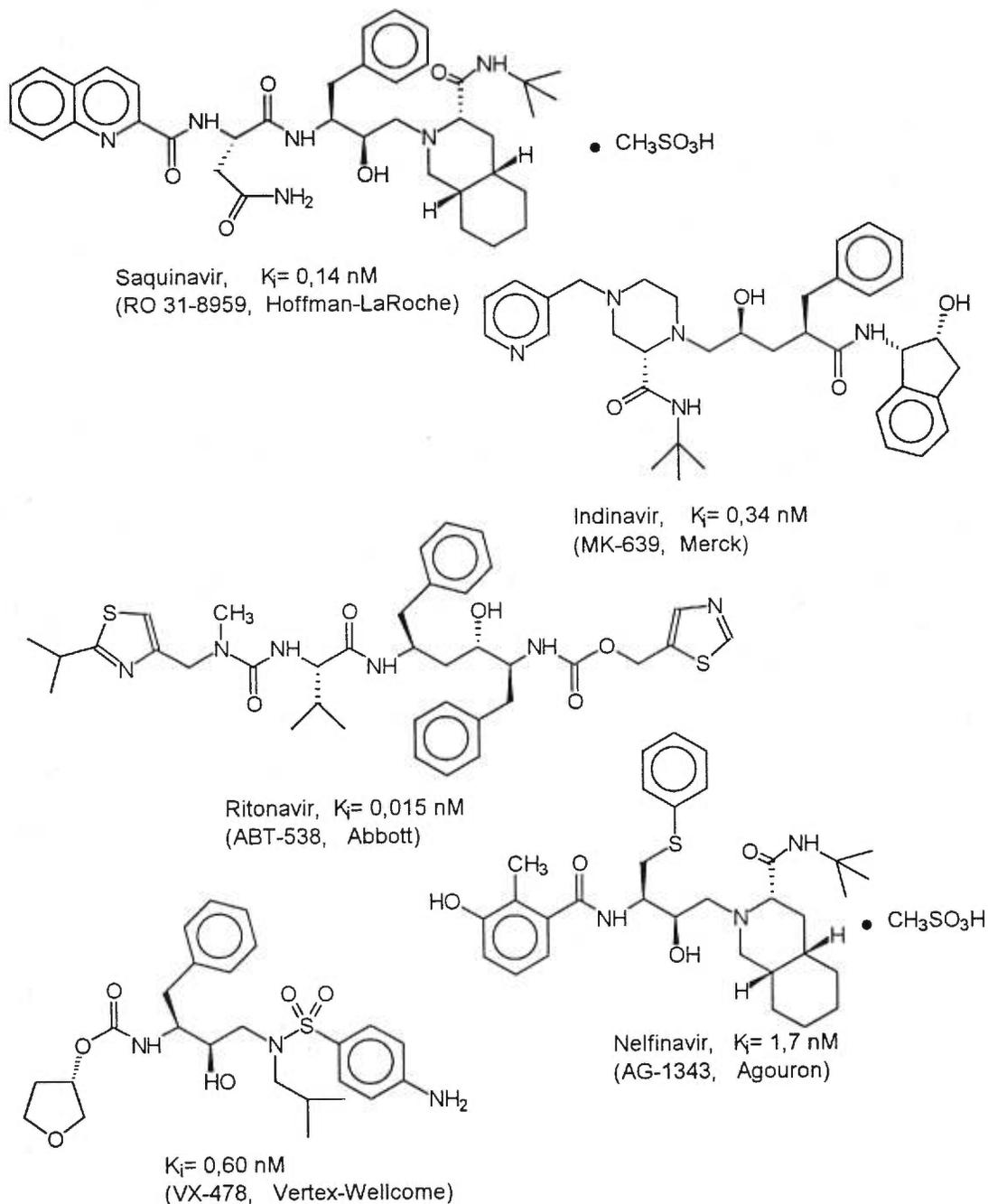


Il était plus simple au départ de concevoir des molécules symétriques, contenant aussi des liaisons peptidiques pour déterminer quels étaient les structures d'inhibiteurs les plus actives, comme c'est le cas des composés à la figure 21. Cependant aucune de ces molécules n'a été utilisée en thérapie anti-VIH, mais elles ont servi de modèle pour la synthèse d'inhibiteurs encore plus efficaces et ayant les propriétés adéquates pour être utilisés *in vivo* comme agents thérapeutiques. La figure 22 montre quelques composés qui ont été évalués jusqu'à un certain stade en phase clinique et quatre d'entre eux (Saquinavir, Indinavir, Ritonavir et Nelfinavir) ont été approuvés officiellement comme médicaments anti-VIH par la *Food and drug administration* (FDA) aux États-Unis⁴.

Au début des recherches sur les anti-protéase, plusieurs inhibiteurs symétriques (symétrie C_2 ; voir exemple fig. 21, composés **51-53**) ont été préparés et se sont avérés très efficaces pour inhiber la protéase, par contre leur efficacité est moindre lorsqu'ils sont en présence du VIH. À première vue, cela peut paraître surprenant compte tenu du fait que la protéase est un dimère (deux copies de la même protéine), un ensemble symétrique, ce qui permet de penser qu'un composé symétrique pourrait mieux interagir avec chacune des deux parties de l'enzyme. Effectivement une molécule symétrique s'insère très bien au site actif de la protéase purifiée *in vitro*. Mais les probabilités élevées de mutation du VIH dans un organisme vivant, engendreront des modifications structurales des enzymes

virales, entre autres la protéase, ce qui réduira l'activité de ces inhibiteurs. Ces mutations, en se produisant simultanément sur les deux monomères identiques de l'enzyme pourraient réduire de façon plus importante les interactions avec l'inhibiteur symétrique, entraînant ainsi une perte de l'activité. Par contre, un inhibiteur non symétrique serait en principe moins susceptible aux mutations de la protéase car il n'interagit pas de la même façon avec les deux monomères au site actif. Celui-ci pourrait alors mieux s'adapter à une modification (*e.g.* changement conformationnel) de la protéase, parce qu'une partie moins importante de sa structure sera affectée par la perte d'interactions due à la mutation, permettant ainsi au reste de l'inhibiteur de conserver certaines affinités avec la protéase⁴⁹. Lors de la recherche de structures actives, il est beaucoup plus simple de concevoir des inhibiteurs symétriques. Néanmoins, lorsqu'un composé actif est découvert, l'introduction de groupements différents, pour occuper les sous-sites hydrophobes S_1/S_1' et S_2/S_2' , peut être faite en s'inspirant de la structure d'un composé symétrique. C'est d'ailleurs la stratégie que nous avons adoptée, notre travail ne traitant que de l'évaluation de composés symétriques.

Figure 22: Inhibiteurs de la protéase du VIH-1 en essais cliniques ou approuvés par la FDA

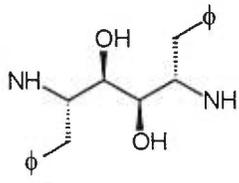
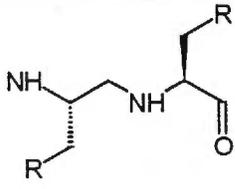
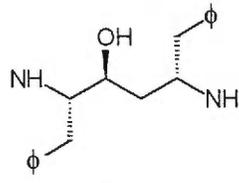
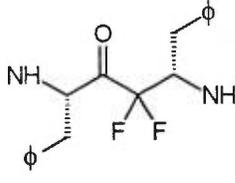
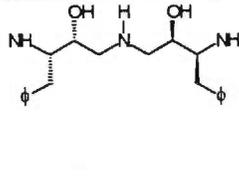
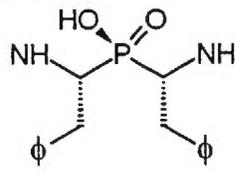


Les inhibiteurs présentement en développement devront, en plus de bloquer efficacement l'action de la protéase, avoir la plus petite taille possible pour augmenter leur biodisponibilité⁴⁹ *i.e.* pour atteindre le cerveau

et les différents tissus de l'organisme. Ceux-ci devront idéalement posséder le moins possible de liaisons peptidiques pour réduire leur dégradation par les différentes peptidases de l'organisme.

Bien que les inhibiteurs qui sont présentement commercialisés ont tous une fonction isostère hydroxyéthylène, plusieurs autres types de fonctions ont été préparées jusqu'à maintenant. Le Tableau 3 montre quelques fonctions isostères contenues dans les structures d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1.

Tableau 3: Quelques fonctions isostères d'inhibiteurs rapportées dans la littérature

Noms	Structures	Noms	Structures
Diol		Amide réduit	
Hydroxyéthylène		α -Difluorocétone	
Aminodiol		Phosphinate	

Quoique l'inhibition varie selon la nature des substituants sur leurs positions N-terminales, toutes ces familles de composés possédant les synthons centraux représentés dans le tableau 3 ont un dérivé ayant une constante d'inhibition (K_i) de l'ordre du nanomolaire.

Dans cette optique, nous proposons de préparer de nouveaux composés ayant une fonction isostère diméthylèneamine (-CH₂NHCH₂-), comprenant de façon générale une amine centrale entourée de deux résidus hydrophobes et deux fonctions N-terminales substituées, dans le but d'être évalués comme inhibiteurs de la protéase du VIH-1, tout en discutant de la relation structure-activité.

Chapitre 5

Synthèse d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1

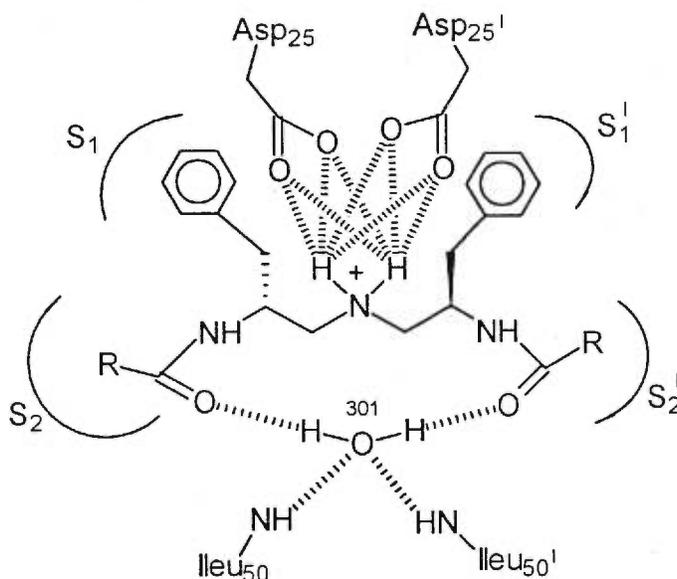
5.1 Idée générale

Les composés que l'on projette de préparer à partir de deux résidus de la phénylalanine comme inhibiteurs de la protéase comprendront un squelette triaminé. Comparativement aux inhibiteurs déjà rapportés dans la littérature, nous proposons d'introduire une fonction diméthylèneamine ($-\text{CH}_2\text{NHCH}_2-$, comme fonction isostère) pour interagir avec les deux Asp_{25} et $25'$ du site actif de l'enzyme. De chaque côté de cette fonction isostère, ces composés auront des groupements benzyles provenant de la chaîne latérale de deux résidus de la phénylalanine lesquels sont connus pour occuper efficacement les sous-sites S_1/S_1' du site actif de la protéase. Enfin aux extrémités des résidus de la phénylalanine, les deux fonctions amines terminales serviront à introduire différents groupements hydrophobes (R) par l'intermédiaire d'une fonction carbonylée (amide, carbamate, urée, sulfonyle, etc.). Ces substituants auront pour but d'occuper les sous-sites S_2/S_2' afin d'augmenter les interactions des composés avec le centre actif de la protéase et obtenir des inhibiteurs avec une activité significative (fig. 23)⁴⁶⁻⁴⁷.

Comme pour plusieurs inhibiteurs connus, nos composés possèdent deux groupements carbonylés susceptibles d'interagir avec la

molécule d' H_2O_{301} . La protéase opère en milieu acide, l'amine centrale de nos composés sera protonée dans ces conditions et pourrait former une interaction polaire favorable avec les résidus d'acide aspartique au site catalytique de la protéase.

Figure 23: Interactions proposées de nos inhibiteurs avec la protéase



5.2 Synthèse des composés triaminés comme inhibiteurs de la protéase du VIH-1

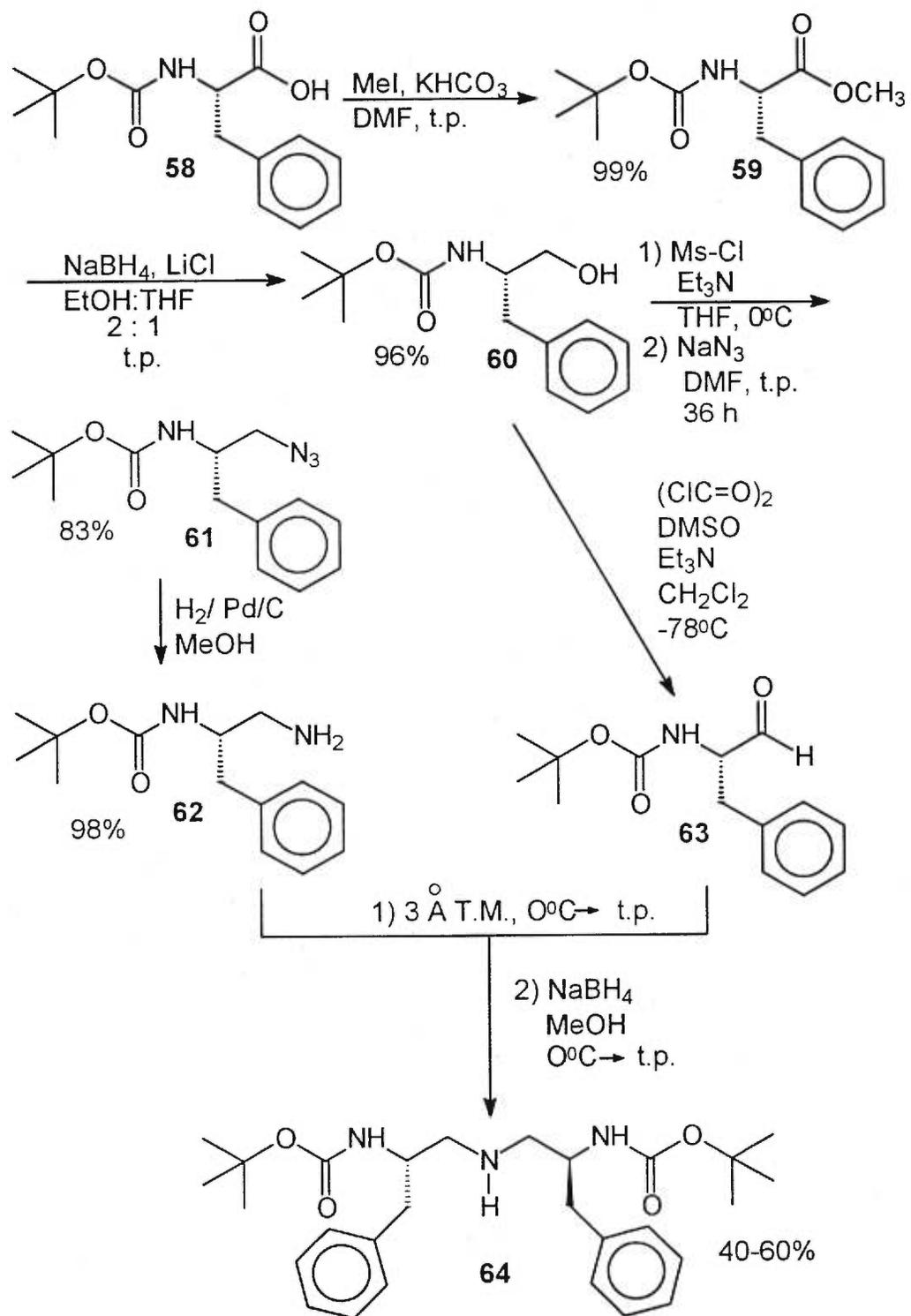
5.2.1 Synthèse de la portion centrale de nos composés triaminés

La synthèse de la portion centrale de nos composés comme inhibiteurs de la protéase est faite principalement par la manipulation de divers groupements fonctionnels (schéma 7).

Nous avons utilisé la phénylalanine *N*-protégée avec le groupement Boc (**58**) comme produit de départ pour préparer l'intermédiaire **64** à partir duquel seront dérivés nos composés finaux. La fonction acide carboxylique de cette dernière est d'abord transformée en ester méthylique **59** dans un excellent rendement de 99% par un déplacement nucléophile Sn2 du carboxylate sur l'iodure de méthyle, dans le diméthylformamide (DMF). Lorsque la réaction est complétée, un simple conclusif aqueux a donné l'ester brut **59** désiré avec un degré de pureté satisfaisant pour passer à la prochaine étape, sans nécessiter de purification sur colonne chromatographique⁵⁰. L'ester **59** montre une valeur de rotation optique expérimentale comparable à celle rapportée dans la littérature, ainsi que des données spectroscopiques RMN et infrarouge propres à sa structure.

La fonction ester du composé **59** est réduite avec le NaBH₄ dans un mélange d'éthanol et de tétrahydrofurane (2:1) et en présence d'un léger excès de chlorure de lithium. L'alcool **60** est ainsi obtenu après un conclusif aqueux dans un rendement de 96% et avec un degré de pureté ne nécessitant pas de purification supplémentaire⁵⁰. L'alcool **60** possède une valeur de rotation optique expérimentale et de point de fusion comparable à celles rapportées dans la littérature⁵⁰, ainsi que des données spectroscopiques RMN et infrarouge propres à sa structure.

Schéma 7: Synthèse de la portion centrale des composés triaminés



En vue des étapes subséquentes, la quantité d'alcool **60**, qui servira de précurseur pour préparer l'amine **62** et l'aldéhyde **63** est divisée en deux portions. Une première portion est utilisée pour transformer l'alcool **60** en dérivé azoture **61**, par une réaction de substitution nucléophile Sn2. Dans ce cas, l'hydroxyle de l'alcool **60** sera transformé en bon groupe partant, un mésylate, en le faisant réagir avec le chlorure de mésyle dans le THF. Après un conclusif, celui-ci ne sera pas purifié davantage et le brut de cette réaction sera traité par l'azoture de sodium pour donner l'azoture correspondant **61**⁵¹⁻⁵². Cette dernière étape de substitution nécessite 36 h de réaction à température ambiante dans le DMF pour qu'elle soit complète. Une chromatographie sur colonne de gel de silice permet d'obtenir l'azoture **61** dans un rendement de 83%. Les spectres RMN ¹H et infrarouge ne présentent plus les signaux hydroxyles du précurseur et la ccm révèle bien la formation d'un nouveau composé (l'azoture) moins polaire que l'alcool de départ.

L'hydrogénation catalytique (H₂/Pd/C) de l'azoture **61** dans le MeOH nous a conduit à l'amine **62** dans un rendement de 98%⁵². Celle-ci est isolée par une filtration sur un coussin de celite[®] et n'est pas purifiée davantage. Le spectre RMN ¹H de l'amine **62** montre un multiplet à 2,71 ppm intégrant pour deux protons associés à la présence d'un groupement NH₂. La ccm révèle la formation d'un nouveau produit très polaire qui ne migre pas du tout et qui est fortement coloré rouge brun par la ninhydrine, ce qui ne laisse aucun doute sur la présence d'une fonction amine (NH₂).

Quant à l'autre portion de l'alcool **60**, que nous avons mise de côté, elle est utilisée pour préparer l'aldéhyde **63** à l'aide des conditions modifiées d'oxydation de Swern⁵³. La réaction est suivie sur ccm et la disparition de l'alcool **60** de départ de même que l'apparition d'un nouveau produit moins polaire, l'aldéhyde **63**, peuvent être observées vu leur différence de Rf. Lorsque la réaction est complétée, l'aldéhyde **63** ne peut être purifié par chromatographie, étant donné que le phénylalaninal est connu pour épimériser sur gel de silice⁶¹⁻⁶². En contraste avec les dérivés d'acides carboxyliques (les esters, acides, amides, etc) qui possèdent un hétéroatome pour stabiliser l'oxygène électroattracteur, les aldéhydes (encore plus que les cétones) sont susceptibles à l'énolisation⁶¹⁻⁶². Ceci est particulièrement facilité en présence de silice alors que cette dernière sert de catalyseur à la tautomérisation⁶¹⁻⁶². Alors dès que l'aldéhyde **63** est obtenu sans autre purification, la prochaine étape est immédiatement effectuée, d'autant plus que les aldéhydes se dégradent lors de l'entreposage^{53,61,62}.

L'étape suivante consiste en un couplage amino-réductif de l'amine **62** sur l'aldéhyde **63**⁵⁴⁻⁵⁵. Les deux produits sont mélangés et agités dans le MeOH à 0°C, en présence de tamis moléculaire, pour former un intermédiaire imine (-C=N-), qui sera réduit *in situ* par l'ajout de borohydrure de sodium (NaBH₄) dans le méthanol. À la fin de la réaction et suivant le conclusif habituel, une purification par chromatographie sur gel de silice est effectuée car le résidu brut de la réaction contient plusieurs impuretés telles

qu'observées par ccm. Celle-ci est importante puisqu'il n'y a pas eu de purification pour les réactions précédentes et que des produits secondaires se sont accumulés, entre autres durant la réaction d'oxydation de Swern et de réduction lors du couplage amino-réductif. Même si le composé est une amine, la migration sur silice est aisée car il s'agit d'une amine secondaire substituée par deux groupements peu polaires, de telle sorte qu'un Rf de 0,22 est obtenu dans un mélange 50% AcOEt/Hexanes. Le composé triaminé **64**, avec deux groupements Boc protégeant les deux extrémités N-terminales, est donc obtenu avec un rendement variant entre 40 et 60 % suivant les essais effectués. Le spectre RMN ^1H du composé triaminé **64** montre la présence de l'amine centrale (NH) par un multiplet à 1,65 ppm et l'assignation des signaux en RMN ^1H et ^{13}C a été faite à l'aide d'expériences à deux dimensions COSY (^1H - ^1H) et HMQC (^1H - ^{13}C) lesquelles sont conformes à la structure attendue. Sur le spectre infrarouge, on remarque à 3366 cm^{-1} une bande associée à l'amine (amine centrale) et la présence d'une bande à 1684 cm^{-1} indique aussi la présence de liaisons carbonylées (C=O) de type carbamate pour les groupements protecteurs Boc.

5.2.2 Protection de l'amine centrale du composé **64**

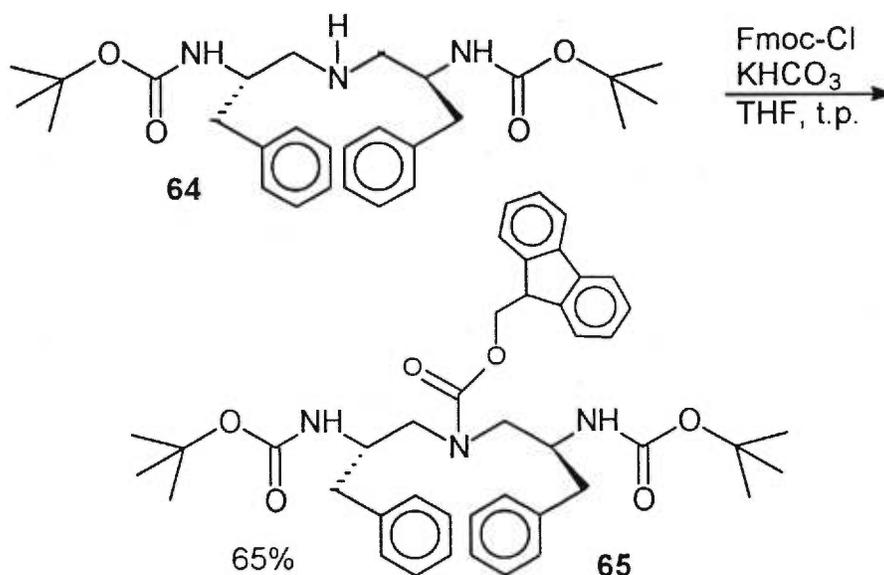
L'amine **64**, avec deux groupements Boc protégeant les deux extrémités N-terminales, est un intermédiaire clé qui est la base d'une série de dérivés obtenus en substituant les amines des extrémités par différents

groupements après libération du groupement protecteur Boc. Ces dérivés du composé **64** seront donc préparés afin d'étudier leur activité inhibitrice envers la protéase du VIH-1 en fonction des différents substituants introduits sur les positions N-terminales. Pour cela, nous devons d'abord protéger l'amine centrale avant de libérer les amines en positions terminales afin d'éviter les problèmes de sélectivité. L'objectif étant d'avoir une amine libre centrale comme fonction isostère en analogie aux inhibiteurs hydroxyéthylènes, il faut donc prévenir toute réaction à ce niveau. Nous avons donc choisi d'utiliser un groupement protecteur qui pourrait résister aux conditions acides employées lors de la déprotection du groupement Boc et qui pourrait être aussi facilement libéré à la dernière étape de synthèse. Notre choix s'est arrêté sur le fluorénylméthoxy-carbonyle (Fmoc), un groupement protecteur qui a la caractéristique d'être clivé en milieu basique (schéma 8)²².

L'addition du chlorure de fluorénylméthoxy-carbonyle sur l'amine **64** est faite en présence du KHCO_3 pour neutraliser le HCl libéré et aussi pour conserver le caractère nucléophile de l'amine centrale tout au long de la réaction. Celle-ci se déroule dans le THF à la température ambiante et le tricarbamate **65** a ainsi été obtenu dans un rendement de 65%. Son spectre RMN ^1H montre des signaux aromatiques additionnels dans la région de 6,8 à 8,0 ppm dus au Fmoc. Aussi, la présence d'un multiplet entre 4,21 et 4,32 ppm (en ^1H) intégrant pour trois protons et en corrélation par HMQC avec les

signaux à 46,70 et 66,72 ppm (en ^{13}C) ppm, est associées aux méthylène et méthine aliphatiques du Fmoc.

Schéma 8: Introduction du groupement Fmoc sur l'amine 64



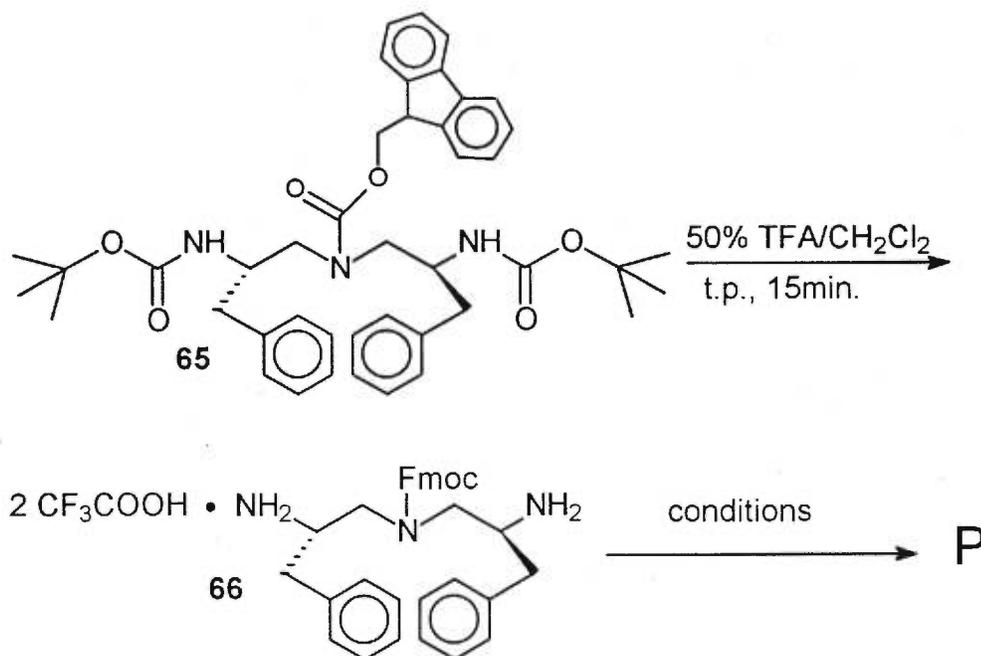
Fait à noter sur les spectres RMN (^1H et ^{13}C) de **65** enregistrés dans le DMSO-d_6 , nous avons observé que les signaux du squelette triaminé sont tous doublés; ce qui laisse croire que l'introduction du Fmoc rend la molécule asymétrique par rapport à l'axe de l'amine centrale. Une explication probable serait que la grande taille du groupement Fmoc provoque un encombrement stérique important avec les deux groupements phényles ou *tert*-butyles, empêchant dans un premier temps la rotation libre de chacun des groupements de part et d'autre de l'amine. Ensuite cette conformation relativement figée, du moins en temps de RMN, oriente le groupement Fmoc de façon à ce que ce dernier influence différemment les

deux chaînes aliphatiques de chaque côté de l'azote central. Les protons et les carbones de part et d'autre de la molécule n'ont donc plus tout à fait le même environnement chimique, provoquant ainsi des signaux différents sur les spectres RMN ^1H et ^{13}C . D'autre part, la rotation d'un lien carbamate est lente en temps de RMN et la présence du Fmoc sur l'amine centrale peut donner lieu à l'apparition de rotamères ce qui pourrait aussi expliquer le dédoublement des signaux. Il est à noter que les spectres RMN ne semblent pas indiquer une liaison hydrogène entre le carbonyle du Fmoc et le proton d'un N-H terminal. Le déplacement chimique de ce dernier reste dans la même région avec ou sans le groupement Fmoc (dans le DMSO- d_6).

5.2.3 Synthèse d'analogues du tricarbamate 65

C'est à partir du tricarbamate **65** que les autres analogues ont été préparés par l'introduction de divers substituants sur ses extrémités aminées tel que schématisé dans la schéma 9. Les composés finaux qui seront évalués comme inhibiteurs potentiels sur la protéase du VIH-1 sont obtenus après avoir enlevé le groupement protecteur Fmoc.

Schéma 9: Synthèse des analogues Fmoc-triaminés



Les extrémités aminées protégées de **65** sont libérées du groupement Boc à l'aide d'une solution de 50% d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. Ensuite, les conditions de réaction utilisées pour introduire les divers substituants sur les amines libres de **66** permettent d'obtenir les analogues désirés (**P**) et ceci est résumé aux tableaux 4 et 5.

