

Université de Montréal

**Design et synthèse d'un modèle rigide du Sialyl Lewis^x
comme ligand des sélectines.**

Par

Sylvie Charron

Département de chimie

Faculté des arts et sciences

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)**

juin, 1998

©Sylvie Charron



QD

3

U574

1999

v.004

Université de Montréal

Design et synthèse d'un modèle rigide du site de liaison

comme ligand des réactions

par

Sylvie Chanton

Département de chimie

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de

l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

juin 1999

Sylvie Chanton



Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Design et synthèse d'un modèle rigide du Sialyl Lewis^x
comme ligand des sélectines.

présenté par:

Sylvie Charron

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Denis Gravel

Dr William Lubell

Dr James D. Wuest

Mémoire accepté le: 99.02.10

SOMMAIRE

Nous avons voulu, dans le cadre de ce projet, raffiner la connaissance du site actif de la E-sélectine en synthétisant un inhibiteur rigide dont le design a été élaboré à partir de la modélisation moléculaire.

Les synthèses des nombreuses molécules qui imitent le ligand naturel de la E-sélectine (SLe^x) sont décrites dans la littérature. Les plus simples ne contiennent que les deux pharmacophores qui sont essentiels à la liaison entre SLe^x et la E-sélectine (un groupement chargé négativement, en général un carboxylate, et un diol dont les groupements hydroxyles sont orientés de façon gauche). Nous avons donc disposé dans l'espace les groupements carboxylate et diol comme ils le sont sur SLe^x dans le modèle de son interaction avec la E-sélectine décrit par Kogan et coll.⁽²⁴⁾ à l'aide d'un gabarit rigide, le squelette d'un stéroïde.

Ce modèle est basé sur les coordonnées cristallographiques de la "rat mannose binding protein" (MBP) puisque c'est le seul membre de la famille des lectines de type-C (dont fait partie la E-sélectine) ayant été co-cristallisé avec son ligand (un oligomère du mannose). Dans ce modèle, on suppose que l'interaction entre l'oligomère du mannose et la MBP est quasi identique à celle entre SLe^x et la E-sélectine. Puisque les coordonnées cristallographiques des domaines lectine et EGF de la E-sélectine sont disponibles, nous avons superposé son site actif sur celui de la MBP. Nous avons ensuite superposé les oxygènes et les carbones 2 et 3 du fucose de SLe^x respectivement sur les oxygènes et les carbones 3 et 4 de l'oligomère du mannose. Finalement, le retrait des structures de la MBP et de

l'oligomère du mannose a permis l'obtention du modèle de l'interaction entre SLe^x et la E-sélectine.

La synthèse de l'inhibiteur potentiel débute par la modification de l'anneau D de l'oestrone. La cétone a donc été soumise aux conditions de la réaction de Wittig et la double liaison résultante à une hydroboration-oxydation.

Nous avons ensuite modifié l'anneau A du stéroïde en débutant par une réduction de Birch du noyau aromatique. On a pu obtenir une cétone α,β -insaturée en faisant l'hydrolyse en milieu acide de l'éther énolique. L'énolisation subséquente de l'énone en position 2,3 suivie de l'attaque électrophile du (camphorsulfonyl)oxaziridine nous a donné une α -hydroxyénone. Le diol a ensuite été obtenu en faisant l'hydrogénation de la double liaison suivie de la réduction de la cétone. Après protection du diol, une réaction hypiodite a été effectuée afin de fonctionnaliser le carbone 18. Finalement, un traitement en milieu basique nous a permis de retrouver le diol et d'ouvrir la lactone pour obtenir l'inhibiteur potentiel.

Ce dernier fut alors soumis à des tests biologiques afin de déterminer son activité vis-à-vis la E- et la P-sélectine en utilisant SLe^x comme contrôle. Malheureusement, nous fûmes dans l'impossibilité de déterminer les valeurs exactes du IC₅₀ de notre inhibiteur à cause d'un problème de solubilité.

Malgré cela, les résultats préliminaires obtenus nous permettent déjà de conclure que le modèle proposé par Kogan et coll. de l'interaction entre SLe^x et la E-sélectine n'est pas tout à fait exact.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	ii
TABLE DES HORS TEXTES	
Liste de tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des équations	xiii
Liste des schémas	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xv
<u>PARTIE THÉORIQUE</u>	
INTRODUCTION	
0.1 Les sélectines	2
0.2 Rôle des sélectines dans le processus d'adhésion cellulaire	4
0.3 Intérêt thérapeutique associé aux sélectines	5
0.4 Inhibiteurs des sélectines	9
0.5 Élaboration d'un modèle à l'échelle moléculaire du site récepteur de la E-sélectine	20

0.6	Autres méthodes utilisées pour trouver des inhibiteurs aux sélectines	29
0.7	Relation entre les sites récepteurs de la E- et de la P-sélectine	31
0.8	Design d'un inhibiteur rigide de la E-sélectine	32
CHAPITRE 1		
1.	Rétrosynthèse	34
CHAPITRE 2		
2.	Modification de l'anneau D de l'oestrone	36
2.1	Synthèse	36
2.2	Séparation des diastéréoisomères	38
CHAPITRE 3		
3.	Modification de l'anneau A du stéroïde	40
3.1	Réduction de l'anneau A	40
3.2	α -Hydroxylation de la cétone	43

3.3	Synthèse du triol 14	51
CHAPITRE 4		
4.	La réaction hypoiodite	58
4.1	Introduction	58
4.2	Mécanisme de la réaction hypoiodite	59
4.3	Ajustement du protocole expérimental	62
4.4	Résultats expérimentaux	65
4.5	Préparation du substrat choisi pour effectuer la réaction hypoiodite	69
4.6	Analyse des résultats	72
CHAPITRE 5		
5.	Atteinte de l'objectif de synthèse	73
CONCLUSION		76

PARTIE EXPÉRIMENTALE**Notes concernant la partie expérimentale**

A- Instrumentation	79
B- Purification des solvants et réactifs	80
C- Chromatographie	81
D- Généralités	82

SYNTHÈSE

1. Préparation de la 3-méthoxyestra-1,3,5(10)-triène-17-one (6)	84
2. Préparation de la 3-méthoxy-17-méthylène-estra-1,3,5(10)-triène (7)	86
3. Préparation de la 17-hydroxyméthyl-3-méthoxyestra-1,3,5(10)-triène (8)	88
4. Préparation de la 17-hydroxyméthyl-3-méthoxyestra-2,5(10)-diène (9)	90
5. Préparation de la 17-hydroxyméthyl-4-estren-3-one (10)	91
6. Préparation de l'acétate de la 17-hydroxyméthyl-5 β -estran-3-one (11)	92
7. Préparation de la 2 β -hydroxy-17-hydroxyméthyl-4-estren-3-one (12)	94

8.	Préparation de la 2 β -hydroxy-17-hydroxyméthyl-5 β -estran-3-one (13)	95
9.	Préparation de la 2 β ,3 β -dihydroxy-17-hydroxyméthyl-5 β -estrane (14)	97
10.	Préparation du triacétate de la 2 β ,3 β -dihydroxy-17-hydroxyméthyl-5 β -estrane	99
11.	Préparation du carbonate de la 2 β ,3 β -dihydroxy-17-hydroxyméthyl-5 β -estrane (16)	100
12.	Préparation de la 3-méthoxyestra-1,3,5(10)-trièn-18,20-lactone	102
13.	Préparation de la 4-estren-3-one-18,20-lactone	104
14.	Préparation du carbonate de la 2 β ,3 β -dihydroxy-5 β -estra-18,20-lactone (17)	105
15.	Préparation du sel sodé de la 18-carboxylate-2 β ,3 β -dihydroxy-17-hydroxyméthyl-5 β -estrane (1)	107
	BIBLIOGRAPHIE	109

REMERCIEMENT	115
ANNEXE 1	116
ANNEXE 2	121
ANNEXE 3	129
ANNEXE 4	133

Liste des tableaux

Tableau 1	Liste des antagonistes à la E-sélectine	9
Tableau 2	Résultats des expériences RMN NOE	22
Tableau 3	Résidus impliqués dans la coordination du calcium au site actif conservés dans la MBP	24
Tableau 4	Rendements des réactions d' α -hydroxylation	49
Tableau 5	Déplacements chimiques des hydrogènes situés en position 2,3 et 20	54
Tableau 6	Analyse des configurations possibles des hydrogènes selon la configuration de l'alcool en position 3	55
Tableau 7	Résumé des différentes modifications apportées à la réaction hypoiodite	66
Tableau 8	Résumé des réactions hypoiodites décrites dans la littérature	67
Tableau 9	Coordonnées atomiques et paramètres équivalents de déplacements isotropiques (Å^2)	124
Tableau 10	Distances interatomiques	125
Tableau 11	Angles de valence	126
Tableau 12	Angles de torsion	127
Tableau 13	Géométrie des ponts hydrogène	128

Liste des figures

Figure 1	Structures des sélectines	3
Figure 2	L'adhésion cellulaire	4
Figure 3	Concept d'une drogue antiadhésive	7
Figure 4	Structure de SLe ^x	8A
Figure 5	Superposition des domaines lectine de la MBP et de la E-sélectine	21
Figure 6	Interactions NOE entre les différentes parties de SLe ^x en solution et lié à la E-sélectine	22
Figure 7	Conformations de SLe ^x	23
Figure 8	Coordination des résidus de la E-sélectine et de la MBP au calcium de leur récepteur et interactions avec leur substrat respectif	25
Figure 9	Interactions optimisées entre SLe ^x et la E-sélectine	27
Figure 10	Modèles rigides de type stéroïde	32
Figure 11	Rétrosynthèse de la 18-carboxylate-2 β ,3 β -dihydroxy-17-hydroxyméthyl-5 β -estrane 1	34
Figure 12	États de transition possibles lors de l'hydrogénation de la double liaison de l'énone 11	42
Figure 13	Formation des énolates de l'énone 10	43
Figure 14	Attaque d'un réactif électrophile sur l'énolate de la cétone α,β -insaturée 10	48
Figure 15	États de transition possibles pour l'hydrogénation de la double liaison de l' α -hydroxyénone 12	53

Figure 16	Disposition des oxygènes pouvant fonctionnaliser le carbone 18 d'un stéroïde	61
Figure 17	Spectre RMN ^1H du composé 12	117
Figure 18	Spectre RMN ^1H du composé 14	118
Figure 19	Spectre RMN ^1H du composé 1	119
Figure 20	Spectre RMN ^{13}C du composé 1	120
Figure 21	Structure du composé 13	123
Figure 22	Spectre RMN ^1H du triacétate	130
Figure 23	Spectre RMN ^1H du triacétate avec irradiation du proton 2	131
Figure 24	Spectre RMN ^1H du triacétate avec irradiation du proton 3	132
Figure 25	Modification des plasmides	134
Figure 26	Interactions possibles lors des tests d'adhésion	136

Liste des équations

Équation 1	Conditions de la réaction hypiodite	59
------------	-------------------------------------	----

Liste des schémas

Schéma 1	Modification de l'anneau D	36
Schéma 2	Estérification de l'alcool 8	39
Schéma 3	Modification de l'anneau A (première partie)	40
Schéma 4	Synthèse d'une 2 β -hydroxyénone	45
Schéma 5	Méthode employée dans la littérature pour former une 2 β -hydroxyénone	45
Schéma 6	Mécanisme proposé pour l'aromatisation du triméthylsilyl énoïl éther par le <i>m</i> -CPBA	47
Schéma 7	Modification de l'anneau A (deuxième partie)	51
Schéma 8	Mécanisme de la réaction hypiodite	59
Schéma 9	Protection des alcools en position 2 et 3 du triol 14	70

LISTE DES ABRÉVIATIONS

9-BBN	: 9-borabicyclo[3.3.1]nonane
AcOEt	: acétate d'éthyle
BuLi	: butyllithium
°C	: degré centigrade
ccm	: chromatographie sur couche mince
d	: doublet
dd	: doublet dédoublé
ddd	: doublet de doublets dédoublés
DMSO	: diméthylsulfoxyde
DMF	: N,N-diméthylformamide
Équiv.	: équivalent
Ex	: exemple
g	: gramme
hex	: hexanes
Hz	: hertz
IE	: impact électronique
IR	: infrarouge
J	: constante de couplage
LAH	: hydrure de lithium et d'aluminium
LDA	: diisopropylamide de lithium
Litt.	: littérature
L-sélectride	: tri-sec-butyl-hydroborate de lithium
m	: multiplet
<i>m</i> CPBA	: acide <i>m</i> -chloroperbenzoïque
MeOH	: méthanol
mg	: milligramme

MHz	: mégahertz
min	: minute
mg	: milligramme
mL	: millilitre
mmol	: millimole
MoOPH	: "oxydoperoxymolybdenum(pyridine)(hexamethylphosphoric triamide)"
p. f.	: point de fusion
<i>p</i> TSA	: acide <i>p</i> -toluènesulfonique
ppm	: partie par million
q	: quadruplet
R _f	: rapport frontal
RMN	: résonance magnétique nucléaire
s	: singulet
se	: singulet élargie
t	: triplet
TBAF	: fluorure de tétrabutylammonium
THF	: tétrahydrofurane
TMS	: tétraméthylsilane
TMSCl	: chlorotriméthylsilane
V	: volt
W	: watt
δ	: déplacement chimique

PARTIE THÉORIQUE

INTRODUCTION

0.1 LES SÉLECTINES

Les leucocytes sont des cellules qui circulent dans le sang et qui jouent un rôle défensif contre les lésions de l'organisme. Lorsque celles-ci surviennent, ils infiltrent les tissus affectés pour effectuer leur travail. Les leucocytes doivent donc, dans un premier temps, sortir des vaisseaux sanguins via des mécanismes de régulation précis.

Les sélectines⁽¹⁾ sont des molécules d'adhésion cellulaire qui participent au processus de recrutement des leucocytes sur les lieux d'inflammation. Cette famille de molécules comprend trois membres; la E- (ELAM-1), la P- (PADGEM) et la L-sélectine (LECAM-1).

La L-sélectine est une molécule qui se retrouve sur les leucocytes. Elle y est exprimée en permanence. Elle possède plusieurs récepteurs naturels (GlyCAM-1, Sgp90, Sgp200 et MAdCAM-1). La L-sélectine est impliquée dans le recrutement des neutrophiles, monocytes et lymphocytes sur les lieux d'inflammation. Elle permet également aux lymphocytes qui sont dans le sang de retourner dans le système lymphatique.

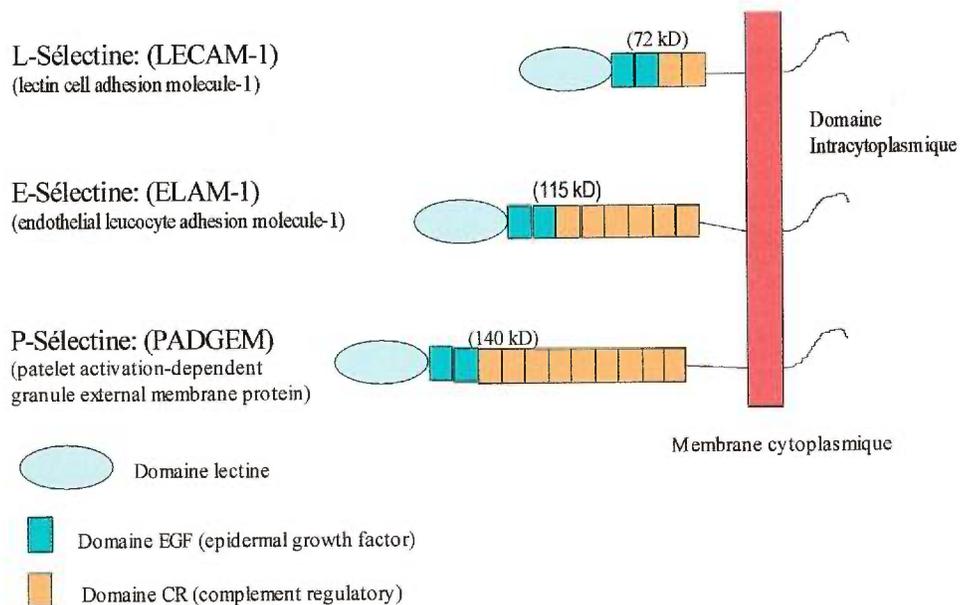
La E-sélectine est présente sur les cellules endothéliales activées. Son expression à la surface des cellules exige la synthèse de nouveaux ARN messager ce qui demande de trois à six heures. L'activation de ce processus peut être engendrée par des cytokines comme l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur nécrosant les tumeurs (TNF), des lymphotoxines (LT)

et/ou des lipopolysaccharides (LPS). Ses récepteurs naturels sont la PSGL-1 et la ESL-1. Elle est impliquée dans le recrutement des neutrophiles, monocytes et certaines cellules T (mémoire) sur les lieux d'inflammation.

Finalement, on retrouve la P-sélectine à la surface des plaquettes et cellules endothéliales activées dans les minutes suivant leur activation. L'histamine, la thrombine et les peroxydes provoquent la translocation et la fusion de la P-sélectine, (qui est contenue dans les granules-alpha des plaquettes ou dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales), vers la membrane plasmique. Son récepteur naturel est la PSGL-1. Elle est impliquée dans l'adhésion des neutrophiles et monocytes sur les plaquettes et cellules endothéliales activées.

Comme on peut le voir à la figure 1, il y a beaucoup de ressemblance entre les structures des sélectines.

FIGURE 1. Structure des sélectines⁽¹⁾

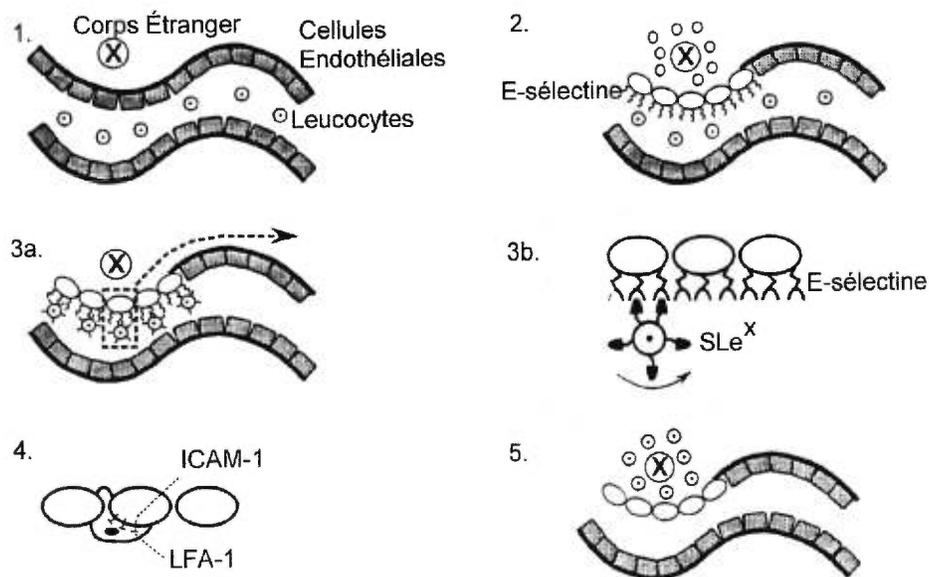


Il y a environ 65% d'homologie dans la séquence d'ADN des domaines lectines et EGF des sélectines et environ 40% au niveau des domaines CR, transmembranaires et cytoplasmiques. Les sélectines reconnaissent deux ligands: sialyl Lewis X (SLe^x) et son isomère sialyl Lewis A (SLe^a). Ces ligands se retrouvent à la surface des différents récepteurs mentionnés précédemment. Bien que l'affinité entre SLe^x et les sélectines soit assez faible (0.5-1.0mM), le rôle des sélectines est essentiel au recrutement des leucocytes.

0.2 RÔLE DES SÉLECTINES DANS LE PROCESSUS D'ADHÉSION CELLULAIRE.

La figure 2 représente les diverses étapes nécessaires au processus d'adhésion impliquant la E-sélectine⁽²⁾.

FIGURE 2. L'adhésion cellulaire⁽²⁾



1. Exposition à un pathogène.
2. Suite à cette exposition, il y a alors libération de cytokines. Celles-ci vont provoquer l'expression de la E-sélectine.
3. a) Interactions faibles entre la E-sélectine et SLe^x. b) Celles-ci vont donner lieu au "roulement" de SLe^x à la surface des cellules endothéliales.
4. Il y a ensuite activation des intégrines (LFA-1) par des chémoattractants [N-formyl peptide, C5a, leucotriène B₄, patelet activating factor, α -chemokines (IL-8), β -chemokines (MCP-1, MIP-1)]. Cette activation permet l'adhésion ferme du leucocyte sur la cellule endothéliale via l'interaction entre les intégrines (LFA-1) et les immunoglobulines (ICAM-1).
5. Les leucocytes vont alors traverser l'épithélium vers les tissus environnants.

0.3 INTÉRÊT THÉRAPEUTIQUE ASSOCIÉ AUX SÉLECTINES.

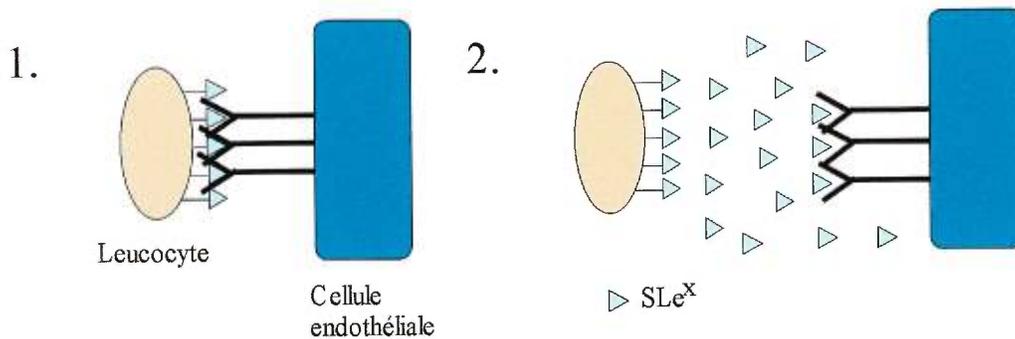
Il existe certaines pathologies associées à la mauvaise régulation du système immunitaire impliquant les sélectines. Lorsqu'il y a un déséquilibre et que les leucocytes s'accumulent en trop grands nombres dans les tissus, ils peuvent alors causer des dommages et nuire à l'organisme au lieu de lui être bénéfique. Plusieurs maladies inflammatoires proviennent de ce déséquilibre dont celles-ci⁽¹⁾ :

- Psoriasis
- Choc septique
- Asthme
- Arthrite rhumatoïde
- Maladie inflammatoire de l'intestin
- Métastases cancéreuses

Les métastases cancéreuses ne sont pas reliées à une trop grande accumulation de leucocytes dans les tissus. Toutefois, on sait que les métastases cancéreuses expriment SLe^x et/ou SLe^a à leur surface. Ces derniers peuvent interagir avec la E- et/ou la P-sélectine et, de la même façon que les leucocytes le font, pénétrer dans les tissus. C'est ainsi qu'un cancer localisé peut se répandre à l'ensemble de l'organisme.

Si on veut éliminer ou réduire les symptômes reliés à ces maladies, il suffit de bloquer une des étapes nécessaires au passage des leucocytes (ou métastases) du sang aux tissus environnants. Pour ce faire, on doit développer une drogue antiadhésive^(3a). Ce concept est représenté dans la figure 3.

FIGURE 3. Concept d'une drogue antiadhésive.



1. Pour observer l'adhésion cellulaire, il faut que la sélectine interagisse avec le SLe^x exprimé par le leucocyte (ou métastase).
2. Si on introduit dans le sang une grande quantité de SLe^x, ceux-ci vont se lier aux sélectines et bloquer les sites d'interactions donnant habituellement lieu à l'adhésion cellulaire.