Tableau 4: Synthèse des intermédiaires Fmoc

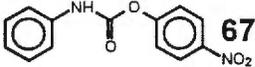
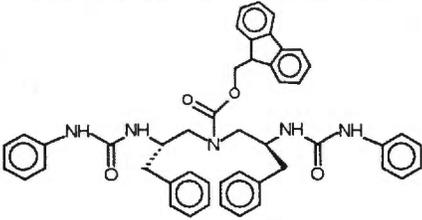
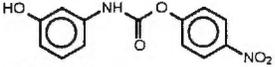
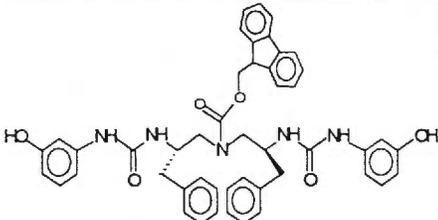
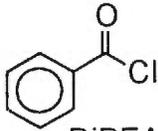
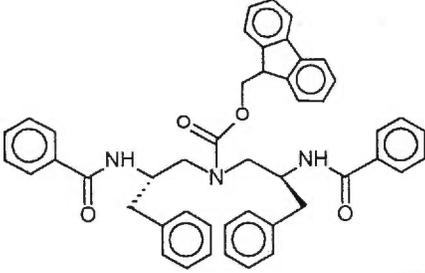
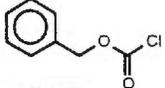
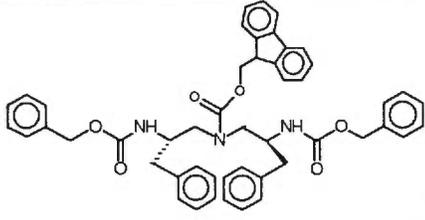
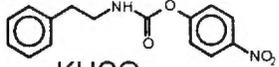
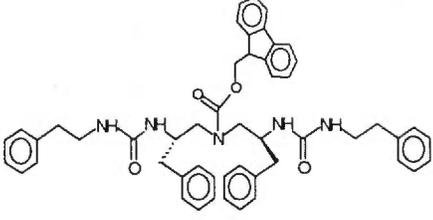
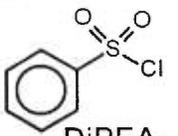
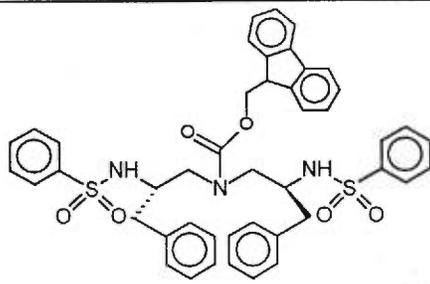
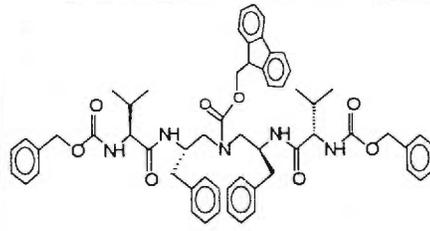
Conditions réaction	Produits formés (P)	rendement %
 67 KHCO ₃ DMF, t.p. 4 h	 68	66
 69 KHCO ₃ DMF, t.p. 4 h	 70	44
 71 DiPEA THF, t.p.	 72	60
 73 DiPEA THF, t.p.	 74	66
 75 KHCO ₃ DMF, t.p. 4 h	 76	63

Tableau 5: Synthèse des intermédiaires Fmoc (suite)

Conditions réaction	Produits formés (P)	rendement %
 77 DiPEA THF, t.p.	 78	46
CbzVal-OH 79 EDC, HOBT KHCO ₃ DMF, t.p. 4 h	 80	89

Pour tous les composés des tableaux 4 et 5, l'assignation des signaux observés sur les spectres RMN ¹H et ¹³C a été faite à partir des expériences à deux dimensions COSY et HMQC et tous ont montré des caractéristiques spectroscopiques en accord avec leurs structures. Tout comme dans le cas du tricarbamate **65**, la présence du Fmoc dans ces analogues rend asymétrique leur structure tridimensionnelle de part et d'autre de l'amine. Il arrive aussi dans certains cas qu'il existe un équilibre entre diverses conformations en solution et on observe alors un

dédoublément des signaux sur les spectres RMN ^1H et ^{13}C pour chacun des deux résidus de la phénylalanine. C'est pour cette raison que les spectres sont beaucoup plus complexes ou qu'ils s'expriment sous forme de multiplets mal résolus.

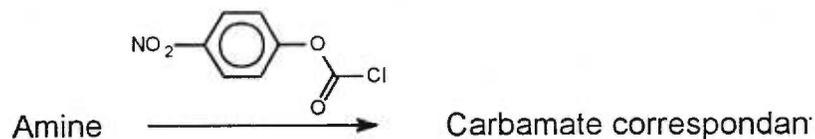
Les composés **68** et **70** contiennent deux groupements phénylurées. Les protons $\text{NH}_{\text{urée}}$ se retrouvent dans la région aromatique sur les spectres de RMN ^1H , au-delà de 7,5 ppm. Même si seulement deux protons parmi les quatre NH-urées peuvent être identifiés par expériences COSY, l'intégration de cette région est concordante avec la présence des deux autres. Des signaux caractéristiques aux liaisons carbonyles introduites sont aussi observables sur les spectres RMN ^{13}C à plus de 155 ppm.

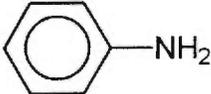
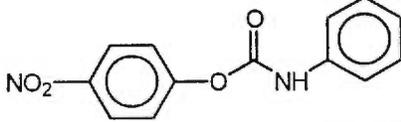
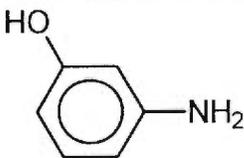
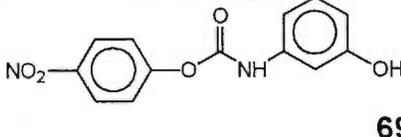
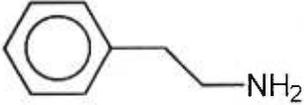
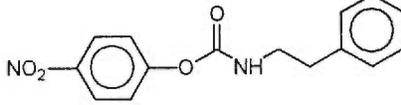
Le composé **76**, qui a été préparé à l'aide du même genre de réactif que les produits **68** et **70** comprend aussi une fonction urée. Cependant celle-ci est exprimée par un multiplet à environ 5,7 ppm (RMN ^1H), soit dans un champ beaucoup plus élevé que ses homologues phénylurées (à plus de 7,5 ppm). Cela est sans doute explicable par la présence du groupement phényle lié sur l'azote des composés **68** et **70** et qui a pour effet de déblinder le proton urée de façon beaucoup plus importante que dans le cas de **76** où seulement une chaîne aliphatique se retrouve greffée directement sur l'urée. Sur les spectres RMN ^{13}C , on peut aussi remarquer la présence de signaux à plus de 155 ppm associés aux liaisons carbonyles (urées) semblables au produit précurseur **65**.

Pour synthétiser les produits **72**, **74** et **78**, des réactifs acylants (chlorures d'acides) ont été utilisés dans le THF pour obtenir des rendements respectifs de 60, 66 et 46%. Ces trois composés montrent tous une augmentation en signaux aromatiques sur leurs spectres RMN ^1H (6,9 à 7,8 ppm) et ^{13}C (120 à 145 ppm) comparativement au composé **65**.

Également, le spectre RMN ^1H de l'analogue **78** enregistré dans le DMSO- d_6 montre quatre signaux distincts pour les deux protons sulfonamides présents, et ce dans deux régions bien distinctes (deux par deux), soit à 7,75 et 7,81 ppm et à plus bas champ à 9,12 et 9,23 ppm. Cela semble indiquer la présence de deux conformations, l'une serait linéaire (7,75 et 7,81 ppm) et l'autre impliquerait une liaison d'hydrogène pour expliquer le déplacement chimique à plus bas champ (9,12 et 9,23 ppm). Le DMSO- d_6 est reconnu pour ses propriétés à briser des liaisons hydrogène intermoléculaires. Il est donc possible que ces liaisons soient formées par un repliement sur elle-même de la molécule de façon à se lier intramoléculairement. Il sera intéressant de voir si le produit résultant du clivage du groupement Fmoc (**86**) possèdera des protons NH aussi déblindés.

Pour synthétiser les composés **68**, **70** et **76**, les substituants acylants requis **67**, **69** et **75** (tableaux 4 et 5) ont dû être préalablement préparés en faisant réagir les amines correspondantes avec le *p*-nitrophénoxychloroformate (tableau 6)⁵⁶.

Tableau 6: Synthèse des réactifs *p*-nitrophénoxy-carbamates

Structure de l'amine	Structure du carbamate	Rendement (%)
 Aniline	 67	81
 m-aminophénol	 69	56
 Phénéthylamine	 75	83

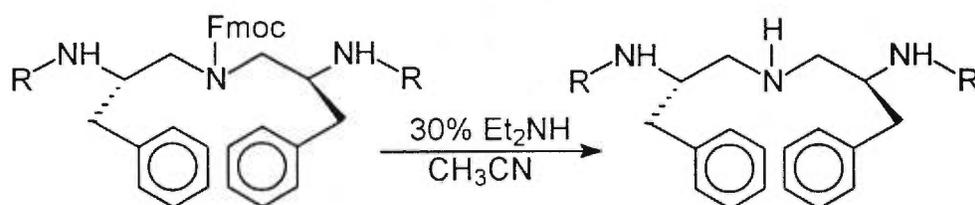
Il est intéressant de remarquer que les rendements de l'acylation des amines avec le chloroformate de *p*-nitrophénoxyde sont affectés par la présence d'un groupement phénolique. Ainsi le composé **69** n'a été obtenu qu'avec un rendement de 56% comparativement à l'obtention des deux autres dérivés **67** et **75** avec des rendements supérieurs à 80%. Les spectres RMN ^{13}C des dérivés **67**, **69** et **75** montrent tous un signal caractéristique d'une fonction carbonylée à plus de 155 ppm. Tandis que la présence des phényles s'exprime par un patron conforme aux structures proposées sur leurs spectres RMN ^1H et ^{13}C . Notons entre autres les deux

doublets caractéristiques au cycle *p*-nitrophénoxy qui sont facilement identifiables en RMN ^1H .

5.2.4 Déprotection du groupement Fmoc des analogues N-protégés

Les mêmes conditions de réaction ont été utilisées dans tous les cas afin de déprotéger l'amine centrale des analogues Fmoc, tel qu'indiqué dans le tableau 7 avec leurs rendements respectifs²².

Tableau 7: Rendements de déprotection du groupement Fmoc



No.	Produits formés (-R)	Rend. %	No.	Produits formés (-R)	Rend. %
81		68	82		40
83		86	84		82
85		80	86		69
87		65			

Le groupement protecteur Fmoc est couramment utilisé pour la synthèse peptidique en phase solide. Ce dernier est alors généralement enlevé après chaque couplage en utilisant la pipéridine. Dans cette situation, le réactif est aisément éliminé par une simple filtration, ce qui n'est pas applicable dans notre cas. D'autre part, le point d'ébullition de la pipéridine, à 105°C, rend difficile son évaporation, c'est pourquoi nous avons plutôt choisi d'employer la diéthylamine. La diéthylamine s'est avérée très efficace pour effectuer la déprotection du Fmoc en solution puisqu'elle possède une réactivité semblable à la pipéridine et qu'elle peut être facilement enlevée du milieu réactionnel par évaporation sous vide avec un point d'ébullition de 55°C²². Le mécanisme de clivage du Fmoc sera discuté plus en détails à la section 5.3.3.

Une solution de 30% en diéthylamine dans l'acétonitrile a été utilisée pour faire la déprotection de ces analogues. Ceux-ci ont été isolés après recristallisation dans des rendements variant de 40 à 86%. L'assignation des signaux observés sur les spectres RMN ¹H et ¹³C, a été faite à l'aide d'expériences à deux dimensions COSY et HMQC et tous possèdent les caractéristiques spectroscopiques en accord avec leurs structures. De façon générale, ces produits finaux lorsque comparés à leurs homologues Fmoc précurseurs, n'expriment plus les signaux caractéristiques au groupement protecteur. Les spectres de RMN ¹H et ¹³C de ces analogues en plus d'être simplifiés en nombre de signaux ne

montrent plus de dédoublement. L'encombrement stérique ou l'anisotropie engendrés par la présence du Fmoc ne pouvant plus se manifester, les deux substituants de chaque côté de l'amine centrale montrent un environnement chimique identique. L'amine centrale est également exprimée en RMN ^1H par un multiplet entre 1,6 et 1,9 ppm et intégrant pour un seul proton.

Il existe une exception avec l'analogue **86** qui montre sur le spectre RMN ^1H , comme son précurseur protégé **78**, deux signaux différents pour chacun des protons sulfonamides, *i.e.* un à environ 7,25 ppm et un autre à plus bas champ soit à 9,06 ppm. Aussi on remarque un dédoublement de tous les signaux RMN, ce qui nous laisse croire encore à la présence d'une conformation repliée sur elle-même impliquant une liaison hydrogène intramoléculaire.

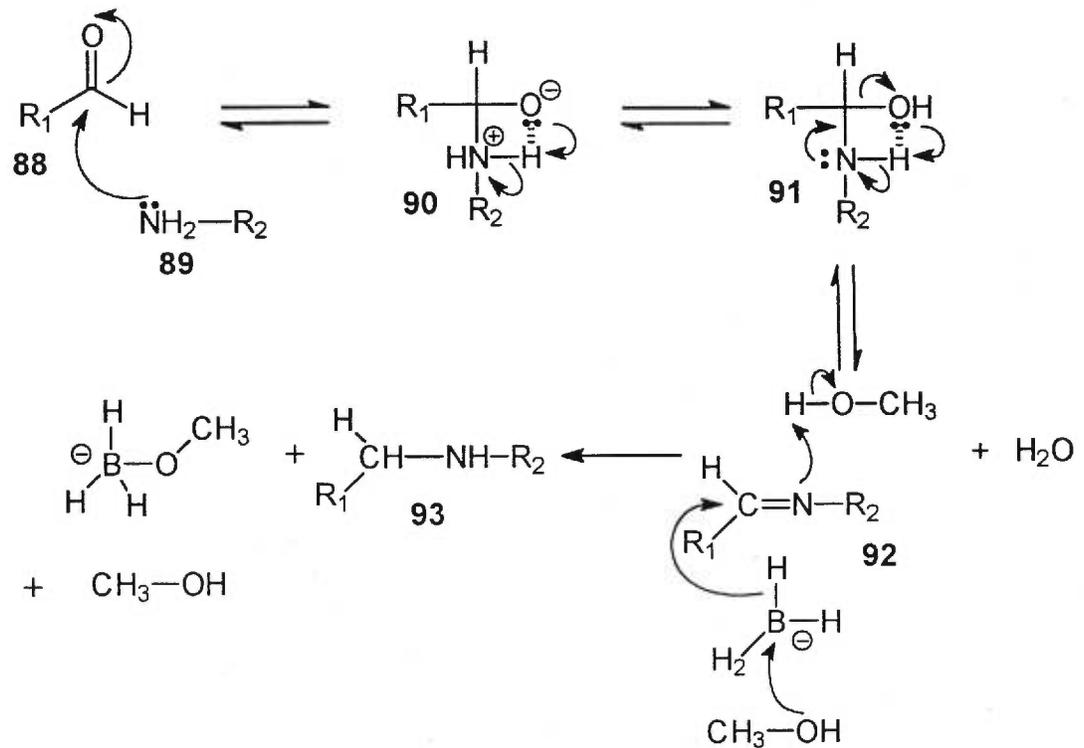
5.3 Mécanismes de réactions

5.3.1 Amination réductive

Le mécanisme de réaction d'amination réductive est bien documenté dans la littérature⁵⁷⁻⁵⁹ et nous l'avons présenté au schéma 10 étant donné que c'est une réaction clé dans la synthèse de nos produits.

Dans le mécanisme proposé le groupement carbonyle de l'aldéhyde **88** subit dans un premier temps une attaque nucléophile par l'amine **89** pour donner l'intermédiaire tétraédrique **90**, lequel après transfert de proton et l'élimination d'une molécule d'eau conduit à l'imine **92**. Par la suite, le borohydrure de sodium effectue la réduction par une addition nucléophile d'hydrure pour donner l'amine désirée **93**. Il est à noter que les étapes qui précèdent la réduction sont en fait des équilibres entre les différents intermédiaires et résultent en un déplacement vers la production d'imine aidé par la présence de tamis moléculaire dans le milieu qui piège l'eau produite au cours de la réaction.

Schéma 10: Mécanisme d'amination réductive

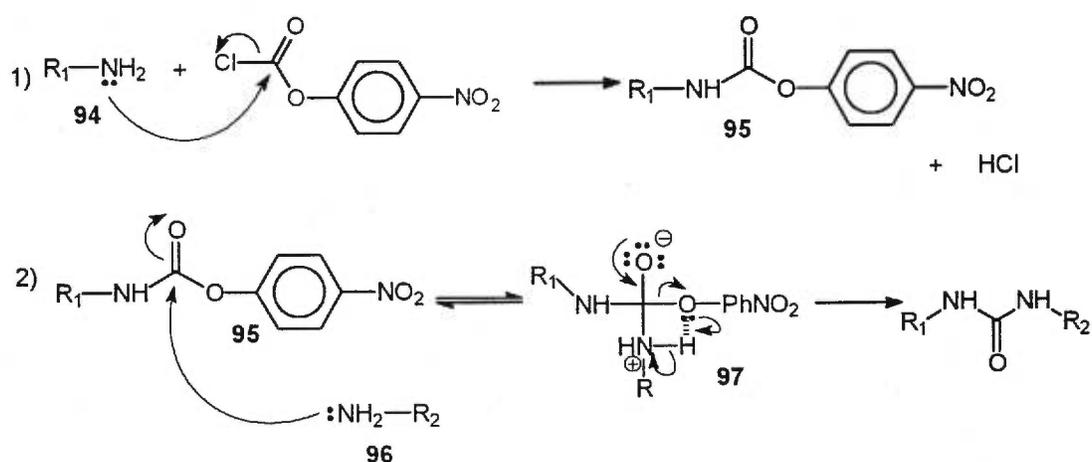


5.3.2 Mécanisme de formation de la fonction urée

Les fonctions urées sont introduites sur les analogues à partir de réactifs synthétisés (voir schéma 11). En effet, les différentes amines **94** réagissent par une attaque nucléophile sur le chloroformate de *p*-nitrophénoxyde pour conduire à une série de carbamates réactifs **95**. La formation des urées est réalisée à partir du carbamate correspondant **95**, qui subit une attaque nucléophile de l'amine **96** pour conduire à l'intermédiaire

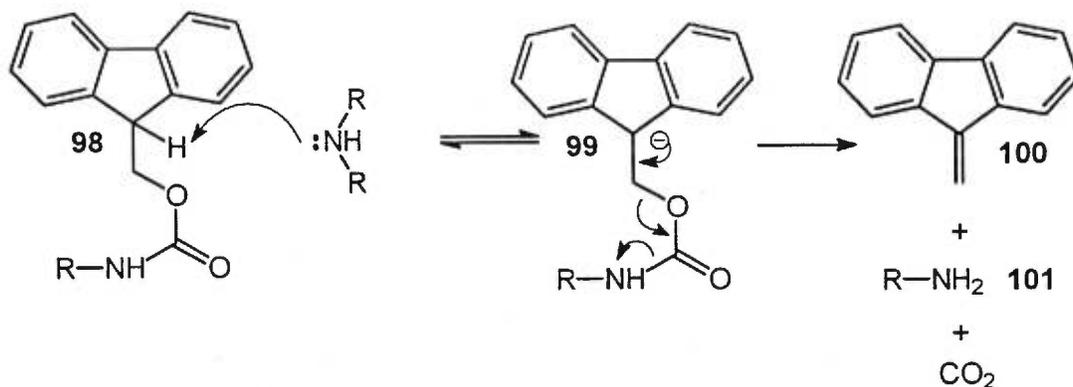
tétraédrique **97**. Il s'agit d'une réaction réversible mais le groupement le plus apte à agir comme groupement partant est le *p*-nitrophénoxyde permettant ainsi de former les fonctions urées.

Schéma 11: Mécanisme de formation d'une fonction urée



5.3.3 Mécanisme de clivage du fluorénylméthoxy-carbonyl (Fmoc)

La dernière étape de synthèse de nos composés triaminés consistait à libérer l'amine centrale du groupement protecteur Fmoc par un traitement basique²²(schéma 12).

Schéma 12: Mécanisme de clivage du Fmoc

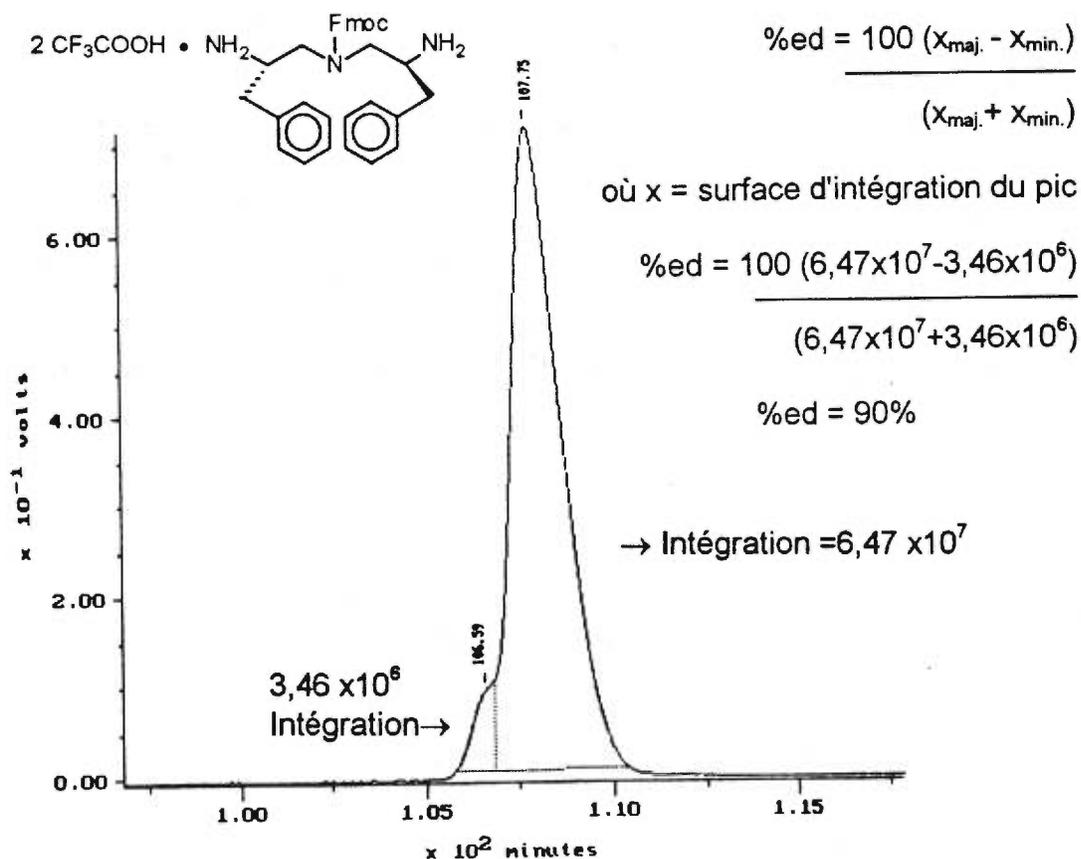
Le mécanisme de déprotection consiste à arracher d'abord le proton acide du Fmoc du composé **98** par une base pour conduire à un équilibre avec la forme carbanion **99**. Rapidement, l'intermédiaire carbanion se décomposera en libérant l'amine **101** et produira du CO₂ ainsi que du fulvène (**100**) comme produits secondaires de réaction²⁴.

5.4 Pureté diastéréoisomérique de notre synthon chiral **66**

Afin de vérifier que la synthèse de nos composés ne comportait pas d'étapes conduisant à des mélanges d'épimères, nous avons évalué la pureté diastéréoisomérique de notre synthon central à partir de l'intermédiaire triaminé **66**, parce que l'aldéhyde aminé **63** utilisé pour la réaction d'amination réductive, est reconnu pour être sensible à

l'épimérisation⁶¹⁻⁶³. Nous avons donc déterminé le pourcentage d'excès diastéréoisomérique (%ed) du triamine **66** par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) sur une phase stationnaire inverse et en suivant les conditions de séparation précisées à la section 6.2.4⁶⁰. Dans l'éventualité où il y aurait eu de l'épimérisation, nous n'obtiendrions que deux diastéréoisomères, ce qui permet d'anticiper une séparation sur une colonne standard sans être obligé d'utiliser une colonne chirale dispendieuse. Une fois la séparation effectuée, le calcul du %ed est fait à partir des valeurs d'intégration de la surface de chaque pic (fig. 24).

Figure 24: Chromatogramme (HPLC) de **66** et calcul du %ed



Plusieurs essais ont été effectués dans le but de séparer ces deux diastéréoisomères (différents types de colonnes, d'éluants, de gradients...). Ici, nous avons représenté la meilleure séparation, celle-ci n'est pas parfaite mais elle nous permet tout de même d'évaluer un %ed de 90%, ce qui est très bien. Les chromatogrammes de l'autre diastéréoisomère et du mélange des deux diastéréoisomères sont représentés en annexe 3. On peut donc affirmer que dans une certaine mesure, le centre chiral de la phénylalanine est préservé au cours des réactions dans les conditions utilisées.

5.5 Enzymologie de nos composés sur la protéase du VIH-1

Le test d'inhibition de la protéase qui a été utilisé pour évaluer l'efficacité de nos produits est décrit en annexe 2⁶⁴.

Ce test de cinétique enzymatique a permis d'évaluer le potentiel d'inhibition de nos produits sur la protéase du VIH-1, soit la constante d'inhibition (K_i). De la même façon que la constante d' IC_{50} , plus la valeur de K_i sera petite, moins grande sera la concentration du composé nécessaire pour inhiber l'activité de la protéase, et plus efficace sera l'inhibiteur (tableaux 8 et 9).

Tableau 8: Résultats d'inhibition de dérivés carbamates, urées et amides sur la protéase du VIH-1

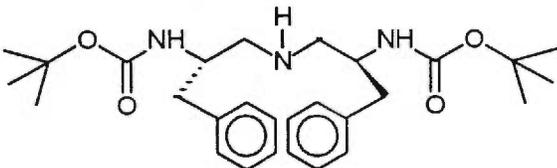
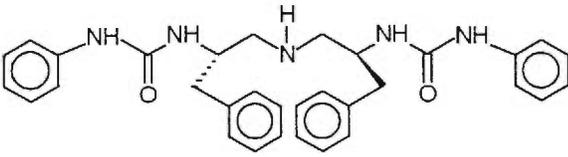
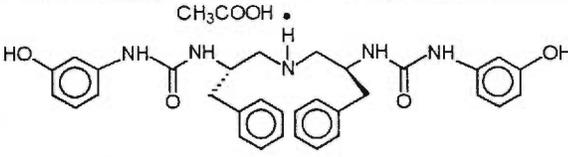
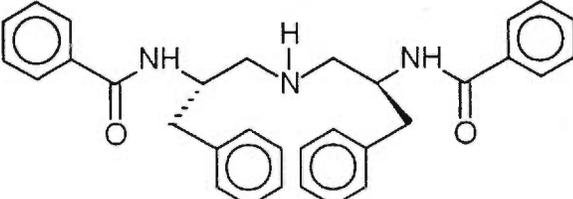
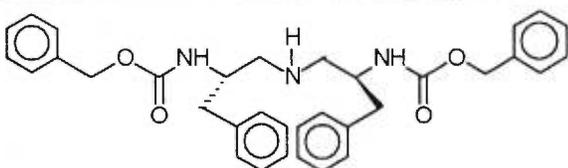
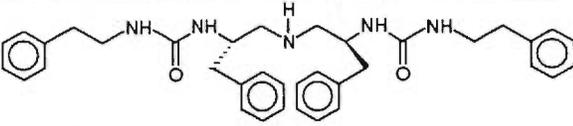
Numéro	Structure du composé	K_i (μM)
64		1,20
81		50,0
82		59,8
83		2,16
84		57,2
85		41,7

Tableau 9: Résultats d'inhibition de dérivés sulfonamide et CbzVal sur la protéase du VIH-1

Numéro	Structure du composé	K_i (μM)
86		>100
87		6,40

Les constantes d'inhibition des composés triaminés **64**, **81-85** et **87** des tableaux 8 et 9 varient entre 1,2 et 59,8 μM et aucune activité inhibitrice n'a été observée pour le composé disulfonamide **86** jusqu'à une concentration de 100 μM . De façon générale, nous pouvons dire que tous ces composés ne possèdent qu'une valeur modeste de K_i soit de l'ordre du micromolaire (μM), comparativement à d'autres types d'inhibiteurs rapportés dans la littérature dont plusieurs ont des K_i de l'ordre du nanomolaire (nM). Cependant, les inhibiteurs de la littérature ont été obtenus après un travail de plus longue haleine qui a permis de préparer de nombreux (plusieurs dizaines) composés pour finalement en obtenir quelques-uns avec une très haute activité. Tandis que nous n'avons préparé jusqu'à maintenant que huit composés de cette famille et que ce nombre restreint indique que nous en

sommes qu'à l'étape exploratoire. Mais comme ces aminodiméthylènes représentent une nouvelle famille d'inhibiteurs potentiels de la protéase du VIH-1, le composé **64** avec un K_i de 1,20 μM est relativement actif. Ce dernier peut être considéré comme une molécule prototype d'intérêt, justifiant la poursuite de façon plus approfondie des recherches dans cette direction. Donc nos composés ne doivent pas être considérés comme des composés finaux mais plutôt comme des composés à être élaborés et qui devront être modifiés pour obtenir des inhibiteurs très actifs.

Le composé **64** est le meilleur inhibiteur de la protéase dans cette série, avec un $K_i = 1,20 \mu\text{M}$. Ce résultat est très intéressant puisque les groupements *tert*-butyles aux positions N-terminales ne sont pas nécessairement les meilleurs groupements pour occuper efficacement les sous-sites hydrophobes S_2/S_2' du site actif de la protéase, mais ce composé montre tout même une bonne activité. Il nous restait donc à introduire différents groupements hydrophobes capables d'occuper les mêmes sous-sites du centre actif mais avec plus d'efficacité.

Pour ce faire, nous avons préparé le composé **87** (tableau 9) qui comprend les résidus CbzVal- en positions N-terminales, comme dans le cas de l'inhibiteur connu **51**. Nous voulions introduire sur notre molécule des substituants déjà bien connus pour permettre des interactions favorables avec la protéase afin de vérifier l'effet de ceux-ci sur l'activité anti-protéase du VIH. Malheureusement, l'activité de l'analogue Cbz-Val **87** ($K_i = 6,40 \mu\text{M}$) est beaucoup moins élevée que celle du composé connu **51** (0,22 nM), un

résultat plutôt décevant. L'analogue Cbz-Val **87** est même 5 fois moins actif que l'analogue Boc **64** ($K_i = 1,20 \mu\text{M}$), ce qui ne représente pas la même tendance d'activité retrouvée chez des inhibiteurs connus, en particulier ceux ayant une fonction isostère hydroxéthylène avec les mêmes substituants. À ce moment-ci des analogues triaminés comportant d'autres substituants ont donc été préparés dans le but d'optimiser les interactions avec le site actif de la protéase et ainsi augmenter l'activité de nos composés.

Parmi les cinq autres analogues N-arylacylés **81-87** préparés, l'analogue benzoylé **83** ($K_i = 2,16 \mu\text{M}$) c'est avéré le plus actif. Ce dernier représente un intéressant point de départ pour préparer une grande famille d'analogues par l'introduction d'une variété de groupements benzoylés substitués (grand nombre de réactifs disponibles commercialement). Le groupement benzoylé est très facile à introduire aux extrémités N-terminales de notre précurseur triaminé. Dans une étude future, il serait donc intéressant de voir l'effet qu'auraient divers groupements benzoylés substitués sur le potentiel d'inhibition de la protéase du VIH-1.

D'autres analogues triaminés du tableau 8, les composés **81**, **82** et **85**, possèdent une fonction urée sur leurs extrémités N-terminales et leurs potentiels d'inhibition respectifs sont de $50 \mu\text{M}$, $59,8 \mu\text{M}$ et $41,7 \mu\text{M}$. Ces résultats qui sont parmi les moins bons de la série, nous poussent à croire que la fonction urée réduit les interactions favorables avec le site actif. La géométrie de la liaison urée oriente sûrement les groupements phényles

d'une manière non propice à former des interactions hydrophobes optimales avec les résidus des sous-sites de l'enzyme. En effet, le composé analogue, l'amide **83**, possède une activité inhibitrice plus de 23 fois plus élevée que l'analogue urée **81**.

L'analogue carbamate de benzyle **84** qui possède un K_i de 57,2 μM nous révèle que le groupement benzyloxycarbonyle (Cbz), sur les extrémités N-terminales de notre squelette triaminé, ne favorise pas l'établissement de bonnes interactions avec l'enzyme par rapport à son homologue carbamate de *tert*-butyle **64** ($K_i = 1,2 \mu\text{M}$) ou à son homologue phényl amide **83** ($K_i = 57,2 \mu\text{M}$).

Il est à noter que l'analogue phényl sulfonamide **86** (tableau 9) est inactif jusqu'à une concentration de 100 μM . Pourtant celui-ci ne montre que peu de différence au niveau de sa composition avec l'analogue benzoylamide **83** ($K_i = 2,16 \mu\text{M}$), seul le groupement sulfonamide diffère du groupement amide. Ce changement conduit à un analogue sulfonamide qui n'a plus d'activité, indiquant ainsi que les groupements sulfonyles sur notre composé triaminé sont défavorables pour l'établissement d'interactions efficaces avec le site actif de la protéase du VIH-1. Il faut se rappeler que le spectre RMN ^1H de l'analogue phénylsulfonamide **86** montre les indications d'une liaison hydrogène intramoléculaire (voir section 5.2.4). Celle-ci impose au composé une certaine conformation qui semble défavorable à son association avec le site actif de la protéase du VIH-1.

Somme toute, la préparation de huit membres d'une nouvelle famille d'inhibiteurs avec une structure de base triaminée comprenant deux résidus phénylalanine, nous aura permis d'identifier, dans une étude exploratoire et préliminaire, deux composés **64** et **83** avec une activité appréciable de l'ordre du μM . Il s'agit de résultats suffisamment encourageants pour poursuivre éventuellement les travaux dans cette voie en vue de développer d'autres inhibiteurs de la protéase du VIH-1. Il serait en effet nécessaire de compléter les traitements présentement utilisés qui demandent à être améliorés soit au niveau de la résistance, de l'efficacité et de la toxicité.

Chapitre 6

Partie expérimentale

6.1 Instrumentation

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (^1H , à 500 MHz) et du carbone (^{13}C , 125 MHz) ont été enregistrés sur un appareil Bruker AMX2-500. Les autres expériences de RMN à deux dimensions telles COSY⁶⁵ par transfert de cohérence homonucléaire et HMQC⁶⁶ par corrélation inverse hétéronucléaire suivant la séquence BIRD à zéro ou double quanta, ont été effectuées sur le même appareil selon les paramètres d'acquisition décrits dans la littérature. Dans tous les cas, les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par millions (ppm). Les spectres ont été pris en solution dans divers solvants, et ceux-ci seront précisés pour chacun des produits. Lorsque le deutérochloroforme (CDCl_3) est utilisé, les déplacements chimiques sont rapportés selon une référence interne, soit le tétraméthylsilane (TMS, $\delta = 0,00$ ppm). Mais dans la plupart des cas, d'autres solvants deutériés ont été utilisés, tels l'acétone- d_6 et le DMSO- d_6 (diméthylsulfoxyde- d_6) et la calibration a alors été faite sur le signal du solvant. Les signaux sont ainsi référencés à 2,05 ppm en ^1H et 29,2 ppm en ^{13}C pour l'acétone- d_6 , et à 2,5 ppm en ^1H et 39,6 ppm en ^{13}C pour le DMSO- d_6 . Dans la description des spectres RMN, la valeur des constantes de couplage (J) sera donnée en Hertz (Hz). Les symbolismes suivants

seront utilisés pour exprimer la multiplicité des signaux: s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublet), t (triplet), q (quadruplet), quint (quintuplet), m (multiplet). L'ordre utilisé pour la notation de ces données RMN sera le suivant: déplacement chimique (multiplicité, constante de couplage, intégration, assignation).

Vous remarquerez aussi qu'une numérotation a été indiquée sur certaines structures de composés, celle-ci est tout à fait arbitraire et elle peut varier selon les composés. Cette numérotation n'a pour but que de faciliter et clarifier l'assignation des signaux.

Les points de fusion ont été déterminés dans des tubes capillaires non scellés sur un appareil Büchi 530 (avec bain d'huile sous agitation) et ne sont pas corrigés.

Les rotations optiques spécifiques ($[\alpha]_D^{25}$) sont déterminées à 25°C à partir d'un polarimètre digital Jasco DIP-370 en utilisant la raie D du sodium (589 nm). Elles sont mesurées en solution dans le méthanol ou le chloroforme (CHCl₃) et déterminées suivant l'équation suivante:

$$[\alpha]_D^{25} = \alpha \cdot 100 / c \quad \text{où} \quad \alpha = \text{valeur mesurée}$$

c=concentration (g/100mL)

Les spectres infrarouges (IR) sont enregistrés sur un appareil Bomem Michelson 100 et les échantillons sont analysés à partir d'une dispersion dans le KBr lorsqu'ils sont solides, ou à l'aide d'un film étendu entre 2 pastilles de NaCl lorsqu'ils se retrouvent sous forme d'huile.

Les spectres originaux (RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC, SM HR, IR) sont disponibles au laboratoire du professeur Gilles Sauvé de l'Institut Armand-Frappier à Laval.

6.2 Chromatographie

6.2.1 Chromatographie sur couche mince

La chromatographie analytique sur couche mince (ccm) a été réalisée sur plaques d'aluminium enduites de gel de silice (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) de 0,20 mm d'épaisseur et comprenant un indicateur de fluorescence. Elles ont servi à estimer la progression des réactions, vérifier la formation des différents produits et à donner une approximation de la pureté de certains produits. Elles ont aussi été essentielles pour optimiser les conditions d'élution pour les chromatographies flash, d'après les migrations relatives obtenues (R_f).

6.2.2 Chromatographie éclair

Toutes les purifications chromatographiques sur colonne sont effectuées selon la méthode décrite par Still et coll.⁶⁷ avec quelques modifications. Lorsque la ccm du produit à purifier montre une séparation difficile (à cause d'une faible différence de R_f entre les produits), le brut de la

réaction est adsorbé préalablement sur du gel de silice avant d'être introduit en tête de colonne pour faire la séparation, en général par gradient d'élution (*i.e.* en augmentant graduellement la polarité de l'éluant).

6.2.3 Les révélateurs

Les différents produits présents sur les ccm éluées sont détectés par l'utilisation de révélateurs:

1) La lumière ultraviolette (UV): les plaques de ccm utilisées sont enduites d'un produit fluorescent absorbant les radiations UV. Ceci permet donc de visualiser certains produits (absorbant l'UV) qui apparaissent violets sur un fond vert fluorescent.

2) La ninhydrine: un des révélateurs des plus intéressants, puisqu'il présente des colorations variées d'un composé à l'autre, et souvent aussi, selon la concentration du produit sur la plaque. La solution est préparée en faisant dissoudre 3 g de ninhydrine dans 970 mL d'éthanol 95% et 30 mL d'acide acétique et elle permet en général de visualiser des molécules comprenant un groupement nucléophile (principalement les amines). La technique consiste à tremper la plaque ccm dans la solution puis à la chauffer à l'aide d'un pistolet à air chaud (plus de 200°C).

3) Mélange acide cérique/molybdate d'ammonium: il permet d'observer la plupart des composés organiques, mais tous auront la même couleur. La solution est préparée en faisant dissoudre 20 g de molybdate

d'ammonium ($[\text{NH}_4]_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) et 8,3 g de sulfate de cérium (Ce^{+4}) hydraté ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2\cdot x\text{H}_2\text{O}$, 30% de Ce) dans 750 mL d'eau et 90 mL d'acide sulfurique concentré. La façon de révéler les composés est identique à celle employée pour la ninhydrine.

6.2.4 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Nous avons utilisé un chromatographe HPLC (Waters 510) afin de quantifier la racémisation du composé **66** dans la réaction d'amination réductive (section 5.2). La détection des pics est faite par un détecteur spectrophotomètre UV à 266 nm, de type Waters 490E. L'appareil est aussi muni d'un injecteur automatique WISP 712. Le contrôle du chromatographe et l'acquisition des données sont faits à l'aide du logiciel Baseline 810 (version 3.30). La séparation de ces deux diastéréoisomères se déroule en mode gradient (composition variable de l'éluant tout au long de la séparation) avec un mélange de départ de 40% (60% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ contenant 0,1% de TFA) et 60% (H_2O contenant 0,1% de TFA), jusqu'à un mélange final de 60% (60% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ contenant 0,1% de TFA) et 40% (H_2O contenant 0,1% de TFA). La colonne utilisée est une $\mu\text{Bondapak}$ avec des particules de 10 μm et mesurant 30 cm x 3.9 mm (P/N 27324) de Waters, de phase inverse- C_{18} . Le chromatogramme de cette séparation se retrouve à la section 5.4, figure 24. L'acétonitrile utilisée comme solvant est de grade HPLC et de l'eau nanopure a aussi été utilisée.

6.3 Purification des solvants

6.3.1 Les solvants usuels

Tous les solvants de qualité "reagent" utilisés pour les manipulations chromatographiques proviennent de la compagnie Anachemia et sont distillés afin de prévenir les sources de contamination. Les solvants utilisés pour les purifications par recristallisation sont de qualité "spectrograde".

6.3.2 Les solvants anhydres

Plusieurs réactions nécessitent des conditions anhydres et les solvants sont fraîchement distillés à partir de montages permanents munis d'un vigreux, et ce de la façon suivante: dans tous les cas, la distillation est effectuée sous une atmosphère d'argon sec avec des solvants de qualité spectrograde:

1) Le tétrahydrofurane (THF) est porté à reflux en présence de sodium et de benzophénone pendant quelques heures, il est distillé lorsque la coloration bleue intense du radical diphenylcétylsodium est persistante.

2) Le dichlorométhane (CH_2Cl_2) est porté à reflux sur de l'hydrure de calcium pendant quelques minutes et puis distillé.

3) Le diméthylformamide est porté à reflux sur de l'hydrure de calcium avant d'être distillé. Le solvant anhydre est ensuite conservé sous argon dans une bouteille brune en présence de tamis moléculaire.

6.4 Réactions effectuées sous conditions anhydres

Plusieurs des réactions décrites dans cette partie expérimentale nécessitent des conditions anhydres en raison de la sensibilité à l'humidité des produits, des réactifs, ou des intermédiaires réactionnels utilisés.

Ces réactions sont effectuées sous une atmosphère inerte, c'est-à-dire en faisant passer un léger courant d'argon sec dans le montage réactionnel (avec entrée et sortie). Les ballons réactionnels utilisés sont séchés *a priori* sous la flamme d'un bunsen puis refroidis sous un courant d'argon. Les aiguilles et les seringues ont été séchées dans l'étuve à 110°C et laissées refroidir dans un dessiccateur contenant de la drierite[®] sèche (chlorure de calcium) avant leur utilisation. Les solutions, solvants et réactifs sont introduits au moyen de seringues séchées, et le transfert de solution d'un ballon à un autre est réalisé à l'aide d'une aiguille double pointe avec pression d'argon.

6.5 Réactions et généralités

Dans la description des procédures expérimentales, les évaporations se déroulent sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif et d'un bain chauffant où la température est maintenue entre 30 et 40°C. Les fractions organiques recueillies après un conclusif sont séchées en y ajoutant du Na₂SO₄ anhydre pour retirer les traces d'eau et elles sont ensuite filtrées sur un coussin de Na₂SO₄ anhydre. Les chromatographies flash (section 6.2.2) sont faites sur le mélange brut isolé suite au conclusif, dont les solvants ont été évaporés. Les fractions recueillies sont analysées par ccm, et les fractions pures d'intérêt sont combinées dans un ballon pour être ensuite évaporées.

Les rendements de réaction sont calculés en tenant compte du réactif limitatif, et à partir des produits isolés après chromatographie flash ou après recristallisation selon le cas.

Les réactions effectuées à basses températures requièrent un bain de glace carbonique (CO₂ solide) dans l'acétone dont le niveau est supérieur à celui à l'intérieur du ballon. La plupart des produits chimiques utilisés proviennent de Aldrich Chemical Company Inc. et de Sigma Chemical Company. Les acides aminés proviennent de la compagnie Bachem Bioscience Inc.

Chapitre 7

Réactions chimiques

7.1 Procédures générales

7.1.1 Procédure générale A (couplage peptidique)

Cette procédure nous permet de faire la synthèse de plusieurs des composés décrits dans la section des inhibiteurs de l'intégrase (section 7.2), surtout lors de la formation du lien amide impliquant le dérivé de l'acide benzoïque avec la partie N-terminale d'un acide aminé.

Dans des conditions anhydres, le composé acide ($R-COOH$, 2,0 équiv) est dissous dans le DMF. On ajoute successivement 2,0 équiv de HOBt et 2,0 équiv de EDC. En parallèle, une solution de l'amine (acide aminé C-protégé) dans le DMF est préparée. On ajoute ainsi 1,05 équiv de triéthylamine au sel d'ammonium correspondant et après dix min cette solution est ajoutée sur l'acide activé. Lorsque le nucléophile (amine) est complètement ajouté, la réaction est poursuivie ainsi de 4 h à une nuit complète.

Conclusif: le mélange réactionnel est dilué dans cinq fois son volume de saumure. On extrait ensuite trois fois avec de l'acétate d'éthyle (AcOEt). Les phases organiques sont combinées, et elles sont lavées encore une fois avec la saumure si la molécule contient deux ou trois

groupements phénols, et une fois avec une solution saturée de bicarbonate de soude ($\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$) plus une autre fois avec la saumure si la molécule finale ne contient aucun ou un seul groupement phénol. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide pour être purifiée par chromatographie éclair tel que décrit dans chaque cas.

7.1.2 Procédure générale B (couplage peptidique)

Cette procédure nous permet de faire la synthèse de liaisons amides impliquant la dopamine et la fonction C-terminale d'un dérivé d'acide aminé, pour conduire aux inhibiteurs de l'intégrase.

Dans des conditions anhydres, le dérivé d'acide aminé (acide libre 1,0 équiv) est dissous dans le DMF. La solution est refroidie à 0°C , puis on ajoute successivement le HOBt (1,5 équiv) et le EDC (1,5 équiv). En parallèle, une solution de dopamine (2,0 équiv) dans le DMF est traitée avec la triéthylamine (2,0 équiv) pour quelques min. Cette solution est ensuite ajoutée goutte à goutte à l'acide activé (toujours à 0°C). Une fois l'addition complétée, on retire le bain de glace et laisse réagir ainsi de 4 h à une nuit complète.

Conclusif: le mélange réactionnel est dilué dans cinq fois son volume de saumure. On extrait ensuite trois fois avec de l'acétate d'éthyle (AcOEt). Les phases organiques sont combinées, et elles sont lavées encore une fois avec la saumure si la molécule contient deux ou trois

groupements phénols, alors qu'aucun autre lavage ne sera fait sur la phase organique si la molécule finale contient plus de trois groupements phénols (parce que les produits ont alors une solubilité appréciable dans l'eau). La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide pour être purifiée par chromatographie éclair tel que décrit dans chaque cas.

7.1.3 Procédure générale C (clivage acide de groupements protecteurs)

Cette procédure nous permet de faire l'hydrolyse de groupements protecteurs sensibles au milieu acide, comme le Boc ou les esters et les éthers *tert*-butyliques.

De façon générale, le composé contenant le groupement protecteur labile en milieu acide est solubilisé dans le dichlorométhane. L'acide trifluoroacétique (TFA) est ajouté pour obtenir une concentration de 50% TFA/ CH_2Cl_2 . La solution est agitée ainsi à la température ambiante pendant cinq à dix minutes en présence du groupement Boc, et de trois à quatre heures dans le cas des esters et éthers *tert*-butyliques. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé premièrement à l'aide d'un évaporateur rotatif, et par la suite sous vide mécanique. L'huile résultante est reprise dans le dichlorométhane et de l'hexane est ajouté. La solution est évaporée de la même façon que précédemment et le produit brut est utilisé tel quel pour la prochaine étape de synthèse.

7.1.4 Procédure générale D (hydrogénation catalytique)

Cette procédure nous permet de faire l'hydrogénolyse des esters benzyliques.

De façon générale, le composé contenant l'ester benzylique est solubilisé dans le méthanol (100%). À cette solution sous agitation est ajouté doucement 5% en poids de palladium sur charbon (Pd/C 10%). Un ballon gonflé d'hydrogène est ensuite installé de façon hermétique (à l'aide d'une aiguille au travers d'un *septum*) sur le contenant réactionnel. La progression de la réaction est suivie par ccm jusqu'à la disparition de l'ester de départ. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sous vide sur un coussin de celite^R lavé avec du méthanol, et le filtrat est évaporé sous vide. Le produit résultant est repris dans le dichlorométhane et est précipité par l'ajout d'hexane. Le composé résultant est utilisé tel quel pour la prochaine étape de synthèse.

7.1.5 Procédure générale E (formation de carbamates et urées)

Cette procédure nous permet de faire la synthèse de carbamates, des intermédiaires réactifs précurseurs à une série de dérivés urées. Ces *p*-nitrophénoxy-carbamates sont obtenus en faisant réagir des amines avec le réactif chloroformate de *p*-nitrophénoxyde.

Dans des conditions anhydres, l'amine (1,0 équiv) est dissous dans le THF. La solution est refroidie à 0°C, puis on ajoute successivement la triéthylamine (2,0 équiv) et le chloroformate de *p*-nitrophénoxyde (1,02 équiv). Une fois l'addition complétée, on retire le bain de glace et on laisse réagir à la température ambiante. La progression de la réaction est suivie par ccm jusqu'à la disparition de l'amine de départ; la réaction est en général assez rapide. Dans le cas où l'amine de départ est sous forme de sel d'acide, celui-ci sera traité *a priori* avec de la triéthylamine (1,0 équiv) avant d'appliquer la procédure.

Conclusif: au mélange réactionnel est ajouté trois fois son volume d'une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$. On extrait ensuite trois fois avec de l'acétate d'éthyle (AcOEt). Les phases organiques sont combinées, et elles sont lavées encore une fois avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ et une autre fois avec de la saumure. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide et le résidu purifié tel que décrit dans chaque cas.

7.1.6 Procédure générale F (déprotection du Fmoc)

Cette procédure nous permet de faire la déprotection du groupement fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc), pour conduire à nos inhibiteurs de la protéase.

Au produit contenant le groupement Fmoc, on ajoute une solution à 30% de diéthylamine (Et_2N) dans l'acétonitrile. La progression de la réaction est suivie par ccm jusqu'à disparition du produit de départ.

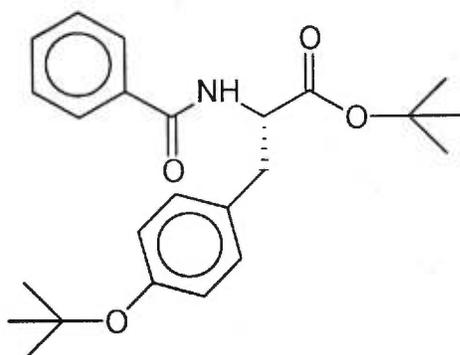
L'amine résultante est par la suite purifiée tel qu'indiqué dans chaque cas.

7.2 Descriptions des produits synthétisés

7.2.1 Inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1

Composé 18

N-(Benzoyl)-*O*-(*t*-butyl)-*L*-tyrosinoate de *t*-butyle



À 0°C et sous conditions anhydres sont ajoutés à une solution de 0,500 g de l'amine 12 dans le THF, 0,450 mL de triéthylamine (2,1 équiv) et 0,270 mL de chlorure de benzoyle (1,5 équiv). Une fois l'addition terminée,

le bain de glace est retiré et la réaction est poursuivie à la température ambiante pendant 30 min.

Conclusif: le mélange réactionnel est traité par trois fois son volume avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$. On extrait ensuite trois fois avec de l'acétate d'éthyle (AcOEt). Les phases organiques sont combinées, lavées encore une fois avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ et une autre fois avec de la saumure. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 .

L'amide **18** est purifiée par chromatographie éclair avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle dans l'hexanes (10%→20%) pour isoler 0,459 g sous forme d'huile dans un rendement de 76%.

R_f: 0,19 (10% AcOEt /hexanes)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -21,6° (c=2,73; CH_3OH)

IR: (KBr, $\nu=\text{cm}^{-1}$): 3227, 1638, 1520, 1446, 1361, 1254, 1184, 1150, 1105, 741

RMN: (CDCl_3)

^1H (500 MHz): 1,31(s, 9H, $-\text{CH}_3$); 1,42(s, 9H, $-\text{CH}_3$); 3,18(d, J=5,7, 2H, $-\text{CH}_2$); 4,92(m, 1H, $-\text{CH}$); 6,82(d, J=7,2, 1H, N-H); 6,90(d, J=7,8, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,09(m, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,37(d, J=7,8, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,45(m, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,73(m, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$).

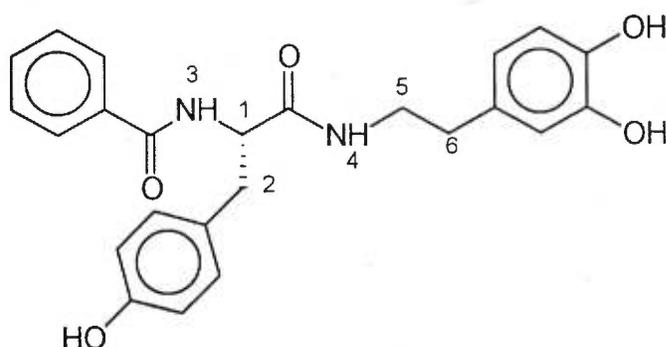
^{13}C (125 MHz): 27,82($-\text{CH}_3$, *t*-Bu); 28,67($-\text{CH}_3$, *t*-Bu); 37,27($\text{C}_{\text{p}}\text{H}_2$); 53,88($\text{C}_{\alpha}\text{H}$); 78,14($-\text{C}-$, *t*-Bu); 82,14($-\text{C}-$, *t*-Bu); 123,92($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 126,88(-

$C_{arom.}$); 128,35(- $C_{arom.}$); 129,86(- $C_{arom.}$); 131,01(- $C_{arom.}$); 133,42(- $C_{arom.}$);
134,00(- $C_{arom.}$); 154,18(- $C_{arom.}$); 166,53 (C=O); 170,75(C=O).

SM HR(EI: 70eV): m/e calculée pour $C_{24}H_{32}N_1O_4$: 398,2331 ; m/e trouvée
398,2341 (M^+).

Composé 21

N-[*N'*-(Benzoyl)-L-tyrosyl]-dopamine



La synthèse du composé **21** est effectuée en utilisant successivement les procédures générales C et B. À partir de 0,438 g du composé **18**, nous récupérons 0,404 g de l'inhibiteur **21**, soit un rendement de 87% après purification par chromatographie éclair (gradient d'élution acétate d'éthyle dans le dichlorométhane (30% → 50%), contenant 1% d'acide acétique).

R_f: 0,13 (1% AcOH/30% AcOEt/CH₂Cl₂)

[α]_D²⁵: -3,4⁰ (c=0,98, CH₃OH)

Point de fusion: 142 °C

IR: (KBr, $\nu=cm^{-1}$): 3227, 1638, 1520, 1361, 1254, 1184, 741

RMN: (Acétone-d₆)

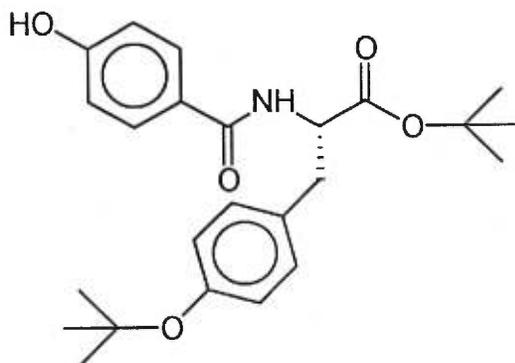
-¹H (500 MHz): 2,59(m, 2H, -CH₂ (6)); 3,01(m, 1H, -CH₂ (2)); 3,13(m, 1H, -CH₂ (2)); 4,44(m, 2H, -CH₂ (5)); 4,86(d, J=5,4, 1H, -CH (1)); 6,46(d, J=7,5, 1H, -CH_{arom.}); 6,71(m, 3H, -CH_{arom.}); 7,11(m, 2H, -CH_{arom.}); 7,32-7,50(m, 3H, -CH_{arom.}); 7,68-7,70(m, 2H, -NH (4) et -CH_{arom.}) 7,80 (d, J=7,5, 2H, -CH_{arom.}); 7,87(d, J=7,9, 1H, -CH_{arom.}); 8,00(t, J=8,4, 1H, -NH (3)); 7,5 à 8,7(s_(signal large), 3H, OH).

-¹³C (125 MHz): 34,92(-CH₂ (6)); 37,25(-CH₂ (2)); 41,34(-CH₂ (5)); 55,86(-CH (1)); 110,01(-C_{arom.}); 115,34(-C_{arom.}); 115,42(-C_{arom.}); 116,04(-C_{arom.}); 118,68(-C_{arom.}); 120,21(-C_{arom.}); 125,22(-C_{arom.}); 127,32(-C_{arom.}); 127,47(-C_{arom.}); 128,44(-C_{arom.}); 130,48(-C_{arom.}); 134,28(-C_{arom.}); 143,68(C-OH_{arom.}); 145,09(C-OH_{arom.}); 156,27(C-OH_{arom.}); 167,37(C=O); 172,06(C=O).

SM HR(EI: 70eV): m/e calculée pour C₂₄H₂₄N₂O₅: 420,1685 ; m/e trouvée 420,1689 (M⁺).

Composé 17

N-(4'-Hydroxybenzoyl)-*O*-(*t*-butyl)-*L*-tyrosinoate de *t*-butyle



La synthèse du composé **17** est réalisée en utilisant la procédure générale A. À partir de 0,455 g d'amine **12**, nous récupérons 0,291 g du composé **17**, soit un rendement de 51% après purification par chromatographie éclair (1% d'acide acétique/20% acétate d'éthyle/dichlorométhane).

R_f: 0,56 (1% AcOH/30% AcOEt/CH₂Cl₂)

[α]_D²⁵: -34,5⁰ (c=3,50, CH₃OH)

Point de fusion: 106°C

IR: (KBr, ν=cm⁻¹): 3275, 2978, 1723, 1634, 1610, 1541, 1503, 1448, 1367, 1251, 1163, 898, 846.

RMN: (CDCl₃)

-¹H (500 MHz): 1,31(s, 9H, -CH₃); 1,41(s, 9H, -CH₃); 3,18(d, J=5,6, 2H, -CH₂); 4,91(m, 1H, -CH); 6,68(d, J=7,3, N-H, 1H); 6,82(d, J=8,0, 2H, -CH_{arom.}); 6,92(d, J=8,3, 2H, -CH_{arom.}); 7,07(d, J=8,0, 2H, -CH_{arom.}); 7,56(d, J=8,3, 2H, -CH_{arom.}); 8,41(s_(signal large), 1H, OH).

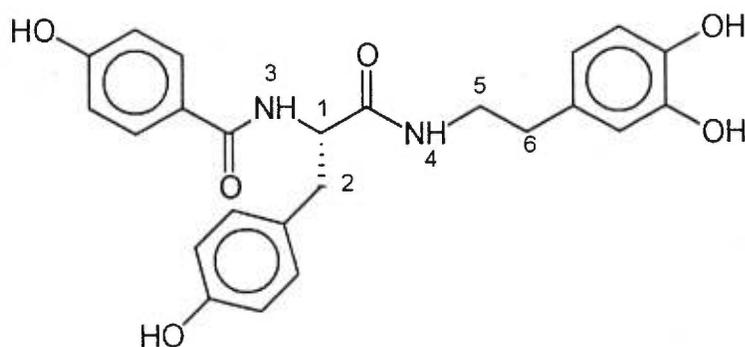
-¹³C (125 MHz): 28,00(-CH₃, *t*-Bu); 28,82(-CH₃, *t*-Bu); 37,48(C_βH₂); 54,12(C_αH); 78,75(-C-, *t*-Bu); 82,86(-C-, *t*-Bu); 115,65(-C_{arom.}); 124,25(-

$C_{\text{arom.}}$; 124,95($-C_{\text{arom.}}$); 129,02($-C_{\text{arom.}}$); 130,08($-C_{\text{arom.}}$); 131,08($-C_{\text{arom.}}$);
154,20($C\text{-OH}_{\text{arom.}}$); 160,35($C\text{-OH}_{\text{arom.}}$); 167,35($C=O$); 171,12($C=O$).

SM HR(Cl: NH_3): m/e calculée pour $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_1\text{O}_5$: 413,2200 ; m/e trouvée
414,2285 (MH^+).

Composé 20

N-[*N'*-(4'-Hydroxybenzoyl)-L-tyrosyl]-dopamine



La synthèse du composé **20** est réalisée en utilisant successivement les procédures générales C et B. À partir de 21,0 mg du composé **17**, nous récupérons 16,0 mg de l'inhibiteur **20**, soit un rendement de 53% après purification par chromatographie éclair (1% d'acide acétique dans l'acétate d'éthyle).

R_f: 0,41 (1% AcOH/AcOEt)

[α]_D²⁵: -29° (c=0.34, CH_3OH)

Point de fusion: 161 °C (déc.)

IR: (KBr, $\nu=\text{cm}^{-1}$): 3279, 1642, 1600, 1512, 1263, 1113, 786, 757, 702.