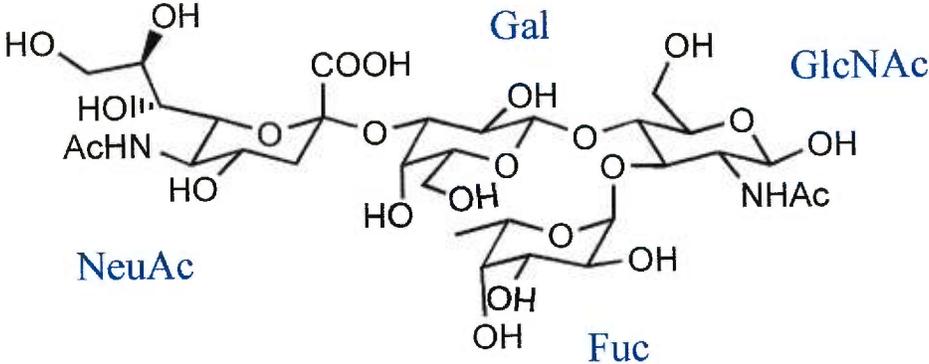
Malheureusement, bien qu'une telle drogue apporterait son lot de bienfaits, elle entraînerait également une conséquence assez fâcheuse. En effet, en empêchant les leucocytes d'adhérer aux cellules endothéliales, ces derniers ne pourraient plus défendre l'organisme *via* les processus anti-inflammatoires. Il deviendrait alors très vulnérable vis-à-vis des infections de toutes sortes. Face à cet inconvénient, Paulson^(3a), un chercheur œuvrant dans le domaine, a mis en évidence le fait suivant. Les patients qui souffrent de LAD-II (leucocyte adhesion deficiency) n'expriment pas la fucosyl transferase. Cette déficience métabolique a pour conséquence la non-synthèse du SLe^x. Toujours chez ces patients, on n'observe pas le roulement des leucocytes à la surface des cellules endothéliales. Ces derniers souffrent de retardement mental sévère et ils sont de petite taille jumelé à une apparence faciale distinctive. De plus, ils démontrent des

infections bactériennes récurrentes telles que la pneumonie, la parodontite et l'otite.^(3b) Pour contrer ces inconvénients, il faut donc adapter la posologie pour en arriver à un compromis acceptable : éviter la trop grande accumulation des leucocytes dans les tissus sans toutefois abolir la défense de l'organisme via les processus anti-inflammatoires.

L'utilisation de SLe^x afin de réduire ou éliminer les symptômes des maladies énumérées à la page 6 est une possibilité qui a été envisagée⁽⁴⁾. Malheureusement, cette molécule comporte plusieurs inconvénients. Comme on peut le voir dans la figure 4, la structure de SLe^x est assez complexe ce qui rend sa synthèse longue. Ce tétrasaccharide est constitué d'un fucose et d'un galactose qui sont tenus dans l'espace *via* deux liens glycosidiques à la N-acétylglucosamine. L'acide N-acétyl-neuraminique est quant à lui lié au galactose par un lien glycosidique β .

De plus, ce n'est pas un composé qui est stable face aux glycosidases, spécialement aux fucosidases et aux sialidases. Il y a donc un problème de pharmacocinétique. Toutefois, la synthèse d'un composé qui imiterait SLe^x tout en évitant ces désavantages semble un choix tout indiqué. Il y a d'ailleurs beaucoup de recherches en cours sur les sélectines. D'après Laine⁽⁵⁾, les compagnies pharmaceutiques auraient dépensé plus de trois cent millions de dollars en recherche sur le sujet durant les six dernières années. En outre, plus de huit cents articles y ont été consacrés.

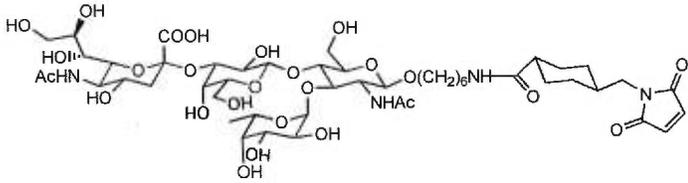
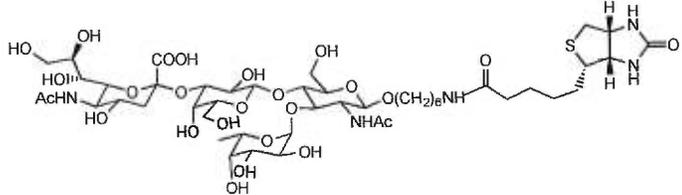
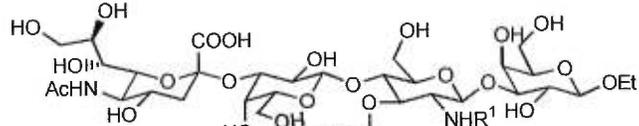
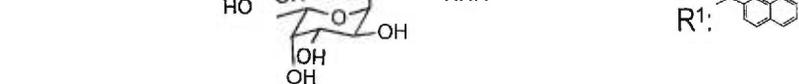
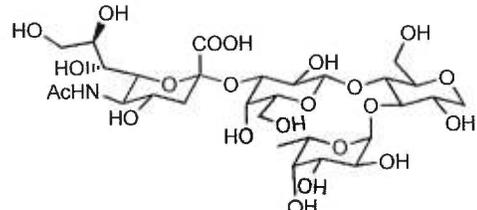
FIGURE 4. Structure de SLe^x.

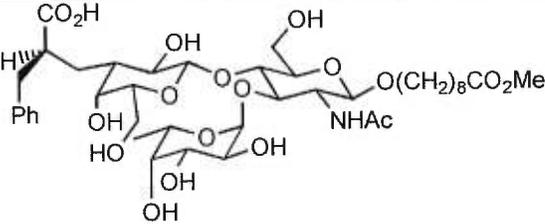
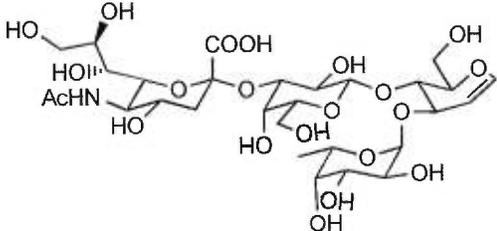
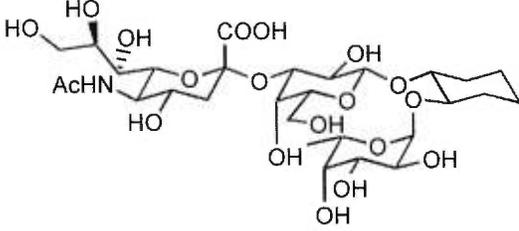
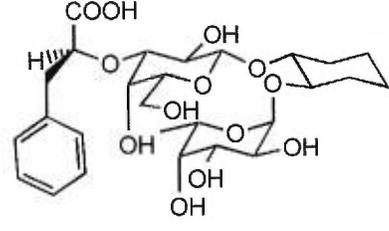
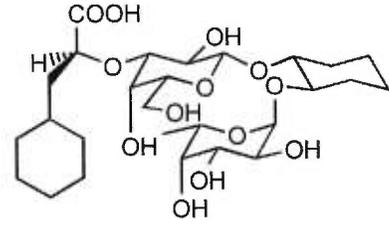
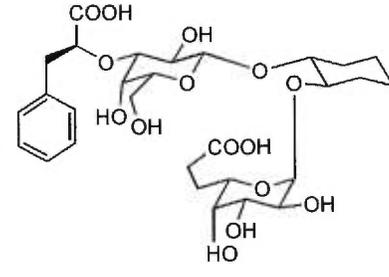


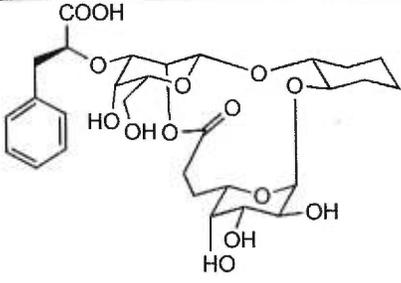
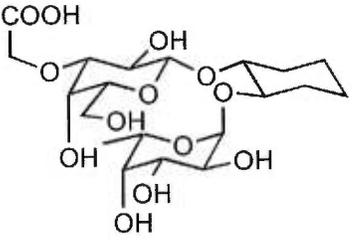
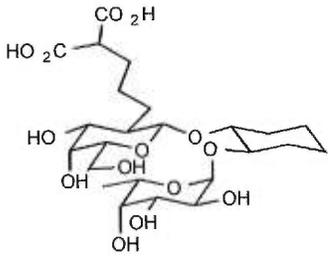
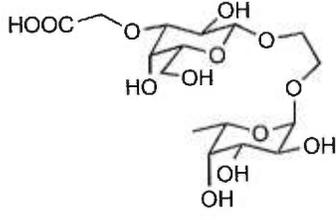
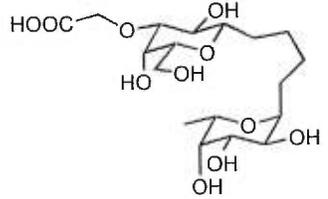
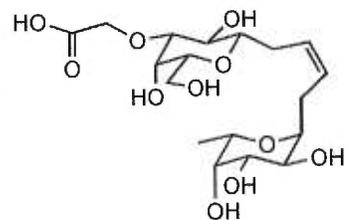
0.4 INHIBITEURS DES SÉLECTINES.

Depuis quelques années, la littérature rapporte un grand nombre de composés imitant SLe^x. Le tableau 1 dresse une liste des antagonistes ayant suscité le plus d'intérêt.

TABLEAU 1 Liste des antagonistes à la E-sélectine

	Produits	$\frac{IC_{50} \text{ E-sélectine}^*}{IC_{50} \text{ P-sélectine}}$ (mM)	Réf.
1		0.28/0.38	6
2		0.59/0.60	6
3a		1.0/-	7
3b		0.08/-	8
4		0.24/>1	9

11		2.6/-	14
12		2.1/-	15
13		0.4/0.6	16
14		0.3/-	14
15		0.1/-	14
16		0.39/-	17

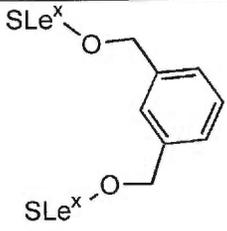
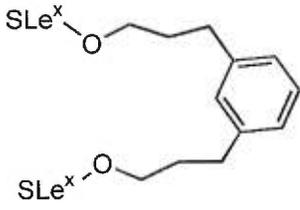
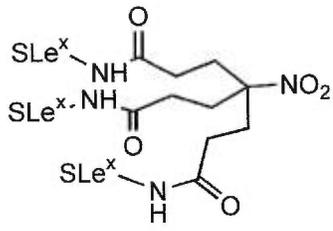
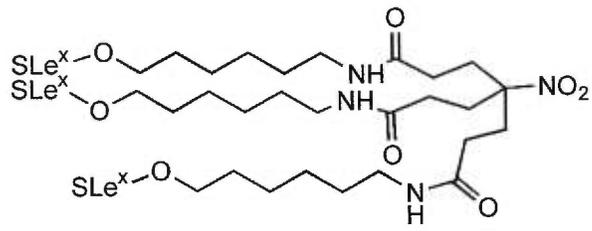
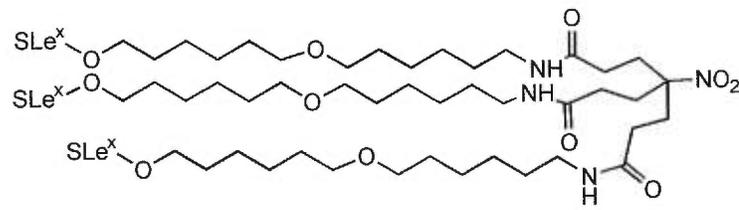
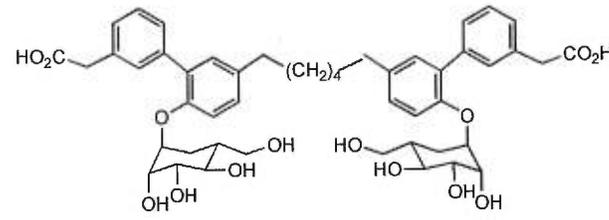
17		2.8/-	17	
18		0.5/-	18	
19		Méthode A: Méthode B:	0.8/1.6 1.4/0.0075	19
20		1.5/-	20	
21		20.0/-	20	
22		15/-	20	

23		>10.0/-	21
24		>5.0/-	22
25		1.6/1.0	16
26		25.0/-	23
27		0.4/1.2	24
28		0.3/0.5	24

29		1.6/7.5	25
30		1.0/0.7	26
31		10/-	20
32		0.2/-	27
33		0.2/-	28
34		0.5/-	29

35		0.1/-	30
36		0.05/-	30
37		>2.0/<0.5	31
38		<0.5/<0.5	31
39		0.1/-	32
40		0.0035/-	33

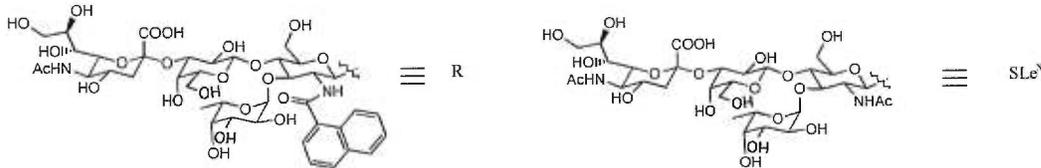
41		0.4/-	15	
42		n = 4	0.14/-	34
		n = 5	0.39/-	
43		n = 1	0.46/-	34
		n = 5	0.47/-	
44			0.35-0.6/-	35
45			0.010**	36

46		0.030/-	37
47		0.032/-	37
48		0.38/>0.8	38
49		0.13/0.14	38
50		0.40/>0.10	38
51		0.5/0.07	85

* Les valeurs d'IC₅₀ peuvent changer en fonction du traitement imposé aux composés. On peut le constater à l'entrée 19 où, selon la méthode

employée pour acidifier le composé, on obtient des valeurs différentes d'IC₅₀. Il est cependant à noter que la différence d'activité n'est pas aussi dramatique pour la E-sélectine que pour la P-sélectine.

** La valeur d'activité est donnée en mg/ml (IC₅₀ de SLe^x = 1.5mg/mL = 0.002mM/mL).



Les entrées 1 à 5 du tableau 2 représentent les changements apportés à la partie GlcNAc de SLe^x. Comme on peut le voir, l'ajout de résidus de structures très différentes (entrée 1 et 2) augmente l'affinité de ces inhibiteurs de la E- et la P-sélectine (le IC₅₀ de SLe^x pour la E-sélectine est environ 1.0mM). Il peut s'agir de la création d'interactions supplémentaires impliquant des résidus des sélectines ne se situant pas dans le site de liaison naturel. En ajoutant un cinquième sucre à SLe^x (entrée 3a), on n'améliore pas l'activité. Toutefois, la substitution de la fonction N-acétyl par une fonction N-acyl aromatique (entrée 3b) l'accroît de façon significative. Les auteurs argumentent qu'il y aurait possiblement formation d'interactions de type π - π ⁽⁸⁾. Finalement, on remarque une augmentation de l'activité pour les entrées 4 et 5 simplement en dénudant la partie GlcNAc.

Les entrées 6 à 11 démontrent que seule la charge négative du carboxyle de l'acide sialique est nécessaire à l'affinité entre la E-sélectine et SLe^x. En effet, dans le cas des entrées 6 et 7, on a tout simplement remplacé l'acide sialique respectivement par des groupements sulfate et phosphate tout en conservant de très bonnes valeurs d'activité. On peut

également le substituer par un acide carboxylique (entrée 11). En comparant les entrées 8 et 9, on se rend compte que l'ajout d'un groupement alkyle augmente l'activité. En fait, les auteurs ont ajouté ce groupement dans le but de doter leur antagoniste d'une ancre artificielle. Puisque ce composé est très hydrophile et que le solvant utilisé lors des tests d'adhésion cellulaire est aqueux, le groupement alkyle pourrait faire des interactions hydrophobes-hydrophobes avec la surface des sélectines et ainsi permettre à l'antagoniste de se lier plus facilement. Enfin à l'entrée 10, l'inhibiteur n'est pas actif puisqu'il mime de façon rigide une mauvaise conformation de SLe^x tel que démontré par des expériences de transfert NOE effectuées par l'auteur.

On peut affirmer que la partie GlcNAc de SLe^x n'est pas nécessaire à l'affinité des antagonistes puisqu'elle est absente dans plusieurs cas (entrées 12 à 22). En fait, plusieurs chercheurs en sont arrivés à la conclusion que cette partie de SLe^x ne fait que tenir en place les parties fucose et galactose. Règle générale, l'affinité sera bonne si l'antagoniste imite bien la conformation bioactive de SLe^x (conformation liée à la sélectine). Si, en plus de cette condition, il est assez rigide, l'affinité devient alors très élevée (exemple: entrée 13, 14-16, 18 et 19). Toutefois, tenter de concevoir un inhibiteur rigide peut s'avérer difficile. Par exemple, le composé à l'entrée 17 est plus rigide que celui de l'entrée 16. On s'attend donc à ce que la lactone soit plus active que sa forme ouverte. Malheureusement, ce n'est pas le cas. Selon Kolb⁽¹⁷⁾, le prix à payer pour la rigidité de cette molécule est très grand parce qu'on impose une distorsion de l'orientation dans l'espace de l'acide qui ne peut plus imiter l'acide sialique de SLe^x.

Les composés 23 à 26 ne possèdent que les parties fucose et l'acide sialique de SLe^x. Encore une fois, l'activité est reliée à une bonne disposition dans l'espace des groupements importants ainsi qu'à la rigidité des produits. Le seul produit qui répond à ces exigences est représenté à l'entrée 25.

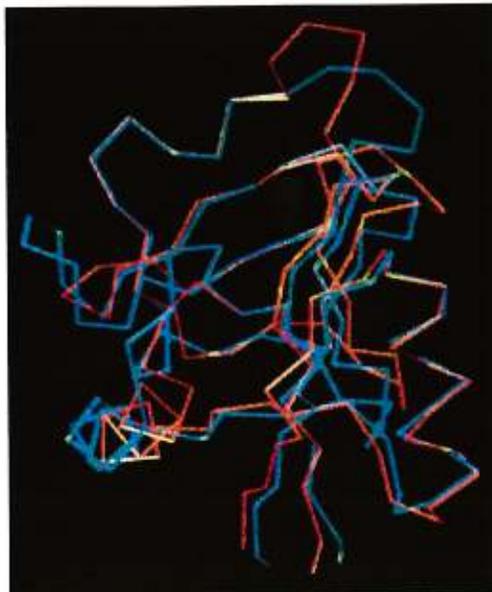
Finalement, les composés des entrées 27 à 36 ne possèdent que la partie fucose de SLe^x. L'acide sialique est remplacé par un acide carboxylique et, dans quelques cas (entrées 32 à 36), la partie galactose est remplacée par des groupements hydroxyles. Il est intéressant de noter que le composé proposé par Kogan et al. (entrée 27) est le premier antagoniste à avoir été conçu entièrement par modélisation moléculaire. Malgré sa grande simplicité, l'activité de ce dernier est comparable à celle de produits beaucoup plus complexes (entrée 1,2,4,5,8,11-14,16,17 et 25).

0.5 ÉLABORATION D'UN MODÈLE À L'ÉCHELLE MOLÉCULAIRE DU SITE RÉCEPTEUR DE LA E-SÉLECTINE.

La modélisation moléculaire a été employée pour concevoir beaucoup d'inhibiteurs des sélectines. Pour ce faire, il faut d'abord avoir en main un modèle exact de l'interaction entre SLe^x et les sélectines. Les structures cristallographiques de la E- et de la P-sélectine co-cristallisées avec le SLe^x seraient idéales. Malheureusement, aucune étude cristallographique n'a été rapportée jusqu'à présent. En fait, le seul membre de la famille des lectines de type-C ayant été co-cristallisé avec son ligand (un oligomère du mannose) est la "rat mannose binding protein" (MBP)⁽³⁹⁾. Même s'il n'y a que 30% d'homologie entre les domaines lectines de la E-sélectine et de la

MBP, les liens disulfures et d'autres regroupements de résidus identiques permettent de les aligner de façon topologique. De plus, on remarque que le repliement du domaine lectine de la E-sélectine est très similaire à celui du même domaine de la MBP (voir figure 5). Par contre, les coordonnées cristallographiques des domaines lectine et EGF de la E-sélectine (qui renferment le site du récepteur du SLe^x) sont disponibles⁽⁴⁰⁾.

FIGURE 5. Superposition des domaines lectine de la MBP et de la E-sélectine⁽⁴⁰⁾.



En bleu : Domaine lectine de la E-sélectine.

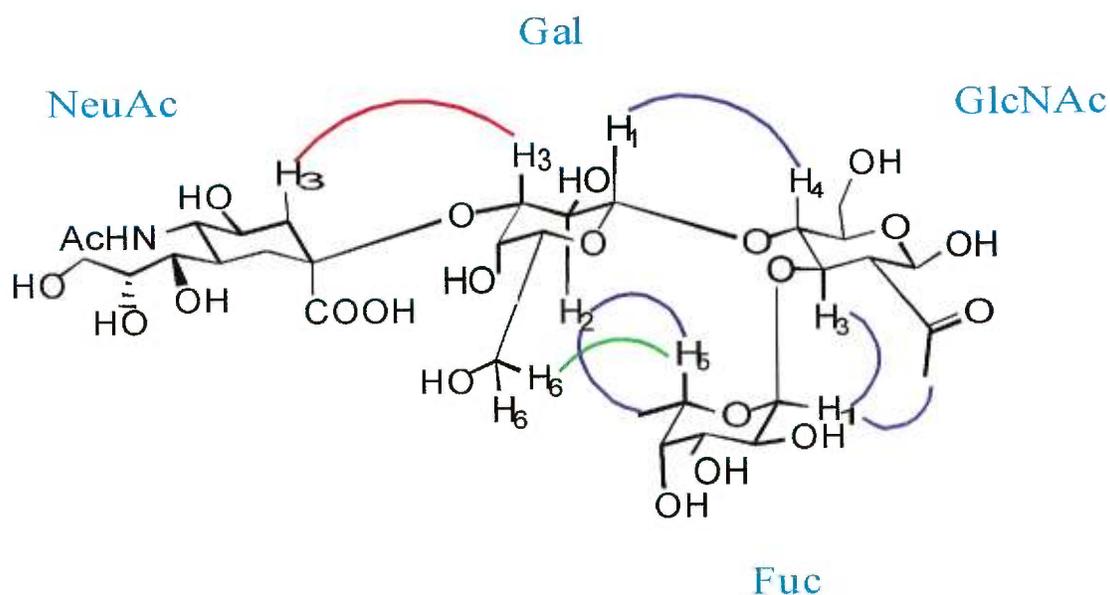
En rouge : Domaine lectine de la MBP.

Plusieurs chercheurs se sont penchés sur la conformation de SLe^x en solution^(40,41,42), ce qui a permis la détermination des conformations de SLe^x par RMN de transfert NOE. Le tableau 2 nous donne la liste des recouvrements intra-moléculaires qui correspondent aux interactions entre les différentes parties de SLe^x. Celles-ci sont représentées dans la figure 6.

TABLEAU 2. Résultats des expériences RMN NOE

Interactions entre différentes parties de SLe ^x lié à la E-Sélectine	Interactions entre différentes parties de SLe ^x en solution
H1 Gal – H4 GlcNAc H1 Fuc – H3 GlcNAc H5 Fuc – H6 Gal CH ₃ Fuc – H2 Gal H5 Fuc – H2 Gal H1 Fuc – CH ₃ GlcNAc	H1 Gal – H4 GlcNAc H1 Fuc – H3 GlcNAc H3 Gal – H _{3ax} NeuAc CH ₃ Fuc – H2 Gal H5 Fuc – H2 Gal H1 Fuc – CH ₃ GlcNAc

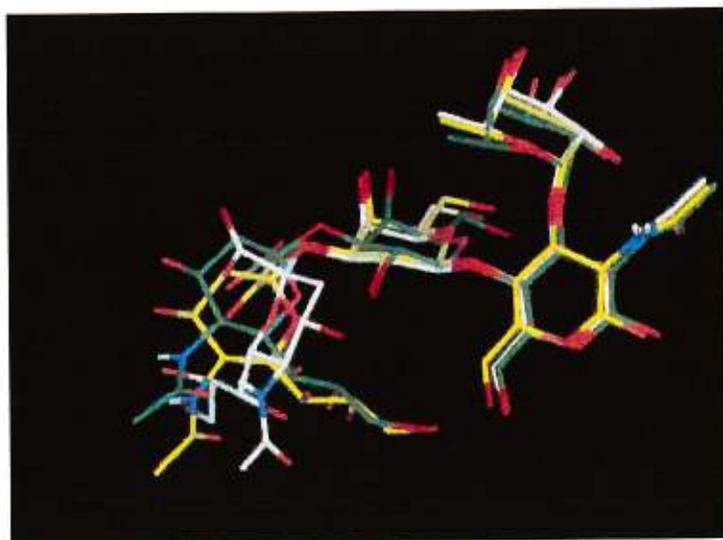
FIGURE 6. Interactions NOE entre les différentes parties de SLe^x en solution et lié à la E-sélectine⁽⁴⁰⁻⁴⁶⁾.



- NOE présent pour les deux conformations
- NOE spécifique de la conformation bioactive de SLe^x
- NOE spécifique de la conformation de SLe^x en solution

D'autres chercheurs ont tenté de déterminer la conformation bioactive de SLe^x ^(43,44,45,46). Hensley et coll.⁽⁴⁴⁾ ont obtenu des résultats qui semblent démontrer que la conformation bioactive de SLe^x est identique à celle de SLe^x en solution. Toutefois, d'autres chercheurs^(43,45,46) ont obtenu des résultats menant à une conclusion différente. En fait, les résultats des expériences NOE sont semblables mais non identiques à ceux obtenus pour SLe^x en solution comme on peut le voir dans le tableau 2. On peut en conclure que la conformation bioactive de SLe^x n'est pas la même que celle que SLe^x adopte en solution mais qu'elle s'en approche beaucoup, particulièrement en ce qui a trait à la position dans l'espace des fragments galactose, fucose et GlcNAc. La figure 7 représente la superposition des différentes conformations de SLe^x ^(32 ou 27).

FIGURE 7. Conformations de SLe^x ⁽²⁷⁾.



En blanc: Conformation de SLe^x en solution.

En jaune: Conformation bioactive de SLe^x .

En vert: Conformation de SLe^x en solution telle que calculée par ordinateur.

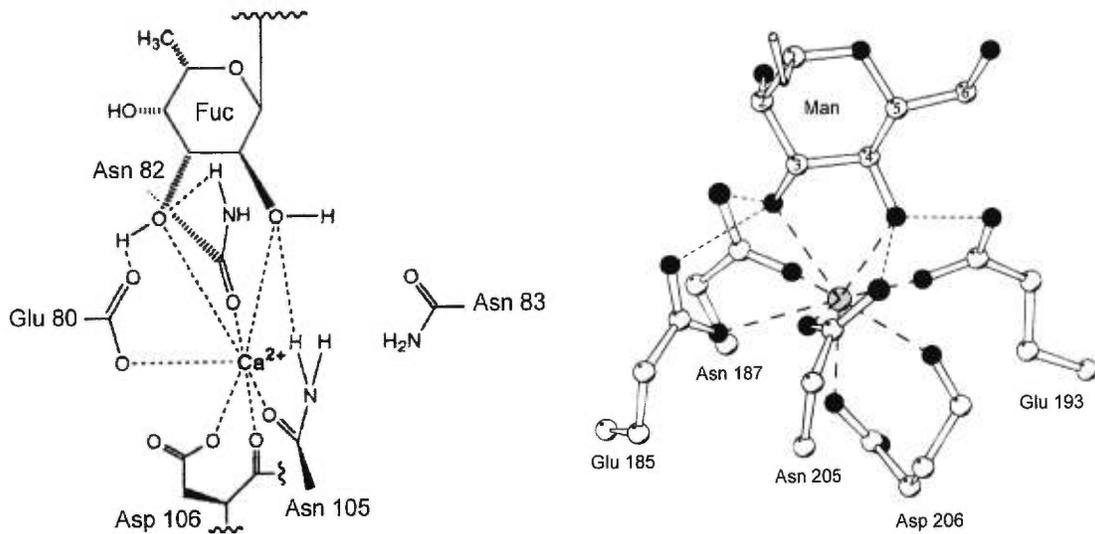
Ayant en main toutes ces informations, Kogan et coll. ont élaboré un modèle de l'interaction entre SLe^x et la E-sélectine, basé sur la structure de la MBP liée avec son substrat⁽⁴⁷⁾. Le calcium est impliqué dans la liaison avec SLe^x. Il est coordonné par les chaînes secondaires de Glu 80, Asn 82, Asn 105 et Asp 106, par le carbonyle de la chaîne principale du Asp 106 et par deux molécules d'eau. Il forme ainsi une sphère de coordination bipyramide pentagonale. Les résidus qui se coordonnent au calcium sont conservés dans le cas de la MBP (voir tableau 3 et figure 8).

TABLEAU 3 **Résidus impliqués dans la coordination du calcium au site actif conservés dans la MBP**

MBP	E-sélectine
Glu 185	Glu 80
Asn 187	Asn 82
Glu 193	Glu 88*
Asn 205	Asn 105
Asp 206	Asp 106

*Ce résidu ne se coordonne pas au calcium

FIGURE 8. Coordination des résidus de la E-sélectine et de la MBP au calcium de leur récepteur et interactions avec leur substrat respectif.



À gauche: Coordination des résidus de la E-sélectine au calcium du récepteur et interaction avec la partie fucose du SLe^x(^{47a}).

À droite: Coordination des résidus de la MBP au calcium du récepteur et interaction avec une unité mannose de son substrat(³⁹).

La seule différence entre les deux sites de liaison est le résidu de Glu 88 de la E-sélectine qui ne se coordonne pas au calcium (à l'opposé à la Glu 193 qui elle se coordonne au calcium). Il est toutefois remplacé par une molécule d'eau qui fait également un pont hydrogène avec Asn 82. Kogan a donc superposé le calcium de la MBP et les oxygènes qui lui sont coordonnés respectivement sur le calcium de la E-sélectine et les oxygènes qui lui sont coordonnés. Mis à part quelques segments qui divergent, la majeure partie du domaine lectine de la E-sélectine se superpose bien avec le do-

maine lectine de la MBP. Il a ensuite superposé les oxygènes et les carbones 2 et 3 du fucose de SLe^x respectivement sur les oxygènes et les carbones 4 et 3 du mannose. Il faut préciser que Kogan a utilisé la conformation bioactive de SLe^x pour effectuer cette superposition. Il lui a suffi ensuite d'enlever la structure de la MBP et celle du mannose qui ont servi de gabarit, pour enfin obtenir le modèle attendu. Celui-ci est supporté par les données de mutagenèse dirigée.

À l'aide de ce modèle, Kogan et coll. ont pu déterminer les fonctions essentielles à la liaison de SLe^x à la E-sélectine. Elles sont représentées à la figure 9.

FIGURE 9. Interactions optimisées entre SLe^x et la E-sélectine⁽⁴⁷⁾.

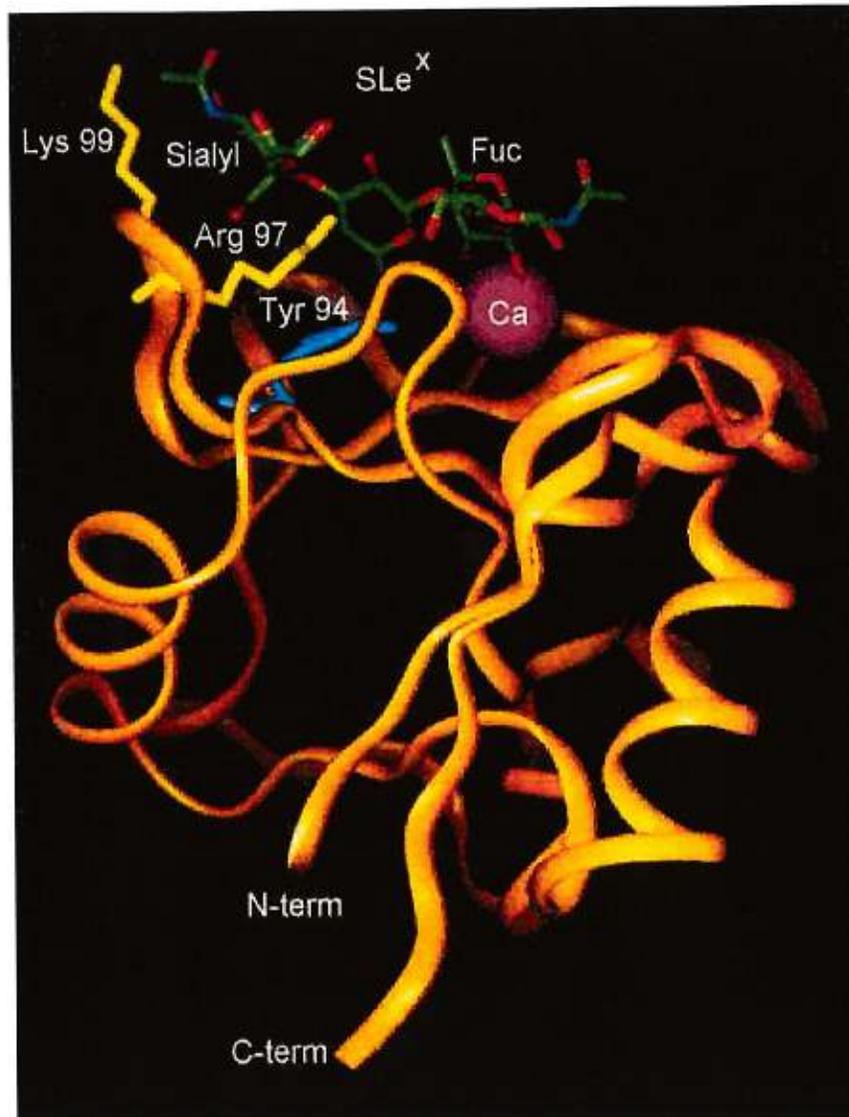
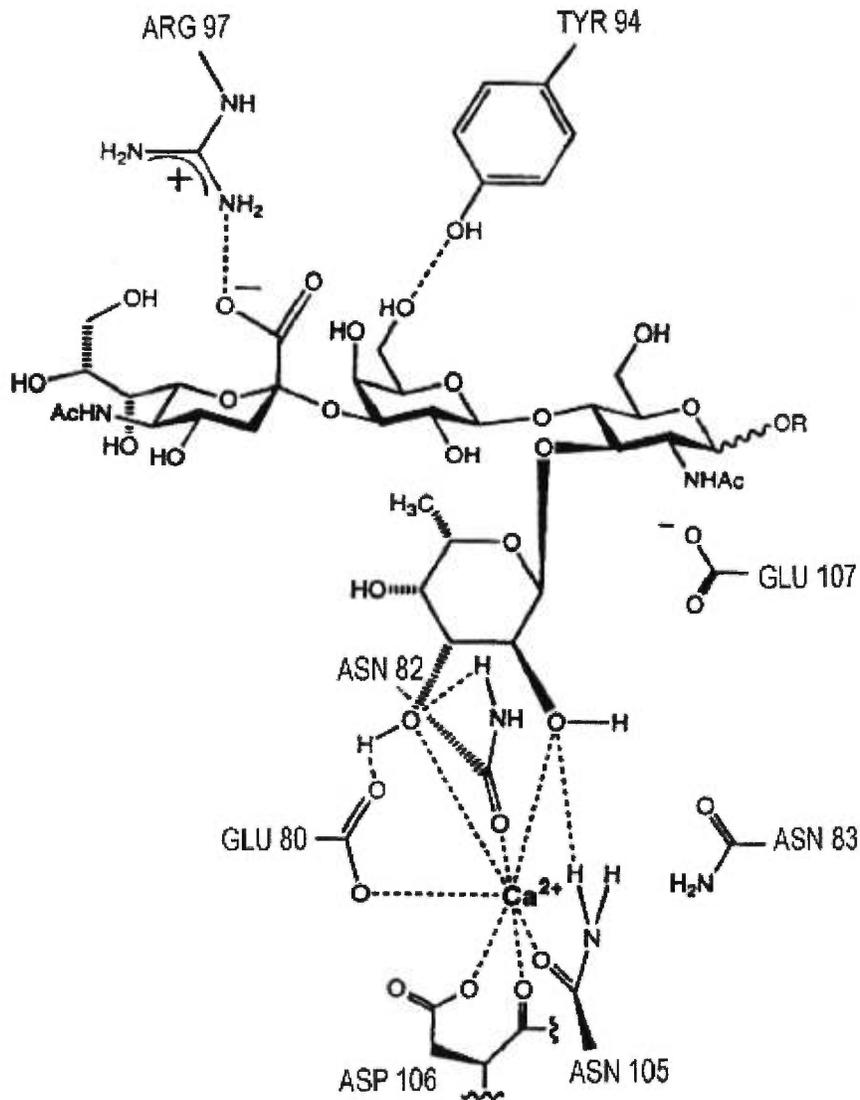


FIGURE 9. (Suite)



Les groupements hydroxyles en C-2 et C-3 du fucose sont très importants puisqu'ils sont liés au calcium. L'acide sialique est également un élément crucial et forme un pont salin avec Arg 97. Enfin, le groupement hydroxyle en C-6 du galactose est coordonné à la Tyr 94. Tous ces groupements fonctionnels sont situés sur une même face et définissent le lieu de

liaison. Les groupements hydroxyles du fucose et l'acide sialique sont distants de 10-12 Å°.

De la même façon, Graves et coll.⁽⁴⁰⁾ ont proposé un modèle en se basant sur la structure cristallographique de la E-sélectine, la conformation de SLe^x en solution et des études de mutagenèses. Dans leur modèle, les groupements hydroxyles 2 et 3 du fucose se lient au calcium tandis que l'acide sialique interagit de façon ionique avec Lys 111 et Lys 113. L'argument qui diminue la valeur de ce modèle et qui renforce celle du modèle de Kogan et coll.⁽²⁴⁾, est donné par l'étude de mutagenèse dirigée effectuée par ce dernier. En effet, en changeant Lys 113 pour l'acide glutamique, on enlève la possibilité de ce résidu d'interagir avec l'acide sialique de façon ionique sans pourtant affecter l'affinité de la E-sélectine pour SLe^x. En fait, puisque Graves a utilisé la conformation de SLe^x en solution (et non sa conformation bioactive), son modèle peut ne pas refléter l'interaction entre ce dernier et la E-sélectine.

0.6 AUTRES MÉTHODES UTILISÉES POUR TROUVER DES INHIBITEURS AUX SÉLECTINES.

La plupart des antagonistes de la E-sélectine ont été conçus en utilisant la modélisation moléculaire de diverses façons. Il y a toutefois d'autres méthodes utilisées pour trouver des inhibiteurs de la E-sélectine. Par exemple, la compagnie Glycomed a utilisé le pharmacophore de SLe^x pour chercher dans une banque de structures tridimensionnelles de produits chimiques⁽³¹⁾. C'est ainsi qu'elle a identifié la glycyrrhizin comme étant un antagoniste potentiel aux sélectines. Comme prévu, la glycyrrhizin bloque

l'interaction entre le SLe^x et les sélectines (entrée 37 du tableau 1). D'ailleurs, ce produit naturel provenant de la licorice est utilisé en Chine comme anti-inflammatoire. En effectuant quelques changements à la structure de la glycyrrhizin, Glycomed a même réussi à obtenir un composé qui a une meilleure affinité pour les sélectines que SLe^x (entrée 38 du tableau 1).

Une autre méthode utilisée dans la recherche d'inhibiteurs de la E-sélectine consiste à considérer l'effet de l'entropie de liaison (entrée 11, 14-17 du tableau 1). À l'aide de simulations faites par ordinateur, les chercheurs ont trouvé une façon de caractériser la conformation bioactive de SLe^x. Ils sont alors à même de prédire quels sont les produits qui vont adopter naturellement une conformation semblable. Comme ces produits sont déjà dans une conformation quasi idéale pour se lier à la E-sélectine, la différence d'entropie impliquée dans le processus de liaison est donc moins défavorable.

Finalement, on pourrait trouver des antagonistes en étudiant les modèles biologiques de l'interaction entre SLe^x et la E-sélectine. C'est ainsi qu'on a remarqué que les dérivés qui possèdent plusieurs unités SLe^x démontrent une plus grande affinité pour la E-sélectine que son monomère.

À partir de ces résultats, une nouvelle ligne de pensée en ce qui concerne l'interaction entre la E-sélectine et SLe^x est apparue⁽⁴⁸⁾. Celle-ci serait de nature multivalente *in vivo*. Afin de mieux comprendre le fondement de cette hypothèse, il faut se rappeler que l'affinité entre la E-sélectine et SLe^x est assez faible. Est-elle assez importante pour justifier le roulement des leucocytes à la surface des cellules endothéliales? Dans ce modèle de l'interaction entre la E-sélectine et SLe^x, on considère que ce dernier a ten-

dance à se regrouper *in vivo* pour se lier à plusieurs sélectines avoisinantes de façon simultanée, ce qui aurait pour effet d'augmenter son affinité pour la E-sélectine. Les entrées 41 à 51 du tableau 2 démontrent d'ailleurs de manière assez convaincante la pertinence des inhibiteurs multivalents. Il est à noter que les valeurs d'IC₅₀ ont été calculées par unité de SLe^x pour permettre une comparaison plus juste avec les antagonistes plus traditionnels.

Encore une fois, Kogan et coll. innovent et utilisent la modélisation moléculaire pour créer une molécule (entrée 51) imitant un composé naturel possédant plus d'une unité SLe^x, le Sialyl di-Lewis^x(⁸⁵). Cette molécule, quoique beaucoup plus simple que les autres composés multivalents, démontre tout de même une très bonne affinité envers la E- et la P-sélectine.

0.7 RELATION ENTRE LES SITES RÉCEPTEURS DE LA E- ET DE LA P-SÉLECTINE.

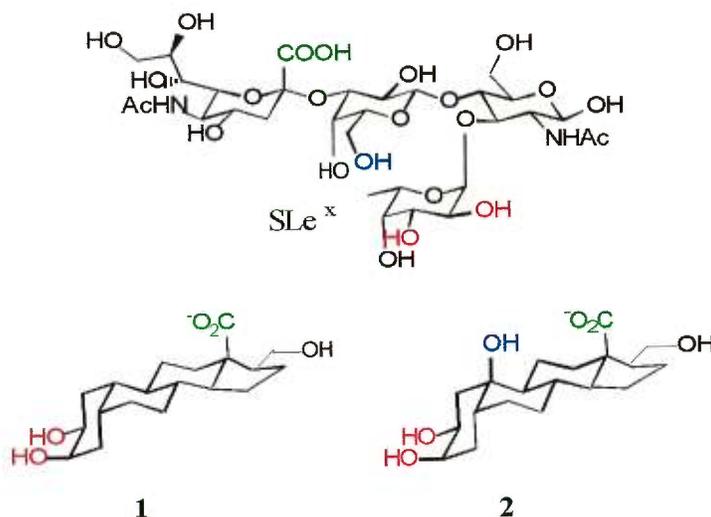
Un modèle a également été proposé pour l'interaction entre la P-sélectine et SLe^x(⁴⁹). Puisqu'il n'y a pas d'étude cristallographique de la P-sélectine rapportée jusqu'ici, un modèle de son domaine lectine a été élaboré à partir de la structure des domaines lectine et EGF de la E-sélectine. Comme le modèle de l'interaction entre la E-sélectine et SLe^x est probablement plus précis que celui établi pour la P-sélectine (on ne connaît pas la structure véritable de son domaine lectine), nous tenterons dans le cadre de ce travail, de faire le design et la synthèse d'antagonistes à la E-sélectine. Pour ce faire, nous utiliserons le modèle proposé par Kogan et coll. Toutefois, comme il y a 63% d'homologie entre les domaines lectines de la E- et de la P-sélectine, un antagoniste conçu pour la E-sélectine pourrait avoir de l'affinité pour la P-sélectine. Il est d'ailleurs possible de le constater tout au

long du tableau 2. Il est important de noter que ces inhibiteurs pourraient adopter plusieurs conformations. On ne peut donc pas affirmer à partir de ces résultats que l'interaction entre SLe^x et la E-sélectine est identique à celle entre SLe^x et la P-sélectine.

0.8 DESIGN D'UN INHIBITEUR RIGIDE DE LA E-SÉLECTINE.

Comme on a pu le constater au tableau 2, il est possible de simplifier considérablement SLe^x tout en gardant une bonne activité. En fait, certains antagonistes ne conservent que la partie fucose de ce dernier et démontrent des IC₅₀ remarquables. Il est toutefois nécessaire d'y intégrer le groupement carboxyle de l'acide sialique. C'est donc à partir de l'ensemble de ces résultats que nous avons proposé les modèles rigides de types stéroïdes représentés à la figure 10.

FIGURE 10. Modèles rigides de type stéroïde.



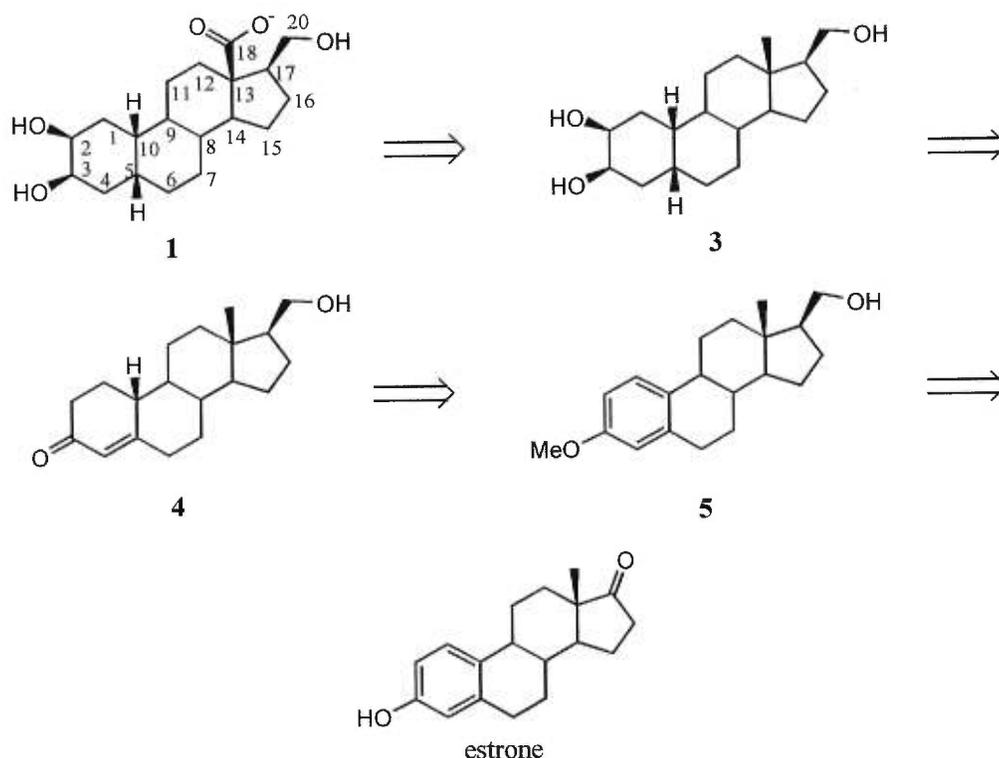
Ces modèles ont été élaborés et optimisés par des expériences de "docking" au site actif de la E-sélectine en utilisant le logiciel BIOSYM. Dans le cas du composé 1, le carboxylate remplace l'acide sialique et les groupements hydroxyles 2 et 3 de l'anneau A imitent les groupements hydroxyles en positions 2 et 3 du fucose de SLe^x. L'hydroxyle en 10 du modèle 2 fait un pont hydrogène avec la Tyr 94 comme le faisait l'hydroxyle 6 du galactose de SLe^x. Le modèle 2 devrait donc être un antagoniste plus efficace que le modèle 1 puisqu'il pourrait permettre une interaction additionnelle entre la E-sélectine et le ligand.