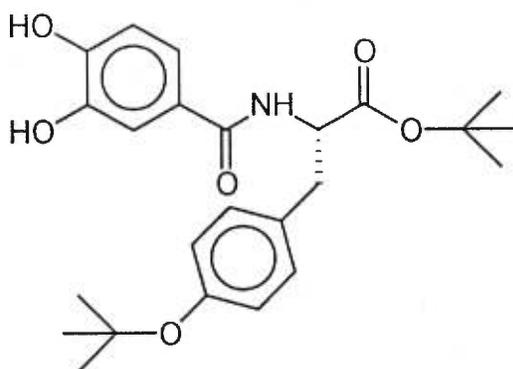
RMN: (Acétone- d_6)

^1H (500 MHz): 2,52-2,61(m, 2H, $-\text{CH}_2$ (6)); 2,95(dd, $J_{\text{gem}}=14,4$ $J_{\text{vic}}=8,2$, 1H, $-\text{CH}_2$ (2)); 3,10(dd, $J_{\text{gem}}=14,4$ $J_{\text{vic}}=5,2$, 1H, $-\text{CH}_2$ (2)); 3,27-3,37(m, 2H, $-\text{CH}_2$ (5)); 4,71-4,76(m, 1H, $-\text{CH}$ (1)); 6,47(d, $J=8,4$, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 6,63-6,70(m, 4H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 6,82(d, $J=6,9$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,07(m, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,38(d, $J=5,2$, 1H, $-\text{NH}$ (4)); 7,54(d, $J=8,0$, 1H, $-\text{NH}$ (3)); 7,69 (d, $J=7,7$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,4-7,9($S_{\text{signal large}}$, 2H, OH); 8,12($S_{\text{signal large}}$, 1H, OH); 8,91($S_{\text{signal large}}$, 1H, OH)

^{13}C (125 MHz): 35,03($-\text{CH}_2$ (6)); 37,32($-\text{CH}_2$ (2)); 41,26($-\text{CH}_2$ (5)); 55,64($-\text{CH}$ (1)); 115,16($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 115,34($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 116,14($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 120,28($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 125,82($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 128,83($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 129,52($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 130,54($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 131,23($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 143,75($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom.}}$); 145,12($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom.}}$); 156,27($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom.}}$); 160,64($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom.}}$); 166,67($\text{C}=\text{O}$); 171,70($\text{C}=\text{O}$).

Composé 16

N-(3',4'-Dihydroxybenzoyl)-*O*-(*t*-butyl)-*L*-tyrosinoate de *t*-butyle



La synthèse du composé **16** est effectuée suivant la procédure générale A. À partir de 0,500 g d'amine **12**, nous récupérons 0,511 g du

composé **16**, soit un rendement de 80% après purification par chromatographie éclair (gradient d'éluion de méthanol dans le dichlorométhane (10% → 25%).

R_f: 0,66 (10% MeOH/CHCl₃)

[α]_D²⁵: -26,7° (c=2,98; CH₃OH)

Point de fusion: 122 °C

IR: (KBr, ν=cm⁻¹): 3063, 2826, 1781, 1725, 1602, 1507, 1368, 1291, 1239, 1159, 894, 842, 756.

RMN: (Acétone-d₆)

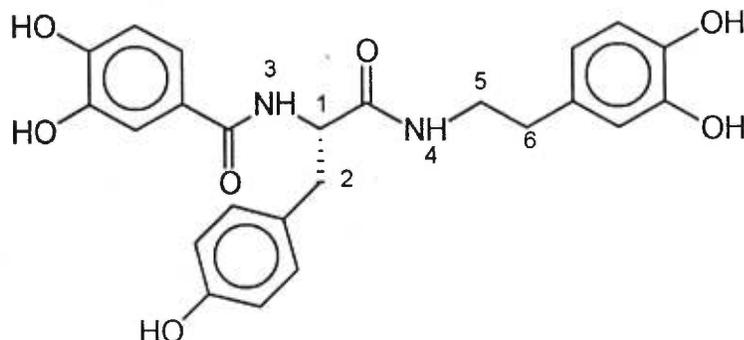
-¹H (500 MHz): 0,87(s, 9H, -CH₃); 0,88(s, 9H, -CH₃); 3,16(m, 2H, -CH₂); 4,78(q, J=7,5, 1H, -CH); 6,85(d, J=9,1, 1H, -CH_{arom.}); 6,89(d, J=8,5, 2H, -CH_{arom.}); 7,21(d, J=8,5, 2H, -CH_{arom.}); 7,29(d, J=9,1, 1H, -CH_{arom.}); 7,42(s, 1H, -CH_{arom.}); 7,49(d, J=7,5, 1H, -NH); 8,29(s_(signal large), 1H, OH); 8,50(s_(signal large), 1H, OH).

-¹³C (125 MHz): 27,47(-CH₃, *t*-Bu); 28,45(-CH₃, *t*-Bu); 37,08(C_βH₂); 55,00(C_αH); 77,77(-C-, *t*-Bu); 81,15(-C-, *t*-Bu); 114,93(-C_{arom.}); 119,81(-C_{arom.}); 123,98(-C_{arom.}); 126,28(-C_{arom.}); 129,14(-C_{arom.}); 132,32(-C_{arom.}); 144,99(-C_{arom.}); 148,68(-C_{arom.}); 152,92(C-OH_{arom.}); 154,51(C-OH_{arom.}); 166,85(C=O); 171,07(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₂₄H₃₁N₁O₆: 429,2149; m/e trouvée 430,2235 (MH⁺).

Composé 19

N-[*N'*-(3',4'-Dihydroxybenzoyl)-*L*-tyrosyl]-dopamine



La synthèse du composé **19** est effectuée en utilisant successivement les procédures générales C et B. À partir de 0,184 g du composé **16**, nous récupérons 0,128 g de l'inhibiteur **19**, soit un rendement de 66% après purification par chromatographie éclair (gradient d'élution d'acétate d'éthyle dans le dichlorométhane (50% → 99%), contenant 1% d'acide acétique).

R_f: 0,38 (1% AcOH/AcOEt)

[α]_D²⁵: -6,1° (c=2,83, CH₃OH)

Point de fusion: 205 °C (déc.)

IR: (KBr, ν=cm⁻¹): 3349, 1640, 1604, 1513, 1443, 1252, 1113, 786, 760.

RMN: (Acétone-d₆)

-¹H (500 MHz): 2,56(m, 2H, -CH₂ (6)); 2,99(dd, J_{gem}=13,6 J_{vic}=7,9, 1H, -CH₂ (2)); 3,11(dd, J_{gem}=13,6 J_{vic}=5,3, 1H, -CH₂ (2)); 3,36(m, 2H, -CH₂ (5)); 4,78(ddd, J=5,3, 7,9, J_{N-H}=7,6, 1H, -CH (1)); 6,46(d, J=7,8, 1H, -CH_{arom.}); 6,64(d, J=7,8, 1H, -CH_{arom.}); 6,68(s, 1H, -CH_{arom.}); 6,70 (d, J=8,3, 2H, -CH_{arom.}); 6,80 (d,

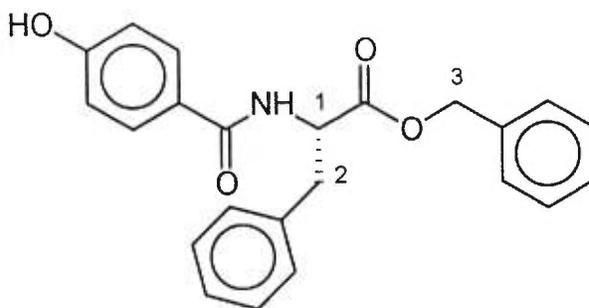
$J=8,6$, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 7,09(d, $J=8,3$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 7,24(d, $J=8,6$ 1H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 7,39(s, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 7,55(m, 1H, $-\text{NH}_{(4)}$); 7,65(d, $J=7,6$, 1H, $-\text{NH}_{(3)}$); 7,5-8,4($s_{(\text{signal large})}$, 5H, OH).

- ^{13}C (125 MHz): 34,94($-\text{CH}_2_{(6)}$); 37,29($-\text{CH}_2_{(2)}$); 41,36($-\text{CH}_2_{(5)}$); 55,84($-\text{CH}_{(1)}$); 115,02($-\text{C}_{\text{arom}}$); 115,38($-\text{C}_{\text{arom}}$); 115,44($-\text{C}_{\text{arom}}$); 116,10($-\text{C}_{\text{arom}}$); 120,04($-\text{C}_{\text{arom}}$); 120,30($-\text{C}_{\text{arom}}$); 121,87($-\text{C}_{\text{arom}}$); 126,10($-\text{C}_{\text{arom}}$); 128,58($-\text{C}_{\text{arom}}$); 130,53($-\text{C}_{\text{arom}}$); 131,10($-\text{C}_{\text{arom}}$); 143,69($\text{C-OH}_{\text{arom}}$); 144,98($\text{C-OH}_{\text{arom}}$); 145,07($\text{C-OH}_{\text{arom}}$); 148,81($\text{C-OH}_{\text{arom}}$); 156,24($\text{C-OH}_{\text{arom}}$); 167,24(C=O); 172,11(C=O).

SM HR(EI: 70eV): m/e calculée pour $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7$: 452,1583; m/e trouvée 452,1592 (M^+).

Composé 24

N-(4'-Hydroxybenzoyl)-L-phénylalaninoate de benzyle



La synthèse du composé **24** est réalisée en utilisant la procédure générale A. À partir de 0,400 g d'amine **22**, nous récupérons 0,323 g du composé **24**, soit un rendement de 92% après purification par

chromatographie éclair (gradient d'élution d'acétate d'éthyle dans le dichlorométhane (5% → 20%), contenant 1% d'acide acétique).

R_f: 0,34 (1% AcOH/5% AcOEt/CH₂Cl₂)

[α]_D²⁵: -33⁰ (c=0,94; CH₃OH)

Point de fusion: 163 °C (déc.)

IR: (KBr, ν=cm⁻¹): 3293, 3065, 3030, 2934, 1711, 1640, 1600, 1535, 1509, 1445, 1328, 1275, 1235, 1182, 996, 845, 747, 696.

RMN: (Acétone-d₆)

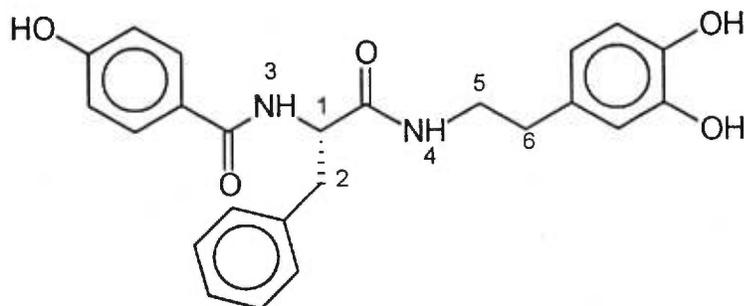
-¹H (500 MHz): 3,16(dd, J_{gem}=12,8 J_{vic}=8,9, 1H, -CH₂ (2)); 3,24(dd, J_{gem}=12,8 J_{vic}=5,5, 1H, -CH₂ (2)); 4,92(m, 1H, -CH (1)); 5,12(s, 2H, -CH₂ (3)); 6,83(d, J=6,6, 2H, -CH_{arom.}); 7,15-7,31(m, 10H, -CH_{arom.}); 7,70(m, 3H, -NH et -CH_{arom.}); 8,9(s_{signal large}, 1H, OH).

-¹³C (125 MHz): 37,42(-CH₂ (2)); 54,65(C_αH); 66,50(-CH₂ (3)); 115,16(-C_{arom.}); 125,73(-C_{arom.}); 126,83(-C_{arom.}); 128,23(-C_{arom.}); 128,58(-C_{arom.}); 129,45(-C_{arom.}); 129,50(-C_{arom.}); 136,41(-C_{arom.}); 137,69(-C_{arom.}); 160,67(C-OH_{arom.}); 166,66(C=O); 171,87(C=O).

SM HR(EI: 70eV): m/e calculée pour C₂₃H₂₁N₁O₄: 375,1470; m/e trouvée 375,1468 (M⁺).

Composé 26

N-[N'-(4'-Hydroxybenzoyl)-L-phénylalani]-dopamine



La synthèse du composé **26** est effectuée en utilisant successivement les procédures générales D et B. À partir de 0,287 g du composé **24**, nous récupérons 0,301 g de l'inhibiteur **26**, soit un rendement de 94% après purification par chromatographie éclair (1% d'acide acétique/50% d'acétate d'éthyle/dichlorométhane).

R_f: 0,34 (1% AcOH/5% AcOEt/CH₂Cl₂)

[α]_D²⁵: -5,82° (c=1,08, CH₃OH)

Point de fusion: 196 °C (déc.)

IR: (KBr, ν=cm⁻¹): 3241, 1620, 1519, 1449, 1365, 1259, 1113, 746, 702.

RMN: (Acétone-d₆)

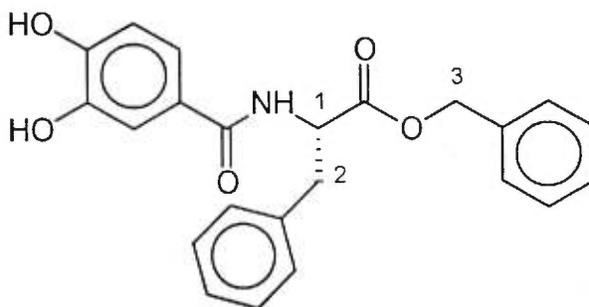
-¹H (500 MHz): (2 conformères) [2,48(t, J=7,6, 2H, -CH₂ (6)_{maj.})+ 2,60(t, J=7,8, -CH₂ (2)_{min.})]2H; 2,93(m, 1H, -CH₂ (2)); 3,00(dd, J_{gem}=13,3 J_{vic}=3,8, 1H, -CH₂ (2)); 3,13-3,25(m, 1H, -CH₂ (5)); 3,32(m, 1H, -CH₂ (5)); 4,59(m, 1H, -CH (1)); 6,41(d, J=7,1, 1H, -CH_{arom.}); 6,57(m, 2H, -CH_{arom.}); 6,76(m, 2H, -CH_{arom.}); 7,12(m, 1H, -CH_{arom.}); 7,21(d, J=7,4, 2H, -CH_{arom.}); 7,26(d, J=7,5, 1H, -CH_{arom.}); 7,65(d, J=7,4, 2H, -CH_{arom.}); 8,00(t, J=5,7, <1H, -NH (4)_{maj.}); 8,21(d, J=8,3, >1H, -NH (3) et -NH (4)_{min.}); 8,59(s, 1H, OH); 8,69(s, 1H, OH); 9,92(s, 1H, OH)

- ^{13}C (125 MHz): 34,73(-CH₂ (6)maj.); 34,90(-CH₂ (6)min.); 37,49(-CH₂ (2)); 40,76(-CH₂ (5)maj.); 41,31(-CH₂ (5)min.); 54,96(-CH (1)); 114,75(-C_{arom.}); 115,55(-C_{arom.}); 116,06(-C_{arom.}); 119,36(-C_{arom.}); 124,88(-C_{arom.}); 126,21(-C_{arom.}); 128,09(-C_{arom.}); 129,09(-C_{arom.}); 129,23(-C_{arom.}); 129,46(-C_{arom.}); 130,24(-C_{arom.}); 130,51(-C_{arom.}); 138,68(-C_{arom.}); 143,62(C-OH_{arom.}); 145,16(C-OH_{arom.}); 160,26(C-OH_{arom.}); 165,97(C=O); 171,42(C=O).

SM HR(EI: 70eV): m/e calculée pour C₂₄H₂₄N₂O₅: 420,1685; m/e trouvée 420,1689 (M⁺).

Composé 23

N-(3',4'-Dihydroxybenzoyl)-L-phénylalaninoate de benzyle



La synthèse du composé **23** est réalisée en utilisant la procédure générale A. À partir de 0,308 g d'amine **22**, nous récupérons 0,319 g du composé **23**, soit un rendement de 60% après purification par chromatographie éclair (gradient d'élution d'acétate d'éthyle dans le dichlorométhane (30% → 50%), contenant 1% d'acide acétique).

R_f: 0,54 (1% AcOH/30% AcOEt/CH₂Cl₂)

$[\alpha]_D^{25}$: $-36,1^{\circ}$ ($c=3,56$; CH_3OH)

Point de fusion: 139°C (déc.)

IR: (KBr , $\nu=\text{cm}^{-1}$): 3317, 1700, 1609, 1552, 1516, 11451, 1234, 1112, 816.

RMN: (Acétone- d_6)

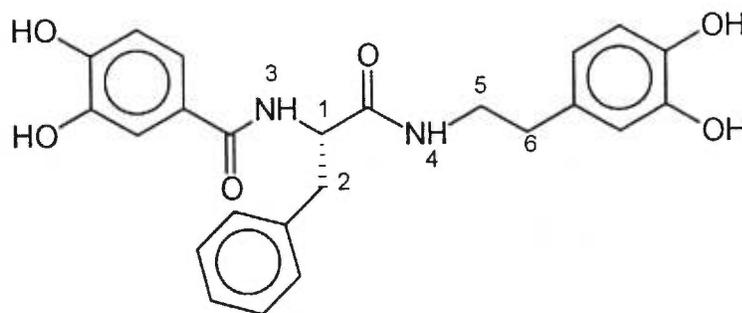
^1H (500 MHz): 3,24(dd, $J_{\text{gem}}=13,6$ $J_{\text{vic}}=8,5$, 1H, $-\text{CH}_2$ (2)); 3,32(dd, $J_{\text{gem}}=13,6$ $J_{\text{vic}}=5,2$, 1H, $-\text{CH}_2$ (2)); 5,03(ddd, $J=5,2$, 8,5 et $J_{\text{NH}}=8,0$, 1H, $-\text{CH}$ (1)); 5,17(s, 2H, $-\text{CH}_2$ (3)); 6,92(d, $J=8,0$, 1H, $-\text{NH}$); 7,20-7,36(m, 11H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,53(s, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,88(d, $J=7,3$, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$) 8,57(s(signal large), 1H, OH).

^{13}C (125 MHz): 37,16($-\text{CH}_2$ (2)); 54,60($-\text{C}_{\alpha}\text{H}$); 66,53($-\text{CH}_2$ (3)); 114,92($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 117,23($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 119,95($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 125,73($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 126,71($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 128,08($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 128,43($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 129,25($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 135,98($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 137,23($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 144,91($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom.}}$); 148,76($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom.}}$); 167,38($\text{C}=\text{O}$); 171,64($\text{C}=\text{O}$).

SM HR(Cl: NH_3): m/e calculée pour $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_1\text{O}_5$: 391,1498; m/e trouvée 392,1490 (MH^+).

Composé 25

N-[*N'*-(3',4'-Dihydroxybenzoyl)-*L*-phénylalaniyl]-dopamine



La synthèse du composé **25** est effectuée en utilisant successivement les procédures générales D et B. À partir de 18,0 mg du composé **23**, nous récupérons 19,0 mg de l'inhibiteur **25**, soit un rendement de 73% après purification par chromatographie éclair (1% d'acide acétique/acétate d'éthyle).

R_f: 0,44 (1% AcOH/AcOEt)

[α]_D²⁵: -10⁰ (c=0,08, CH₃OH)

Point de fusion: 201 °C (déc.)

IR: (KBr, ν=cm⁻¹): 3285, 2978, 1725, 1602, 1507, 1368, 1291, 1238, 1159, 894, 843, 757.

RMN: (Acétone-d₆)

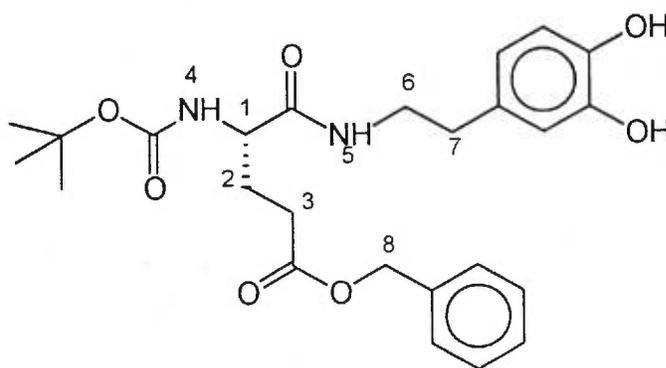
-¹H (500 MHz): 2,52-2,59(m, 2H, -CH₂ (6)); 3,04(dd, J_{gem}=13,6 J_{vic}=7,7, 1H, -CH₂ (2)); 3,18(dd, J_{gem}=13,6 J_{vic}=6,3, 1H, -CH₂ (2)); 3,32(m, 2H, -CH₂ (5)); 4,77(dt, J=6,3 et 7,6, 1H, -CH (1)); 6,45(d, J=7,1, 1H, -CH_{arom.}); 6,65(s, 1H, -CH_{arom.}); 6,80(d, J=7,1, 2H, -CH_{arom.}); 7,11-7,26(m, 6H, -CH_{arom.}); 7,34(s, 1H, -CH_{arom.}); 7,38(m, 2H, -NH (4) et -CH_{arom.}); 7,52(d, J=7,6, 1H, -NH (3)); 7,98(s, 4H, OH).

-¹³C (125 MHz): 35,03(-CH₂ (6)); 38,04(-CH₂ (2)); 41,27(-CH₂ (5)); 55,36(-CH (1)); 114,95(-C_{arom.}); 115,05(-C_{arom.}); 115,42(-C_{arom.}); 116,16(-C_{arom.}); 119,93(-C_{arom.}); 120,28(-C_{arom.}); 126,59(-C_{arom.}); 128,44(-C_{arom.}); 129,56(-C_{arom.}); 131,24(-C_{arom.}); 138,37(-C_{arom.}); 143,75(C-OH_{arom.}); 144,98(C-OH_{arom.}); 145,13(C-OH_{arom.}); 148,69(C-OH_{arom.}); 166,74(C=O); 171,49(C=O).

SM HR(EI: 70eV): m/e calculée pour $C_{24}H_{24}N_2O_6$: 436,1634; m/e trouvée 436,1639 (M^+).

Composé 31

N-N'-(*t*-Butoxycarbonyl)- δ -benzyloxy-L-glutamyl]-dopamine



La synthèse du composé **31** est réalisée en utilisant la procédure générale B. À partir de 0,500 g d'acide **30**, nous récupérons 0,400 mg du produit **31**, soit un rendement de 65% après purification par chromatographie éclair (1% d'acide acétique/25% acétate d'éthyle/dichlorométhane).

R_f: 0,41 (1% AcOH/25% AcOEt/CH₂Cl₂)

[α]_D²⁵: -13,2° (c=1,16; CH₃OH)

Point de fusion: 58 °C (déc.)

IR: (KBr, ν =cm⁻¹): 3333, 2975, 1688, 1620, 1522, 1449, 1367, 1267, 1169, 747.

RMN: (Acétone-d₆)

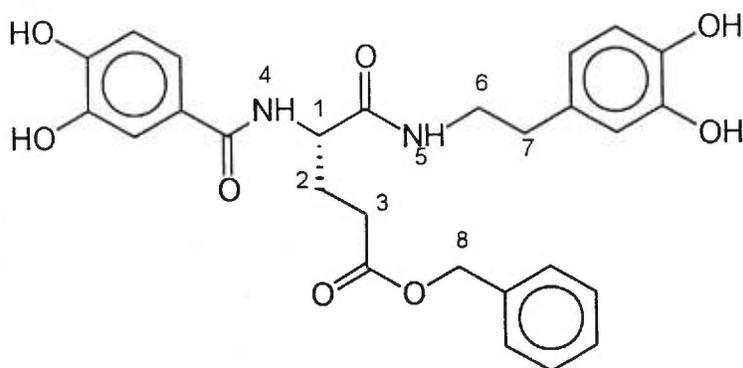
^1H (500 MHz): 1,40(s, 9H, $-\text{CH}_3$); 1,95(m, 1H, $-\text{CH}_2$ (2)); 2,14(m, 1H, $-\text{CH}_2$ (2))
 2,46(t, $J=7,3$, 2H, $-\text{CH}_2$ (3)); 2,65(t, $J=7,0$, 2H, $-\text{CH}_2$ (7)); 3,38(m, 2H, $-\text{CH}_2$ (6));
 4,19(m, 1H, $-\text{CH}$ (1)); 5,11(s, 2H, $-\text{CH}_2$ (8)); 6,19(d, $J=7,4$, 1H, $-\text{NH}$ (4)); 6,55(d,
 $J=8,2$, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 6,74(m, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,29-7,33(m, 5H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,43(m,
 1H, $-\text{NH}$ (5)); 7,75(s(signal large), 1H, OH); 7,83(s(signal large), 1H, OH)

^{13}C (125 MHz): 27,88($-\text{CH}_3$, Boc); 27,99($-\text{CH}_2$ (2)); 30,16($-\text{CH}_2$ (3)); 35,03($-\text{CH}_2$
 (7)); 41,12($-\text{CH}_2$ (6)); 54,04($-\text{CH}$ (1)); 65,86($-\text{CH}_2$ (8)); 78,85($-\text{C}-$, Boc); 115,39($-\text{C}_{\text{arom.}}$);
 115,90($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 120,18($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 128,07($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 128,13($-\text{C}_{\text{arom.}}$);
 128,54($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 130,98($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 136,67($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 143,63($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom.}}$); 145,10($\text{C}-$
 $\text{OH}_{\text{arom.}}$); 155,72($\text{C}=\text{O}$); 167,38($\text{C}=\text{O}$); 171,64($\text{C}=\text{O}$).

SM HR(Cl: NH_3): m/e calculée pour $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$: 472,2208; m/e trouvée
 473,2303 (MH^+).

Composé 32

N-[*N'*-(3',4'-Dihydroxybenzoyl)- δ -benzyloxy-L-glutamyl]-dopamine



La synthèse du composé **32** est effectuée en utilisant
 successivement les procédures générales C et A. À partir de 0,400 g du

composé **31**, nous récupérons 0,124 g de l'inhibiteur **32**, soit un rendement de 28% après purification par chromatographie éclair (1% d'acide acétique/ acétate d'éthyle).

R_f: 0,49 (1% AcOH/AcOEt)

[α]_D²⁵: -5,75° (c=1,20; CH₃OH)

Point de fusion: 108 °C (déc.)

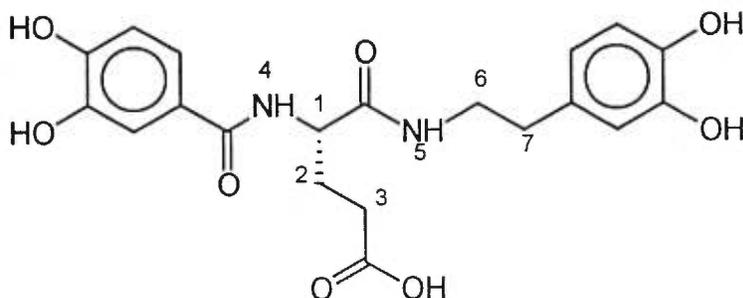
IR: (KBr, ν =cm⁻¹): 3241, 1712, 1621, 1514, 1447, 1244, 1110, 746.

RMN: (Acétone-d₆)

-¹H (500 MHz): 2,02(m, 1H, -CH₂ (2)); 2,23(m, 1H, -CH₂ (2)); 2,47(m, 2H, -CH₂ (3)); 2,50(t, J=7,0, 2H, -CH₂ (7)); 3,35(m, 2H, -CH₂ (6)); 4,61(m, 1H, -CH₍₁₎); 5,05(s, 2H, -CH₂ (8)); 6,48(d, J=7,6, 1H, -CH_{arom.}); 6,64(d, J=7,6, 1H, -CH_{arom.}); 6,68(s, 1H, -CH_{arom.}); 6,82(d, J=8,8, 1H, -CH_{arom.}); 6,90-7,03(m, 1H, -CH_{arom.}); 7,25-7,31(m, 5H, -CH_{arom.}); 7,44(s, 1H, -CH_{arom.}); 7,49(m, 1H, NH₍₅₎); 7,66(d, J=7,8, 1H, -NH₍₄₎); 7,5-8,8(s_(signal large), 4H, OH).

-¹³C (125 MHz): 27,59(-CH₂ (2)); 30,63(-CH₂ (3)); 35,02(-CH₂ (7)); 41,26(-CH₂ (6)); 53,44(-CH₍₁₎); 65,99(-CH₂ (8)); 115,00(-C_{arom.}); 115,14(-C_{arom.}); 115,40(-C_{arom.}); 116,09(-C_{arom.}); 120,09(-C_{arom.}); 120,30(-C_{arom.}); 126,13(-C_{arom.}); 128,14(-C_{arom.}); 128,26(-C_{arom.}); 128,61(-C_{arom.}); 131,15(-C_{arom.}); 136,75(-C_{arom.}); 143,72(C-OH_{arom.}); 145,01(C-OH_{arom.}); 145,10(C-OH_{arom.}); 148,82(C-OH_{arom.}); 167,38(C=O); 171,64(C=O); 172,80(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₂₇H₂₈N₂O₈: 508,1900; fragment m/e trouvée 491,1821 (M⁺-OH: m/e théorique 491,1818); fragment m/e trouvée 401,1346 (M⁺-BnO: m/e théorique 401,1349);

Composé 33*N*-[*N'*-(3',4'-Dihydroxybenzoyl)-L-glutamyl]-dopamine

La synthèse du composé **33** est réalisée en utilisant la procédure générale D. À partir de 43,0 mg du composé **32**, nous récupérons 32,0 mg de l'inhibiteur **33**, soit un rendement de 92% après purification par chromatographie éclair (5% d'acide acétique/acétate d'éthyle).

R_f: 0,41 (5% AcOH/AcOEt)

[α]_D²⁵: -27° (c=0,45; CH₃OH)

Point de fusion: 151 °C (déc.)

IR: (KBr, ν=cm⁻¹): 3237, 1716, 1628, 1515, 1446, 1262, 775.

RMN: (DMSO-d₆)

¹H (500 MHz): 1,88(m, 1H, -CH₂ (2)); 1,97(m, 1H, -CH₂ (2)); 2,24(m, 2H, -CH₂ (3)); 2,50(t, J=7,0, 2H, -CH₂ (7)); 3,18(m, 2H, -CH₂ (6)); 4,34(m, 1H, -CH₂ (1)); 6,42(d, J=8,2, 1H, -CH_{arom.}); 6,57(d, J=5,2, 1H, -CH_{arom.}); 6,60(s, 1H, -CH_{arom.}); 6,77(d, J=8,3, 1H, -CH_{arom.}); 7,24(d, J=8,1, 1H, -CH_{arom.}); 7,31(s, 1H, -CH_{arom.});

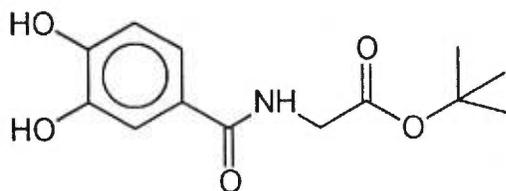
7,88(t, J=5,5, 1H, NH₍₅₎); 8,08(d, J=7,5, 1H, -NH₍₄₎); 8,00-11,5(s_(signal large), 5H, OH).

¹³C (125 MHz): 25,94(-CH₂₍₂₎); 29,53(-CH₂₍₃₎); 33,56(-CH₂₍₇₎); 39,56(-CH₂₍₆₎); 51,74(-CH₍₁₎); 113,63(-C_{arom.}); 114,19(-C_{arom.}); 114,32(-C_{arom.}); 114,76(-C_{arom.}); 118,05(-C_{arom.}); 118,22(-C_{arom.}); 124,13(-C_{arom.}); 128,98(-C_{arom.}); 142,39(-C_{arom.}); 143,64(-C_{arom.}); 143,95(-C_{arom.}); 147,38(C-OH_{arom.}); 165,04(C=O); 170,19(C=O); 173,09(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₂₀H₂₂N₂O₇: 418,1420; fragment m/e trouvée 401,1354 (M⁺-OH: m/e théorique 401,1349).

Composé 28

N-(3',4'-Dihydroxybenzoyl)-L-glycinoate de *t*-butyle



La synthèse du composé **28** est effectuée suivant la procédure générale A. À partir de 0,400 g de l'acide aminé **27**, nous récupérons 0,337 g du composé **28**, soit un rendement de 52% après purification par chromatographie éclair (gradient d'élution d'acétate d'éthyle dans le dichlorométhane (15%→25%), contenant 1% d'acide acétique).

R_f: 0,31 (1% AcOH/15% AcOEt/CH₂Cl₂)

Point de fusion: 139 °C (déc.)

IR: (KBr, $\nu=\text{cm}^{-1}$): 3483, 3407, 3180, 2986, 1730, 1629, 1593, 1517, 1370, 1290, 1235, 1162, 758.

RMN: (Acétone- d_6)

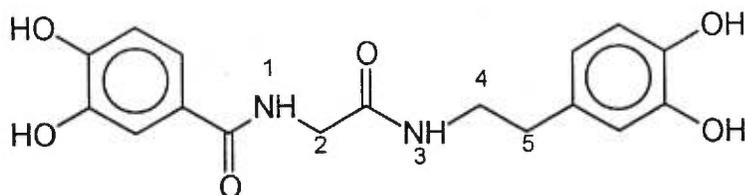
^1H (500 MHz): 1,52(s, 9H, $-\text{CH}_3$); 4,09(d, $J=5,5$, 2H, $-\text{CH}_2$); 6,95(d, $J=7,3$, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,42(d, $J=7,3$, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,55(s, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,90(s_(signal large), 1H, $-\text{NH}$); 8,34(s_(signal large), 1H, OH); 8,60(s_(signal large), 1H, OH)

^{13}C (125 MHz): 27,56($-\text{CH}_3$); 42,24($-\text{CH}_2$); 80,85($-\text{C}-$); 114,97($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 119,78($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 126,33($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 145,04($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom.}}$); 148,67($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom.}}$); 166,22($\text{C}=\text{O}$); 169,30($\text{C}=\text{O}$).

SM HR(EI: 70eV): m/e calculée pour $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_1\text{O}_5$: 267,1107; m/e trouvée 267,1102 (M^+).

Composé 29

N-[*N'*-(3',4'-Dihydroxybenzoyl)-L-glycyl]-dopamine



La synthèse du composé **29** est réalisée en utilisant successivement les procédures générales C et B. À partir de 0,277 g du composé **28**, nous récupérons 0,163 g de l'inhibiteur **29**, soit un rendement de 45% après purification par chromatographie éclair (1% d'acide acétique/30% acétate d'éthyle/dichlorométhane).

R_f: 0,17 (1% AcOH/AcOEt)

Point de fusion: 155 °C (déc.)

IR: (KBr, $\nu=\text{cm}^{-1}$): 3266, 2900, 1641, 1600, 1515, 1442, 1365, 1287, 1196, 1114, 785, 761.

RMN: (Acétone- d_6)

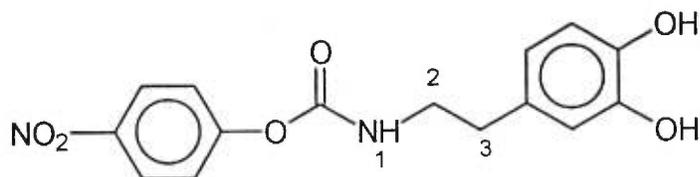
^1H (500 MHz): 2,58(t, $J=7,1$, 2H, $-\text{CH}_2$ (5)); 3,34(dt, $J=7,1$ et $J_{\text{NH}}=5,1$, 2H, $-\text{CH}_2$ (4)); 3,99(d, $J=5,3$, 2H, $-\text{CH}_2$ (2)); 6,47(d, $J=8,0$, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 6,64(d, $J=8,0$, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 6,67(s, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 6,85(d, $J=7,7$, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 7,31(d, $J=7,7$, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 7,44(s, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 7,47(t, $J=5,1$, 1H, $-\text{NH}$ (3)); 7,94(t, $J=5,0$, 1H, $-\text{NH}$ (1)); 7,4-8,0(s(signal large), 2H, OH); 8,4(s(signal large), 2H, OH)

^{13}C (125 MHz): 35,05($-\text{CH}_2$ (5)); 41,26($-\text{CH}_2$ (4)); 43,53($-\text{CH}_2$ (2)); 115,04($-\text{C}_{\text{arom}}$); 115,41($-\text{C}_{\text{arom}}$); 116,10($-\text{C}_{\text{arom}}$); 120,02($-\text{C}_{\text{arom}}$); 120,24($-\text{C}_{\text{arom}}$); 126,07($-\text{C}_{\text{arom}}$); 131,15($-\text{C}_{\text{arom}}$); 143,72($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom}}$); 145,05($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom}}$); 148,85($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom}}$); 167,52($\text{C}=\text{O}$); 169,88($\text{C}=\text{O}$).

SM HR(EI: 70eV): m/e calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$: 346,1165; m/e trouvée 346,1172 (M^+).

Composé 35

Carbamate de *N*-(3,4-Dihydroxyphénéthyle)-*O*-(4-nitrophényle)



La synthèse du composé **35** est réalisée en utilisant la procédure générale E. À partir de 0,250 g de dopamine, nous récupérons 0,186 g du composé **35**, soit un rendement de 40% après purification par chromatographie éclair (30% d'acétate d'éthyle/dichlorométhane).

R_f: 0,50 (30% AcOEt/CH₂Cl₂)

Point de fusion: 124 °C (déc.)

IR: (KBr, $\nu = \text{cm}^{-1}$): 3531, 3350, 1720, 1522, 1347, 1285, 1217, 863, 659.

RMN: (Acétone-d₆)

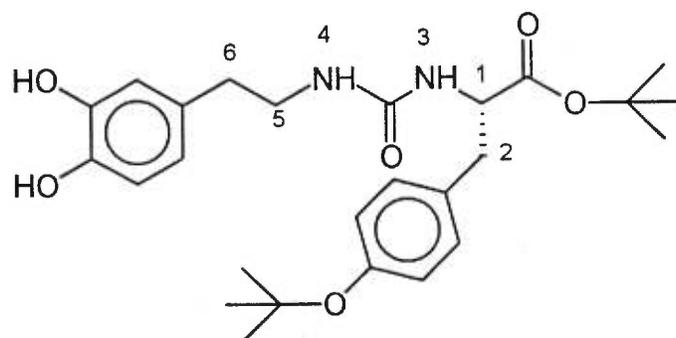
-¹H (500 MHz): 2,72(t, J=7,3, 2H, -CH₂ (3)); 3,39(m, 2H, -CH₂ (2)); 6,56(d, J=7,2, 1H, -CH_{arom}); 6,72(m, 2H, -CH_{arom}); 7,02(t, J=5,2, 1H, -NH (1)); 7,34(d, J=9,0, 2H, -CH_{arom}); 7,74(s, 2H, OH); 8,21(d, J=7,9, 2H, -CH_{arom}).

-¹³C (125 MHz): 35,80(-CH₂ (3)); 42,93(-CH₂ (2)); 115,48(-C_{arom}); 116,04(-C_{arom}); 120,29(-C_{arom}); 122,29(-C_{arom}); 122,74(-C_{arom}); 130,86(-C_{arom}); 143,69(-C_{arom}); 145,17(-C_{arom}); 153,44(C-OH_{arom}); 156,83(C-OH_{arom}); 162,79(C=O).

SM HR(EI: 70eV): m/e calculée pour C₁₅H₁₄N₂O₆: 318,0880; fragment m/e trouvée 179,0577 (M⁺-OPhNO₂: m/e théorique 179,0582).

Composé 37

N-(3,4-Dihydroxyphénéthylcarbamyloxy)- δ -(*t*-butyl)-L-tyrosinoate de *t*-butyle



Sous conditions anhydres, à 0,140 g d'amine **12** en solution dans le DMF est ajouté 0,062 mL de Et₃N (1,1 équiv) et 0,150 g de carbamate **35** (1,0 équiv). Après 4 h, une ccm indique la disparition des produits de départ.

Conclusif: le mélange réactionnel est dilué dans cinq fois son volume de saumure. On extrait ensuite trois fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont combinées et elles sont lavées encore une fois avec la saumure. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na₂SO₄, puis évaporée sous vide.

Le produit **37** est purifié par chromatographie éclair avec un éluant composé de 1% d'acide acétique/30 % acétate d'éthyle/dichlorométhane.

R_f: 0,44 (1% AcOH/30% AcOEt/CH₂Cl₂)

[α]_D²⁵: 12,1⁰ (c=1,29; CH₃OH)

Point de fusion: 161 °C (déc.)

IR: (KBr, ν=cm⁻¹): 3361, 2978, 1726, 1646, 1560, 1507, 1367, 1244, 1159, 896.

RMN: (Acétone-d₆)

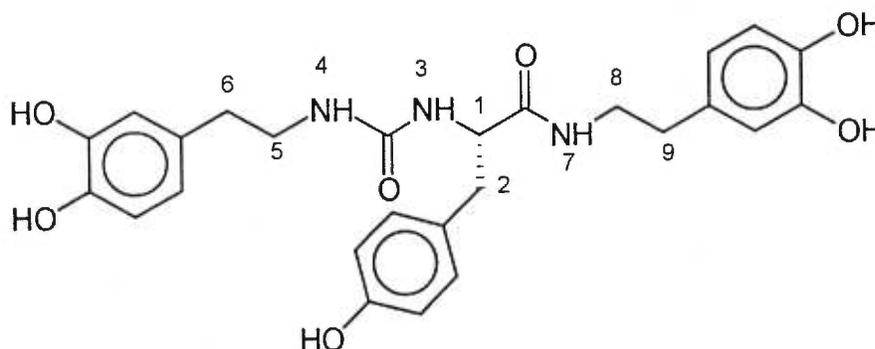
^1H (500 MHz): 1,29(s, 9H, $-\text{CH}_3$); 1,36(s, 9H, $-\text{CH}_3$); 2,60(t, $J=7,2$, 2H, $-\text{CH}_2$ (6)); 2,93(d, $J=7,0$, 2H, $-\text{CH}_2$ (2)); 3,31(m, 2H, $-\text{CH}_2$ (5)); 4,50(dt, $J=7,0$ et $J_{\text{NH}}=7,5$, 1H, $-\text{CH}$ (1)); 5,71(d, $J=7,5$, 2H, $-\text{NH}$ (3) et (4)); 6,52(d, $J=7,6$, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 6,70(d, $J=7,6$, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 6,73(s, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 6,89(d, $J=7,3$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,11(d, $J=7,3$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,67(s, 1H, OH); 7,74(s, 1H, OH).

^{13}C (125 MHz): 27,52($-\text{CH}_3$, *t*-Bu); 28,50($-\text{CH}_3$, *t*-Bu); 36,06($-\text{CH}_2$ (6)); 38,27($-\text{CH}_2$ (2)); 41,80($-\text{CH}_2$ (5)); 55,04($-\text{CH}$ (1)); 77,77($-\text{C}-$, *t*-Bu); 80,84($-\text{C}-$, *t*-Bu); 115,41($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 116,01($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 120,24($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 123,91($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 130,21($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 131,58($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 132,27($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 143,61($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 145,18($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom.}}$); 154,53($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom.}}$); 157,62($\text{C}=\text{O}$); 171,86($\text{C}=\text{O}$).

SM HR(EI: 70eV): *m/e* calculée pour $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6$: 472,2573; *m/e* trouvée 472,2581 (M^+).

Composé 38

N-[*N'*-(3,4-Dihydroxyphényl)éthylcarbonyl]-*L*-tyrosyl]-dopamine



La synthèse du composé **38** est réalisée en utilisant successivement les procédures générales C et B. À partir de 0,137 g du

composé **37**, nous récupérons 50,0 mg de l'inhibiteur **38**, soit un rendement de 47% après purification par chromatographie éclair (1% d'acide acétique/acétate d'éthyle).

R_f: 0,25 (1% AcOH/AcOEt)

[α]_D²⁵: 6,5° (c=0,98; CH₃OH)

Point de fusion: 111 °C (déc.)

IR: (KBr, ν=cm⁻¹): 3315, 1642, 1518, 1446, 1360, 1250, 1113, 808.

RMN: (Acétone-d₆)

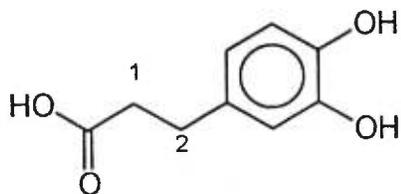
¹H (500 MHz): 2,51(m, 4H, -CH₂ (6) et (9)); 2,76(dd, J_{gem}=13,6 J_{vic}=8,6, 1H, -CH₂ (2)); 2,89(dd, J_{gem}=13,6 J_{vic}=6,3, 1H, -CH₂ (2)); 3,09-3,37(m, 4H, -CH₂ (5) et (8)); 4,50(ddd, J=6,3, 8,6 et J_{NH}=7,8, 1H, -CH₍₁₎); 5,90(td, J=5,2, 1H, -NH (4)); 6,29(d, J=7,8, 1H, -NH (3)); 6,35(m, 2H, -CH_{arom.}); 6,44-6,69(m, 6H, -CH_{arom.}); 6,99(d, J=7,5, 2H, -CH_{arom.}); 7,46(d, J=5,2, 1H, -NH (7)); 7,50-8,12(s_(signal large), 5H, O-H).

¹³C (125 MHz): 34,77(-CH₂ (6)); 36,00(-CH₂ (9)); 38,48(-CH₂ (2)); 41,28(-CH₂ (8)); 41,88(-CH₂ (5)); 55,86(-CH (1)); 115,33(-C_{arom.}); 115,44(-C_{arom.}); 116,06(-C_{arom.}); 116,24(-C_{arom.}); 120,21(-C_{arom.}); 128,44(-C_{arom.}); 130,64(-C_{arom.}); 131,15(-C_{arom.}); 131,39(-C_{arom.}); 143,72(C-OH_{arom.}); 145,08(C-OH_{arom.}); 156,29(C-OH_{arom.}); 158,65(C=O); 173,29(C=O).

SM HR(EI: 70eV): m/e calculée pour C₂₆H₂₉N₃O₇: 470,2000; fragment m/e trouvée 342,1227 (M⁺-(HO)₂PhCH₂CH₂NH: m/e théorique 342,1216).

Composé 40

Acide 3-(3',4'-dihydroxyphényl)-propanoïque



La synthèse du composé **40** est faite en utilisant la procédure générale D pour réduire la double liaison. À partir de 0,150 g de l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (**39**), nous récupérons 0,152 g du composé **40**, soit un rendement quantitatif. L'analyse par ccm ne montrant qu'un seul produit celui-ci a été utilisé tel quel pour la prochaine étape de réaction.

R_f: 0,55 (1% AcOH/AcOEt)

Point de fusion: 139 °C (déc.)

IR: (KBr, $\nu = \text{cm}^{-1}$): 3383, 2942, 2687; 1680, 1608, 1527, 1445, 1288, 1225, 1111; 920.

RMN: (Acétone- d_6)

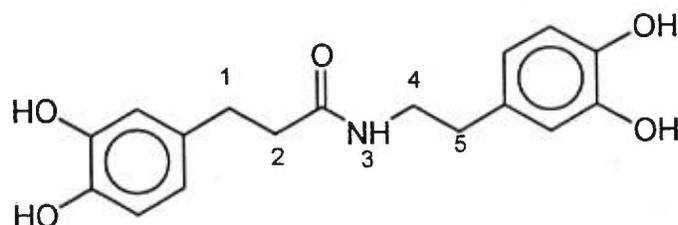
-¹H (500 MHz): 2,56(t, J=7,7, 2H, -CH₂ (2)); 2,78(t, J=7,7, 2H, -CH₂ (2)); 6,57(d, J=7,7, 1H, -CH_{arom.}); 6,75(m, 2H, -CH_{arom.}); 8,51(s_(signal large), 3H, OH).

-¹³C (125 MHz): 30,26(-CH₂ (2)); 35,80(-CH₂ (1)); 115,41(-C_{arom.}); 115,59(-C_{arom.}); 115,59(-C_{arom.}); 119,70(-C_{arom.}); 132,90(-C_{arom.}); 143,38(C-OH_{arom.}); 144,99(C-OH_{arom.}); 174,45(C=O).

SM HR(EI: 70eV): m/e calculée pour C₉H₁₀O₄: 182,0579; m/e trouvée 182,0583 (M⁺).

Composé 5

N-[3-(3',4'-Dihydroxyphényl)-propanoyl]-dopamine



La synthèse du composé **5** est réalisée en utilisant la procédure générale B. À partir de 0,151 g du composé **40**, nous récupérons 0,173 g de l'inhibiteur **5**, soit un rendement de 66% après purification par chromatographie éclair (gradient d'éluion d'acétate d'éthyle dans le dichlorométhane (40%→75%), contenant 1% d'acide acétique).

R_f: 0,32 (1% AcOH/50% AcOEt/CH₂Cl₂)

Point de fusion: 153⁰C (déc.)

IR: (KBr, ν =cm⁻¹): 3313, 2942, 1613, 1523, 1445, 1359, 1283, 1195, 1112, 811, 783.

RMN: (Acétone-d₆)

-¹H (500 MHz): 2,41(t, J=7,6, 2H, -CH₂ (1)); 2,58(t, J=7,3, 2H, -CH₂ (5)); 2,75(t, J=7,6, 2H, -CH₂ (2)); 3,33(dt, J=7,3, J_{NH}=5,0, 2H, -CH₂ (4)); 6,45-6,50(m, 2H, -CH_{arom.}); 8,69(m, 4H, -CH_{arom.}); 7,32(d, J=5,0, 1H, -NH (3)); 7,94(s_(signal large), 4H, OH).

3 fois avec la saumure. La phase organique est ensuite séchée et
 du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide pour donner une huile
 blanche. L'analyse par ccm ne montre qu'un seul produit formé, d'une
 pureté élevée sans avoir recours à d'autres techniques de purification;
 rendement: 99%)

100% AcOEt/hexanes)

$[\alpha]_D^{22}$: -4° (c=2;
 MeOH) (valeur connue catalogue Aldrich, $[\alpha]_D^{22}$: -4° (c=2;

ν): 3437, 3030, 2954, 1741, 1709, 1499, 1363, 1213, 1167, 1080.

δ)

δ (ppm): 1,41(s, 9H, $-\text{CH}_3$); 3,05(dd, $J_{\text{gem}}=13,9$ $J_{\text{vic}}=5,5$, 1H, $-\text{CH}_2$);

3,70(s, 3H, $-\text{CH}_3$); 4,58(m, 1H, $-\text{CH}$);

6,2, 1H, $-\text{NH}$); 7,13(d, $J=7,1$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,22-7,30(m, 3H,

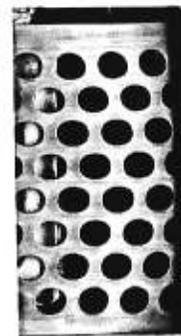
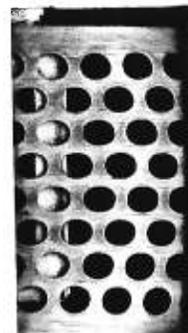
δ (ppm): 23,23($-\text{CH}_3$, Boc); 38,30($-\text{CH}_2$); 52,11($-\text{CH}_3$); 54,38($-\text{CH}$);

126,94($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 128,47($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 129,22($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 135,97(-

5,02(C=O); 172,28(C=O).

§ 60

(S)-2-(2-oxycarbonyl)-phénylalaninol



3 fois avec la saumure. La phase organique est ensuite séchée et
 du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide pour donner une huile
 te. L'analyse par ccm ne montre qu'un seul produit formé, d'une
 réciable sans avoir recours à d'autres techniques de purification;
 t: 99%)

0% AcOEt/hexanes)

$[\alpha]_D^{22}$: -4° (c=2;
 3^o (c=1,32; MeOH) (valeur connue^{catalogue Aldrich}).

^1H): 3,437, 3,030, 2,954, 1,741, 1,709, 1,499, 1,363, 1,213, 1,167, 1,080.

^{13}C)

MHz): 1,41(s, 9H, $-\text{CH}_3$); 3,05(dd, $J_{\text{gem}}=13,9$ $J_{\text{vic}}=5,5$, 1H, $-\text{CH}_2$);

$J_{\text{gem}}=13,9$ $J_{\text{vic}}=8,3$, 1H, $-\text{CH}_2$); 3,70(s, 3H, $-\text{CH}_3$); 4,58(m, 1H, $-\text{CH}$);

6,2, 1H, $-\text{NH}$); 7,13(d, $J=7,1$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,22-7,30(m, 3H,

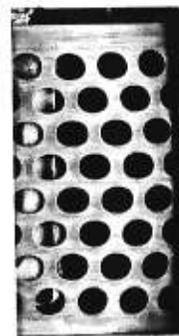
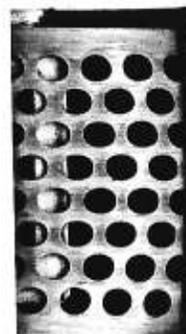
MHz): 23,23($-\text{CH}_3$, Boc); 38,30($-\text{CH}_2$); 52,11($-\text{CH}_3$); 54,38($-\text{CH}$);

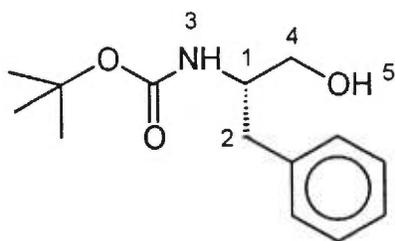
, Boc); 126,94($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 128,47($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 129,22($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 135,97(-

5,02(C=O); 172,28(C=O).

§ 60

xyrcarbonyl)-phénylalaninol





À 21,00 g d'ester **59** dans 50 mL de THF est ajouté 6,06 g de NaBH_4 (2,2 équiv) et 6,80 g de LiCl (2,5 équiv). Un volume de 100 mL d'éthanol absolu est ensuite ajouté lentement au mélange réactionnel et l'agitation poursuivie pendant toute la nuit.

Conclusif: le mélange réactionnel est évaporé sous vide et le résidu solide blanc est neutralisé lentement par l'ajout d'une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ en présence d'éther éthylique. Après 20 min d'agitation les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite deux autres fois avec l'éther éthylique. Les phases organiques sont combinées et lavées une fois avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$, et une autre fois avec la saumure. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide. L'aminoalcool **60** résultant est ensuite cristallisé dans un mélange CH_2Cl_2 /hexanes pour obtenir un solide blanc (rendement: 96%).

R_f: 0,22 (30% AcOEt/hexanes)

[α]_D²⁵: -26,4° (c=5,56, CH_3OH)(littérature⁵⁰: **[α]_D²³**: -28,3° (c=1, CH_3OH))

Point de fusion: 95°C (littérature⁵⁰: **p.f.**: 96-97 °C)

IR: (KBr, $\nu=\text{cm}^{-1}$): 3356, 2957, 1687, 1527, 1171, 1006

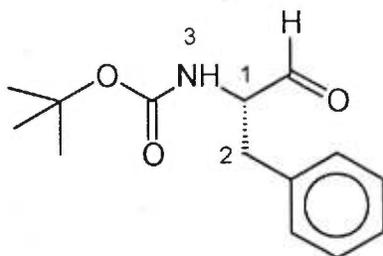
RMN: (DMSO-d_6)

^1H (500 MHz): 1,31 (s, 9H, $-\text{CH}_3$); 2,59(dd, $J_{\text{gem}}=13,5$ $J_{\text{vic}}=8,8$, 1H, $-\text{CH}_2$ (2)); 2,81(dd, $J_{\text{gem}}=13,5$ $J_{\text{vic}}=5,4$, 1H, $-\text{CH}_2$ (2)); 3,28(m, 1H, $-\text{CH}_2$ (4)); 3,35(m, 1H, $-\text{CH}_2$ (4)); 3,58(m, 1H, $-\text{CH}$ (1)), 4,69(t, $J=5,5$, 1H, OH); 6,56(d, $J=8,6$, 1H, $-\text{NH}$ (3)); 7,15-7,27 (m, 5H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$).

^{13}C (125 MHz): 23,82($-\text{CH}_3$, Boc); 36,87($-\text{CH}_2$ (2)); 54,01($-\text{CH}$ (1)); 63,00(CH_2 (4)); 77,45($-\text{C}-$, Boc); 125,83($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 128,10($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 129,17($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 139,46($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 155,23(C=O).

Composé 63

N-(*t*-Butoxycarbonyl)-phénylalaninal



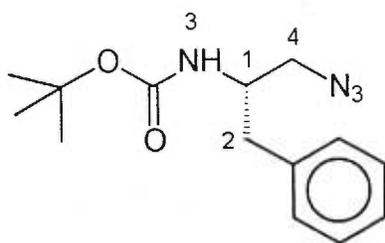
À -78°C sous atmosphère inerte, nous ajoutons goutte à goutte à une solution de 6,25 mL de chlorure d'oxalyle (2 équiv) dans 30 mL de CH_2Cl_2 , 7,62 mL de DMSO (3 équiv) dans 15 mL de CH_2Cl_2 . Après 5 min, 9,00 g d'aminoalcool **60** dans 25 mL de CH_2Cl_2 sont ajoutés au milieu réactionnel et l'agitation est poursuivie ainsi pour 1 h. Un volume de 20 mL de triéthylamine dans 20 mL de CH_2Cl_2 est ensuite ajouté goutte à goutte à la réaction. Lorsque l'addition est complète le bain d'acétone- $\text{CO}_2(\text{s})$ est retiré et le milieu réactionnel est laissé revenir à la température ambiante.

Conclusif: le mélange réactionnel est tout de suite neutralisé par l'ajout d'une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$. Les phases sont séparées et la phase aqueuse extraite encore deux fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont combinées et lavées une fois avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$, et une autre fois avec la saumure. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide. L'analyse par ccm montre l'aldéhyde formé **63** et la disparition de l'aminoalcool **60** de départ. Le phénylalaninal **63** brut est utilisé au plus tôt tel quel pour la prochaine étape sans manipulation ou purification supplémentaire.

R_f : 0,40 (30% AcOEt/hexanes)

Composé 61

Azoture de (2S)-2-(*t*-butoxycarbonylamino)-3-phényl-propyle



À 0°C , dans des conditions anhydres, à 8,90 g de l'aminoalcool **60** dans 50 mL de THF sont ajoutés 9,90 mL (2,0 équiv) de Et_3N et 4,15 mL de chlorure de mésyle (MsCl , 1,5 équiv). Le mélange réactionnel est agité pour 5 min.

Conclusif: le mélange réactionnel est dilué avec 150 mL d'une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ et extrait avec trois portions d'éther éthylique. Les phases organiques sont combinées et lavées deux fois avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$, et une autre fois avec la saumure. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide pour donner une huile transparente. L'analyse par ccm ne montre qu'un seul produit formé. La prochaine étape est conduite sur le résidu brut de cette réaction sans autre purification.

À une solution de l'intermédiaire mésylate dans 40 mL de DMF sont ajoutés 4,65 g d'azoture de sodium (NaN_3 , 2,0 équiv) et la réaction est poursuivie ainsi sous agitation pendant 36 h.

Conclusif: le mélange réactionnel est dilué avec 120 mL d'une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ et extrait avec trois portions d'éther éthylique. Les phases organiques sont combinées et lavées deux fois avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$, et une autre fois avec la saumure. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide pour donner une huile transparente. L'analyse par ccm montre la présence d'un seul nouveau produit formé (**61**) avec des sels très polaires. Le produit **61** est purifié par chromatographie éclair dans un éluant composé de 20% AcOEt/hexanes

R_f : 0,42 (10% AcOEt/hexanes)

$[\alpha]_D^{25}$: $-33,3^{\circ}$ ($c=5,36$, CH_3OH)

Point de fusion: 45°C

IR: (KBr, $\nu=\text{cm}^{-1}$): 3019, 2104, 1706, 1496, 1215, 779, 741.

RMN: (DMSO- d_6)

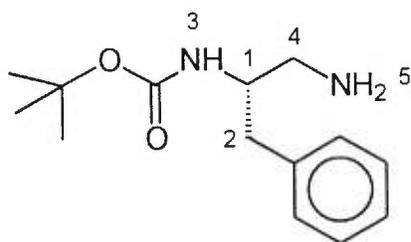
^1H (500 MHz): 2 isomères 4 :1; 1,28 et 1,33 (2s, 9H, $-\text{CH}_3$); 2,64-2,74(m, 2H, $-\text{CH}_2$ (2)); 3,29 (d, $J=6,1$, 2H, $-\text{CH}_2$ (4)); 3,76(m, 1H, $-\text{CH}$ (1)); 6,60(d, 0,20H, $-\text{NH}$ (3)min.); 7,02(d, $J=8,6$, 0,8H, $-\text{NH}$ (3)maj.); 7,17-7,50 (m, 5H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$).

^{13}C (125 MHz): 23,28($-\text{CH}_3$, Boc); 37,63($-\text{CH}_2$ (2)); 52,07($-\text{CH}$ (1));

53,58($-\text{CH}_2$ (4)); 77,85($-\text{C}-$, Boc); 128,19($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 129,19($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 130,54($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 138,44($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 155,14($\text{C}=\text{O}$).

Composé 62

(2S)-2-(*t*-Butoxycarbonylamino)-3-phényl-1-propylamine



À 9.80 g d'azoture **61** dans 50 mL de méthanol sont ajoutés 500 mg de 10% Pd/C. Un ballon gonflé d'hydrogène est ensuite installé de façon hermétique sur une aiguille au travers du septum couvrant le ballon réactionnel. La réaction est suivie par ccm jusqu'à la disparition du produit de départ. Le mélange réactionnel est ensuite filtré sur un coussin de celite et le filtrat est évaporé sous vide. Le produit **62** ainsi isolé est utilisé tel quel pour la prochaine réaction.