C'est toutefois le modèle 1 que nous avons choisi de synthétiser dans un premier temps. Ce modèle rigide permettra de tester l'exactitude du modèle de l'interaction entre la E-sélectine et SLe^x proposé par Kogan. De plus, il fournira de précieux indices sur la relation entre la topologie des récepteurs de la E- et de la P-sélectine. En effet, **étant donné la rigidité complète du modèle stéroïdal**, toute différence de topologie entre les sites récepteurs devrait se traduire par une différence correspondante dans les IC₅₀ mesurés (SLe^x est utilisé comme contrôle) . Au cours des pages qui suivent, nous décrivons donc la synthèse du composé 1 à partir de l'oes-trone.

CHAPITRE 1

1. RÉTROSYNTHÈSE

FIGURE 11. Rétrosynthèse de la 18-carboxylate-2 β ,3 β -dihydroxy-17-hydroxyméthyl-5 β -estrane 1.



La réaction clé de cette synthèse est celle qui permet de fonctionnaliser le carbone 18. C'est une réaction qui demande une disposition très spécifique des groupements fonctionnels impliqués (le méthyle 18 et le groupement hydroxyle sur le carbone 20). Heureusement, ces conditions sont remplies dans le cas des stéroïdes substitués de façon appropriée comme nous allons le voir au chapitre 4. Le composé 1 devrait donc pouvoir être synthétisé à partir du triol 3.

Le triol **3** quant à lui devrait pouvoir provenir de la cétone α,β -insaturée **4** sur laquelle on pourrait effectuer une hydrogénation de la double liaison suivie d'une α -hydroxylation à la position 2 puis d'une réduction à l'hydrure du carbonyle. L'énone **4**, à son tour, pourrait être obtenue en réalisant sur l'alcool **5** une réduction de Birch suivie d'une hydrolyse.

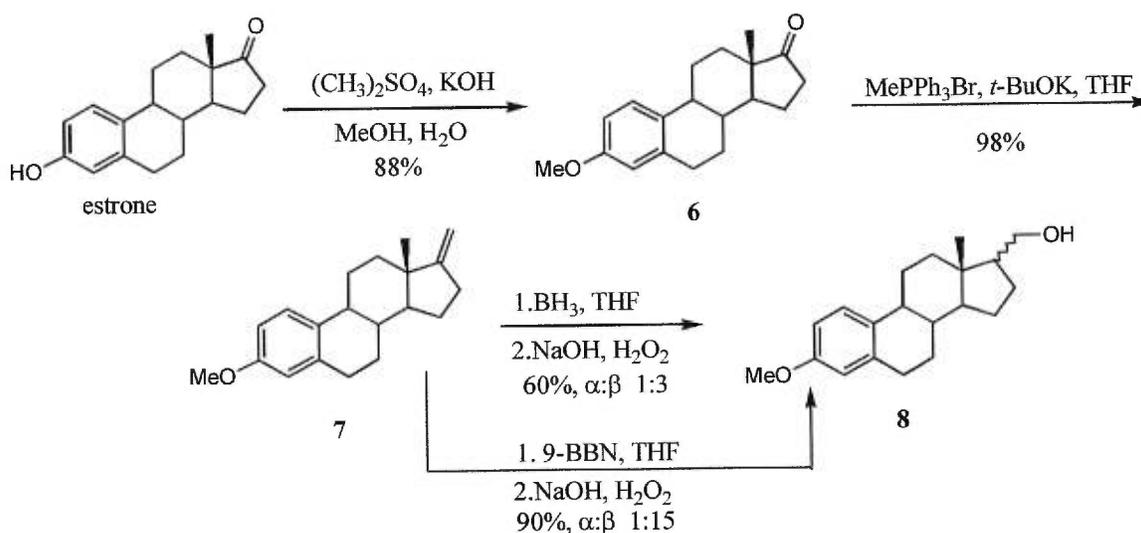
Finalement, on pourrait préparer l'alcool **5** à partir de l'oestrone. Il faudrait d'abord protéger le phénol. On pourrait alors réaliser une réaction de Wittig sur la cétone puis, en soumettant le groupement méthylène aux conditions d'hydroboration, on obtiendrait l'alcool **5**.

CHAPITRE 2

2. MODIFICATION DE L'ANNEAU D DE L'OESTRONE.

2.1 Synthèse

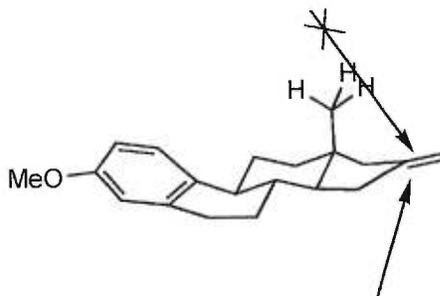
SCHÉMA 1. Modification de l'anneau D.



Comme on peut le voir dans le schéma 1, la transformation de l'anneau D ne pose pas trop de problèmes. On protège d'abord l'hydroxyle phénolique en utilisant, en présence d'hydroxyde de potassium, le sulfate de diméthyle comme agent alkylant, dans un mélange d'eau et de méthanol⁽⁵⁰⁾. Le céto-éther **6** désiré est obtenu dans un rendement de 88 %. On voit alors apparaître sur le spectre RMN ^1H du produit un singulet à 3.78 ppm qui représente le méthyle du groupement méthoxy. De plus, le point de fusion trouvé expérimentalement (118-120°C) correspond bien à celui donné dans

la littérature (121-123°C)⁽⁵⁰⁾. La préparation de l'ylure nécessaire à la réaction de Wittig subséquente est accomplie en mettant en présence le *tert*-butoxyde de potassium et le bromure de méthyltriphénylphosphonium^(51a). L'ajout de cet ylure à la solution du céto-éther **6** donne le composé méthylénique **7** dans un rendement de 98 %. Celui-ci est caractérisé par l'apparition d'un pic à 4.70 ppm qui indique la présence des deux protons vinyliques. Encore une fois, le point de fusion trouvé expérimentalement (84-85°C) concorde bien avec celui donné dans la littérature (81-82°C)^(51b). Finalement, l'hydroboration-oxydation de la double liaison conduit à l'alcool **8**⁽⁵²⁾.

Le spectre RMN ¹H montre l'apparition de deux signaux à 3.60 et 3.79 ppm appartenant à la partie AB (les deux hydrogènes en position 20) d'un système ABX, ce qui confirme la présence d'un groupement hydroxyle sur le carbone 20. De plus, on note la disparition des protons vinyliques à 4.70 ppm. La présence de deux singulets à 0.70 et 0.85 ppm ne peut que représenter le méthyle 18 car l'intégration totale de ces derniers équivaut à trois protons. Puisqu'on obtient deux déplacements chimiques différents au lieu d'un seul, il faut en conclure que le produit recueilli est en fait constitué d'un mélange de deux diastéréoisomères dont le majoritaire donne un pic à 0.70 ppm. C'est à l'aide des intégrations respectives de ces deux pics que nous avons pu déterminer le ratio diastéréoisomérique. Cette réaction est décrite dans la littérature⁽⁵²⁾ et les auteurs n'obtiennent, après recristallisation, que le diastéréoisomère où le carbone 20 est orienté de façon β. De plus, en regardant le modèle moléculaire du stéroïde **7** tel que représenté par la structure ci-dessous, on voit bien que la face α est plus dégagée (la face β est bloquée par le méthyle 18) et donc que l'attaque du réactif devrait s'effectuer par ce côté.



Finalement, la description du spectre RMN ^1H du diastéréoisomère où le carbone 20 est β est donnée dans la littérature^(53b) et on y remarque que le déplacement chimique du méthyle 18 est de 0.67 ppm. Comme ce déplacement chimique correspond à celui du diastéréoisomère majoritaire de notre mélange, nous avons considéré que le carbone 20 de ce dernier est β .

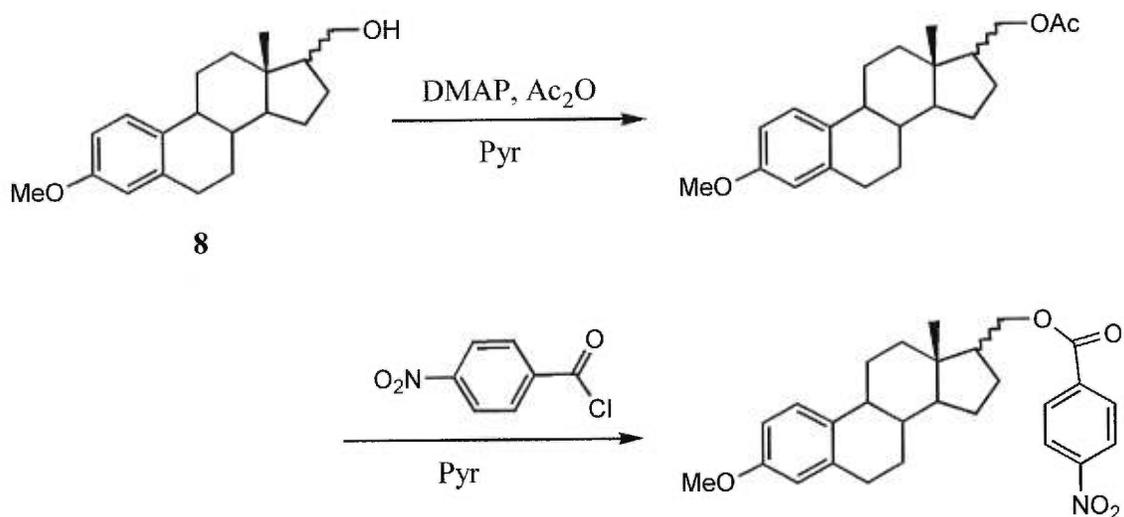
Comme on peut le voir dans le schéma 1, la diastéréosélectivité de l'hydroboration n'est pas satisfaisante ($\alpha : \beta$ 1 :3). Nous avons donc essayé un autre réactif: le 9-BBN^(53a). Comme ce réactif est beaucoup plus encombré, on devrait augmenter la diastéréosélectivité de la réaction. Effectivement, l'hydroboration de la double liaison donne une excellente diastéréosélectivité ($\alpha : \beta$ 1:15) et un rendement de 90 %.

2.2 Séparation des diastéréoisomères

Comme nous l'avons mentionné un peu plus tôt, les modifications apportées à l'anneau D du stéroïde n'ont pas posé trop de problèmes. C'est toutefois la séparation des diastéréoisomères qui s'avéra difficile. L'utilisation de la chromatographie sur colonne ne fut d'aucune utilité puisque les R_f des diastéréoisomères étaient identiques dans tous les éluants

essayés. Nous avons pu réussir une séparation après plusieurs cristallisations. Cependant, le rendement du procédé n'étant que de 31 %, nous avons dû explorer d'autres approches. Nous avons alors tenté de transformer la fonction alcool en ester^(54,55), espérant ainsi obtenir des R_f différents pour chaque diastéréoisomère (voir schéma 2).

SCHÉMA 2. Estérification de l'alcool 8.



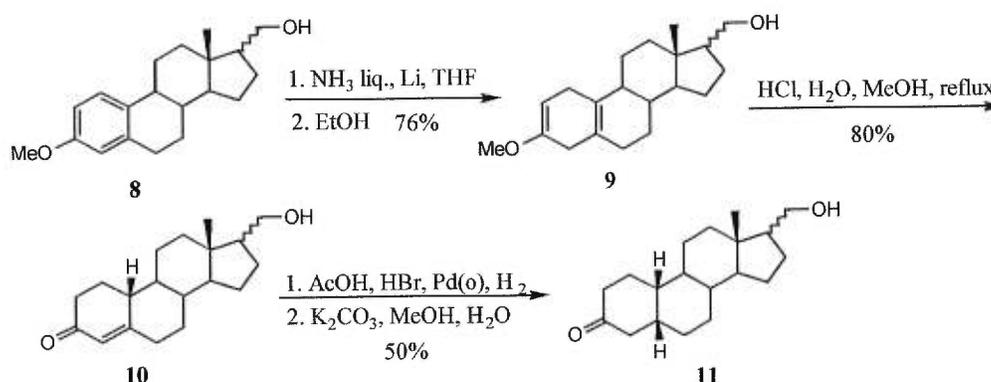
Malheureusement, tous nos efforts afin d'effectuer la séparation des deux diastéréoisomères se sont avérés infructueux et nous dûmes nous résoudre à continuer la synthèse avec le mélange de ces deux diastéréoisomères. Toutefois, cette décision ne mettra pas en cause la synthèse du composé 1 comme nous allons le voir au chapitre 4.

CHAPITRE 3

3. MODIFICATION DE L'ANNEAU A DU STÉROÏDE

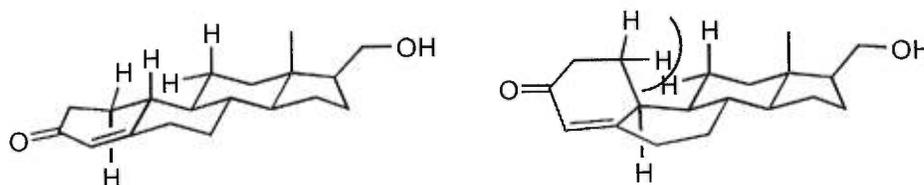
3.1 Réduction de l'anneau A

SCHÉMA 3. Modification de l'anneau A (première partie)



Une fois l'aménagement de la chaîne latérale en 17 terminé, nous avons porté notre attention vers l'aménagement de l'anneau A. La modification de l'anneau A débute par la réduction de Birch du cycle aromatique pour donner l'éther énolique **9**⁽⁵⁶⁾ avec un rendement brut de 76 %. Sans purifier le produit, nous avons ensuite procédé à l'hydrolyse de l'énol éther en milieu acide⁽⁵⁶⁾. Le spectre RMN ^1H du produit, obtenu avec un rendement de 80 %, confirme la présence du produit attendu par l'absence des pics produits par le cycle aromatique (normalement entre 6.64 et 7.20 ppm) et du pic représentant le méthyle du groupement méthoxy (normalement vers 3.78 ppm). On y note également l'apparition d'un singulet à 5.81 ppm qui est caractéristique du proton vinylique en α d'une cétone α,β -insaturée de ce type⁽⁵⁶⁾.

Comme on peut le voir dans le schéma 3, l'hydrolyse de l'éther énolique **9** donne lieu à un hydrogène en position 10 qui est orienté de façon β . Puisque dans ces conditions, le produit majoritaire sera le produit thermodynamique, il nous suffit de comparer la stabilité des produits possibles pour expliquer ce résultat. Leurs structures sont représentées ci-dessous.

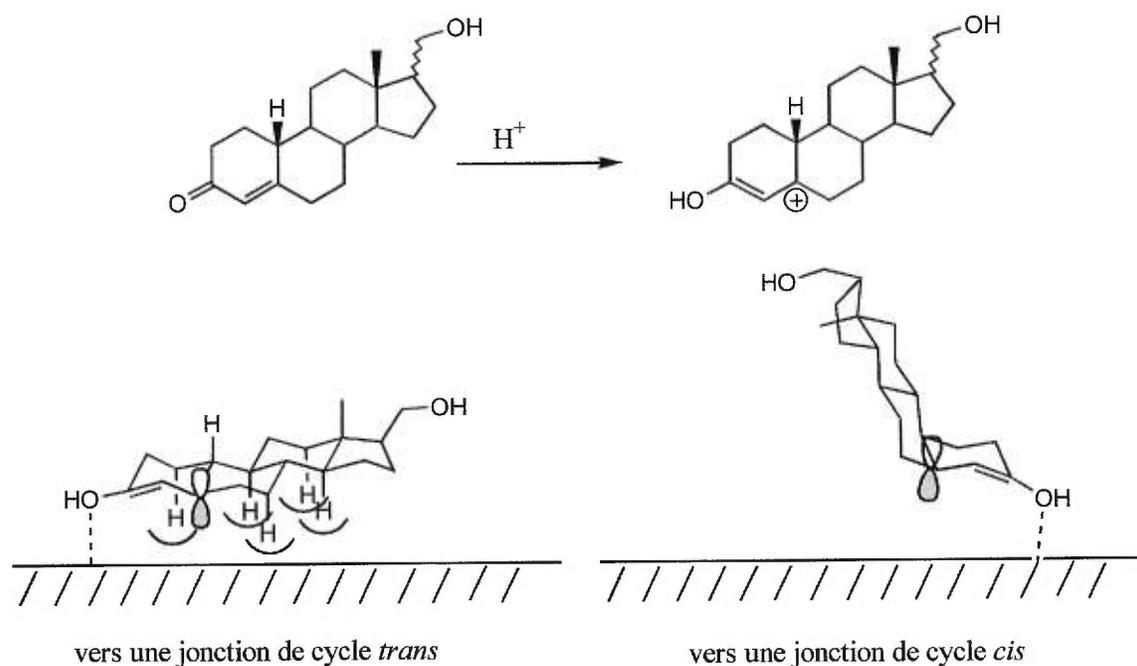


La structure du produit où l'hydrogène 10 est orienté de façon α est plus haute en énergie à cause de la répulsion causée par l'interaction entre les hydrogènes 11 de l'anneau C et les hydrogènes 1 de l'anneau A. De plus, ce diastéréoisomère ne permet pas à l'anneau B d'adopter une conformation chaise.

La double liaison de la cétone α,β -insaturée est ensuite réduite par le palladium(0) dans une solution contenant de l'acide acétique, de l'acide bromhydrique et le stéroïde **10**, sous une atmosphère d'hydrogène⁽⁵⁷⁾. Évidemment, un alcool placé dans ces conditions va se retrouver sous forme d'acétate. On doit alors soumettre le produit de réduction au carbonate de potassium dans un mélange de méthanol et d'eau pour pouvoir retrouver l'alcool désiré **11**. Celui-ci est obtenu dans un rendement de 50 % pour les deux étapes.

Comme il est montré dans le schéma 3, la réduction de la double liaison donne lieu à un hydrogène en position 5β . Dans ce cas-ci, la réaction est sous un contrôle cinétique. C'est donc l'état de transition le plus bas en énergie qui conduira au produit majoritaire. Ils sont représentés dans la figure 12⁽⁵⁸⁾.

FIGURE 12. États de transition possibles lors de l'hydrogénation de la double liaison de l'énone 11.



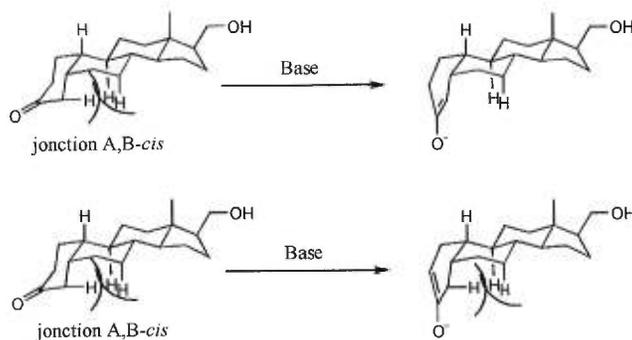
Comme on peut le voir, l'état de transition menant à une jonction de cycle A,B-*trans* est plus élevé en énergie relativement à l'autre état de transition, puisqu'il y a des interactions répulsives entre les hydrogènes axiaux du stéroïde et la surface du palladium. C'est donc le produit ayant une

jonction de cycle A,B-*cis* qui sera majoritaire. D'ailleurs, la réduction de la double liaison d'une cétone α,β -insaturée en milieu acide pour donner une jonction de cycle A,B-*cis* est décrite à plusieurs reprises dans la littérature⁽⁶⁹⁾.

3.2 α -Hydroxylation de la cétone.

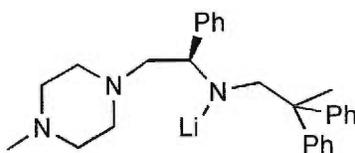
Dans le schéma général de rétrosynthèse proposé à la figure 11, l'étape qui suit normalement cette hydrogénation est une α -hydroxylation de la cétone en position 2 pour donner un groupement hydroxyle β . Nous dûmes malheureusement abandonner assez rapidement cette idée. En fait, pour pouvoir effectuer cette réaction, il faut pouvoir former majoritairement un énolate Δ^2 . Or, il est mentionné à plusieurs reprises dans la littérature que les stéroïdes ayant une jonction de cycle A,B-*cis* forment des énolates Δ^3 et ce, sous des conditions cinétiques et thermodynamiques⁽⁵⁹⁾. On peut comprendre la raison de cette tendance en regardant les modèles moléculaires des énolates. Comme on peut le voir dans la figure 13, une jonction de cycle A,B-*cis* implique une certaine tension de cycle puisque les hydrogènes 7 et 9 de l'anneau B repoussent l'hydrogène 4 de l'anneau A qui est situé trop près⁽⁵⁸⁾.

FIGURE 13. Formation des énolates de l'énone 10.



La formation de l'énolate Δ^3 provoque une décompression stérique puisque l'hydrogène 4 de l'anneau A est repoussé vers l'extérieur du cycle. Ce n'est cependant pas le cas lors de la formation de l'énolate Δ^2 , ce qui explique pourquoi on obtient principalement l'énolate Δ^3 dans des conditions cinétiques. Évidemment, l'énolate Δ^3 est également formé majoritairement dans des conditions thermodynamiques puisque ce dernier est plus stable que l'énolate en Δ^2 qui lui contient des tensions de cycle.

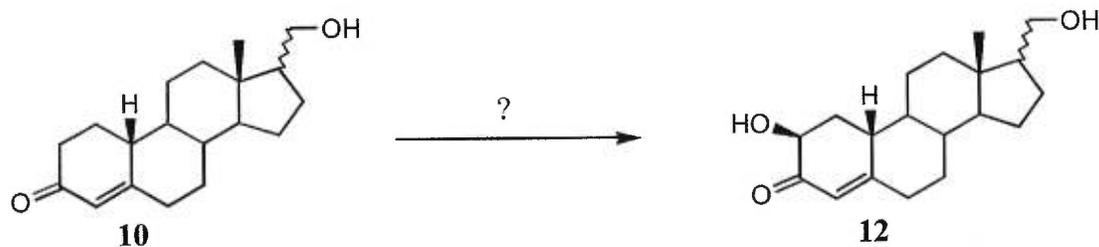
Une façon de contourner ce problème est l'utilisation en quantité stoechiométrique de la base chirale rapportée par Koga⁽⁶⁰⁾:



Il y a cependant un inconvénient majeur à ce réactif: sa synthèse. En effet, il faut compter huit étapes pour synthétiser cette base chirale à partir de la (R)-phénylglycine⁽⁶¹⁾. Cette possibilité est donc très peu attrayante dans le cadre d'une synthèse où il faudrait en utiliser une grande quantité.

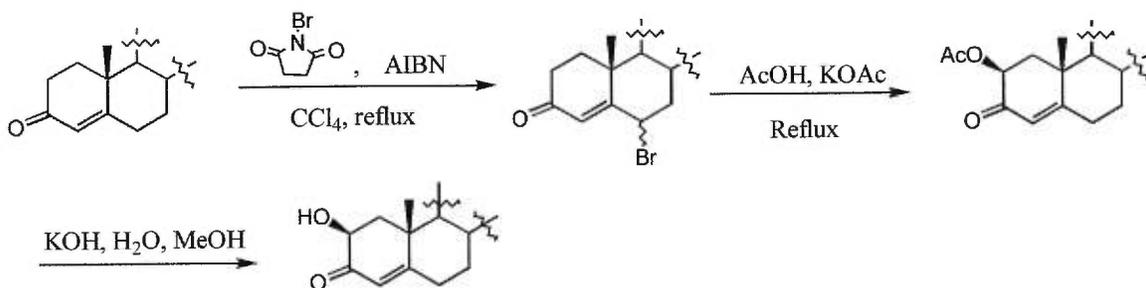
L'autre façon de contourner le problème consiste à laisser la double liaison Δ^4 en place au moment de faire l' α -hydroxylation (schéma 4).

SCHÉMA 4. Synthèse d'une 2 β -hydroxyénone.



Dans la littérature, il y a deux méthodes qui retiennent l'attention pour accomplir ce genre de transformation sur des modèles stéroïdiques. La première s'effectue en trois étapes distinctes (voir schéma 5)^(62a).

SCHÉMA 5. Méthode employée dans la littérature pour former une 2 β -hydroxyénone.