R_f: 0,0 (ne migre pas à 50% AcOEt/hexanes)

[α]_D²⁵: -7,1° (c=3,48, CH₃OH)

IR: (KBr, ν =cm⁻¹): 3433, 1702, 1497, 1165, 936.

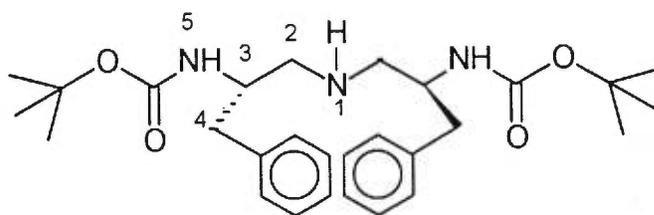
RMN: (CDCl₃)

¹H (500 MHz): 2 isomères 4 :1; 1,39 (s, 9H, -CH₃); 2,71(s_(signal large), 2H, -NH₂₍₅₎); 2,76-2,81(m, 2H, -CH₂₍₂₎); 3,03(m, 2H, -CH₂₍₄₎); 3,83(m, 0,8H, -CH_{(1)maj.}); 3,97(m, 0,2H, -CH_{(1)min.}); 4,94(s_(signal large), 0,8H, -NH_{(3)maj.}); 5,22(s_(signal large), 0,2H, -NH_{(3)min.}); 7,18-7,29 (m, 5H, -CH_{arom.}).

¹³C (125 MHz): 28,35(-CH₃, Boc); 38,34(-CH₂₍₂₎); 44,24(-CH₂₍₄₎); 53,51(CH₍₁₎); 79,28(-C-, Boc); 126,41(-C_{arom.}); 128,45(-C_{arom.}); 129,29(-C_{arom.}); 137,91(-C_{arom.}); 155,89(C=O).

Composé 64

(2S,2S)-Di-(2-*t*-butoxycarbonylamino-3-phényl-propyl)-amine



À l'aldéhyde **63** (1,02 équiv) en solution dans le méthanol, est ajouté le tamis moléculaire (3A). Le mélange est refroidi à 0°C, puis sont additionnés goutte à goutte 9,80 g de l'amine **62** (1 équiv). Après 30 min, le bain de glace est retiré et la réaction est poursuivie encore 30 min à la température ambiante. Une légère teinte verte apparaît alors dans la solution.

Le milieu réactionnel est remplacé dans le bain de glace avant d'ajouter lentement le NaBH_4 (3 équiv) (ou le NaBH_3CN). Le mélange est laissé revenir à température ambiante puis agité ainsi pour toute la nuit. Le mélange filtré sur un coussin de celite, lavé avec du méthanol et le filtrat évaporé sous vide.

Conclusif: le mélange est repris dans l'éther et l'excès d'hydrure neutralisé avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$. La phase aqueuse extraite trois fois avec de l'éther, les fractions organiques combinées, lavées avec une solution saturée de $\text{NaCl}(\text{aq})$ puis séchées et filtrées sur du Na_2SO_4 .

Le composé triaminé (**64**) résultant est ensuite purifié par chromatographie éclair avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle dans l'hexanes (30% → 50%).

R_f: 0,22 (50% AcOEt/hexanes)

[α]_D²⁵: -4,51° (c=4,36, MeOH)

Point de fusion: 126°C

IR: (KBr, $\nu=\text{cm}^{-1}$): 3366, 2958, 1684, 1523, 1366, 1251, 1170, 1054, 748, 700.

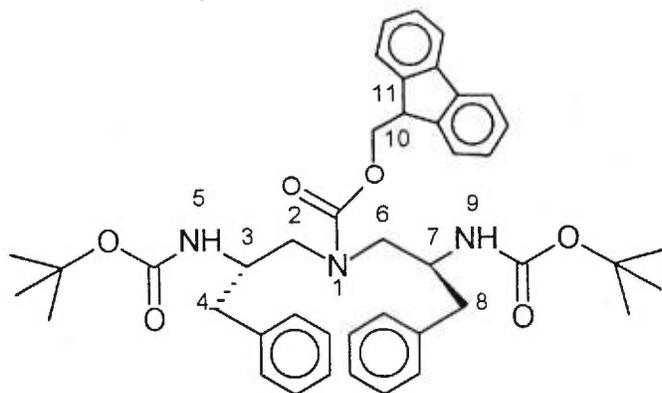
RMN: (DMSO- d_6)

-¹H (500 MHz): 3 isomères 4:1:1; 1,29 et 1,33(2s, 18H, -CH₃); 1,65(s_(signal large), 1H, -NH₍₁₎); 2,47(m, 4H, -CH₂₍₂₎); 2,62(dd, $J_{\text{gem}}=13,0$ $J_{\text{vic}}=7,2$, 2H, -CH₂₍₄₎); 2,76(dd, $J_{\text{gem}}=13,0$ $J_{\text{vic}}=5,2$, 2H, -CH₂₍₄₎); 3,63(m, 2H, -CH₍₃₎); 6,25(m, 0,2H, -NH_{(3)min.}); 6,62(m, 1,6H, -NH_{(3)maj.}); 6,78(m, 0,2H, -NH_{(3)min.}); 7,16-7,26 (m, 10H, -CH_{arom.}).

^{13}C (125 MHz): 28,34(-CH₃, Boc); 38,34(-CH₂ (4)); 51,91(-CH (3)); 52,04(-CH (3)); 52,60(-CH₂ (2)); 52,71(-CH₂ (2)); 77,49(-C-, Boc); 125,87(-C_{arom.}); 128,09(-C_{arom.}); 129,19(-C_{arom.}); 139,48(-C_{arom.}); 155,35(C=O).

Composé 65

Carbamate de (2*S*,2*S*)-*N,N*-Di-(2-*t*-butoxycarbonylamino-3-phényl-propyle)-*O*-fluorènylméthyle



À une solution de l'amine **64** (1.0 équiv) dans 75 mL de THF refroidi à 0°C sont ajoutés 2,00 g de KHCO₃ (2.1 équiv). À cette suspension, sont additionnés lentement 3,14 g de chloroformate de fluorènylméthyle (Fmoc-Cl, 1,15 équiv). Après l'addition, le bain de glace est retiré et la progression de la réaction est suivie par ccm jusqu'à complétion, soit pendant quelques min.

Conclusif: l'excès de Fmoc-Cl est neutralisé avec une solution saturée de NaHCO_{3(aq)} avant d'extraire trois fois la phase aqueuse avec de l'éther. Cette phase étherée est lavée une fois avec une solution saturée de NaCl_(aq) puis séchée et filtrée sur du Na₂SO₄.

Le composé **65** est ensuite purifié par chromatographie éclair avec un gradient d'élution d'acétate d'éthyle dans l'hexane (15% → 25%), pour obtenir un rendement de 65%.

R_f: 0,56 (30% AcOEt/hexanes)

[α]_D²⁵: -15,5⁰ (c=4,15, MeOH)

Point de fusion: 67⁰C

IR: (ν=cm⁻¹): 3419, 2968, 1701, 1504, 1244, 1166.

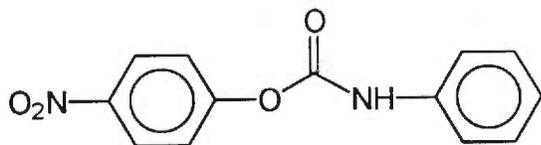
RMN: (DMSO-d₆)

-¹H (500 MHz): 2 isomères 1:1; 1,23, 1,27 et 1,29(3s, 4,5, 4,5 et 9H, -CH₃); 2,44-2,62(m, 4H, -CH₂ (4) et (8)); 3,03-3,45(m, 4H, -CH₂ (2) et (6)); 3,80-4,00(m, 2H, -CH₂ (3) et (7)); 4,21-4,32(m, 3H, -CH₂ (10) et -CH (11)); 6,31(d, J=8,9 0,5H, -NH); 6,49(d, J=9,0 0,5H, -NH); 6,62(d, J=9,0 0,5H, -NH); 6,69(d, J=9,0 0,5H, -NH); 7,08-7,38(m, 12H, -CH_{arom.}); 7,40(t, 7,1, 2H, -CH_{arom.}); 7,56-7,68(m, 2H, -CH_{arom.}); 7,85-7,90(m, 2H, -CH_{arom.}).

-¹³C (125 MHz): 27,68(-CH₃, Boc); 28,34(-CH₃, Boc); 37,72+38,94(-CH₂ (4) et (8)); 46,70(-CH (11)); 49,94-51,98(-CH (3) et (7) et -CH₂ (2) et (6)); 66,72(-CH₂ (10)); 77,46(-C-, Boc); 77,36(-C-, Boc); 120,00(-C_{arom.}); 124,93(-C_{arom.}); 125,78(-C_{arom.}); 127,05(-C_{arom.}); 127,52(-C_{arom.}); 127,91(-C_{arom.}); 128,85(-C_{arom.}); 138,72(-C_{arom.}); 140,58(-C_{arom.}); 143,82(-C_{arom.}); 155,07(C=O); 155,35(C=O); 155,56(C=O).

Composé 67

Carbamate de O-(4-nitrophényle)-N-phénylène



La synthèse du composé **67** est effectuée en utilisant la procédure générale E. À partir de 0,150 mL d'anilline, nous récupérons 0,357 g du composé **67**, soit un rendement de 81% après recristallisation dans le CH₂Cl₂/hexanes.

R_f: 0,33 (20% AcOEt/hexanes)

Point de fusion: 137 °C

IR: (KBr, $\nu = \text{cm}^{-1}$): 3302, 3112, 3070, 1714, 1595, 1526, 1489, 1347, 1202, 1010, 754, 693.

RMN: (CDCl₃)

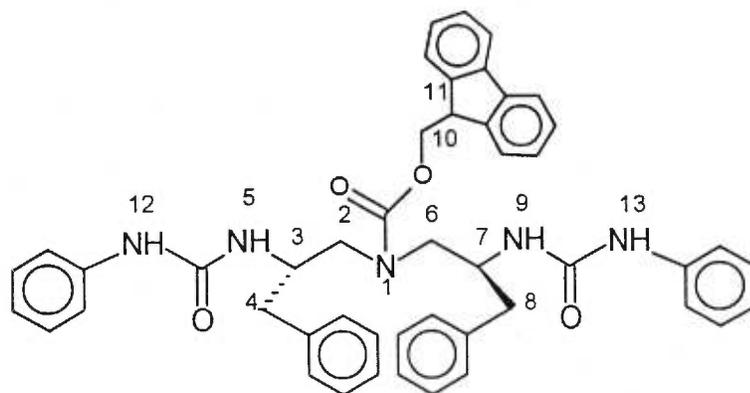
-¹H (500 MHz): 2 isomères 4:1; 6,47(s_(signal large), 0,2H, -NH_(min.)); 7,06(s_(signal large), 0,8H, -NH_(maj.)); 6,89(d, J=9,1, 0,4H, -CH_{arom.(min.)}); 7,16(t, J=7,4, 1H, -CH_{arom.}); 7,33-7,46(m, 5H, -CH_{arom.}); 7,34(d, J=9,1, 1,6H, -CH_{arom.}); 8,14(d, J=9,1, 0,4H, -CH_{arom.(min.)}); 8,27(d, J=9,1, 1,6H, -CH_{arom.(maj.)}).

-¹³C (125 MHz): 115,67(-C_{arom.}); 119,08(-C_{arom.}); 121,69(-C_{arom.}); 122,18(-C_{arom.}); 124,64(-C_{arom.}); 125,27(-C_{arom.}); 126,22(-C_{arom.}); 129,35(-C_{arom.}); 136,63(-C_{arom.}); 145,13(-C_{arom.}); 150,22(-C_{arom.}); 155,40(C=O).

SM HR(EI: 70eV): m/e calculée pour C₁₃H₁₀N₂O₄: 257,0560; m/e trouvée 258,0643 (MH⁺).

Composé 68

Carbamate de (2*S*,2*S*)-*N,N*-di-(2-phénylcarbamoylamino-3-phényl-propyle)-
O-fluorènylméthyle



La synthèse du composé **68** est effectuée à partir de 0,200 g du composé **65** en utilisant successivement la procédure générale C et les manipulations suivantes. Le produit brut obtenu de la procédure C est solubilisé dans le DMF avant d'ajouter 0,130 g de KHCO_3 (2,3 équiv). Le mélange est agité pendant 15 min puis 0,294 g du composé **67** (2,0 équiv) sont additionnés. La réaction est poursuivie ainsi pour 3,5 h.

Conclusif: le mélange est dilué dans cinq fois son volume avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ et la solution est extraite avec trois portions d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont combinées et lavées une fois avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$, et une autre fois avec la saumure. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide.

L'urée **68** est purifiée par chromatographie éclair avec un gradient d'éluant en acétate d'éthyle dans l'hexane (30% → 50%) pour obtenir 0,201 g de **68**, soit avec un rendement de 66%.

R_f: 0,18 (30% AcOEt/hexanes)

[α]_D²⁵: -15,5° (c=4,15, MeOH)

Point de fusion: 67°C

IR: (ν=cm⁻¹): 3419, 2968, 1701, 1504, 1244, 1166.

RMN: (Acétone-d₆)

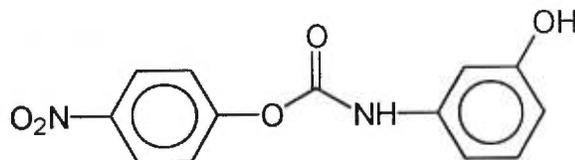
-¹H (500 MHz): 2,62-2,86(m, 4H, -CH₂ (4) et (8)); 3,42-3,61(m, 4H, -CH₂ (2) et (6)); 4,21-4,43(m, 5H, -CH₍₃₎ et (7) et -CH₂ (10) et -CH (11)); 5,66-5,76(m, 2H, -NH (5) et 9); 6,90(q, J=7,3, 2H, -CH_{arom}); 7,11-7,61(m, 26H, -CH_{arom} et -NH (12) et (13)); 7,81(d, J=7,3, 2H, -CH_{arom}).

-¹³C (125 MHz): 2 isomères; 37,57(-CH₂ (4) et (8)); 45,97(-CH (11)); 48,78 et 49,54(-CH (3) et (7)); 50,01+50,53+51,05(-CH₂ (2) et (6)); 65,92(-CH₂ (10)); 117,16(-C_{arom}.); 117,26(-C_{arom}.); 118,67(-C_{arom}.); 120,31(-C_{arom}.); 123,82(-C_{arom}.); 124,84(-C_{arom}.); 124,91(-C_{arom}.); 125,93(-C_{arom}.); 126,34(-C_{arom}.); 126,93(-C_{arom}.); 126,99(-C_{arom}.); 127,33(-C_{arom}.); 128,05(-C_{arom}.); 137,35(-C_{arom}.); 139,18(-C_{arom}.); 139,98(-C_{arom}.); 143,00(-C_{arom}.); 143,20(-C_{arom}.); 153,78(C=O); 154,10(C=O); 155,44(C=O); 155,71(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₄₇H₄₅N₅O₄: 743,355; fragment m/e trouvée 336,1716 (M⁺-Fmoc-(PhNH)₂: m/e théorique 336,1712).

Composé 69

Carbamate de *N*-(3-hydroxyphényl)-*O*-(4-nitrophényl)



La synthèse du composé **69** est réalisée en utilisant la procédure générale E. À partir de 1,00 g de *m*-aminophénol, nous récupérons 1,42 g du composé **69**, soit un rendement de 56% après recristallisation dans CH₂Cl₂/hexanes.

R_f: 0,26 (30% AcOEt/hexanes)

Point de fusion: 168 °C

IR: (KBr, $\nu = \text{cm}^{-1}$): 3291, 3090, 1728, 1615, 1549, 1450, 1354, 1154, 1011, 862.

RMN: (CDCl₃)

-¹H (500 MHz): 6,54(d, J=10,2, 1H, -CH_{arom.}); 7,00(d, J=9,1, 2H, -CH_{arom.}); 7,10(d, J=7,2, 1H, -CH_{arom.}); 7,17(s, 1H, -CH_{arom.}); 7,46(d, J=9,1, 2H, -CH_{arom.}); 8,26(m, 1H, -CH_{arom.}); 8,47(s_(signal large), 1H, -OH), 9,22(s_(signal large), 1H, -NH).

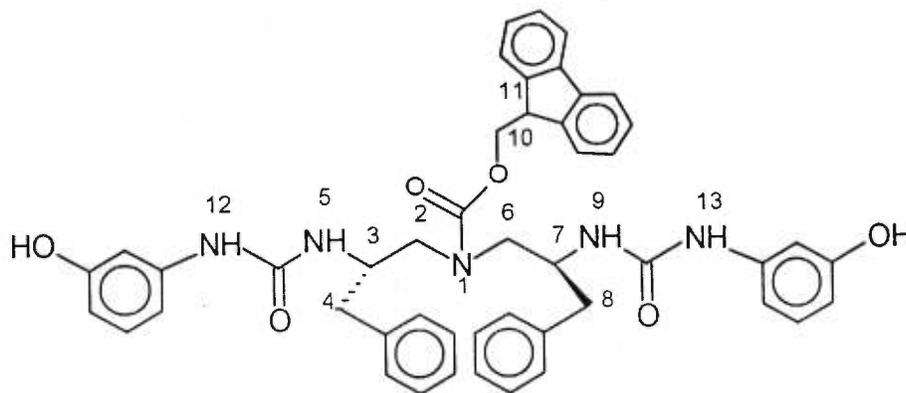
-¹³C (125 MHz): 106,20(-C_{arom.}); 110,21(-C_{arom.}); 110,94(-C_{arom.});

122,79(-C_{arom.}); 125,21(-C_{arom.}); 126,20(-C_{arom.}); 129,61(-C_{arom.}); 139,63(-C_{arom.}); 145,22(-C_{arom.}); 150,66(-C_{arom.}); 156,23(-C-OH_{arom.}); 158,22(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₁₃H₁₀N₂O₅: 274,0610; fragment m/e trouvée 245,0923 (MNH₄⁺-NO₂-H): m/e théorique 254,0926).

Composé 70

Carbamate de (2*S*,2*S*)-*N,N*-di-[2-(3-hydroxyphényl)carbamoylamino-3-phényl-propyle]-*O*-fluorénylméthyle



La synthèse du composé **70** est réalisée suivant les mêmes procédures que celles décrites pour la préparation du composé **68** mais en utilisant 0,150 g du composé **65**.

L'urée **70** est purifiée par chromatographie éclair (50% d'acétate d'éthyle dans l'hexane, pour obtenir 72,0 mg de **70** dans un rendement de 44%.

R_f: 0,36 (50% AcOEt/hexanes)

[α]_D²⁵: -7,17⁰ (c=4,49, MeOH)

Point de fusion: 148°C

IR: (ν=cm⁻¹): 3334, 3062, 2939, 1669, 1605, 1549, 1494, 1444, 1229, 1156, 742, 696.

RMN: (DMSO-d₆)

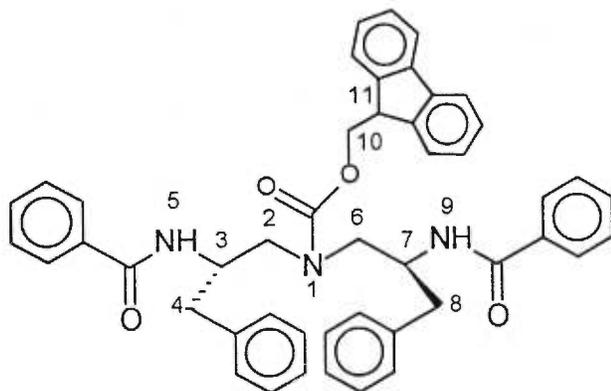
^1H (500 MHz): 2,52-2,76(m, 4H, $-\text{CH}_2$ (4) et (8)); 3,25-3,45(m, 4H, $-\text{CH}_2$ (2) et (6)); 4,09-4,30(m, 5H, $-\text{CH}$ (3) et (7) et $-\text{CH}_2$ (10) et $-\text{CH}$ (11)); 5,80-5,90(m, 2H, $-\text{NH}$ (5) et 9); 6,28(d, $J=7,6$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 6,63-6,68(m, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 6,91-6,96(m, 4H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 7,04-7,24(m, 12H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 7,35(m, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 7,50 et 7,53(2d, $J=7,4$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 7,84(m, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$); 8,23 et 8,28(2s, 2H, OH); 9,16 et 9,17(2s, 2H, $-\text{NH}$ (12) et (13)).

^{13}C (125 MHz): 2 isomères; 38,32+38,56($-\text{CH}_2$ (4) et (8)); 46,77($-\text{CH}$ (11)); 48,38+48,79($-\text{CH}$ (3) et (7)); 49,56+50,51+51,00+51,37($-\text{CH}_2$ (2) et (6)); 68,16($-\text{CH}_2$ (10)); 104,82($-\text{C}_{\text{arom}}$); 105,24($-\text{C}_{\text{arom}}$); 108,24($-\text{C}_{\text{arom}}$); 108,52($-\text{C}_{\text{arom}}$); 108,91($-\text{C}_{\text{arom}}$); 120,09($-\text{C}_{\text{arom}}$); 125,04($-\text{C}_{\text{arom}}$); 126,11($-\text{C}_{\text{arom}}$); 127,18($-\text{C}_{\text{arom}}$); 127,60($-\text{C}_{\text{arom}}$); 128,19($-\text{C}_{\text{arom}}$); 129,12($-\text{C}_{\text{arom}}$); 129,48($-\text{C}_{\text{arom}}$); 128,50($-\text{C}_{\text{arom}}$); 140,72($-\text{C}_{\text{arom}}$); 141,47($-\text{C}_{\text{arom}}$); 143,91($-\text{C}_{\text{arom}}$); 144,04($-\text{C}_{\text{arom}}$); 154,71($\text{C}-\text{OH}_{\text{arom}}$); 155,96($\text{C}=\text{O}$); 156,09($\text{C}=\text{O}$); 157,72($\text{C}=\text{O}$).

SM HR(Cl: NH_3): m/e calculée pour $\text{C}_{47}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_6$: 775,3450; fragment m/e trouvée 336,1720 ($\text{M}^+ - \text{Fmoc} - (\text{HOPhNH})_2$: m/e théorique 336,1712).

Composé 72

Carbamate de (2S,2S)-*N,N*-di-(2-benzoylamino-3-phényl-propyle)-*O*-fluorénylméthyle



La synthèse du composé **72** est réalisée en utilisant successivement la procédure générale C et les manipulations suivantes, à partir de 0,400 g du composé **65**. Le produit brut obtenu de la procédure C est solubilisé dans le THF et on y ajoute 0,435 mL de diisopropyléthylamine (DIPEA, 2,25 équiv). La solution est agitée pour 5 min et on y ajoute 0,145 mL de chlorure de benzoyle (1,1 équiv). La réaction est poursuivie ainsi pour 30 min.

Conclusif: le mélange est traité par trois fois son volume avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ puis extrait avec trois portions d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont combinées et lavées une fois avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$, et une autre fois avec la saumure. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide.

Le diamide **72** est purifié par chromatographie éclair avec un gradient d'éluion d'acétate d'éthyle dans l'hexane (30% → 50%), pour obtenir 0,231 g de **72**, soit avec un rendement de 60%.

R_f: 0,53 (50% AcOEt/hexanes)

$[\alpha]_D^{25}$: 6,9⁰ (c=1,27, CHCl₃)

Point de fusion: 172 °C

IR: (ν =cm⁻¹): 3317, 3061, 3028, 2935, 1693, 1641, 1531, 1484, 1450, 1239, 1126, 1029, 742, 698.

RMN: (DMSO-d₆)

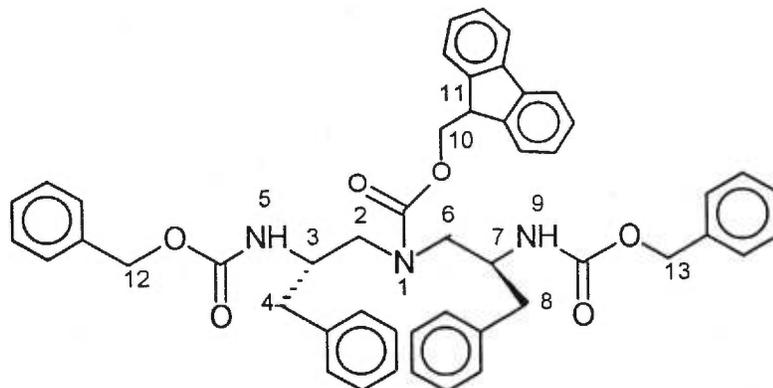
-¹H (500 MHz): 2,69-2,87(m, 4H, -CH₂ (4) et (8)); 3,39-3,64(m, 4H, -CH₂ (2) et (6)); 4,02-4,20(m, 3H, -CH₂ (10) et -CH (11)); 4,50-4,60(m, 2H, -CH(3) et (7)); 7,14-7,49(m, 24H, -CH_{arom.}); 7,52-7,54(m, 4H, -CH_{arom.}); 8,17-8,22(m, 2H, -NH (5) et 9).

-¹³C (125 MHz): 2 isomères; 37,47+37,74(-CH₂ (4) et (8)); 46,63+46,69(-CH (11)); 49,05+49,23

(-CH (3) et (7)); 50,17+50,44+50,81+51,36(-CH₂ (2) et (6)); 66,94(-CH₂ (10)); 120,08(-C_{arom.}); 125,01(-C_{arom.}); 126,01(-C_{arom.}); 127,12(-C_{arom.}); 127,61(-C_{arom.}); 128,09(-C_{arom.}); 128,22(-C_{arom.}); 129,99(-C_{arom.}); 130,89(-C_{arom.}); 131,02(-C_{arom.}); 134,80(-C_{arom.}); 138,80(-C_{arom.}); 140,65(-C_{arom.}); 143,87(-C_{arom.}); 155,86(C=O); 156,02(C=O); 166,19(C=O).

Composé 74

Carbamate de (2S,2S)-di-*N,N*-(2-benzyloxycarbonylamino-3-phénylpropyle)-*O*-fluorénylméthyle



La synthèse du composé **74** est réalisée en utilisant successivement la procédure générale C et les manipulations suivantes, à partir de 0,400 g du composé **65**. Le produit brut obtenu de la procédure C est solubilisé dans le THF et on y ajoute 0,415 mL de diisopropyléthylamine (DIPEA, 2,1 équiv). La réaction est agitée pour 5 min et on y ajoute 0,380 mL de chlorure de benzyle (2,0 équiv). La réaction est poursuivie ainsi pour 30 min.

Conclusif: le mélange est traité avec trois fois son volume d'une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ puis extrait avec trois portions d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont combinées et lavées une fois avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$, et une autre fois avec la saumure. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide.

Le carbamate **74** est purifié par chromatographie éclair (25% d'acétate d'éthyle dans l'hexane, pour obtenir 0,286 g de **74**, soit avec un rendement de 66%.

R_f : 0,29 (30% AcOEt/hexanes)

$[\alpha]_D^{25}$: -7,9⁰ (c=4,39, CHCl₃)

Point de fusion: 68 °C

IR: (ν =cm⁻¹): 3337, 3030, 2939, 1704, 1516, 1452, 1238, 1124, 1044, 741, 698.

RMN: (DMSO-d₆)

-¹H (500 MHz): 2,61(m, 4H, -CH₂ (4) et (8)); 3,16(m, 4H, -CH₂ (2) et (6)); 3,96-4,02(m, 2H, -CH₍₃₎ et (7)); 4,25-4,33(m, 3H, -CH₂ (10) et -CH (11)); 4,81-4,97(m, 4H, -CH₂ (12) et (13)); 7,01-7,41(m, 26H, -CH_{arom.}+ -NH (5) et (9)); 7,57(m, 2H, -CH_{arom.}); 7,88(d, J=7,5, 2H, -CH_{arom.}).

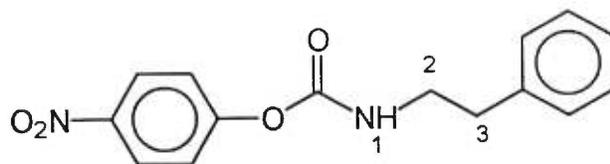
-¹³C (125 MHz): 2 isomères; 37,72(-CH₂ (4) et (8)); 46,77+46,84(-CH (11)); 50,73+50,86+51,59

+52,22(-CH₂ (2) et (6) et -CH (3) et (7)); 64,92(-CH₂ (12) et (13)); 66,84(-CH₂ (10)); 120,12(-C_{arom.}); 125,10(-C_{arom.}); 126,04(-C_{arom.}); 127,16(-C_{arom.}); 127,28(-C_{arom.}); 127,38(-C_{arom.}); 127,64(-C_{arom.}); 128,10(-C_{arom.}); 128,29(-C_{arom.}); 129,02(-C_{arom.}); 137,31(-C_{arom.}); 138,54(-C_{arom.}); 138,74(-C_{arom.}); 140,74(-C_{arom.}); 143,97(-C_{arom.}); 144,05(-C_{arom.}); 155,62(C=O); 155,80(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₃₆H₄₃N₅O₂: 773,3550; fragment m/e trouvée 552,2855 (MH⁺-Fmoc: m/e théorique 552,2862).

Composé 75

Carbamate de *N*-phénéthyle-*O*-(4-nitrophényle)



La synthèse du composé **75** est effectuée en utilisant la procédure générale E. À partir de 1,04 mL de phénéthylamine, nous récupérons 1,96 g du composé **75**, soit un rendement de 83% après purification par recristallisation dans le dichlorométhane/hexanes).

R_f: 0,20 (30% AcOEt/hexanes)

Point de fusion: 108 °C (déc.)

IR: (KBr, $\nu = \text{cm}^{-1}$): 3346, 3083, 3027, 1707, 1621, 1532, 1488, 1353, 1213, 882, 697.

RMN: (CDCl₃)

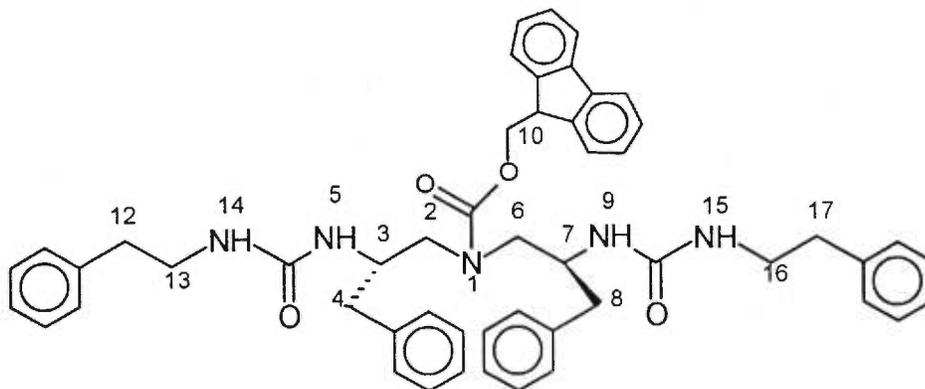
-¹H (500 MHz): 2,89(t, J=6,6, 2H, -CH₂(₃)); 3,59(m, 2H, -CH₂(₂)); 5,30(m, 1H, -NH(₁)); 7,12-7,34(m, 7H, -CH_{arom.}); 8,7(d, J=8,4, 2H, -CH_{arom.}).

-¹³C (125 MHz): 35,71(-CH₂(₃)); 42,37(-CH₂(₂)); 115,48(-C_{arom.}); 116,04(-C_{arom.}); 121,87(-C_{arom.}); 125,01(-C_{arom.}); 126,70(-C_{arom.}); 128,71(-C_{arom.}); 138,17(-C_{arom.}); 144,62(-CH_{arom.}); 153,03(C-O_{arom.}); 155,91(C=O_{arom.}).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₁₅H₁₄N₂O₄: 286,0952; m/e trouvée 287,1036 (MH⁺).

Composé 76

Carbamate de (2S, 2S)-N,N-di-(2-phénéthylcarbamoylamino-3-phénylpropyle)-O-fluorènylméthyle



La synthèse du composé **76** est réalisée en utilisant successivement la procédure générale C et les manipulations suivantes, à partir de 0,400 g du composé **65**. Le produit brut obtenu de la procédure C est solubilisé dans le DMF et on y ajoute 0,210 mL de diisopropyléthylamine (DIPEA, 1,0 équiv). La réaction est agitée pour 15 min, et on y ajoute 0,280 g de KHCO_3 (5 équiv) et 0,225 g du composé **75** (1,1 équiv). La réaction est poursuivie ainsi pour 3,5 h.

Conclusif: le mélange est dilué dans cinq fois son volume avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ puis extrait avec trois portions d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont combinées et lavées une fois avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$, et une autre fois avec la saumure. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide.

L'urée **76** est purifiée par chromatographie éclair (50% d'acétate d'éthyle dans l'hexanes, pour obtenir 0,282 g de **76** dans un rendement de 63%.

R_f : 0,16 (50% AcOEt/hexanes)

$[\alpha]_D^{25}$: -2,87° (c=3,04, CHCl₃)

Point de fusion: 74 °C (déc.)

IR: (ν =cm⁻¹): 3333, 3061, 3027, 2931, 1943, 1877, 1805, 1690, 1640, 1554, 1495, 1451, 1243, 1126, 1084, 1030, 744, 699.

RMN: (DMSO-d₆)

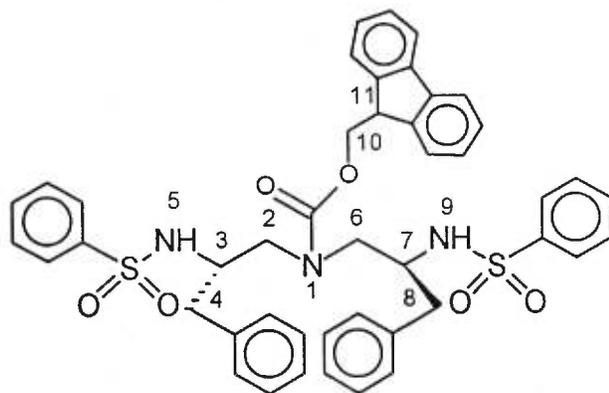
-¹H (500 MHz): 2,53(m, 8H, -CH₂ (4) et (8) et -CH₂ (12) et (17)); 3,14(m, 8H, -CH₂ (2) et (6) et -CH₂ (13) et (16)); 4,22(m, 2H, -CH (3) et (7)); 4,22-4,33(m, 3H, -CH₂ (10) et -CH (11)); 5,63-5,86(m, 4H, -NH (5), (9), (14) et (15)); 7,06-7,39(m, 24H, -CH_{arom.}); 7,55-7,62(m, 2H, -CH_{arom.}); 7,87(d, J=7,4, 2H, -CH_{arom.}).

-¹³C (125 MHz): 36,17+38,60(-CH₂ (4) et (8) et -CH₂ (12) et (17)); 40,92(-CH₂ (13) et (16)); 46,85(-CH₂ (10)); 48,61+48,92+49,66(-CH (3) et (7)); 50,74+51,74(-CH₂ (2) et (6)); 66,74(-CH₂ (11)); 120,12(-C_{arom.}); 125,08(-C_{arom.}); 125,93(-C_{arom.}); 127,16(-C_{arom.}); 127,63(-C_{arom.}); 128,07(-C_{arom.}); 128,27(-C_{arom.}); 128,67(-C_{arom.}); 129,10(-C_{arom.}); 138,77(-C_{arom.}); 139,75(-C_{arom.}); 140,74(-C_{arom.}); 143,92(-C_{arom.}); 144,18(-C_{arom.}); 155,82(C=O); 155,95(C=O); 157,54(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₅₁H₅₂N₅O₄: 798,4110; fragment m/e trouvée 336,1707 (M⁺-Fmoc-(PhCH₂CH₂NH)_{x2}: m/e théorique 336,1712); fragment m/e trouvée 457,2600 (M⁺-Fmoc-PhCH₂CH₂NH: m/e théorique 457,2603);

Composé 78

Carbamate de (2*S*, 2*S*)-*N,N*,-di-(2-phénylsulfonylamino-3-phényl-propyle)-*O*-fluorènylméthyle)



La synthèse du composé **78** est effectuée en utilisant successivement la procédure générale C et les manipulations suivantes, à partir de 0,400 g du composé **65**. Le produit brut obtenu de la procédure C est solubilisé dans le THF et 0,435 mL de diisopropyléthylamine (DIPEA, 2,25 équiv) sont ajoutés. La solution est agitée pendant 5 min puis 0,317 mL de chlorure de benzène sulfonyle (2,2 équiv) sont ajoutés. La réaction est poursuivie ainsi pour 30 min.

Conclusif: le mélange est traité avec trois fois son volume d'une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$ puis extrait avec trois portions d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont combinées et lavées une fois avec une solution saturée de $\text{NaHCO}_{3(\text{aq})}$, et une autre fois avec la saumure. La phase organique est ensuite séchée et filtrée sur du Na_2SO_4 , puis évaporée sous vide.

Le sulfonamide **78** est purifié par chromatographie éclair avec un gradient d'éluion d'acétate d'éthyle dans l'hexanes (20%→30%), pour obtenir 0,205 g de **72** (un rendement de 46%).

R_f: 0,10 (20% AcOEt/hexanes)

[α]_D²⁵: -12,1⁰ (c=25,48, CHCl₃)

Point de fusion: 184 °C

IR: (ν=cm⁻¹): 3280, 3062, 3028, 2933, 1956, 1901, 1811, 1687, 1603, 1478, 1440, 1325, 1245, 1087, 1030, 964, 749, 694.

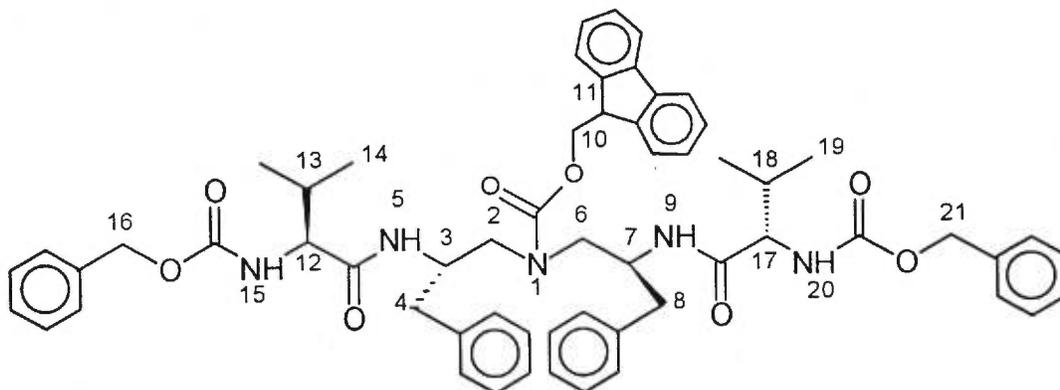
RMN: (DMSO-d₆)

-¹H (500 MHz): 2 isomères 1:1; 2,35(m, 1H, -CH₂ (4) et (8)); 2,43-2,55(m, 1H, -CH₂ (4) et (8)); 2,67(m, 2H, -CH₂ (4) et (8)); 3,00(m, 1H, -CH₂ (2) et (6)); 3,18-3,44(m, 3H, -CH₂ (2) et (6)); 3,60(m, 0,5H, -CH₂ (3) et (7)); 3,74(m, 0,5H, -CH₂ (3) et (7)); 4,05-4,26(m, 4H, -CH₂ (10), -CH (11) et -CH (3) et (7)); 6,92-7,66(m, 25H, -CH_{arom.}); 7,75(m, 0,5H, -NH (5) et (9)); 7,81(m, 0,5H, -NH (5) et (9)); 7,88(m, 3H, -CH_{arom.}); 9,12(m, 0,5H, -NH (5) et (9)); 9,23(m, 0,5H, -NH (5) et (9)).

-¹³C (125 MHz): 2 isomères; 36,67+ 39,80(-CH₂ (4) et (8)); 46,55+46,77(-CH₂ (10)); 49,76+49,88+50,90+51,62+52,20+ 53,17+54,26+54,43(-CH₂ (2) et (6) et -CH (3) et (7)); 66,94(-CH₂ (11)); 120,12-153,4(-C_{arom.}).

Composé 80

Carbamate de (2S, 2S)-N,N-di[2-(N'-benzyloxycarbonyl-L-valinyl)amino-3-phényl-propyle]-O-fluorènylméthyle



La synthèse du composé **80** est effectuée en utilisant successivement les procédures générales C et A, mais au lieu d'utiliser 1,05 équiv de Et_3N nous avons utilisé 2,0 équiv de KHCO_3 . À partir de 0,100 g du composé **65**, nous récupérons 0,124 g de l'inhibiteur **32**, soit un rendement de 89% après purification par chromatographie éclair (30% acétate d'éthyle/hexanes).

R_f: 0,69 (30% AcOEt/ CH_2Cl_2)

[α]_D²⁵: -22,3⁰ (c=0,44, 10% DMSO/MeOH)

Point de fusion: 165 °C (déc.)

IR: ($\nu=\text{cm}^{-1}$): 3306, 3063, 3031, 2950, 1687, 1645, 1527, 1453, 1246, 1133, 1033, 744, 699.

RMN: (DMSO- d_6)

-¹H (500 MHz): 2 siomères 4:1; 0,52(m, 1H, - CH_3 (14) et (19)); 0,58(m, 1H, - CH_3 (14) et (19)); 0,70(m, 10H, - CH_3 (14) et (19)); 1,65(m, 0,5H, -CH (13) et (18)min.); 1,83(m, 1,5H, -CH (13) et (18)maj.); 2,55-2,68(m, 4H, - CH_2 (4) et (8)); 3,19-3,42(m, 4H, - CH_2 (2) et (6)); 3,79(m, 2H, - CH (12) et (17)); 4,21-4,34(m, 5H, - CH (3) et (7) et - CH_2 (10) et -CH

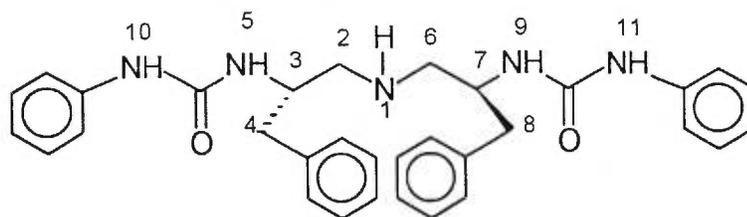
(₁₁); 4,98-5,08(m, 4H, -CH₂ (₁₆) et (₂₁)); 6,64-6,89(m, 0,5H, -NH (₁₅) et (₂₀)_{min.}); 7,04-7,41(m, 25,5H, -CH_{arom.} + -NH (₁₅) et (₂₀)_{maj.}); 7,52-7,74(m, 4H, -CH_{arom.} + -NH (₅) et (₉)); 7,88(d, J=7,1, 2H, -CH_{arom.}).

¹³C (125 MHz): 17,92+19,25+19,38(-CH₃ (₁₄) et (₁₉)); 30,24(-CH₂ (₁₃) et (₁₈)); 38,25(-CH₂ (₄) et (₈)); 46,77(-CH (₁₁)); 48,48+49,08+50,49(-CH (₃) et (₇)); 50,48+51,01(-CH₂ (₂) et (₆)); 60,45(-CH (₁₂) et (₁₇)); 65,42(-CH₂ (₁₆) et (₂₁)); 66,96(-CH₂ (₁₀)); 120,15-144,08(-C_{arom.}); 155,50(C=O); 156,10(C=O); 170,76(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₅₉H₆₅N₅O₈: 971,4950; fragment m/e trouvée 642,3647 (MH⁺-Fmoc-BnO: m/e théorique 642,3655).

Composé 81

(2S, 2S)-Di-(2-phénylcarbamoylamino-3-phényl-propyl)-amine



La synthèse du composé **81** est réalisée en utilisant la procédure générale F. Lorsque la réaction est terminée (ccm), le mélange réactionnel est évaporé sous vide, et la purification est faite par chromatographie éclair (10% méthanol/acétate d'éthyle). À partir de 35,0 mg du composé **68**, nous récupérons 17,0 mg de l'inhibiteur **81**, soit un rendement de 68%.

R_f: 0,48 (10% AcOEt/MeOH)

[α]_D²⁵: -16,7° (c=1,22, MeOH)

Point de fusion: 142⁰C (déc.)

IR: (ν =cm⁻¹): 3319, 3029, 2931, 1645, 1599, 1552, 1499, 1441, 1312, 1240, 747, 897.

RMN: (DMSO-d₆+Acétone-d₆)

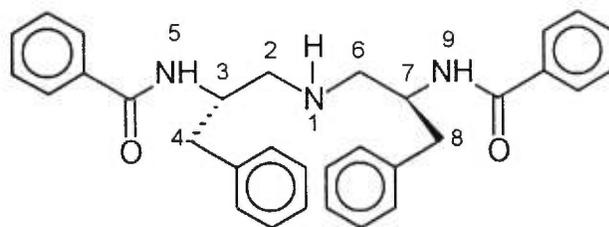
-¹H (500 MHz): 1,83(m, 1H, -NH₍₁₎); 2,59(m, 4H, -CH₂_{(2) et (6)}); 2,83(m, 4H, -CH₂_{(4) et (8)}); 3,99(m, 2H, -CH_{(3) et (7)}); 6,11(d, J=7,8, 1H, NH_{(5) ou (9)}); 6,13(d, J=8,0, 1H, NH_{(5) ou (9)}); 6,86(m, 2H, -CH_{arom.}); 7,18(m, 6H, -CH_{arom.}); 7,25(m, 8H, -CH_{arom.}); 7,42(m, 4H, -CH_{arom.}); 8,41(s, 1H, -NH_{(10) ou (11)}); 8,46(s, 1H, -NH_{(10) ou (11)}).

-¹³C (125 MHz): 38,69+38,83(-CH₂_{(4) et (8)}); 50,77+50,92(-CH_{(3) et (7)}); 52,59+52,68(-CH₂_{(2) et (6)}); 117,60(-C_{arom.}); 120,81(-C_{arom.}); 125,93(-C_{arom.}); 128,20(-C_{arom.}); 128,50(-C_{arom.}); 129,37(-C_{arom.}); 139,25(-C_{arom.}); 140,86(-C_{arom.}); 155,10(C=O); 155,16(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₃₂H₃₅N₅O₂: 521,285; fragment m/e trouvée 336,1716 (M⁺-(PhNH)_{x2}: m/e théorique 336,1712).

Composé 83

(2S, 2S)-Di-(2-benzoylamino-3-phényl-propyl)-amine



La synthèse du composé **83** est effectuée selon la procédure générale F. Pendant la réaction, des cristaux de l'amine **83** se forment. Lorsque l'analyse par ccm montre la disparition du produit de départ, on ajoute un peu d'hexane au milieu réactionnel pour compléter la précipitation. Le milieu réactionnel est refroidi à 0°C et filtré. Le solide blanc est lavé avec une solution d'éther/hexanes (30%). À partir de 46,0 mg du composé **72**, nous récupérons 29,0 mg de l'inhibiteur **83**, avec un rendement de 86%.

R_f: 0,11(50% AcOEt/CH₂Cl₂)

[α]_D²⁵: -7,9° (c=0,58, MeOH)

Point de fusion: 98 °C (déc.)

IR: (ν=cm⁻¹): 3376, 3032, 2925, 1650, 1531, 1316, 1102, 705, 642.

RMN: (DMSO-d₆)

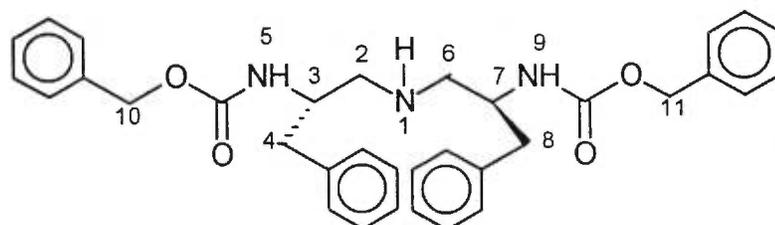
-¹H (500 MHz): 1,91(m, 1H, -NH₍₁₎); 2,68(m, 4H, -CH₂_{(2) et (6)}); 2,82(m, 2H, -CH₂_{(4) et (8)}); 2,91(dd, J_{gem}=13,9 J_{vic}=4,9, 2H, -CH₂_{(4) et (8)}); 4,23(m, 2H, -CH_{(3) et (7)}); 7,14(m, 2H, -CH_{arom.}); 7,22(m, 8H, -CH_{arom.}); 7,40(m, 4H, -CH_{arom.}); 7,48(m, 2H, -CH_{arom.}); 7,74(m, 4H, -CH_{arom.}); 8,50(m, 2H, -NH_{(5) et (9)}).

-¹³C (125 MHz): 38,01(-CH₂_{(4) et (8)}); 51,13(-CH_{(3) et (7)}); 52,48+52,61 (-CH₂_{(2) et (6)}); 125,90(-C_{arom.}); 127,23(-C_{arom.}); 129,13(-C_{arom.}); 131,93(-C_{arom.}); 134,94(-C_{arom.}); 139,44(-C_{arom.}); 166,13(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₃₂H₃₄N₃O₂: 492,2651; m/e trouvée 492,2647 (MH⁺).

Composé 84

(2S, 2S)-Di-(2-benzyloxycarbonylamino-3-phényl-propyl)-amine



La synthèse du composé **84** est réalisée d'après la procédure générale F. Lorsque l'analyse par ccm montre la disparition du produit de départ, le milieu réactionnel est évaporé sous vide. À partir de 0,150 g du composé **74**, nous récupérons 94,0 mg de l'inhibiteur **84**.

Le composé **84** est purifié par recristallisation dans un mélange CH₂Cl₂/hexanes avec un rendement de 82%.

R_f: 0,15 (50% AcOEt/hexanes)

[α]_D²⁵: -4,8⁰ (c=1,29, CHCl₃)

Point de fusion: > 250 °C

IR: (ν=cm⁻¹): 3326, 3061, 3029, 2936, 2852, 1693, 1534, 1254, 1051, 742, 698.

RMN: (DMSO-d₆)

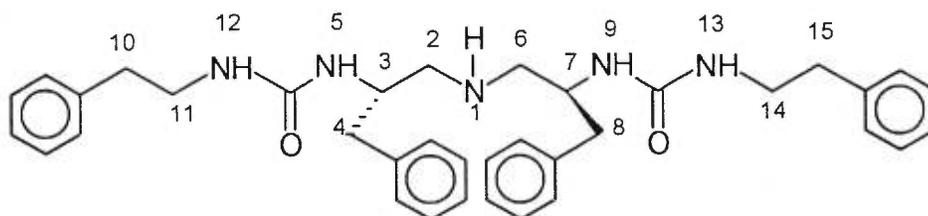
-¹H (500 MHz): 2,84(m, 4H, -CH₂ (4) et (8)); 3,06(m, 4H, -CH₂ (2) et (6)); 3,25(m, 1H, NH₍₁₎); 4,12(m, 2H, -CH₍₃₎ et (7)); 4,96(d, J_{gem}=12,8, 2H, -CH₂ (10) et (11)); 5,04(d, J_{gem}=12,8, 2H, -CH₂ (10) et (11)); 7,19-7,29(m, 20H, -CH_{arom.}); 7,31(d, J=7,1, 2H, -NH₍₅₎ et (9)).

^{13}C (125 MHz): 38,43(-CH₂ (4) et (8)); 50,20(-CH (3) et (7)); 51,57(-CH₂ (2) et (6)); 65,71(-CH₂ (10) et (11)); 126,54(-C_{arom.}); 127,78(-C_{arom.}); 128,42(-C_{arom.}); 128,47 (-C_{arom.}); 129,49(-C_{arom.}); 137,28(-C_{arom.}); 156,27(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₃₄H₃₈N₃O₄: 552,2862; m/e trouvée 552,2855 (MH⁺).

Composé 85

(2S, 2S)-Di-(2-phénéthylcarbamoylamino-3-phényl-propyl)-amine



La synthèse du composé **85** est effectuée en utilisant la procédure générale F. Lorsque l'analyse par ccm montre la disparition du produit de départ, le milieu réactionnel est évaporé sous vide. À partir de 59,0 mg du composé **76**, nous récupérons 34,0 mg de l'inhibiteur **85** (rendement de 80%).

Le composé **85** est purifié par recristallisation dans un mélange CH₂Cl₂/hexanes.

R_f: 0,12 (50% AcOEt/CH₂Cl₂)

[α]_D²⁵: -3,2⁰ (c=0,41, MeOH)

Point de fusion: 145 °C (déc.)

IR: (ν=cm⁻¹): 3320, 3060, 3026, 2929, 1631, 1567, 1226, 748, 699.

RMN: (DMSO-d₆)

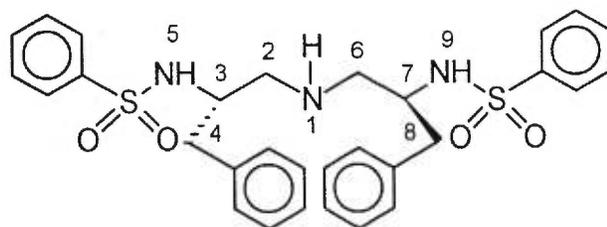
¹H (500 MHz): 1,74(m, 1H, -NH₍₁₎); 2,43(m, 4H, -CH₂_{(2) et (6)}); 2,63(m, 6H, -CH₂_{(4) et (8)} et -CH₂_{(10) et (15)}); 2,63(m, 2H, -CH₂_{(4) et (8)}); 3,19(m, 4H, -CH₂_{(11) et (14)}); 3,79(m, 2H, -CH_{(3) et (7)}); 5,80(m, 4H, -NH_{(5), (9), (12) et (13)}); 7,17-7,26(m, 20H, -CH_{arom.}).

¹³C (125 MHz): 36,22(-CH₂_{(10) et (15)}); 38,69(-CH₂_{(4) et (8)}); 40,95(-CH₂_{(11) et (14)}); 50,68(-CH_{(3) et (7)}); 52,83(-CH₂_{(2) et (6)}); 125,86(-C_{arom.}); 125,98(-C_{arom.}); 128,10(-C_{arom.}); 128,31(-C_{arom.}); 128,70(-C_{arom.}); 129,26(-C_{arom.}); 139,34(-C_{arom.}); 139,82(-C_{arom.}); 157,72(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₃₆H₄₃N₅O₂: 577,3490; fragment m/e trouvée 457,2609 (M⁺-PhCH₂CH₂NH: m/e théorique 547,2603).

Composé 86

(2S, 2S)-Di-(2-phénylsulfonylamino-3-phényl-propyl)-amine



La synthèse du composé **86** est réalisée en utilisant la procédure générale F. Lorsque l'analyse par ccm montre la disparition du produit de départ, le milieu réactionnel est évaporé sous vide. À partir de 59,0 mg du composé **78**, nous récupérons 34,0 mg de l'inhibiteur **86** (rendement de 69%).

Le composé **86** est purifié par recristallisation dans un mélange CH_2Cl_2 /hexanes.

R_f : 0,18 (50% AcOEt/hexanes)

$[\alpha]_D^{25}$: -17° ($c=0.94$, MeOH)

Point de fusion: 107 °C (déc.)

IR: ($\nu=\text{cm}^{-1}$): 3303, 3074, 2930, 1714, 1553, 1451, 1322, 1212, 1159, 1092, 751, 699.

RMN: (DMSO- d_6)

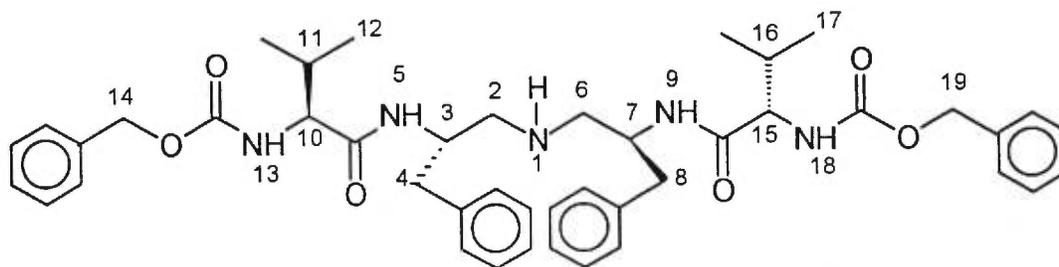
^1H (500 MHz): 1,80(m, 1H, $-\text{NH}_{(1)}$); 2,37(m, 2H, $-\text{CH}_2_{(2)}$ et (6)); 2,43(m, 2H, $-\text{CH}_2_{(2)}$ et (6)); 2,54(m, 1H, $-\text{CH}_2_{(4)}$ et (8)); 2,61(dd, $J_{\text{gem}}=14,0$ $J_{\text{vic}}=7,1$, 1H, $-\text{CH}_2_{(4)}$ et (8)); 2,79(m, 2H, $-\text{CH}_2_{(4)}$ et (8)); 3,3(m, 1H, $-\text{CH}_{(3)}$ ou (7)); 3,90(m, 1H, $-\text{CH}_{(3)}$ ou (7)); 7,05-7,30(m, 16H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$ et $-\text{NH}_{(5)}$ ou (9) .); 7,47(t, $J=7,5$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$.); 7,55(m, 1H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$.); 7,69(d, $J=7,5$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom}}$.); 9,06(m, 1H, $-\text{NH}_{(5)}$ et (9)).

^{13}C (125 MHz): 37,23+38,50($-\text{CH}_2_{(4)}$ et (8)); 51,65+51,92($-\text{CH}_2_{(2)}$ et (6) et $-\text{CH}_{(3)}$ ou (7)); 54,93+55,12($-\text{CH}_{(3)}$ ou (7)); 126,10($-\text{C}_{\text{arom}}$.); 126,20($-\text{C}_{\text{arom}}$.); 126,32($-\text{C}_{\text{arom}}$.); 128,61($-\text{C}_{\text{arom}}$.); 129,10($-\text{C}_{\text{arom}}$.); 129,17($-\text{C}_{\text{arom}}$.); 132,11($-\text{C}_{\text{arom}}$.); 138,35($-\text{C}_{\text{arom}}$.); 141,60($-\text{C}_{\text{arom}}$.).

SM HR(Cl: NH_3): m/e calculée pour $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$: 563,1911; m/e trouvée 564,1983 (MH^+).

Composé 87

(2S,2S)-Di-[(2-(*N'*-benzyloxycarbonyl-L-valinyl)-amino-3-phényl-proyl)]-amine



La synthèse du composé **87** est effectuée en utilisant la procédure générale F. Lorsque l'analyse par ccm montre la disparition du produit de départ, le milieu réactionnel est évaporé sous vide. À partir de 85,5 mg du composé **80**, nous récupérons 43,0 mg de l'inhibiteur **87**.

Celui-ci a été purifié par recristallisation dans un mélange THF/hexanes, pour obtenir un rendement de 65%.

R_f: 0,11 (50% AcOEt/CH₂Cl₂)

[α]_D²⁵: -11⁰ (c=0,57, 10% DMSO/THF)

Point de fusion: 218 °C (déc.)

IR: (ν=cm⁻¹): 3295, 3063, 3031, 2959, 2871, 1693, 1649, 1535, 1293, 1243, 1036, 740, 699.

RMN: (DMSO-d₆)

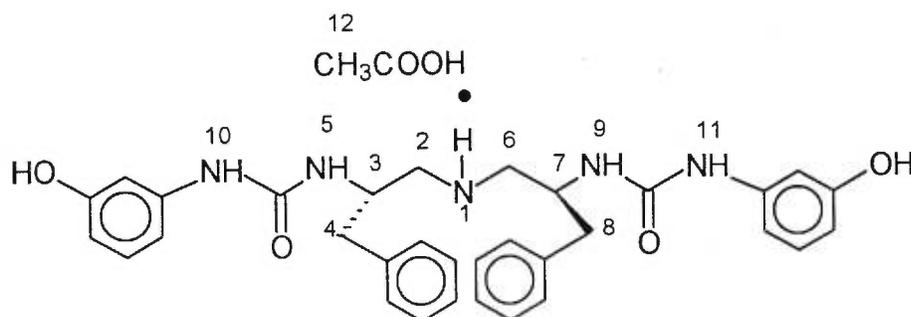
-¹H (500 MHz): 0,78(s, 12H, -CH₃ (12) et (17)); 1,65(m, 1H, -NH (1)); 1,86(m, 2H, -CH (11) et (16)_{min.}); 2,47(m, 4H, -CH₂ (2) et (6)); 2,64(dd, J_{gem}=13,2 J_{vic}=7,7, 2H, -CH₂ (4) et (8)); 2,82(dd, J_{gem}=13,2 J_{vic}=4,6, 2H, -CH₂ (4) et (8)); 3,76(t, J=8,1, 2H, -CH (10) et (15)); 3,92(m, 2H, -CH (3) et (7)); 5,03(s, 4H, -CH₂ (14) et (19)); 7,12-7,21(m, 12H, -CH_{arom.} + -NH (13) et (18)); 7,30-7,35(m, 10H, -CH_{arom.}); 7,72(d, J=8,1, 2H, -NH (5) et (9)).

^{13}C (125 MHz): 18,29+19,21(-CH₃ (12) et (17)); 30,27(-CH₂ (11) et (16)); 37,24(-CH₂ (4) et (8)); 50,35(-CH₂ (2) et (6)); 52,33(-CH (3) et (7)); 60,57(-CH (10) et (15)); 65,37(-CH₂ (14) et (19)); 125,88(-C_{arom.}); 127,64(-C_{arom.}); 127,78(-C_{arom.}); 128,04(-C_{arom.}); 128,35(-C_{arom.}); 129,18(-C_{arom.}); 137,18(-C_{arom.}); 139,04(-C_{arom.}); 156,05(C=O); 170,67(C=O).