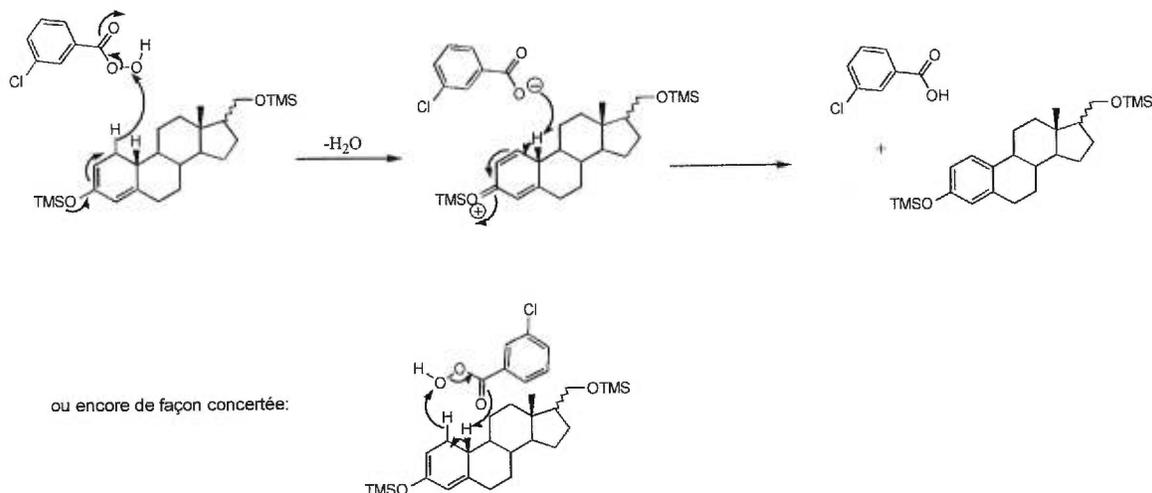
On doit en premier lieu faire la bromation du carbone 6 par la procédure de Djerassi^(62b). L'acétylation de ce composé donne alors un composé de type 2 β -acétoxyénone. Finalement, après hydrolyse de l'ester, les auteurs obtiennent une 2 β -hydroxyénone avec un rendement total de 12%. Les principaux inconvénients de cette méthode sont l'isomérisation du centre carbinolique (ce qui explique le faible rendement obtenu) ainsi que le nombre élevé d'étapes requises.

La deuxième méthode est plus directe. Il s'agit de former l'énolate de la cétone α,β -insaturée pour ensuite y ajouter le réactif oxydant MoOPH⁽⁶³⁾. On effectue donc en une étape l' α -hydroxylation de l'énone. Malheureusement, les auteurs obtiennent par cette méthode un mélange des deux diastéréoisomères. De plus, leur rendement n'est que de 32% et ce, dans le meilleur des cas.

Puisque les rendements obtenus à l'aide de ces deux méthodes sont très faibles, nous avons décidé d'essayer une méthode plus générale d' α -hydroxylation. Il s'agit de l'oxydation d'un triméthylsilyl énoïl éther par l'acide *m*-chloroperbenzoïque⁽⁶⁴⁾.

Nous avons donc déprotonné la cétone α,β -insaturée **10** en utilisant le LDA comme base. L'énol, piégé par du TMSCl, fut ensuite mis en présence de *m*-CPBA. Malheureusement, le produit recueilli, après un traitement avec une solution d'hydroxyde de sodium ou de TBAF, n'était pas celui que nous attendions. En effet, après purification, les composés ont montré par RMN ¹H des pics qui dénotent la présence d'un cycle aromatique. Pour qu'il y ait eu aromatisation du produit, il aurait fallu que le *m*-CPBA ne réagisse pas comme nous l'avions prévu.

SCHÉMA 6. Mécanisme proposé pour l'aromatisation du triméthylsilyl énoïl éther par le *m*-CPBA.

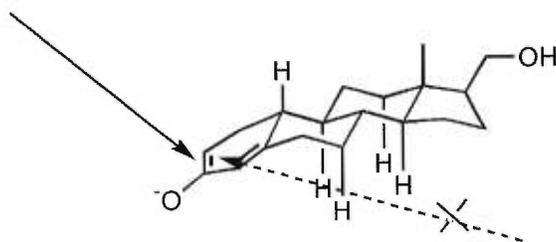


Comme on peut le voir dans le schéma 6, grâce à la participation du triméthylsilyl énoïl éther, l'attaque d'un oxygène électrophile du *m*-CPBA pourrait mener au départ d'un hydruure pour donner une molécule d'eau. Le carboxylate ainsi formé aurait alors pu être en mesure d'arracher un proton pour former le cycle aromatique. On peut également envisager la possibilité d'une réaction concertée où le départ de l'hydruure coïncide avec l'arrachement d'un proton.

Comme l'oxydation du triméthylsilyl énoïl éther par le *m*CPBA donne lieu à l'aromatisation de l'anneau A, nous avons décidé d'abandonner cette méthode. De toute manière, la stéréosélectivité associée à cette réaction est assez faible comme le rapporte un article dans lequel on y décrit l' α -hydroxylation du cholest-4-en-3-one (le ratio α : β du groupement hydroxyle 2 étant de 1 :1.5)⁽⁶⁶⁾.

Afin de réaliser la réaction d' α -hydroxylation, il nous fallait donc trouver un réactif qui ne provoquerait pas l'aromatisation de l'anneau A. De plus, ce dernier doit pouvoir attaquer de façon sélective la face β de l'énolate afin d'obtenir une bonne diastéréosélectivité. Comme on peut le voir dans la figure 14, l'approche du réactif par la face α est défavorisée à cause de l'encombrement stérique dû aux groupements hydroxyles axiaux.

FIGURE 14. Attaque d'un réactif sur l'énolate de la cétone α,β -insaturée 10.



En ayant en main un réactif encombré, on favorise une attaque par la face β puisque ce dernier sera plus sensible aux interactions défavorables causées par les hydrogènes axiaux. On devrait ainsi améliorer la diastéréosélectivité de la réaction.

En prenant cet élément en considération, nous avons décidé d'effectuer l' α -hydroxylation à l'aide des N-sulfonyloxaziridines suivantes⁽⁶⁷⁾ :



(+)-(2R,8aS)-10-(camphorsulfonyl)oxaziridine



(-)-(2S,8aR)-10-(camphorsulfonyl)oxaziridine

Nous avons tout d'abord effectué la réaction en utilisant chacun des énantiomères. La procédure est très simple. Après avoir formé l'énolate de l'énone **10** en utilisant LDA comme base, on ajoute l'oxaziridine à -78°C . Après extraction, on récupère l' α -hydroxycétone voulue. Comme on peut le voir dans le tableau 4, les rendements des réactions sont très semblables.

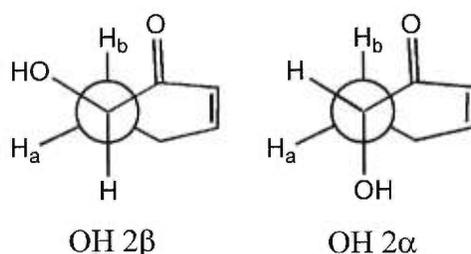
TABEAU 4. Rendements des réactions d' α -hydroxylation.

10-(camphorsulfonyl)oxaziridine	Rendements (%)
(+)	76
(-)	80
(+/-)	79

De plus, dans tous les cas, un seul diastéréoisomère est observé dans les spectres RMN ^1H . Il semble donc que seul l'encombrement du réactif soit responsable de la très bonne stéréosélectivité obtenue. Nous avons dès lors décidé d'utiliser un mélange des énantiomères de la (10-

(camphorsulfonyl)oxaziridine pour la suite des essais et ce, pour des raisons d'économie.

C'est par l'analyse du spectre RMN ^1H que nous pourrions déterminer quel est le diastéréoisomère obtenu. Comme on peut le voir ci-dessous, les deux diastéréoisomères possibles produiront un pic sous forme de quadruplet puisqu'ils ont deux hydrogènes vicinaux non équivalents chimiquement.



Toutefois, les constantes de couplage vont varier selon le diastéréoisomère. En effet, si on regarde le cas où le groupement hydroxyle est orienté de façon β , on s'aperçoit que l'hydrogène carbinolique est antipériplanaire par rapport à l'hydrogène b. Cette disposition amène une constante de couplage très élevée (de l'ordre de 10-13 Hz d'après la courbe de Karplus⁽⁶⁸⁾). Dans l'autre cas, tous les hydrogènes sont gauches les uns par rapport aux autres. Les constantes de couplage devraient donc être de l'ordre de 2 à 5 Hz.

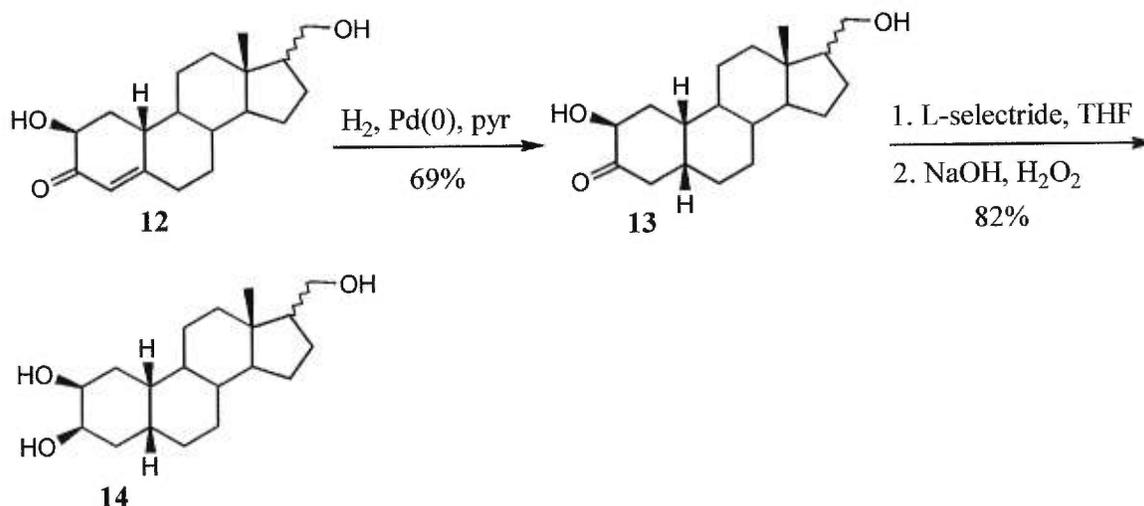
Comme on s'y attendait, on remarque sur le spectre RMN ^1H du composé **12** un quadruplet vers 4.06 ppm (voir annexe 1 p. 114). Les constantes de couplage qui lui sont associées sont égales à 12.93 et 5.54 Hz. Nous

avons donc recueilli le diastéréoisomère où le groupement hydroxyle est orienté de façon β .

3.3 Synthèse du triol 14

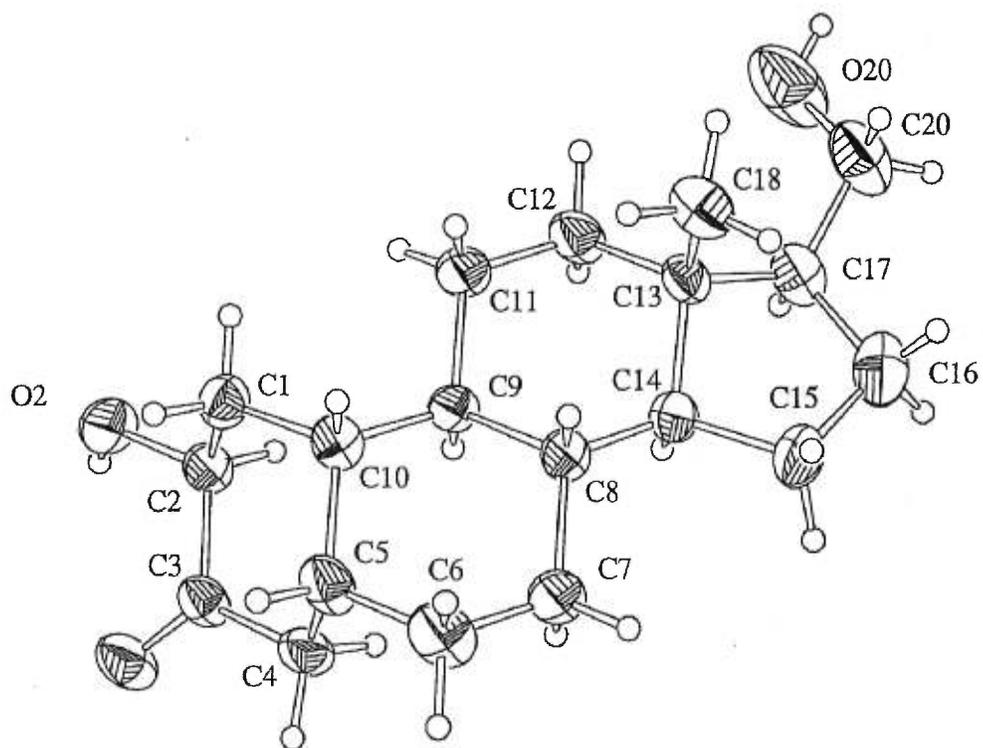
Comme on peut le voir dans le schéma 7, maintenant que nous avons en main l' α -hydroxycétone **12**, une hydrogénation suivie d'une réduction permettront d'obtenir le triol **14**.

SCHÉMA 7. Modification de l'anneau A (deuxième partie)



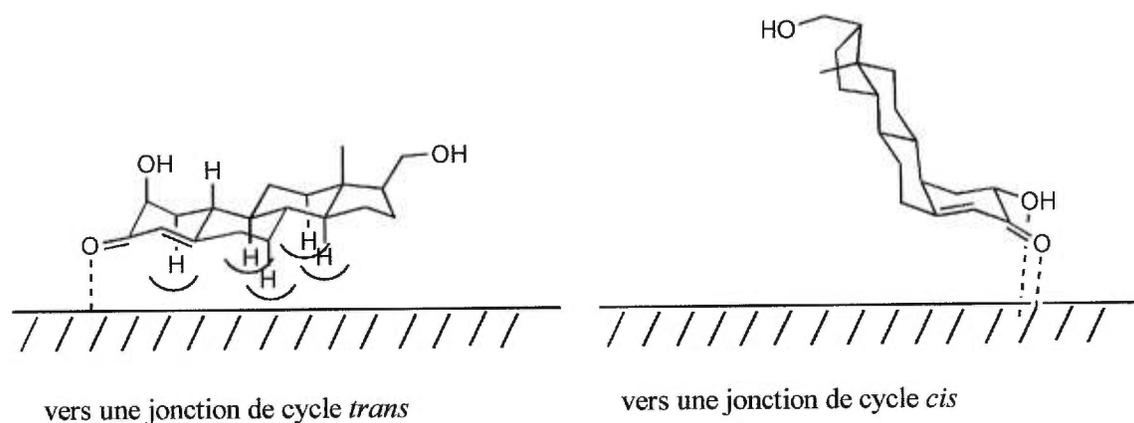
La réduction de la double liaison d'une cétone α,β -insaturée pour donner une jonction de cycle A,B-*cis* est largement documentée dans la littérature⁽⁶⁹⁾. Cependant, dans notre cas, la méthode choisie devait impliquer des conditions de réaction aussi neutres que possible afin de conserver la configuration de l'alcool en position 2. Nous avons donc décidé d'employer le palladium(0) dans la pyridine sous une atmosphère d'hydrogène pour d'effectuer la réduction⁽⁷⁰⁾. Le spectre RMN ^1H confirme la réduction de la

double liaison par la disparition du pic représentant le proton vinylique vers 5.81 ppm. On peut également y remarquer que la configuration de l'alcool 2 est demeurée intacte puisqu'on retrouve un quadruplet vers 4.16 ppm ayant des constantes de couplage quasi identiques à celles décrites un peu plus tôt. Toutefois, ce n'est qu'à partir d'une étude par diffraction des rayons-X des cristaux de l' α -hydroxycétone **13** (obtenus après trois cristallisations dans l'acétate d'éthyle) que nous pûmes confirmer de façon absolue la configuration de l'hydrogène 5 (voir annexe 2 p. 121). La représentation ORTEP de la structure de l' α -hydroxycétone **13** telle que déterminée par l'étude cristallographique est montrée ci-dessous.



La cause de la diastéréosélectivité de cette réaction est similaire à celle qui prévaut dans le cas de la réduction de l'énone **10** en conditions acides (voir schéma 3). En effet, comme on peut le voir dans la figure 15, l'état de transition menant à une jonction de cycle *trans* implique des interactions de répulsion entre la surface du palladium et les hydrogènes axiaux, ce qui augmente son énergie relativement à l'autre état de transition⁽⁷¹⁾.

FIGURE 15. États de transition possibles de l'hydrogénation de la double liaison de l' α -hydroxyénone **12**.



De plus, l'état de transition menant à une jonction de cycle A,B-*cis* est favorisé par l'interaction entre le groupement hydroxyle en position 2 et la surface du palladium, ce qui contribue à augmenter la différence d'énergie entre les deux états de transition.

La réduction de la cétone **13** est effectuée par le L-sélectride suivi de l'ajout de solutions aqueuses d'hydroxyde de sodium et de peroxyde d'hydrogène⁽⁷³⁾. Le spectre RMN ¹H confirme que la réduction de la cétone a bien eu lieu. En effet, on remarque l'apparition d'un pic vers 3.92 ppm ce

qui implique la formation d'un nouveau centre carbinolique. De plus, on remarque sur le spectre RMN ^{13}C la disparition du pic de la cétone qui se situait vers 211.87 ppm, et l'apparition d'un pic à 69.83 ppm ce qui, encore une fois, confirme la transformation de la cétone en alcool.

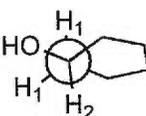
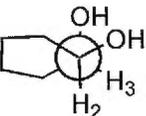
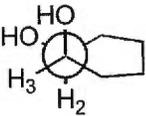
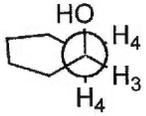
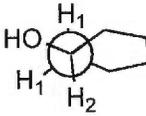
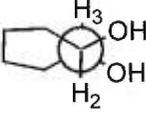
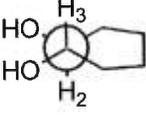
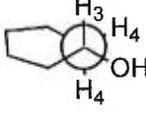
L'attaque du réactif se fera de façon équatoriale puisque ce dernier est trop encombré pour le faire de façon axiale. En effet, une attaque axiale sur une cyclohexanone implique des interactions répulsives entre le réactif et les hydrogènes axiaux du cycle. L'attaque équatoriale est quant à elle libre de telles répulsions. Pour confirmer la configuration de l'alcool en position 3, il nous fallait analyser les constantes de couplage des pics correspondant aux hydrogènes en position 2 et 3. Malheureusement, comme on peut le voir au tableau 5, le pic de l'hydrogène 2 est superposé au pic correspondant aux hydrogènes 20 puisque leurs déplacements chimiques sont très semblables (voir annexe 1 p. 114).

TABLEAU 5. Déplacements chimiques des hydrogènes situés en position 2,3 et 20.

Position des hydrogènes	Déplacement chimique avant acétylation (ppm)	Déplacement chimique après acétylation (ppm)
2	3.56	4.82
3	3.93	5.30
20	3.43, 3.60	4.04, 4.06

L'analyse des constantes de couplage est donc impossible dans ces conditions. Nous avons alors transformé les groupements hydroxyles en groupements acétoxy par la méthode usuelle⁽⁵⁴⁾. Suite à cette transformation, les déplacements chimiques des hydrogènes en position 2, 3 et 20 ont beaucoup changé. Toujours en regardant dans le tableau 5, on peut voir qu'il n'y a maintenant plus de recouvrement entre les pics, ce qui rend l'analyse des constantes de couplage faisable. Le tableau 6 résume l'ensemble des couplages entre les hydrogènes 1,2,3 et 4 possibles suite à la réduction de la cétone **13**.

TABLEAU 6. Analyse des configurations possibles des hydrogènes selon la configuration de l'alcool en position 3.

	Hydrogènes voisins de l'hydrogène 2 α .		Hydrogènes voisins de l'hydrogène 3.	
3 H α				
θ entre les hydrogènes ($^\circ$)	60 et 180	60	60	60 et 60
3 H β				
θ entre les hydrogènes ($^\circ$)	60 et 180	180	180	60 et 180

Des angles de 60° et de 180° donnent respectivement des constantes de couplage de l'ordre de 2 à 5 Hz et de 10 à 13 Hz selon la courbe de Karplus⁽⁶⁸⁾.

Afin de faciliter le calcul des constantes de couplage obtenues expérimentalement, nous avons effectué une série de découplage sélectif en faisant des expériences de double résonance (voir annexe 3 p. 127). Nous avons tout d'abord irradié l'hydrogène 2 afin de simplifier le pic correspondant à l'hydrogène 3. Malheureusement, le pic obtenu après irradiation fut un singulet élargi. Il nous fut donc impossible d'en tirer les constantes de couplage. On peut cependant en déduire que ces dernières doivent être assez faibles puisqu'elles ne sont pas détectables. Nous avons par la suite effectué l'irradiation de l'hydrogène 3. L'hydrogène 2 qui était sous la forme d'un doublet de doublets dédoublés est alors apparu sous la forme d'un doublet dédoublé. Nous avons pu en déduire les constantes de couplage qui sont dues aux hydrogènes en position 1 (12.15 et 4.73 Hz). Finalement, à l'aide du spectre RMN ^1H original du triacétate, nous avons déterminé la constante de couplage entre l'hydrogène 2 et l'hydrogène 3 (2.96 Hz).

En comparant ces valeurs à celles déterminées à partir du tableau 6, on arrive à conclure que l'hydrogène en position 3 est orienté de façon α et donc que le groupement hydroxyle 3 est orienté de façon β . En effet, il n'y a que le cas où l'hydrogène 3 est placé de façon α qui permette une constante de couplage entre ce dernier et l'hydrogène 2 de l'ordre de 2.96 Hz. Dans l'autre cas, l'angle entre ces deux hydrogènes serait de 180° et donnerait lieu à une constante de couplage de l'ordre de 10 à 13 Hz, ce qui est loin de la valeur expérimentale. De plus, seule la possibilité où l'hydrogène

3 est placé de façon α concorde avec l'observation qu'il ne donne lieu qu'à de petites constantes de couplage avec tous ses hydrogènes voisins.

Maintenant que les configurations de tous les centres chiraux de l'anneau A ont été établies avec certitude, nous pouvons passer à la réaction de fonctionnalisation du carbone 18.

CHAPITRE 4

4. LA RÉACTION HYPOIODITE

4.1 Introduction

La réaction qui permet de fonctionnaliser le méthyle 18 est essentielle à notre plan de synthèse. Cette transformation peut s'effectuer via cinq réactions connues:

- L'homolyse des N-chloramines (réaction de Löffler-Freytag)⁽⁷³⁾
- L'oxydation des alcools par le tétraacétate de plomb⁽⁷⁴⁾
- La photolyse des esters de nitrite (réaction de Barton)⁽⁷⁵⁾
- L'homolyse des hypochlorites⁽⁷⁶⁾
- La réaction hypoiodite⁽⁷⁷⁾

De ces méthodes, la réaction hypoiodite semble la plus simple et la plus efficace puisqu'elle donne directement un produit où le carbone 18 est oxydé au niveau de l'aldéhyde. L'oxydation des alcools par le tétraacétate de plomb est une réaction semblable mais elle mène à un degré d'oxydation inférieur (les produits obtenus sont des éthers cycliques). Les trois autres méthodes nécessitent la formation d'un dérivé dans une étape préalable à l'homolyse. Finalement, la réaction hypoiodite ne requiert aucun appareil ou source de lumière particulière. C'est donc pour toutes ces raisons que nous avons choisi de fonctionnaliser le carbone 18 par cette méthode. Les conditions expérimentales sont données dans l'équation 1.

La réaction débute par la formation d'hypoiodites d'acétyle. Ceux-ci sont en équilibre avec la paire d'ions I^+ et AcO^- . À ce point, un des doublets libres de l'oxygène d'un alcool peut attaquer l'ion I^+ pour former, après la perte d'un proton, un hypoiodite d'alkyle. Ce dernier décompose de façon homolytique lorsque la température de la solution atteint $60^\circ C$ ou plus, pour donner des radicaux I^\cdot et alkoxy. Cette décomposition est accélérée par une concentration adéquate de l'ion I^+ . Celle-ci peut être obtenue par l'irradiation de l'iode en solution par une lumière dont la longueur d'onde se situe entre 500 et 550 m μ .

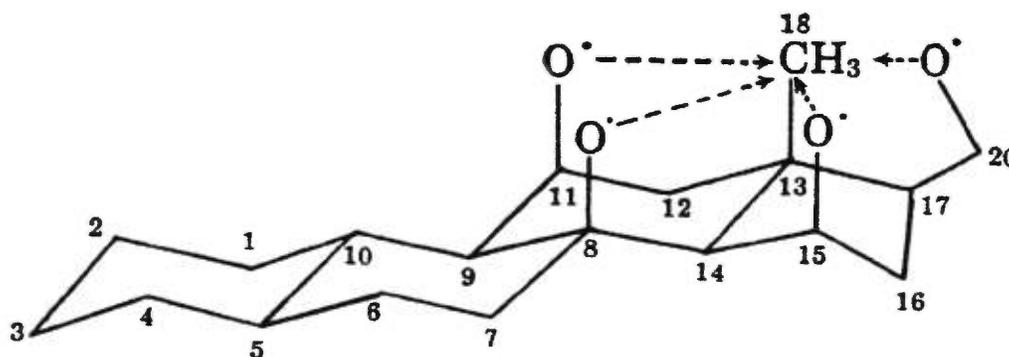
Le radical alkoxy peut maintenant arracher un proton de façon intramoléculaire ce qui donne un radical alkyle. Il y a ensuite une recombinaison des radicaux alkyle et I^\cdot pour donner un iodo alcool. La même séquence intervient une deuxième fois sans toutefois donner lieu à un diiodo alcool. En fait, la substitution d'un deuxième atome d'iode sur le carbone est impossible à cause de l'encombrement stérique. Il y a plutôt transfert d'un électron, ce qui va générer un carbocation et un iodure. L'oxygène attaque alors le carbocation pour former un iodo éther. Il y a ensuite substitution de l'iode par un groupement acétate. Finalement, une oxydation de Jones donne la lactone.

C'est l'abstraction de l'atome d'hydrogène par le radical alkoxy qui demande une disposition spécifique des groupements fonctionnels impliqués dans cette réaction. En effet, l'état de transition le plus favorable à l'abstraction de l'hydrogène est un cycle à 6 de forme chaise. Conséquemment, l'hydrogène arraché doit se situer sur le carbone δ . Il faut également

que la distance entre le radical alkoxy et l'hydrogène soit d'environ 2.0 Å. La réactivité des atomes d'hydrogènes diminue dans l'ordre tertiaire > secondaire > primaire, ce qui est prévisible.

Comme on peut le voir dans la figure 16, il y a quatre oxygènes qui sont placés dans l'espace de façon à répondre à toutes ces exigences et donc, à partir desquels le carbone 18 pourrait être fonctionnalisé. Il existe plusieurs stéroïdes ayant un oxygène en position 11 que nous aurions pu utiliser comme produit de départ pour notre synthèse. Toutefois, leur coût d'achat est beaucoup trop élevé. De toutes les possibilités restantes, il nous apparaissait plus commode d'utiliser l'oxygène en position 20 puisque les oxygènes en position 8 et 15 sont difficiles à obtenir. De plus, le coût de l'oestrone à partir de laquelle on peut introduire un oxygène en position 20 est acceptable.

FIGURE 16. Disposition des oxygènes pouvant fonctionnaliser le carbone 18 d'un stéroïde.



4.3 Ajustement du protocole expérimental

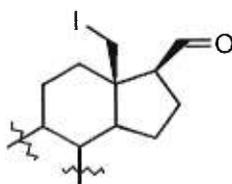
Les protocoles expérimentaux de cette réaction sont décrits à maintes reprises dans la littérature^(77c-f). Malheureusement, les conditions réactionnelles n'ont pu être reproduites de façon exacte dans le cadre de nos expériences. En fait, les articles décrivent l'utilisation de cette réaction pour transformer un stéroïde sur une échelle dix fois plus grande que celle utilisée lors de nos essais. Il a donc fallu ajuster les protocoles à notre échelle, ce qui exigeait également un travail d'optimisation des conditions réactionnelles. Comme on a pu le voir précédemment, le mécanisme de cette réaction est complexe et implique de nombreuses variables, ce qui rend le travail très difficile à accomplir.

Le premier paramètre à évaluer fut la puissance de la source lumineuse. Afin de faciliter la comparaison entre les différents protocoles, nous avons calculé pour chaque article le ratio de la puissance de la source lumineuse utilisée par rapport à la quantité de réactif stéroïdique. Ce ratio varie de 10 W/mmol à 43.8 W/mmol.

Si on fait le même calcul pour l'ensemble de nos essais, on arrive à des ratios variant de 45 W/mmol jusqu'à 180 W/mmol. Malheureusement, ce n'est pas un paramètre que nous pouvions contrôler à notre volonté puisqu'on ne disposait pas toujours d'une quantité suffisante de réactif stéroïdique pour pouvoir travailler avec un ratio comparable à ceux donnés par la littérature. Quelles sont alors les conséquences d'une augmentation de ce ratio sur les conditions réactionnelles? En fait, l'irradiation de la solution a deux buts:

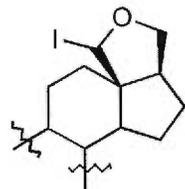
- Favoriser une concentration idéale d'ion I^+ .
- Chauffer la solution pour permettre l'homolyse de l'alkyle hypoiodite.

On peut alors penser que l'augmentation du ratio de la puissance de la source lumineuse par rapport à la quantité de réactif stéroïdique ne ferait que diminuer le temps de réaction. Ce n'est malheureusement pas aussi simple que ça. En fait, il y a une réaction secondaire qui est également favorisée par l'augmentation de ce ratio. Il s'agit de la réaction entre le tétraacétate de plomb et l'iode pour donner du dioxyde de carbone, de l'iodométhane et du diacétate de plomb^(77d). Si tel est le cas, il y aura accumulation de l'iodoalcool dans le milieu réactionnel. Après oxydation, nous récupérerons donc l'iodoaldéhyde représenté ci-dessous.



Ce sera alors l'indication que l'intensité de la source lumineuse est trop forte et qu'il faut ajouter des réactifs pour que la réaction puisse se compléter.

Le deuxième paramètre à évaluer fut le temps de réaction. L'analyse des plaques ccm ne fut d'aucune utilité puisque le mélange réactionnel contenait un très grand nombre de produits. Il nous fut impossible de déterminer où se situait la tache correspondant au produit attendu (l'iodoéther représenté ci-dessous).



Le seul indice pouvant nous indiquer que la réaction était terminée fut la couleur de la solution. En effet, au temps zéro, la solution est de couleur violette (couleur causée par l'iode). Au fur et à mesure que le temps passe, la solution devient de plus en plus pâle jusqu'au point où elle prend la couleur blanc crème. Ce changement de couleur est évidemment dû à la disparition de l'iode.

Malheureusement, cet indice n'est pas très fiable, surtout lorsque le ratio de la puissance de la source lumineuse par rapport à la quantité de réactif stéroïdique utilisé est grand. Comme nous l'avons vu un peu plus tôt, la disparition de l'iode n'est pas seulement causée par la formation d'acétyl hypoiodite, mais aussi par la formation d'iodométhane et de dioxyde de carbone.

En fin de compte, l'optimisation des conditions de réaction est particulière à chaque essai. Il s'agit donc pour le manipulateur de tenir compte des résultats des expériences précédentes pour ajuster son tir. Par exemple, pour une plus petite quantité de produit, il faudra ajouter plus d'équivalents de réactif pour la même intensité de lumière. Ce n'est toutefois qu'à la toute fin de la réaction, après l'oxydation de Jones, qu'il nous est possible de déterminer si les conditions réactionnelles étaient adéquates, par l'analyse des produits secondaires obtenus.

4.4 Résultats expérimentaux

Parmi les produits secondaires identifiés aux cours des différents essais, nous avons noté la présence de l'iodoéther. Nous avons donc augmenté la quantité de tétraacétate de plomb et d'iode dans le mélange réactionnel par rapport aux quantités prescrites par les protocoles décrits dans la littérature (voir les tableaux 7 et 8)^(77c-f). Nous avons également observé à quelques reprises d'autres produits secondaires. Nous croyons qu'ils pourraient être dû à la réaction du tétraacétate de plomb sur l'alcool. Les structures hypothétiques de ces produits sont représentés ci-dessous.

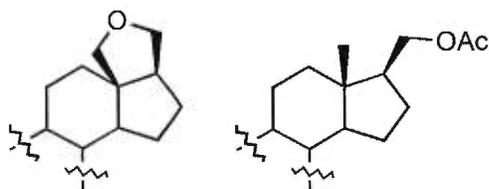
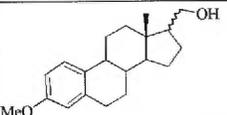
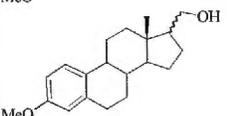
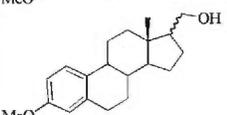
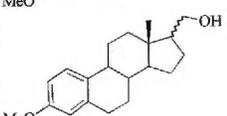
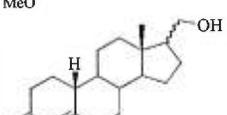
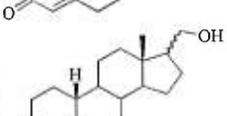
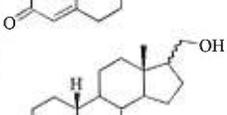
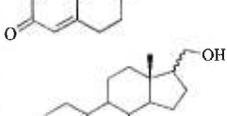
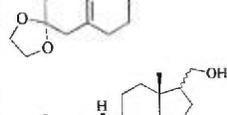
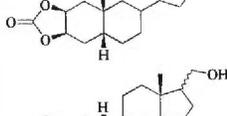
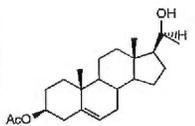
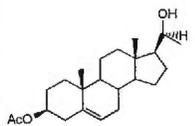
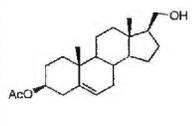
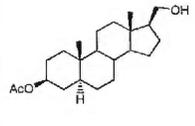
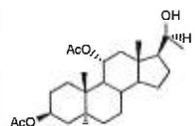
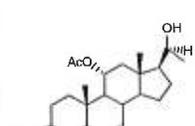
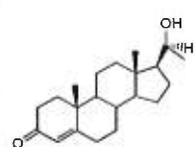


TABLEAU 7. Résumés des différentes modifications apportées à la réaction hypoiodite.

Entrée	Produits de départ	Quantité de Pb(OAc) ₄ (équiv.)	Quantité de I ₂ (équiv.)	Temps d'irradiation (min.)	Rendements* (%)
1	 8	4.46	1.14	120	25
2	 8	5.82	1.14	150	25
3	 8	6.69	1.14	210	16
4	 8	6.69	3.00	210	18
5	 10	4.46	1.14	120	30
6	 10	4.46	2.33	120	20
7	 10	6.19	1.14	300	27
8	 --	4.46	1.14	180	traînée
9	 16	7.14	1.59	90	22
10	 16	7.14	1.59	90	30

* Il s'agit des rendements obtenus pour la transformation des produits de départ en lactones.

TABLEAU 8. Résumé des réactions hypiodites décrites dans la littérature.

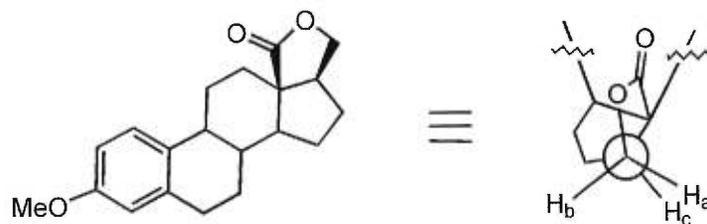
Entrée	Produits de départ	Quantité de Pb(OAc) ₄ (équi.)	Quantité de I ₂ (équi.)	Temps de réaction (min.)	Rendement* (%)	Réf.
1		3.89	0.87	60-90	39-43	77d
2		2.43	1.14	150	46	77e
3		5.54	1.6	90	51	77f
4		--	--	--	75	77b
5		2.6	1.18	120	70	77c
6		2.55	1.18	--	72	77c
7		--	--	--	47	77c

* Il s'agit des rendements obtenus pour la transformation des produits de départ en lactones.

Comme la fonctionnalisation du carbone 18 est essentielle à notre synthèse, nous voulions y incorporer la réaction hypiodite le plus tôt possible. En fait, cette synthèse ne peut être complétée que si cette réaction donne les résultats escomptés. Nous avons donc d'abord soumis l'alcool **8** aux conditions de la réaction hypiodite.

Nous avons mentionné auparavant que la séparation des diastéréoisomères **8** (p. 39) n'était pas nécessaire à cette synthèse. Effectivement, lors de la réaction hypiodite, seul le diastéréoisomère dont le carbone 20 est β réagira pour donner une lactone. Le mélange sera dès lors facile à séparer puisqu'il y aura des groupements fonctionnels différents sur chacun des deux composés qui le constituent.

Le spectre RMN ^1H de la lactone est très caractéristique. On y remarque tout d'abord la disparition du pic à 0.70 ppm, ce qui reflète la fonctionnalisation du méthyle 18. Il y a ensuite l'apparition d'un doublet à 4.13 ppm et d'un doublet dédoublé à 4.37 ppm. Il s'agit des hydrogènes de la lactone. La différence de multiplicité des pics peut être expliquée en regardant la structure de la lactone formée.



Comme on peut le voir ci-dessus, les protons H_a et H_b ne sont pas équivalents chimiquement. Il y a donc un couplage géminale entre ces deux protons. Le proton H_a couple également avec le proton H_c ce qui donne un

pic sous forme d'un doublet dédoublé. Toutefois, l'angle entre les protons H_b et H_c est de $\sim 90^\circ$. La courbe de Karplus⁽⁶⁸⁾ nous indique que dans ces cas, la constante de couplage est à peu près nulle. On obtient donc sur le spectre RMN 1H , un pic sous forme d'un doublet pour le proton H_b . Les commentaires concernant le spectre RMN 1H de ce composé s'appliquent à toutes les lactones formées à partir de la réaction hypiodite et ce, peu importe quel est le substrat de départ.

Malgré toutes les modifications apportées, les rendements expérimentaux de cette réaction n'ont pas excédé 25% comme on peut le voir dans le tableau 7 aux entrées 1 à 4. Puisque l'alcool **8** ne semblait pas être un bon substrat pour la réaction hypiodite, nous avons décidé de continuer la synthèse. Un intermédiaire plus avancé nous donnerait peut-être de meilleurs résultats. Au fur et à mesure que nous progressions dans la synthèse, nous avons soumis les intermédiaires aux conditions de la réaction hypiodite. Malheureusement, malgré tous les composés essayés, les rendements n'ont jamais été satisfaisants. Finalement, nous avons choisi d'utiliser l'alcool **16** (voir entrées 9 et 10 du tableau 7) puisque sa structure est semblable à celles des composés donnant les meilleurs rendements dans la littérature (voir entrées 4,5 et 6 du tableau 8).

4.5 Préparation du substrat choisi pour effectuer la réaction hypiodite.

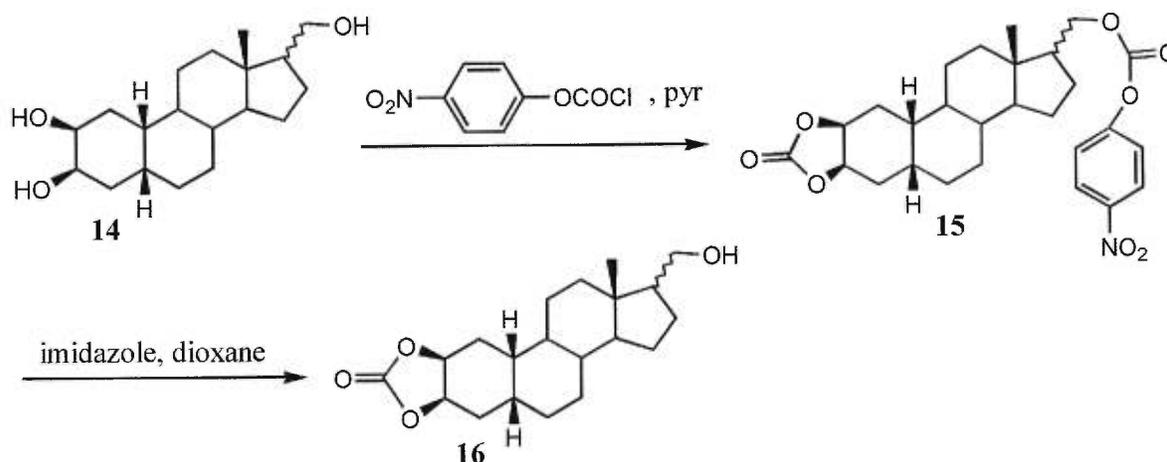
Il faut d'abord protéger les alcools 2 et 3 du triol **14** afin d'éviter le plus grand nombre de réactions secondaires possibles. Plusieurs critères entrent en ligne de compte lors du choix du groupe protecteur à utiliser. Il faut d'abord s'assurer que la méthode choisie est la plus efficace. Si on

prend en considération la méthode habituelle pour protéger sélectivement des alcools secondaires, il faut compter trois étapes:

1. Protection sélective de l'alcool primaire en position 20.
2. Protection des alcools secondaires en position 2 et 3.
3. Déprotection de l'alcool primaire.

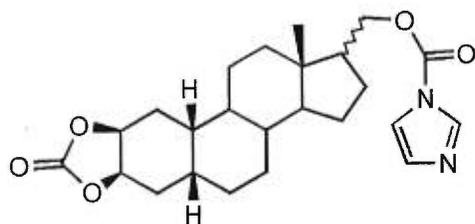
Par contre, si on examine la possibilité de protéger le diol par la formation d'un cycle (un acétal ou encore un carbonate cyclique), on peut sauver une étape. Lors de la fonctionnalisation du carbone 18, les conditions réactionnelles sont assez acides puisqu'il y a formation d'acide acétique et d'acide iodhydrique (voir schéma 8). La protection du diol sous forme d'acétal ne sera donc pas efficace. Nous avons alors décidé de protéger les alcools secondaires sous forme de carbonate cyclique par la méthode représentée dans le schéma 9⁽⁷⁸⁾.

SCHÉMA 9. Protection des alcools en position 2 et 3 du triol 14.



Nous avons donc ajouté à la solution du triol **14** dans la pyridine du chloroformate de *p*-nitrophényle. Après avoir évaporé la pyridine, on solubilise le carbonate mixte **15** dans le dioxane et on y ajoute une solution d'imidazole afin d'effectuer l'aminolyse et retrouver l'alcool libre. Le spectre RMN ^1H confirme l'obtention de l'alcool libre puisqu'on y retrouve les deux doublets dédoublés à 3.56 et 3.72 ppm qui sont caractéristiques des hydrogènes en position 20. De plus, on retrouve deux pics à 4.58 et 4.78 ppm qui représentent respectivement les hydrogènes en position 2 et 3. Comme on peut le voir, ceux-ci sont beaucoup plus déblindés que dans le spectre du triol **14** où on les retrouvait respectivement à 3.56 et 3.93 ppm. La formation de ce carbonate cyclique confirme une fois de plus la relation *cis* des alcools en position 2 et 3.

Malheureusement, un produit secondaire est toujours formé lors de l'hydrolyse. Le spectre RMN ^1H de ce produit contient trois singulets à 6.98, 7.32 et 8.03 ppm. Ces pics sont caractéristiques du noyau imidazole. Il doit donc s'agir du composé représenté ci-dessous:



Il est possible d'obtenir l'alcool libre à partir de ce dernier en le soumettant à des conditions acides. Malgré cela, le rendement global de la transformation du triol **14** jusqu'à l'alcool libre **16** n'est que de 30% dans le meilleur des cas. Tout de même, maintenant que nous avons en main l'alcool **16**, nous pouvons effectuer la réaction hypoiodite.

4.6 Analyse des résultats

À notre plus grand dépit, les rendements obtenus pour la transformation de ce composé en lactone ne furent pas très élevés (30% au plus). Pourtant, la littérature décrit des rendements beaucoup plus grands (voir tableau 8). Quelles sont les raisons pouvant expliquer un tel écart?

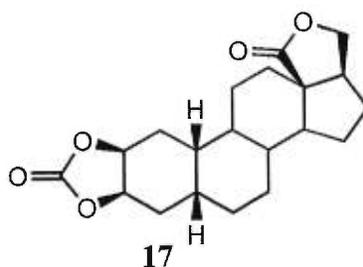
La raison qui saute aux yeux est évidemment le ratio de la puissance de la source lumineuse par rapport à la quantité de réactif stéroïdique qui était plus élevé que ceux décrits dans la littérature. Les ajustements apportés à la réaction n'ont probablement jamais été optimaux.

En ce qui concerne les autres essais (voir entrées 1 à 8 du tableau 7), on peut également associer les mauvais rendements obtenus à la nature des produits de départ. En effet, le cours de la réaction radicalaire intramoléculaire peut être changé par la présence de groupements insaturés comme les cétones ou encore les doubles liaisons. En fait, il peut y avoir addition du radical de façon intermoléculaire sur les groupements insaturés, ce qui baisse le rendement de la réaction^(78a). Comme certains essais (voir entrées 5 à 8 du tableau 7) entre dans cette catégorie de produits, il est normal que les rendements soient plus faibles. On peut également observer cette tendance en comparant les entrées 4, 5 et 6 aux autres entrées du tableau 8. Finalement, il est possible qu'une réaction secondaire diminue les rendements obtenus pour les composés ayant un noyau aromatique (voir entrées 1 à 4 du tableau 7). En effet, il est connu que les hypoiodites d'acétyle sont des réactifs qui sont assez électrophiles pour pouvoir effectuer une halogénéation des noyaux aromatiques.

CHAPITRE 5

5. ATTEINTE DE L'OBJECTIF DE SYNTHÈSE

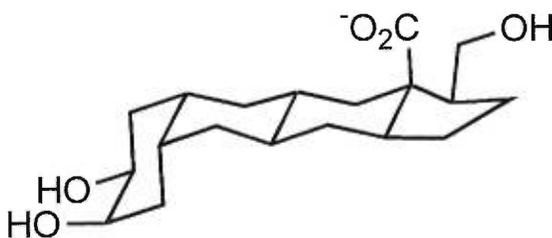
Malgré le faible rendement de la réaction, nous avons pu accumuler une quantité suffisante de la lactone **17** (représentée ci-dessous) pour pouvoir terminer la synthèse.



Nous avons alors ajouté une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 1M à la solution du composé **17** dans le méthanol afin de retrouver le diol et d'ouvrir la lactone^(78,79). La solution a alors été acidifiée jusqu'à pH 5 à l'aide d'une solution de HCl 10 % et ce, dans le but d'obtenir le trihydroxyacide. Malheureusement, le produit recueilli fut la dihydroxylactone. Afin d'éviter ce problème, nous avons donc décidé de ne pas acidifier la solution afin de récupérer le sel de sodium du carboxylate.

Conséquemment, après avoir effectué le traitement en milieu basique, nous avons évaporé les solvants. Le solide obtenu a alors pu être purifié en le passant sur une colonne de Sephadex® en utilisant la DMF comme

éluant. L'analyse du spectre RMN ^1H nous indique que nous avons bien obtenu le composé **1** (voir annexe 1 p. 114).



1

En effet, on s'aperçoit que les pics correspondants aux hydrogènes 2 et 3 sont respectivement situés à 3.16 et 3.49 ppm. Ils sont beaucoup plus blindés que lorsqu'ils étaient protégés sous forme de carbonate cyclique (dans ce cas, ils étaient situés à 4.58 et 4.78 ppm). Les pics correspondants aux hydrogènes 20 sont représentés sous forme d'un doublet dédoublé et d'un doublet, comme si la lactone était toujours fermée. On peut cependant supposer qu'il peut y avoir formation d'un pont hydrogène entre l'alcool 20 et le carboxylate, ce qui fixerait les hydrogènes 20 en place. De plus, on note la présence de trois pics jusqu'ici absents. Il est possible que ce soit les trois hydrogènes des groupements hydroxyles puisque le spectre a été pris en utilisant la DMF deutéré comme solvant. Si c'est le cas, il ne peut s'agir du produit où la lactone serait toujours présente puisqu'il n'y aurait alors que deux groupements hydroxyles libres présents sur la molécule.