SM HR(Cl: NH₃): m/e calculée pour C₄₄H₅₅N₅O₆: 749,4157; fragment m/e trouvée 642,3647 (M⁺-BnO: m/e théorique 642,3655).

Composé 82

Acétate de (2S, 2S)-di-[2-(3-hydroxyphényl)carbamoylamino-3-phénylpropyl]-ammonium



La synthèse du composé **82** est effectuée suivant la procédure générale F. Lorsque l'analyse par ccm montre la disparition du produit de départ, le milieu réactionnel est évaporé sous vide et on y ajoute un de l'acide acétique pour obtenir un pH acide. L'excès d'acide est évaporé sous vide et l'inhibiteur **82** est recristallisé dans un mélange acétone/chloroforme. À partir de 0,203 g du composé **70**, nous récupérons 64,0 mg de l'inhibiteur **82**, soit avec un rendement de 40%.

R_f: 0,29 (50% AcOEt/CH₂Cl₂, sous forme de base libre)

$[\alpha]_D^{25}$: $-7,17^0$ ($c=4,49$, MeOH)

Point de fusion: 117 °C (déc.)

IR: ($\nu=\text{cm}^{-1}$): 3313, 3046, 1664, 1605, 1560, 1495, 1448, 1253, 1158, 759, 699.

RMN: (DMSO- d_6)

^1H (500 MHz): 1,90(s, 3H, $-\text{CH}_3(12)$); 2,53(m, 4H, $-\text{CH}_2$ (2) et (6)); 2,74(dd, $J_{\text{gem}}=13,1$ $J_{\text{vic}}=6,2$, 2H, $-\text{CH}_2$ (4) et (8)); 2,81(dd, $J_{\text{gem}}=13,1$ $J_{\text{vic}}=7,0$, 2H, $-\text{CH}_2$ (4) et (8)); 2,9-4,1(m, $\approx 2\text{H}$, NH_2^+ (1)); 3,90(m, 2H, $-\text{CH}$ (3) et (7)); 6,09 et 6,10(2d, $J=7,0$, 2H, $-\text{NH}$ (5) et (9)); 6,28(d, $J=7,5$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 6,69(d, $J=7,2$, 2H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 6,89(m, 4H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 7,17-7,25(m, 10H, $-\text{CH}_{\text{arom.}}$); 8,39(s, 2H, $\text{NH}_{(10)}$ et (11)); 9,0(s (large signal), 2H, OH) .

^{13}C (125 MHz): 21,44($-\text{CH}_3(12)$); 38,47+38,60($-\text{CH}_2$ (4) et (8)); 50,50+50,64($-\text{CH}_2$ (2) et (6)); 52,59($-\text{CH}$ (3) et (7)); 104,74($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 108,18($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 108,43($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 126,01($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 128,21($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 129,27($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 130,03($-\text{C}_{\text{arom.}}$); 141,65; 154,89(C=O); 157,72(C-OH $_{\text{arom.}}$); 172,35(C=O).

SM HR(Cl: NH_3): m/e calculée pour $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_4$: 553.2750; fragment m/e trouvée 336,1720 ($\text{M}^+-(\text{HOPhNH})\times 2$: m/e théorique 336,1712).

Conclusion

Dans un premier temps, nous avons fait la synthèse d'inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1 en faisant appel à des conditions de réaction normalement utilisées dans la synthèse peptidique. Leur synthèse, comportant quelques étapes, a été réalisée à partir d'acides aminés protégés, tels la tyrosine, la phénylalanine, la glycine et l'acide glutamique, et en utilisant les réactifs de couplage EDC et HOBt. La dopamine a été introduite en position C-terminale tandis que différents groupements benzoyles hydroxylés ont été introduits en position N-terminale. Nous avons aussi synthétisé un composé comportant la dopamine en position N-terminale comme substituant mais introduite par l'intermédiaire d'une fonction urée.

Tous ces composés ont été évalués à l'aide d'un test enzymatique afin de vérifier leur potentiel d'inhibition à l'activité d'intégration de l'intégrase du VIH-1. Ce potentiel s'est avéré élevé pour certains de ces produits.

Dans un deuxième temps, nous avons fait la synthèse de dérivés d'un composé triaminé afin d'investiguer leur potentiel à inhiber la protéase du VIH-1.

La synthèse du synthon de base triaminé est faite à partir de deux résidus phénylalanine, de façon à donner une structure avec trois fonctions

amines dont deux aux extrémités (terminales) et une à la position centrale. Les fonctions N-terminales sont protégées de façon orthogonale par rapport à la fonction N-centrale, nous permettant ainsi de modifier les extrémités sans toucher l'amine centrale.

Divers réactifs acylants ont été utilisés pour substituer les positions N-terminales. Quelques dérivés, avec une fonction urée aux extrémités du synthon central, ont aussi été préparés en activant préalablement leur intermédiaire carboxylique avec le chloroformate de *p*-nitrophénoxyde.

Le test d'inhibition de la protéase du VIH-1 effectué sur ces dérivés triaminés a montré un potentiel appréciable d'inhibition pour certains de ces composés. Ces résultats encourageants confirment que nous avons en main de nouveaux composés suffisamment actifs et nous incitent à poursuivre d'autres travaux de recherche dans cette voie afin d'obtenir des inhibiteurs hautement actifs.

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche, le professeur Gilles Sauvé, pour la formation professionnelle qu'il m'a procuré et pour l'aide financière qu'il a pu m'apporter durant la réalisation de ce travail. J'apprécie beaucoup le climat amical dans lequel s'est déroulé notre collaboration et aussi toute la liberté qui m'a  t e donnée pour exprimer mes opinions et mes idées sur le présent travail.

Je remercie également le professeur Denis Gravel de bien avoir voulu accepter la co-direction de ma maîtrise.

Je voudrais remercier la Fondation Armand-Frappier pour le support financier accordé pour ce travail.

Je dois aussi un énorme et très doux merci à ma compagne, Barbara, qui m'a toujours appuyé et encouragé pendant ces deux années.

Je voudrais aussi mentionner l'aide apportée par de nombreux stagiaires de recherche dont M. Timothy Heeley-Ray, M. Andrew McClory, Mme Caroline Labonté, Mme Rawan Mourani, M. Jean-François Desrosiers, Mme Parisa Rezaiefar, M. Robert Pion et M. François Bachamp.

Je remercie aussi mes collègues du laboratoire de biologie moléculaire, pour les discussions et les diverses explications concernant le VIH, dont Dr. Jocelyn Yelle, M. Benoit Ochietti, M. Jeannot Lettre et Mme

Carole Lavigne et particulièrement M. Khampoune Sayasith pour l'évaluation de nos inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1.

Je dois aussi remercier mes collègues de travail Dr Abderrahim Bouzide, Mme Xiao-Jing Chen, Mme Xiao-Ming Fu, M. Dorin Dolejan et spécialement M. Nicolas LeBerre pour leurs conseils.

Je laisserais l'avant-dernier remerciement au professeur Jean-Pierre Gagné du Centre Océanographique de Rimouski pour m'avoir encouragé à poursuivre des études graduées.

Finalement, je remercie tous mes proches pour la compréhension et les encouragements qu'ils ont su manifester lors de la rédaction de cet ouvrage.

Bibliographie

1. L. Ratner, *Perspect. Drug Discovery Des.*, 1, 3, **1993**.
2. W. D. Hardy, *Med. Clin. North America*, 80, 1239, **1996**.
3. *Chem. Eng. News*, August 24, 26, **1992**.
4. M. J. Gait, J. Karn, *Trends Biotech. (Tibtech)*, 13, 430, **1995**.
5. B. A. Styrt, T. D. Piazza-Hepp, G. K. Chikami, *Antiviral Reaserch*, 31, 121, **1996**.
6. M. Marin, M. Etienne-Julan, M. Puchaczyk, D. Noël, *Médecine/Science*, 10, 430, **1994**.
7. J. Kulkosky, A. M. Skalka, *Pharmacol. Ther.*, 61, 185, **1994**.
8. F. Dyda, A. B. Hickman, T. M. Jenkins, A. Engelman, R. Craigie, D. R. Davies, *Science*, 266, 1981, **1994**.
9. P. O. Brown, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 157, 20, **1990**.
10. J. M. Witcomb, S. H. Hughes, *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 8, 275, **1992**.
11. R. Craigie, A. B. Hickman, A. Engelman, HIV vol. II: *A Practical Approach.*, Oxford University Press, J. Karn edition, **1995**.
12. C. Vink, *Nucleic Acids Res.*, 21, 1419, **1993**.
13. A. Mazumder, M. Gupta, D. M. Perrin, D.S. Sigman, M. Rabinovitz, Y. Pommier, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 11, 115, **1995**.
14. R. A. P. Lutzke, N. A. Eppens, P. A. Weber, R. A. Houghten, R. H. A. Plasterk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 11456, **1995**.

15. J. O. Ojang, R. W. Buckheit, Y. Pommier, A. Mazumder, K. DeVreese, J. A. Esté, D. Reymen, L. A. Pallansch, C. L. Smith, T. L. Wallace, E. DeClerq, M. S. McGarths, R. F. Rando, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 2426, **1995**.
16. R. L. LaFemina, P. L. Graham, K. LeGrow, J. Hastings, A. Wolfe, S. D. Young, E. A. Emini, D. J. Azuda, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 320, **1995**.
17. A. Mazumder, K. Raghavan, J. Weinstein, K. H. Kohn, Y. Pommier, *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 1165, **1995**.
18. A. Mazumder, A. Gazit, A. Levitzky, M. Nicklaus, J. Yung, G. Kohlhagen, Y. Pommier, *Biochemistry*, **34**, 15111, **1995**.
19. T. R. Burke Jr, M. R. Fesen, A. Mazumder, J. Wang, A. M. Carothers, D. Grunberger, J. Driscoll, K. Kohn, Y. Pommier, *J. Med. Chem.*, **88**, 4171, **1995**.
20. M. Crushman, W. M. Golebiewski, Y. Pommier, A. Mazumder, D. Reymen, E. DeClerq, L. Graham, W. G. Rice, *J. Med. Chem.*, **38**, 443, **1995**.
21. W. E. Robinson Jr, M. Cordeiro, S. Abel-Malek, Q. Jia, S. A. Chow, M. G. Reinecke, W. M. Mitchell. *Mol. Pharmacol.*, **50**, 846, **1996**.
22. P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Theime Foundation of organic chemistry, **1994**.
23. T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 2^e éd., **1991**.

24. M. Bodanszky, A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, **1984**.
25. E. Gross, J. Meienhofer, *The Peptides*, Academic Press, **1979**.
26. M. Bodanszky, *Principles of Peptides Synthesis*, Springer-Verlag, **1984**.
27. J. R. McElhanon, M.-J. Wu, M. Escobar, U. Chaudhry, G.-L. Hu, D. W. McGrath, *J. Org. Chem.*, 62, 908, **1997**.
28. T. Konoike, K. Takahashi, Y. Akaki, I. Horibe, *J. Org. Chem.*, 62, 964, **1997**.
29. C. Vink, E. yehekiely, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, R. H. A. Plasterk, *Nucleic Acids Research*, 19, 6691, **1991**.
30. M. Fesen, K. W. Kohn, F. Leteurtre, Y. Pommier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 2399, **1993**.
31. A. Engelman, R. Craigie, *J. Virol.*, 69, 5908, **1995**.
32. R. S. Randal, L. Lubkowska, T. Bhat, S. Munshi, S. V. Gulnik, B. Yu, J. W. Erickson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 1707, **1995**.
33. G. S. Bisacchi, S. Ahmad, M. Alam, A. Ash Faq, J. Barrish, P. T. W. Cheng, J. Greytok, M. Armseier, P. F. Lin, Z. Merchant, M. Skoog, S. Spergd, R. Z. Ahler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 459, **1995**.
34. A. W. Konradi, S.F.Pedersen, *J. Org. Chem.*, 57, 28, **1992**.
35. P. L. Beaulieu, D. Wernic, J.-S. Duceppe, Y. Guindon, *Tetrahedron Lett.*, 36, 3317, **1995**.

36. P. Ehmayer, M. Hüber, A. Billich, B. Rosenwirth, H. Gstach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4, 2851, **1994**.
37. P. Majer, J. Urban, E. Gregorova, J. Kovalinka, P. Noveki, J. Stehlikova, M. Adreansky, J. Sedlacek, P. Strop, *Arch. Biochem. Biophys.*, 304, 1, **1993**.
38. C. Park, J. S. Koh, Y. C. Son, H.-I. Choi, C. S. Lee, N. Choy, K.Y. Moon, W. H. Jung, S. C. Kim, H. Yoon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 1843, **1995**.
39. S. Kaldor, K. Appett, J. E. Fritz, M. Hammond, T. A. Crowell, A. J. Baxter, S. D. Hatch, M. Wiskerchan, M. A. Muesing, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 715, **1995**.
40. S. Kaldor, K. Appett, J. E. Fritz, M. Hammond, T. A. Crowell, A. J. Baxter, S. D. Hatch, M. Wiskerchan, M. A. Muesing, B. A. Dressman, J. A. Burgess, P. P. Lubenhusen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 721, **1995**.
41. V. J. Ralish, J. H. Tatlock, J. F. Davies II, S. Kaldor, B. A. Dressman, S. Reich, M. Pino, N. Nyugen, K. Appelt, L. Musick, B. W. Wu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 727, **1995**.
42. B. M. Kim, C. M. Hanifin, C. B. Zartman, J. P. Vacca, S. R. Michelson, J. H. Lin, I. W. Chen, K. Vastag, L. Drake, J. A. Zugay, E. A. Eminis, W. Schleif, P. S. Anderson, J. R. Anff, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 2239, **1995**.

43. J. E. Munroe, W. J. Hornback, B. Cambell, M. A. Ouellette, S. D. Hatch, M. A. Muestng, M. Wiskersen, J. Baxter, K. Su, K. Campanale, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 2885, **1995**.
44. D. J. Kemf, D. W. Norbeck, L. Codacovi, X. C. Wang, W. E. Kohlbrenner, N. E. Wideburg, D. A. Paul, M. F. Knigge, S. Vasavanonda, A. Craig-Rennard, A. Saldivar, W. Rosenbrook Jr., J. J. Clement, J. J. Plattner, J. Erickson, *J. Med. Chem.* 33, 2689, **1990**.
45. J. W. Erikson, D. J. Neidhardt, J. VanDrie, D. J. Kempf, X. C. Wang, D. W. Norbeck, J. J. Plattner, J. W. Rittenhouse, M. Turon, N. Wideburg, W. E. Kohlbrenner, R. Simmer, R. Helfrich, D. A. Paul, M. Knigge, *Science*, 249, 527, **1990**.
46. K. Appelt, *Perspect. Drug Discovery Des.*, 1, 23, **1993**.
47. M. Care, *Perspect. Drug Discovery Des.*, 1, 49, **1993**.
48. D. C. Chatfield, B. R. Brooks, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 5561, **1995**.
49. S. C. Pettit, S.-F. Michael, B. Swanstrom, *Perspect. Drug Discovery Des.*, 1, 3, **1993**.
50. Y. Hamada, M. Shihata, T. Narajima, *J. Org. Chem.*, 52, 1252, **1987**.
51. M. Miyashita, H. Sato, A. Yoshikoshi, T. Toki, M. Matsushita, H. Irie, T. Yanami, Y. Kikuchi, C. Takasaki, T. Narajima, *Tetrahedron Lett.*, 33, 2833, **1992**.
52. M. Miyashita, H. Sato, A. Yoshikoshi, T. Toki, M. Matsushita, H. Irie, T. Yanami, Y. Kikuchi, C. Takasaki, T. Narajima, Y. Kusumegi, T. Toki, *Tetrahedron Lett.*, 33, 2833, **1992**.

53. R. Chênevert, M. Dickman, *J. Org. Chem.*, **61**, 3332, **1996**.
54. S. J. deSolms, A. A. Deana, E. A. Guilami, S. L. Graham, N. E. Kohl, S. D. Mosser, A. I. Oliff, D. L. Pompliano, E. Rands, T. H. Scholz, J. M. Wiggins, J. B. Gilles, R. L. Smith, *J. Med. Chem.*, **38**, 3967, **1995**.
55. K. Leftheris, T. Kline, G. A. Vite, Y. H. Cho, R. S. Bhide, D. V. Patel, M. M. Patel, R. J. Schmidt, H. N. Weller, M. L. Andarazy, J. M. Carboni, J. L. Guilo-Brow, F. V. F. Lee, C. Ricca, W. C. Rose, N. Yan, M. Barbacid, J. T. Hunt, C. A. Meyers, B. R. Seminger, R. Zahler, V. Manne, *J. Med. Chem.*, **39**, 224, **1996**.
56. J.-M. Kim, Y. Bi, S. J. Paikoff, P. G. Shultz, *Tetrahedron Lett.* **37**, 5305, **1996**.
57. J. March, *Advanced Organic Chemistry (Reactions, Mechanisms and Structure)*, John Wiley and Sons, 4th ed., **1992**.
58. F. A. Carey, R. J. Sunberg, *Advanced Organic Chemistry (Structure and Mechanisms)*, Plenum Press, 2nd ed., **1983**.
59. F. A. Carey, R. J. Sunberg, *Advanced Organic Chemistry (Reactions and Synthesis)*, Plenum Press, 2nd ed., **1983**.
60. E. L. Eliel, S. H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley and Sons, **1994**.
61. J. Jurczak, A. Golebiowski, *Chem. Rev.* **89**, 149, **1989**.
62. A. Ito, R. Takahashi, Y. Baba. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3081, **1975**.
63. W. D. Lubell, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 236, **1987**.

64. E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, J. Erickson, *Science*, 247, 954, 1990.
65. W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, 64, 2229, 1976.
66. A. Bax, S. Subramanian, *J. Mag. Reson.*, 67, 177, 1986.
67. W.C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.*, 43, 2923, 1978.
68. D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, 3rd ed., 1988.
69. D. F. Shriver, *The Manipulation of Air-sensitive Compounds*, McGraw-Hill, 1979.

Annexe 1

Test d'inhibition de l'intégrase du VIH-1

Le test d'inhibition de l'intégrase qui a été utilisé pour évaluer nos inhibiteurs se résume comme suit: un substrat oligonucléotidique double brin dont l'une des extrémités se termine par une séquence 5'-CAGT-3' avec l'extrémité 5' radiomarquée est incubée avec l'intégrase (et ultimement avec l'inhibiteur) dans un tampon réactionnel; l'enzyme clive le -GT terminal (3'-*processing*) and exécute ensuite l'autointégration d'une molécule de substrat dans une autre (réaction d'intégration). Les produits de la réaction sont chargés sur un gel dénaturant de polyacrylamide-urée, séparés par électrophorèse et visualisés par autoradiographie. Les bandes correspondant à l'ADN de taille supérieure à celle du substrat de départ visibles sur le gel représentent les produits de la réaction d'intégration. Lorsque les manipulations décrites ci-dessous sont répétées avec différentes concentrations d'inhibiteur, une valeur de concentration d'inhibition peut être tirée de l'intensité des bandes de la réaction d'intégration. On peut ainsi rapporter une valeur d'IC₅₀ pour chacun de nos produits.

Le substrat synthétique dans ce test est un double brin d'ADN constitué de deux oligonucléotides complémentaires désignés S50 (5'-TGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3', radiomarqué en 5' sur le T) et S05 (5'-ACTGCTAGAGATTTTCCAC A-3'), représentant les 20 derniers nucléotides des séquences LTR du VIH-1.

Détermination de l'activité

À 0,2 pmole du substrat S50-S05 radiomarqué dans un tampon est ajouté 1 μ L de l'enzyme purifiée dans un volume total de 16 μ L. Différents lots d'enzyme et deux tampons différents ont été utilisés pour la réaction enzymatique. Le tampon 1 contient 20 mM d'acide 3-(*N*-morpholino)propane sulfonique (MOPS), pH 7,2, 10 mM dithiothréitol (DTT), 25 mM NaCl, 3 mM MnCl₂ et 10% glycérol. Le tampon 2 contient 25 mM MOPS, pH 7,2, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 7,5 mM MnCl₂, 100 μ g/mL d'albumine sérique bovine (BSA), 10% DMSO et 10% glycérol. La réaction est initiée à 4°C pour 10 min, et est poursuivie ensuite à 37°C pour 90 min. La réaction est arrêtée avec l'addition de 16 μ L du tampon de chargement pour gels contenant 95% de formamide, 30 mM d'EDTA et 0,1% de bromophénol bleu.

Les échantillons sont chauffés 5 min à 100°C et 10 μ L sont chargés sur des gels de 10 cm x 10 cm de 15% polyacrylamide contenant 7 M urée, préparés dans 89 mM Tris-HCl, pH 8,4, 89 mM d'acide borique, 1

mM de tampon d'EDTA (TBE). Les gels sont placés sur un système d'électrophorèse Bio-Rad pour approximativement deux à quatre heures. Les gels sont ensuite enveloppés dans le Saran Wrap™ et exposés à l'autoradiographie à -70°C en utilisant des films Kodak X-OMAT LS.

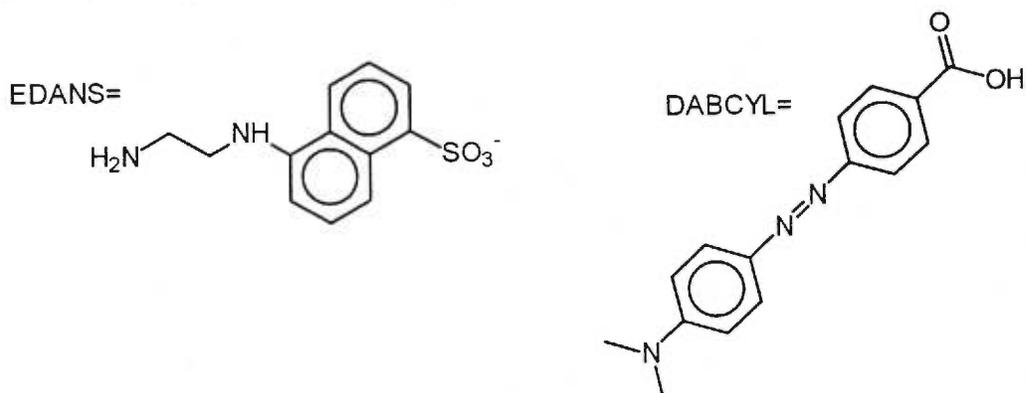
Annexe 2

Test d'inhibition de la protéase du VIH-1

Nous utilisons une méthode fluorométrique pour évaluer l'activité de nos inhibiteurs de la protéase du VIH-1. Cette méthode utilise un substrat synthétique de nature peptidique comprenant un site de clivage et deux acides aminés (AA) modifiés (de façon covalente). Sur un de ces AA a été lié un fluorophore (5-(aminoéthyl)aminonaphtalène sulfonate, EDANS), et l'autre AA modifié comprend un chromophore accepteur (4'-diméthylaminoazobenzène-4-carboxylate, DABCYL). Le chromophore accepteur absorbe la fluorescence du fluorophore sur le peptide intact, mais lorsque celui-ci est clivé par la protéase, le fluorophore est libéré et la fluorescence peut être observée à l'aide d'un fluorimètre. Le taux de clivage du substrat en présence d'un inhibiteur peut donc être évalué pour déterminer une constante d'inhibition pour les différents inhibiteurs.

Structure du substrat utilisé pour le test fluorométrique

Arg—Glu(EDANS)—Ser—Gln—Asn—Tyr*—Pro—Ile—Val—Gln—Lys(DABCYL)—Arg



Composition du tampon utilisé pour le test

- 0,1 M Sodium acétate
- 1,0 M Sodium chloride
- 1,0 mM EDTA
- 1,0 mM DTT
- 10% DMSO
- 1 mg/mL de BSA ajusté à un pH: 4,7

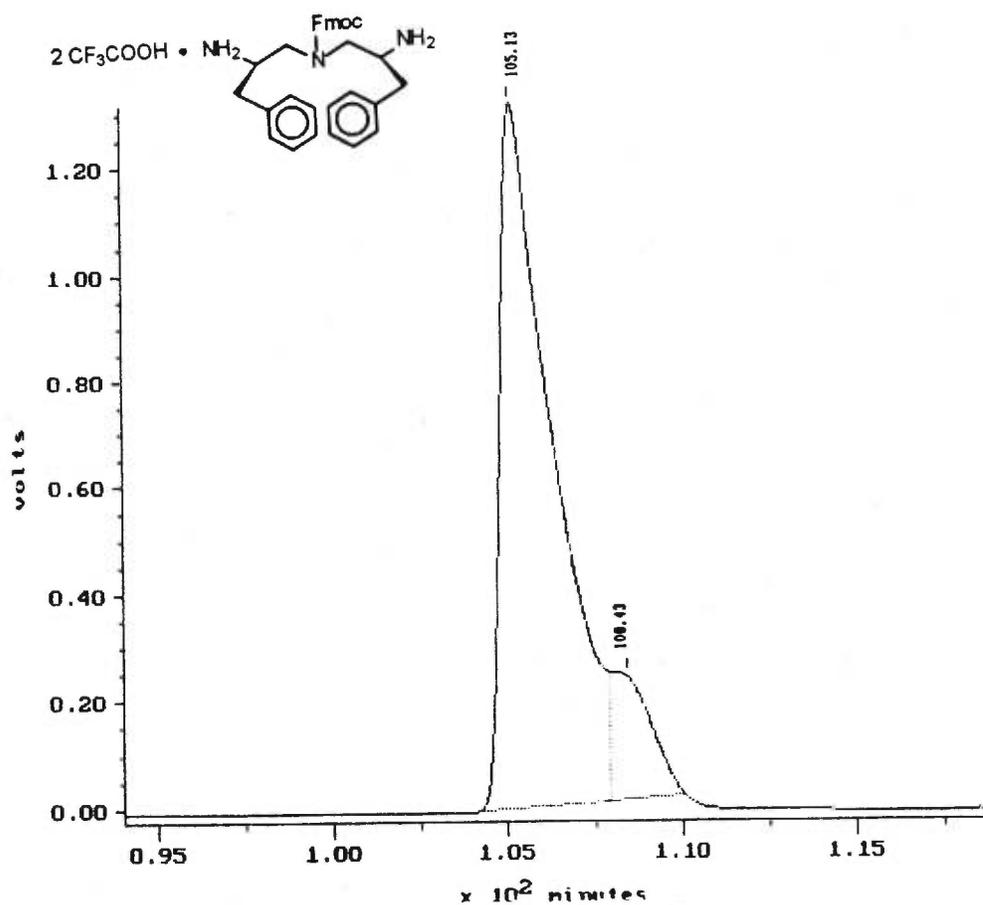
Protocole général

1. Préparer une solution de 2 μ M du substrat de la protéase du VIH dans le tampon
2. Charger cette solution dans la cuvette du fluorimètre (parcours optique de 1 cm)

3. Régler le monochromateur d'excitation et d'émission du fluorimètre à 340 nm et 490 nm, respectivement. Pour obtenir des valeurs comparables, les cuvettes doivent être gardées à 37°C tout au long de l'essai.
4. Commencer chaque essai en ajoutant un petit volume (<3% du volume final) de la protéase du VIH en solution dans le tampon.
5. Mesurer le taux de clivage initial du substrat en observant l'augmentation du signal à 490 nm pour 5 à 8 min. (toujours à 37°C).

Annexe 3

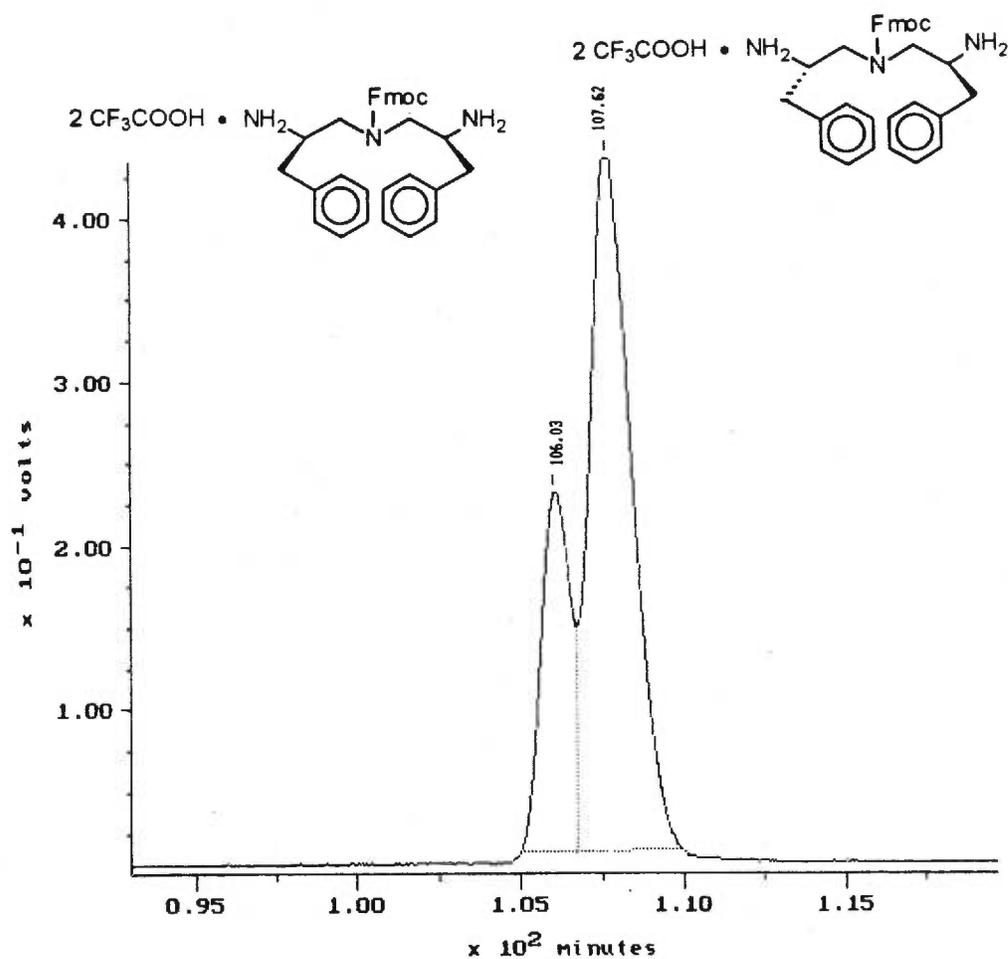
Chromatogramme (HPLC) du diastéréoisomère de l'amine 66



Le composé suivant a été synthétisé avec deux fragments comprenant une D-phénylalanine et une L-phénylalanine selon les méthodes décrites dans ce mémoire.

Chromatogramme (HPLC) d'un mélange de diastéréoisomères de

l'amine 66



Le Chromatogramme suivant montre un mélange des deux diastéréoisomères du composé 66, où leurs structures sont représentées à côté de leur pics respectifs.