Nous avons donc réussi à obtenir le composé **1** en évitant sa relactonisation. Nous avons alors soumis ce dernier à des tests biologiques afin de déterminer son activité vis-à-vis la E- et la P-sélectine (voir annexe 4 p. 131 pour la description des tests). Ces derniers ont été rendus possible grâce

au travail du Dr. Marc Vaillancourt du laboratoire de chimie bioorganique du Dr. Yvan Guindon à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal.

Malheureusement, les résultats obtenus ne sont pas complets puisqu'il nous a été impossible de tester le composé **1** à une concentration plus élevée que 1 mM à cause de problèmes de solubilité du composé. En effet, le test implique des cellules vivantes qui supportent mal la présence de DMSO. Pour pouvoir faire une solution plus concentrée du composé **1**, il nous faudrait augmenter le pourcentage de DMSO en solution, ce qui mettrait en péril la validité du test. Nous devons donc nous en tenir au résultat suivant: le composé **1** donne un $IC_{50} \geq 1$ mM.

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons pu rencontrer nos objectifs. En effet, nous avons conçu le composé **1**, un modèle rigide qui imite SLe^x, à l'aide de la modélisation moléculaire. Pour ce faire, nous avons dû reproduire le modèle de l'interaction entre SLe^x et la E-sélectine tel que décrit par Kogan et coll.⁽²⁴⁾ Nous avons ensuite disposé les groupements carboxylate et diol sur le squelette d'un stéroïde de façon à ce qu'ils soient disposés dans l'espace comme il le sont sur SLe^x dans ce modèle.

Nous avons ensuite mené à terme la synthèse du composé **1** à partir de l'oestrone. Dans un premier temps, il a fallu mettre en place un alcool en position 20 afin de pouvoir effectuer par la suite la transformation du carbone 18 en acide carboxylique. On a ensuite modifié l'anneau A ce qui impliquait la formation de quatre nouveaux centres chiraux. Le noyau aromatique fut réduit à l'énone par une réduction de Birch suivie d'une hydrolyse. Un alcool fut alors introduit en position 2 β par l'attaque électrophile du (camphorsulfonyl)oxaziridine sur l'énol de la cétone α,β -insaturée. La jonction A,B-*cis* a été obtenue par la réduction de l' α -hydroxyénone avec Pd(0) sous une atmosphère d'hydrogène. La cétone en position 3 fut réduite par le L-sélectride pour donner un groupement hydroxyle axial. Finalement, le carbone 18 fut fonctionnalisé par la réaction hypiodite ce qui nous donna, après un traitement basique, le composé **1**.

Malheureusement, puisque nous ne pûmes déterminer avec justesse le IC₅₀ de cet inhibiteur à cause d'un problème de solubilité, il nous est im-

possible de tirer des conclusions définitives en ce qui concerne l'exactitude du modèle de Kogan qui décrit l'interaction entre SLe^x et la E-sélectine. Toutefois, les résultats préliminaires nous permettent déjà de voir que notre inhibiteur sera moins efficace que la plupart des composés présentés dans le tableau 1 (p. 9). Deux hypothèses pourraient expliquer cette "mauvaise performance". Tout d'abord, il est fort possible que la grande rigidité de notre inhibiteur ne lui permette pas d'accommoder le site actif de la E-sélectine autant qu'un composé plus flexible le pourrait. Le modèle de Kogan n'est probablement pas tout à fait exact.

Un autre facteur qu'il ne faut pas négliger est le caractère très hydrophobe de l'inhibiteur. En effet, toujours en regardant le tableau 1, on peut voir que la grande majorité des inhibiteurs sont constitués de sucres. Ces molécules sont donc assez hydrophiles. Le caractère hydrophobe de notre inhibiteur permet peut-être des liaisons non-spécifiques sur la protéine ce qui pourrait le rendre moins disponible pour se lier au site actif.

Dans le futur, la détermination des valeurs exactes des IC₅₀ de notre inhibiteur devra être effectuée par le biais d'un test qui les mesure sans l'utilisation de cellules vivantes comme il en existe dans d'autres laboratoires. Ces données permettront peut-être de mieux établir le degré de similarité entre l'interaction de SLe^x avec la E- et la P-sélectine. Elles permettront également d'évaluer avec plus de justesse l'exactitude du modèle de Kogan et coll.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

NOTES CONCERNANT LA PARTIE EXPÉRIMENTALE

A) INSTRUMENTATION

Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un appareil de type "Büchi" et ne sont pas corrigés.

Les spectres infrarouges (IR) ont été enregistrés sous forme de pastille de NaCl sur le spectrophotomètre Perkin-Elmer modèle 783 et sur le FTIR Bomem MB-series. La bande à 1601 cm^{-1} du polystyrène a été utilisée comme référence.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AMX 300 et sur le Bruker ARX 400. Le solvant utilisé est le CDCl_3 , sauf lors d'indication contraire. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) à bas champs par rapport au tétraméthylsilane (TMS) qui est utilisé comme référence interne. L'analyse des régions résolues a été effectuée en approximation du premier ordre en utilisant la notation suivante: "s" pour singulet, "d" pour doublet, "dd" pour doublet dédoublé, "ddd" pour doublet de doublets dédoublés, "t" pour triplet, "m" pour multiplet, "se" pour singulet élargi. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en hertz (Hz).

Les pouvoirs rotatoires ($[\alpha]_D$) sont mesurés sur un polarimètre Perkin Elmer modèle 341 aux longueurs d'ondes de la lampe de sodium (589 nm). Toutes les mesures ont été effectuées à la température ambiante.

Les spectres de masse (haute résolution) ont été enregistrés en mode ionisation par impact électronique (IE) sur un spectromètre AEI MS-902. Les spectres de masse (basse résolution) ont été enregistrés en Electrospray (ES) sur un spectromètre Quattro II (Micromass). Les analyses élémentaires ont été effectuées par le Laboratoire d'Analyse Élémentaire de l'Université de Montréal.

B) PURIFICATION DES SOLVANTS ET RÉACTIFS.

Tous les solvants et réactifs anhydres ont été préparés comme suit:

THF: distillé sous azote en présence d'hydrure d'aluminium (LAH).

Diisopropylamine, pyridine et triéthylamine: distillés sous azote en présence d'hydrure de calcium (CaH_2).

Tous les solvants commerciaux non anhydre utilisés ont été distillés sur colonne avec garniture de billes de verre à l'exception de quelques solvants, qui ont été utilisés sans purification et dont voici la liste.

<u>MeOH</u>	qualité réactif et spectrograde
<u>DMF</u>	qualité HPLC
<u>Éther éthylique</u>	qualité réactif
<u>Éther de pétrole(65-110°C)</u>	qualité réactif
<u>Alcool isopropylique</u>	qualité réactif

C) CHROMATOGRAPHIE

Les chromatographies sur couche mince (ccm) furent effectuées sur des plaques de gel de silice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) de 0.2 mm d'épaisseur sur un support d'aluminium. La révélation fut effectuée par trempage dans une solution d'acide sulfomolybdique suivi d'un chauffage à 200°C sur une plaque chauffante.

Les chromatographies sur colonne (flash) furent réalisées selon la méthode de Still⁸⁰ en utilisant la silice de Merck 60 (230-400 mesh).

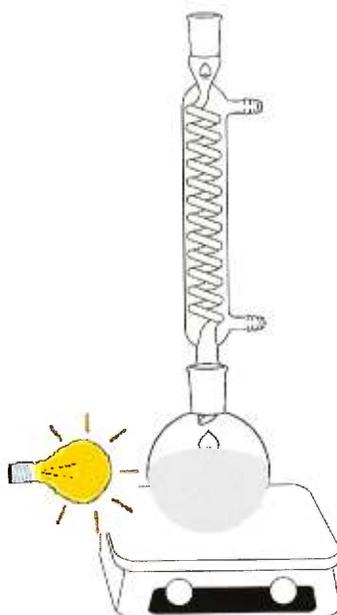
Les filtrations sur gel de silice furent réalisées sous pression réduite (trompe à eau) en utilisant un entonnoir muni d'un verre poreux contenant de 2 à 5 cm de silice du même type que celle décrite précédemment. L'éluant utilisé fut composé d'éther éthylique et d'éther de pétrole dans un pourcentage de 5:95.

Les filtrations sur Sephadex® furent réalisées (sans pression d'azote) dans une colonne munie d'un verre poreux contenant ~30 cm de Sephadex® LH-20 (25-100µm). L'éluant utilisé fut la DMF.

D) GÉNÉRALITÉS

Lorsque des conditions anhydres furent utilisées, l'atmosphère inerte fut obtenue en maintenant une pression d'azote sec sur le mélange réactionnel. Les seringues et aiguilles à doubles pointes furent préalablement séchées dans une étuve à 125°C pendant un minimum de 12 heures; la verrerie de laboratoire fut quant à elle séchée à la flamme et refroidie sous azote.

Les réactions hypoiodite ont été effectuées sous atmosphère inerte en utilisant une lampe 75W, 120 V disposée selon le montage illustré ci-dessous.



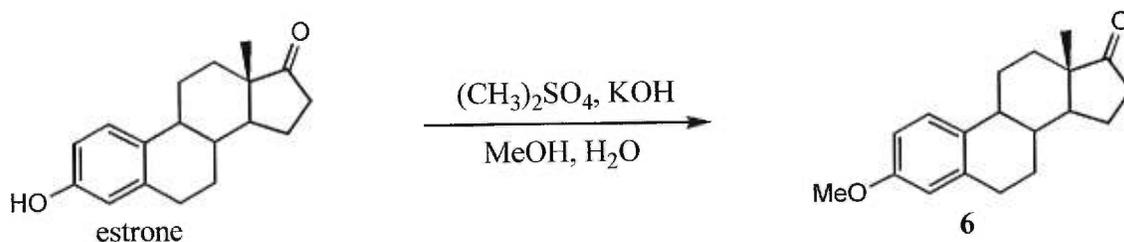
Lorsque l'expression "traitement habituel" est employée, cela signifie que la phase organique fut séchée sur sulfate de magnésium, filtrée par gravité

et que le filtrat fut évaporé sur un évaporateur rotatif sous le vide de la trompe à eau à une température variant de 30°C à 50°C.

Le symbole R_{f_n} détermine le déplacement sur chromatographie sur couche mince dans des conditions d'élution utilisant l'acétate d'éthyle et l'hexane dans un rapport $n\%/(100-n)\%$.

SYNTHÈSE

1. Préparation de la 3-méthoxyestra-1,3,5(10)-trièn-17-one (**6**)⁽⁵⁰⁾.



Après avoir bien mélangé 1000 ml de MeOH (qualité réactif) et 5.0 g d'estrone (18 mmol), on ajoute simultanément 20 ml d'une solution aqueuse de KOH 35% et 10 ml de sulfate de diméthyle (51 mmol). Après dix minutes, on ajoute à nouveau 10 ml de la solution de KOH et 10 ml de sulfate de diméthyle (bis). On laisse agiter la solution pendant la nuit entière. On ajoute ensuite 10 ml de la solution de KOH et 10 ml de sulfate de diméthyle et on amène le mélange à reflux pendant 90 minutes. Après avoir évaporé les solvants, on ajoute 600 ml d'eau et on lave la solution trois fois avec 500 ml de CH_2Cl_2 . Après avoir effectué le traitement habituel, on peut purifier le solide obtenu par chromatographie sur gel de silice (80:20 hex:AcOEt) ou encore par une cristallisation dans le méthanol (qualité spectrograde). On obtient alors le phénol protégé **6** (4.6 g, 88 %) sous forme d'un solide blanc.

$R_{f20} = 0.65$

POINT DE FUSION

118-120°C (litt⁽⁵⁰⁾): 121-123°C)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ 0.92 (s, 3H, CH₃ 18), 3.79 (s, 3H, CH₃O), 6.66 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H 4),
6.74 (dd, J = 8.3 Hz, 2.9 Hz, 1H, H 2), 7.21 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H 1);

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ 13.8, 21.5, 25.9, 26.5, 29.6, 31.5, 35.8, 38.3, 43.9, 47.9, 50.3, 55.1,
111.5, 113.8, 126.3, 131.9, 137.7, 157.5, 220.9;

IR

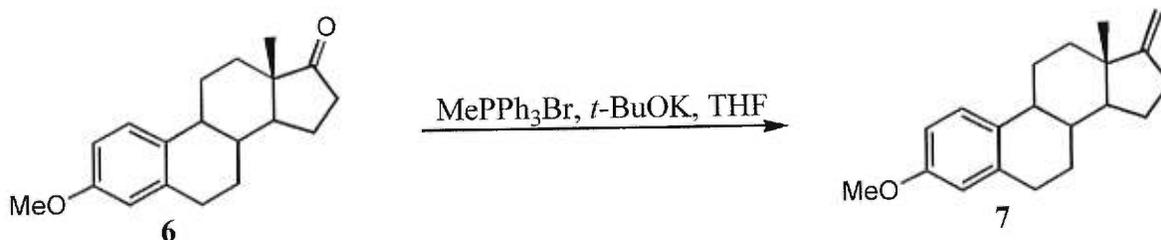
2920, 1740, 1600, 1590, 1500, 1450, 1320, 1250, 1040 cm⁻¹;

ROTATION SPÉCIFIQUE

[α]_D = +144.57° (c = 0.01, dioxane, 22°C)

2. Préparation du 3-méthoxy-17-méthylènestra-1,3,5(10)-triène

(7)^(51a).



La solution de la cétone **6** (1.0 g, 3.5 mmol) dans 31.6 ml de THF est ajoutée au mélange contenant le bromure de méthyltriphenylphosphonium (6.25 g, 17.5 mmol) et le *t*-butylate de potassium (1.86 g, 16.6 mmol) dans 21.3 ml de THF. On chauffe le mélange à reflux pendant 5 heures. Une fois le mélange refroidi, on y ajoute 70 ml d'hexane et 57 ml d'eau. On lave ensuite la phase organique avec 63 ml d'une solution aqueuse de MeOH 50 % et 63 ml de saumure. Après le traitement habituel, on dissout le mélange dans un minimum de CHCl_3 et on le filtre sur gel de silice. Après cristallisation dans un mélange d'éther éthylique et de méthanol (qualité spectrograde), on obtient le composé **7** (0.97 g, 98 % de rendement) sous forme d'aiguilles blanches.

$R_{f_{20}} = 0.95$

POINT DE FUSION

84-85°C (litt^(51b)): 81-82°C)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ 0.84 (s, 3H, CH₃ 18), 3.79 (s, 3H, CH₃O), 4.69 (d, J = 2.2 Hz, 2H, H 20), 6.65 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H 4), 6.73 (dd, J = 8.3 Hz, 2.9 Hz, 1H, H 2), 7.24 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H 1);

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ 19.8, 23.9, 26.6, 27.6, 29.4, 29.8, 35.7, 38.7, 44.0, 44.3, 53.4, 55.1, 100.8, 111.4, 113.7, 126.3, 132.8, 138.0, 157.4, 161.7;

IR

2910, 1650, 1620, 1500, 1460, 1240, 1050, 860 cm⁻¹;

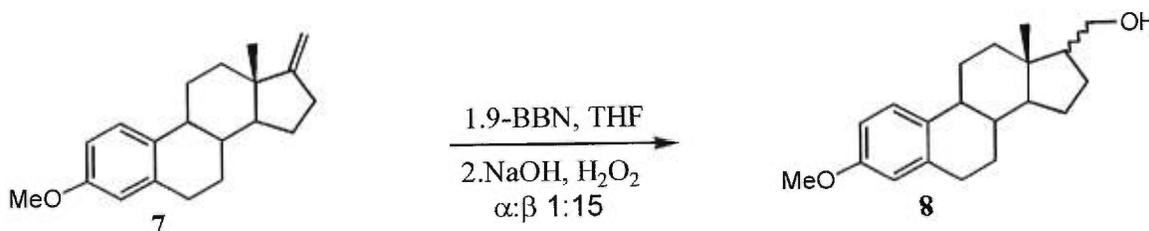
ANALYSE ÉLÉMENTAIRE

Calculée pour C₂₀H₂₆O₁: C, 85.05; H, 9.29. Trouvée: C, 84.74; H, 9.42.

ROTATION SPÉCIFIQUE

[α]_D = +58.00° (c = 0.015, dioxane, 22°C)

3. Préparation du 17-hydroxyméthyl-3-méthoxyestra-1,3,5(10)-triène (8)^(53a).



On ajoute à la solution du stéroïde **7** (41.03 g, 145.3 mmol) dans 2077 ml de THF, 800 ml de la solution de 9-BBN (0.5 M dans le THF, 4×10^2 mmol). Après avoir agité pendant deux heures, on ajoute 1230 ml d'une solution aqueuse de NaOH 10 %. On ajoute ensuite à 0°C, 415 ml d'une solution de H₂O₂ 30 % et on laisse agiter pendant 90 minutes. On extrait alors la solution avec AcOEt. Les phases organiques sont lavées avec une solution aqueuse de NaHSO₃ 10 % et de l'eau. Après le traitement habituel, on purifie le composé par chromatographie sur colonne (80: 20 hex:AcOEt). On obtient alors le mélange des diastéréoisomères **8** (40 g, 86 % de rendement) sous forme d'un solide blanc. On peut séparer les diastéréoisomères pour n'obtenir que celui où le carbone 20 est orienté de façon β par cristallisation dans un mélange d'éther de pétrole et d'éther éthylique (rendement de 31 %). Les spectres RMN ont été effectués sur le diastéréoisomère pur.

$R_{f20} = 0.32$

POINT DE FUSION

117-118°C (litt^(53b).: 108-109°C)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ 0.71 (s, 3H, CH₃ 18), 3.60 et 3.71 (m, 2H, H 20), 3.80 (s, 3H, CH₃O), 6.65 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H 4), 6.73 (dd, J = 8.2 Hz, 2.9 Hz, 1H, H 2), 7.23 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H 1);

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

δ 12.5, 24.2, 25.6, 26.4, 27.8, 29.8, 38.4, 38.7, 42.1, 43.9, 53.0, 54.9, 55.1, 64.6, 111.3, 113.7, 126.2, 132.8, 137.9, 157.3;

IR

3500-3200, 2930, 2880, 1620, 1500, 1450, 1260, 1030, 1000 cm⁻¹;

ANALYSE ÉLÉMENTAIRE

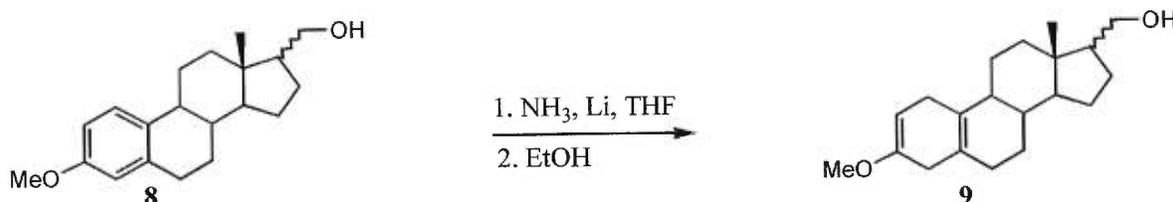
Calculée pour C₂₀H₂₈O₂: C, 79.94; H, 9.40. Trouvée: C, 79.59; H, 9.53.

ROTATION SPÉCIFIQUE

[α]_D = +69.50° (c = 0.015, dioxane, 22°C)

4. Préparation du 17-hydroxyméthyl-3-méthoxyestra-2,5(10)-diène⁽⁵⁶⁾

(9).



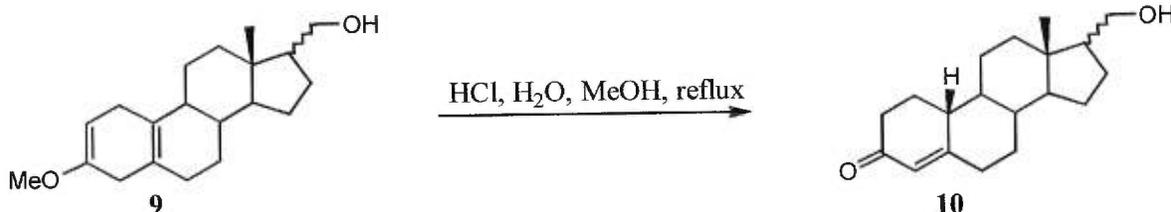
Après avoir condensé 550 ml d'ammoniac, on ajoute le lithium (4.72 g, 680 mmol) par portion et on agite le mélange à -78°C pendant 60 minutes. La solution du stéroïde (5.68 g, 19.0 mmol) dans 94 ml de THF est alors ajoutée goutte à goutte. On laisse réchauffer le mélange jusqu'à ébullition et on agite à reflux pendant 90 minutes. On ajoute ensuite l'éthanol goutte à goutte. On laisse évaporer l'ammoniac pendant toute la nuit. On ajoute alors au résidu une solution aqueuse de NH_4Cl saturée et on extrait par du diéthyl éther. Après le traitement habituel, on obtient le composé **9** (4.4 g, rendement brut de 76 %). Ce composé est utilisé tel quel pour l'étape d'hydrolyse subséquente.

$R_{f20} = 0.38$

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)

δ 0.68 (s, 3H, CH_3 18), 3.56 (s, 3H, CH_3O), 3.54 et 3.73 (m, 2H, H 20), 4.65 (s, 1H, H 2);

5. Préparation de la 17-hydroxyméthyl-4-estren-3-one (10)⁽⁵⁶⁾.



À la solution du stéroïde **9** brut (1.0 g, 3.3 mmol) dans 50 ml de MeOH, on ajoute 34 ml d'une solution aqueuse de HCl 3N. On agite le mélange à reflux pendant 30 minutes. La solution est ensuite extraite avec de l'éther éthylique et de l'eau. Les phases organiques sont lavées avec une solution aqueuse de NaHCO₃ saturée et de la saumure. Après le traitement habituel, on purifie par chromatographie sur colonne (50:50 hex:AcOEt) pour obtenir l'énone **10** (0.80 g, 80% de rendement) sous forme d'un solide blanc.

Rf₅₀ = 0.30

POINT DE FUSION

133-134°C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ 0.70 (s, 3H, CH₃ 18), 3.57 et 3.68 (m, 2H, H 20), 5.81 (s, 1H, H 4);

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 12.4, 24.3, 25.3, 26.2, 26.5, 31.1, 35.5, 36.4, 38.4, 40.1, 41.9, 42.5, 49.6, 52.8, 54.5, 64.3, 124.4, 166.8, 199.9;

IR

3503, 2931, 2877, 1658, 1400, 1261, 1250, 1120, 1000, 883cm⁻¹;

ANALYSE ÉLÉMENTAIRE

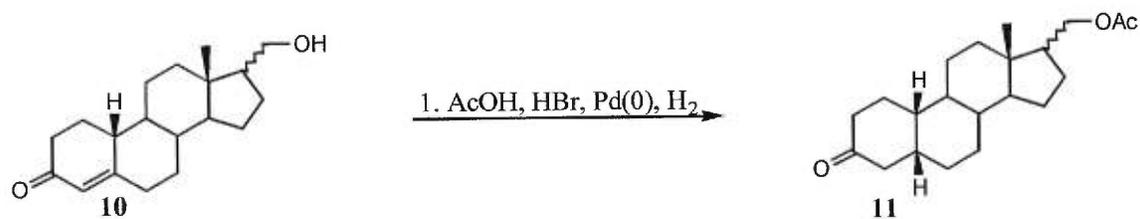
Calculée pour C₁₉H₂₈O₂: C, 79.11; H, 9.79. Trouvée: C, 78.76; H, 10.13.

ROTATION SPÉCIFIQUE

[α]_D = +69.50° (c = 0.003, CHCl₃, 22°C)

6. Préparation de l'acétate de la 17-hydroxyméthyl-5β-estran-3-one

(11)⁽⁵⁷⁾.



L'acide acétique glacial (20.7 ml) et la solution de HBr 3N (0.14 ml) sont ajoutés au palladium(0) (0.073 g) et on y fait barboter de l'hydrogène pendant 30 minutes. Le stéroïde **10** (0.2 g, 0.7 mmol) est ensuite ajouté et le mélange est agité 5 heures sous une atmosphère d'hydrogène. On filtre alors la solution et on neutralise l'acide par une solution de NaHCO₃ saturée. On effectue le traitement habituel après avoir extrait le mélange avec du CH₂Cl₂. On purifie le produit par chromatographie sur colonne (80:20 hex:AcOEt) pour obtenir la cétone **11** (90 mg, 50 % de rendement).

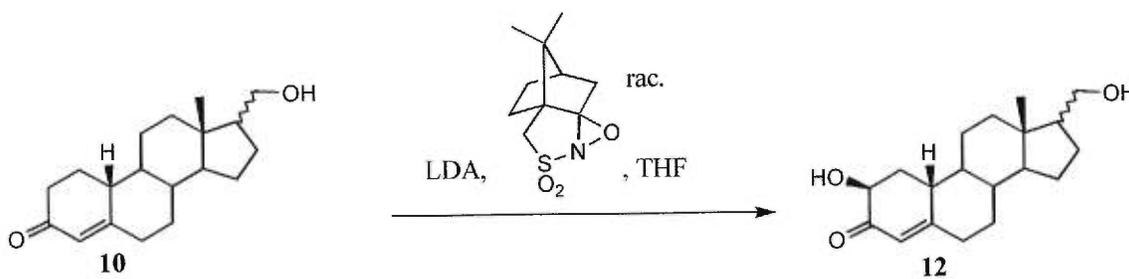
Rf₂₀ = 0.82

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ 0.68 (s, 3H, CH₃ 18), 2.02 (s, 3H, COCH₃), 2.59 (t, J = 14.3 Hz, 1H, H 5), 4.03 (d, J = 10.6 Hz, 2H, H 20);

7. Préparation de la 2 β -hydroxy-17-hydroxyméthyl-4-estren-3-one

(12)⁽⁶⁷⁾.



À -15°C , on ajoute 150 ml d'une solution de BuLi (2.5 M dans l'hexane, 35 mmol) à la solution de diisopropylamine (4.9 ml, 35 mmol) dans 182 ml de THF. On y ajoute également la solution du stéroïde **10** (4.0 g, 14 mmol) dans 55 ml de THF goutte à goutte. Après avoir agité le mélange pendant 15 minutes à 0°C , on ajoute à -78°C la solution du (camphorsulfonyl)oxaziridine (5.9 g, 26 mmol) dans 138 ml de THF. On laisse alors la température monter jusqu'à 0°C et on agite le mélange 10 minutes. On y ajoute alors de la saumure et on extrait la phase aqueuse avec de l'éther éthylique. Après le traitement habituel, on purifie par chromatographie sur colonne (25:75 hex:AcOEt). On obtient alors l' α -hydroxycétone **12** (2.9 g, 69 %) sous forme de mousse blanche. Malheureusement, nous n'avons pas eu la possibilité de faire une caractérisation complète du produit car les nombreuses tentatives de cristallisation de ce dernier ont échoué.

$R_{f_{75}} = 0.28$

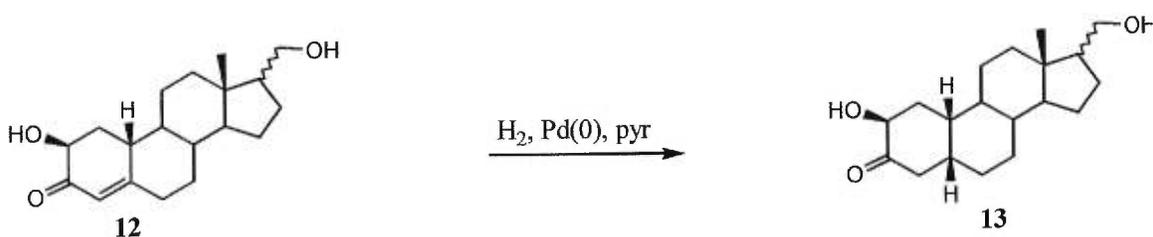
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)

δ 0.63 (s, 3H, CH_3 18), 3.47 et 3.62 (dd, $J = 10.39$ Hz, 7.11 Hz, 2H, H 20), 4.06 (dd, $J = 12.93$ Hz, 5.54 Hz, 1H, H 2), 5.75 (s, 1H, H 4);

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)

δ 12.4, 24.3, 25.4, 27.1, 31.5, 34.0, 36.6, 38.2, 41.4, 42.0, 43.6, 48.1, 52.5, 54.3, 63.9, 68.3, 119.0, 170.9, 199.9;

8. Préparation de la 2 β -hydroxy-17hydroxyméthyl-5 β -estran-3-one (13)⁽⁷⁰⁾.



On fait d'abord barboter de l'hydrogène dans le mélange constitué de 1.4 ml de pyridine et de 0.048 g de palladium(0) pendant 30 minutes tel que décrit dans la littérature⁽⁷⁰⁾. On ajoute ensuite l'énone **12** (0.50 g, 1.6 mmol) puis le mélange est agité pendant 24 heures. On le filtre alors par gravité sur papier filtre flûté et on lave le solide avec de l'éther éthylique. Les phases

organiques sont ensuite extraites par des solutions aqueuses de HCl 10 % et de NaHCO₃ 5 %. On purifie le produit par chromatographie sur colonne (50:50 hex:AcOEt) et par cristallisation dans AcOEt pour obtenir la cétone **13** (0.35 g, 69 % de rendement) sous forme d'aiguilles blanches.

Rf₅₀ = 0.28

POINT DE FUSION

182-184°C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ 0.69 (s, 3H, CH₃ 18), 2.74 (t, J = 14.1 Hz, 1H, H 5), 3.56 et 3.73 (dd, J = 10.39 Hz, 7.11 Hz, 2H, H 20), 4.16 (dd, J = 12.93 Hz, 5.54 Hz, 1H, H 2);

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 12.4, 24.2, 25.4, 25.5, 25.6, 30.2, 37.4, 38.6, 39.6, 39.7, 40.6, 40.7, 41.4, 42.0, 53.0, 54.7, 64.3, 70.9, 211.9;

IR

3516, 3358, 2912, 2865, 1714, 1000 cm⁻¹;

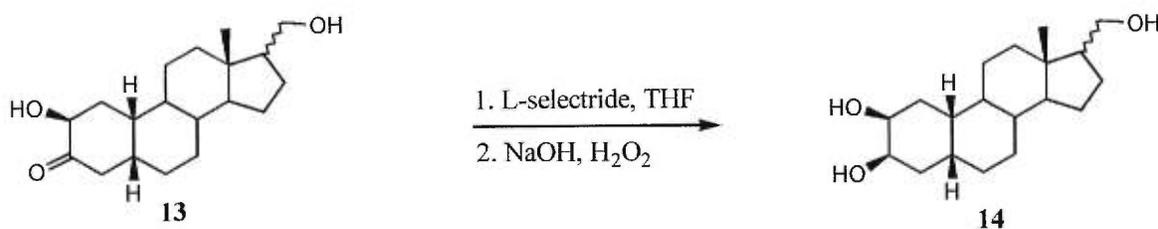
COORDONNÉES CRISTALLOGRAPHIQUES

(voir annexe 2 p. 121)

ROTATION SPÉCIFIQUE

$[\alpha]_D = +6.5^\circ$ ($c = 0.003$, CHCl_3 , 22°C)

9. Préparation de la 2 β ,3 β -dihydroxy-17-hydroxyméthyl-5 β -estrane (14)⁽⁷²⁾.



À la solution du stéroïde **13** (0.50 g, 1.6 mmol) dans 2.7 ml de THF, on ajoute goutte à goutte 1.87 ml de la solution de L-sélectride (1.0 M dans THF, 1.9 mmol) à 0°C . La solution est alors agitée pendant deux heures à 0°C . On ajoute ensuite à température de la pièce 0.5 ml d'une solution de NaOH 3 N et 0.6 ml de H_2O_2 30 %. Finalement, on extrait la phase aqueuse avec de l'éther éthylique et les phases organiques par de l'eau et une solution aqueuse de NaHSO_3 10 %. On purifie le produit en effectuant une

chromatographie sur colonne (100 % AcOEt) pour obtenir le triol **14** (0.41 mg, rendement de 82 %) sous forme d'un solide blanc.

$Rf_{100} = 0.20$

POINT DE FUSION

198-200°C

RMN ¹H (300 MHz, MeOH)

δ 0.66 (s, 3H, CH₃ 18), 3.43 et 3.60 (m, 2H, H 20), 3.56 (m, 1H, H 2), 3.93 (se, 1H, H 3);

RMN ¹³C (100 MHz, MeOH)

δ 14.5, 27.1, 28.6, 28.7, 29.0, 32.1, 32.2, 33.5, 35.3, 41.5, 42.3, 44.6, 44.8, 44.9, 55.9, 58.0, 66.3, 69.8, 72.9;

IR

3285, 3193, 2906, 2865, 1433, 1382, 1351, 1060, 866 cm⁻¹;

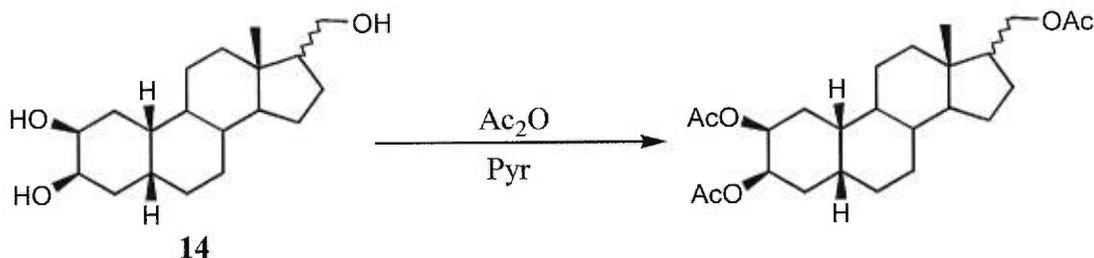
SPECTRE DE MASSE

Calculée pour C₁₉H₃₂O₃ (M⁺) 308.2351, trouvée 308.2341

ROTATION SPÉCIFIQUE

$[\alpha]_D = -6.0^\circ$ ($c = 0.007$, MeOH, 22°C)

10. Préparation du triacétate de la 2 β ,3 β -dihydroxy-17-hydroxyméthyl-5 β -estrane⁽⁵⁴⁾.



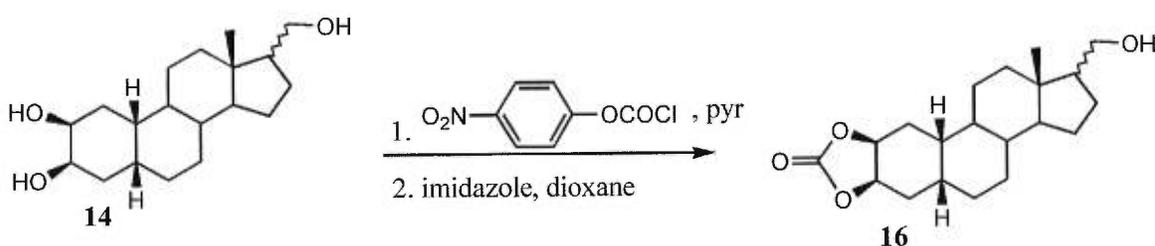
La solution contenant le triol **14** (0.05 g, 0.2 mmol) et 0.62 ml de Ac_2O (6.5 mmol) dans 0.62 ml de pyridine est agitée pendant toute la nuit. On extrait ensuite la phase aqueuse avec AcOEt et les phases organiques combinées sont lavées avec des solutions aqueuses de HCl 2 M et de NaHCO_3 saturée, et de la saumure. Après le traitement habituel, on obtient le triacétate (0.063 g, rendement de 90 %) sous forme de solide blanc. Ce composé n'a été synthétisé que dans le but de faire des expériences de double résonance.

$\text{Rf}_{10} = 0.70$

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)

δ 0.66 (s, 3H, CH_3 18), 1.99 (s, 3H, CH_3CO), 2.02 (s, 3H, CH_3CO), 2.09 (s, 3H, CH_3CO), 4.03 (d, $J = 6.96$ Hz, 2H, H 20), 4.82 (ddd, $J = 12.15$ Hz, 4.73 Hz, 2.96 Hz, 1H, H 2), 5.30 (se, 1H, H 3);

11. Préparation du carbonate de la 2 β ,3 β -dihydroxy-17-hydroxyméthyl-5 β -estrane (16)⁽⁷⁸⁾.



Le mélange contenant le triol **14** (0.30 g, 0.97 mmol) et le *p*-nitrophényl chloroformate (1.96 g, 9.70 mmol) dans 12.5 ml de pyridine est agité pendant 24 heures. On effectue ensuite des extractions sur la phase aqueuse avec CH_2Cl_2 et sur les phases organiques avec une solution aqueuse de NaOH 10 %. Après le traitement habituel, on dilue le résidu dans 20 ml de dioxane. On y ajoute 2 ml d'une solution aqueuse d'imidazole (3.30 g, 48.5 mmol) et on agite pendant deux heures. On ajoute ensuite 20 ml d'une solution aqueuse de HCl 10 % afin de convertir le dérivé imidazole en alcool. On extrait finalement la phase aqueuse avec CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont ensuite extraites avec de l'eau et une solution aqueuse de

NaOH 10 %. Après le traitement habituel, on effectue une chromatographie sur colonne (50:50 hex:AcOEt) pour obtenir l'alcool **16** (0.090 g, rendement de 28 %) sous forme d'un solide blanc. On peut également purifier le produit par cristallisation dans AcOEt.

$R_{f50} = 0.31$

POINT DE FUSION

170-171°C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ 0.66 (s, 3H, CH₃ 18), 3.56 et 3.72 (dd, J = 7.55 Hz, 5.30 Hz, 2H, H 20), 4.59 (m, 1H, H 2), 4.78 (se, 1H, H 3);

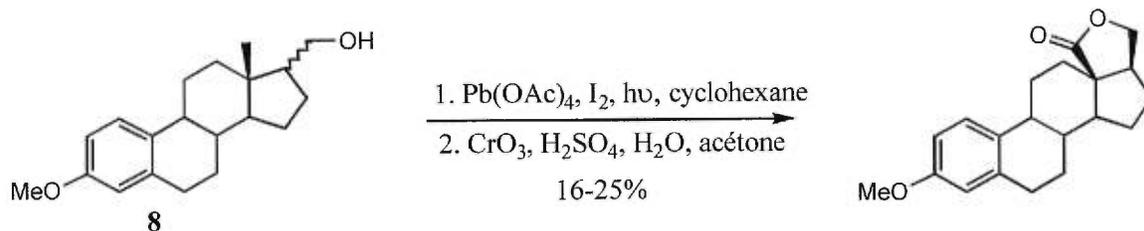
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 12.5, 24.2, 25.3, 25.4, 25.9, 26.7, 28.9, 29.5, 29.8, 38.5, 38.7, 39.8, 41.3, 42.0, 53.0, 54.7, 64.4, 73.7, 76.7, 155.1;

SPECTRE DE MASSE

Calculée pour C₂₀H₃₁O₄ (M⁺) 335.2222, trouvée 335.2231

12. Préparation de la 3-méthoxyestra-1,3,5(10)-trièn-18,20-lactone^(77d).



Le mélange contenant l'alcool **8** (0.52 g, 1.7 mmol), de l'iode (0.48 g, 1.9 mmol) et du Pb(OAc)_4 (3.30 g, 7.40 mmol) dans 60 ml de cyclohexane est amené à ébullition par irradiation d'une lampe ordinaire (75 W, 120 V) placée à 20 cm du ballon. Après 90 minutes, on ajoute 1.00 g de Pb(OAc)_4 (2.26 mmol). Après 60 minutes, on arrête l'irradiation et on filtre le mélange. On lave le filtrat avec une solution aqueuse de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10 % et de l'eau. On ajoute alors 0.2 ml de pyridine aux phases organiques et on évapore. Le résidu est ensuite dilué dans 12 ml d'acétone et on y ajoute, à 0°C, 0.64 ml d'une solution du réactif de Jones (0.22 g de CrO_3 et 0.20 ml de H_2SO_4 dans 0.83 ml d'eau). Après 30 minutes, on détruit l'excès de réactif en ajoutant de l'alcool isopropylique. Après le traitement habituel, on fait une chromatographie sur colonne (85:15 hex:AcOEt) pour obtenir la lactone (0.13 g, rendement de 25 %) sous forme de solide blanc. On peut cristalliser la lactone dans le méthanol pour obtenir des aiguilles blanches.

$\text{Rf}_{15} = 0.32$

POINT DE FUSION

194-196°C (litt^(77g).: 191-192°C)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ 3.78 (s, 3H, CH₃O), 4.13 (d, J = 6.48 Hz, 1H, H 20β), 4.37 (dd, J = 6.65 Hz, 3.67 Hz, 1H, H 20α), 6.64 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H 4), 6.71 (dd, J = 8.2 Hz, 2.9 Hz, 1H, H 2), 7.20 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H 1);

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 25.7, 27.1, 27.9, 29.6, 31.5, 31.6, 36.3, 43.2, 45.3, 53.4, 54.3, 55.1, 72.3, 111.4, 113.6, 126.3, 131.8, 137.9, 157.3, 179.3;

IR

2921, 2854, 1748, 1609, 1495, 1255, 1040 cm⁻¹;

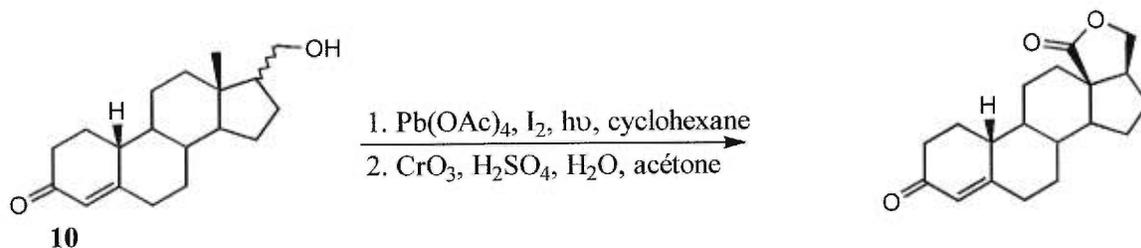
ANALYSE ÉLÉMENTAIRE

Calculée pour C₂₀H₂₄O₃: C, 76.88; H, 7.75. Trouvée: C, 76.45; H, 7.81.

ROTATION SPÉCIFIQUE

[α]_D = +32.60° (c = 0.003, CHCl₃, 22°C)

13. Préparation de la 4-estren-3-one-18,20-lactone^(77d).



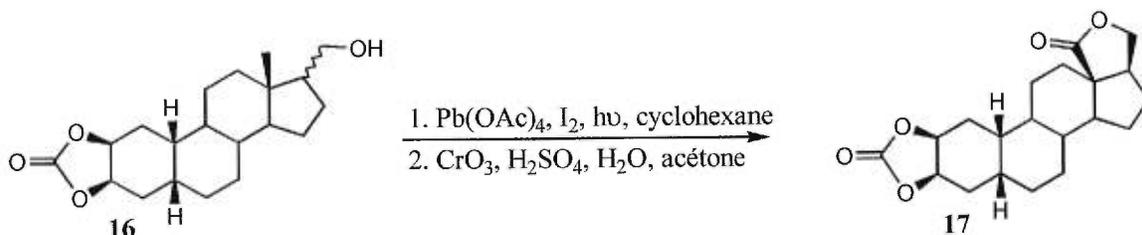
Le mélange contenant l'alcool **10** (0.095 g, 0.33 mmol), de l'iode (0.095 g, 0.38 mmol) et du Pb(OAc)_4 (0.65 g, 1.5 mmol) dans 12 ml de cyclohexane est amené à ébullition par irradiation par une lampe ordinaire (75 W, 120 V) placée à 20 cm du ballon. Après 60 minutes, on ajoute 0.1 g de I_2 (0.4 mmol). Après 60 minutes de plus, on arrête l'irradiation et on filtre le mélange. On lave le filtrat avec une solution aqueuse de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10 % et de l'eau. On ajoute alors 0.1 ml de pyridine aux phases organiques et on évapore. Le résidu est ensuite dilué dans 3 ml d'acétone et on y ajoute, à 0°C, 0.2 ml d'une solution du réactif de Jones (0.22 g de CrO_3 et 0.20 ml de H_2SO_4 dans 0.83 ml d'eau). Après 30 minutes, on détruit l'excès de réactif en ajoutant de l'alcool isopropylique. Après le traitement habituel, on fait une chromatographie sur colonne (60:40 hex:AcOEt) pour obtenir la lactone (0.03 g, rendement de 3×10^1 %) sous forme de solide blanc.

$\text{Rf}_{40} = 0.32$

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)

δ 4.11 (d, $J = 8.75$ Hz, 1H, H 20 β), 4.37 (dd, $J = 8.63$ Hz, 5.02 Hz, 1H, H 20 α), 5.84 (s, 1H, H 4);

14. Préparation du carbonate de la 2 β ,3 β -dihydroxy-5 β -estra-18,20-lactone (17)^(77d).



Le mélange contenant l'alcool **16** (0.14 g, 0.41 mmol), de l'iode (0.17 g, 0.65 mmol) et du $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ (0.65 g, 1.5 mmol) dans 15 ml de cyclohexane est amené à ébullition par irradiation par une lampe ordinaire (75 W, 120 V) placée à 20 cm du ballon. Après 60 minutes, on ajoute 0.65 g de $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ (1.5 mmol). Après 30 minutes, on arrête l'irradiation et on filtre le mélange. On lave le filtrat avec une solution aqueuse de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10 % et de l'eau. On ajoute alors 0.1 ml de pyridine aux phases organiques et on évapore. Le résidu est ensuite dilué dans 5 ml d'acétone et on y ajoute, à 0°C, 0.5 ml d'une solution du réactif de Jones (0.22 g de CrO_3 et 0.2 ml de H_2SO_4 dans 0.83 ml d'eau). Après 30 minutes, on détruit l'excès de réactif en ajoutant de l'alcool isopropylique. Après le traitement habituel, on fait une

chromatographie sur colonne (75:25 hex:AcOEt) pour obtenir la lactone 17 (0.043 g, rendement de 30 %) sous forme de solide blanc. On peut cristalliser la lactone dans AcOEt pour obtenir des aiguilles blanches.

$R_{f_{25}} = 0.30$

POINT DE FUSION

280-282°C

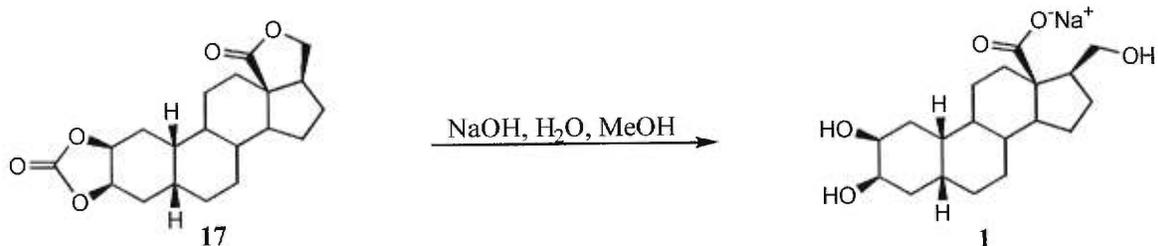
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)

δ 4.10 (d, $J = 6.57$ Hz, 1H, H 20β), 4.34 (dd, $J = 6.66$ Hz, 3.58 Hz, 1H, H 20α), 4.58 (m, 1H, H 2), 4.78 (m, 1H, H 3);

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)

δ 25.0, 25.6, 26.6, 27.1, 28.8, 29.1, 29.8, 31.3, 31.4, 38.1, 38.7, 38.9, 45.2, 53.4, 54.0, 72.2, 73.6, 76.6, 155.0, 179.2;

15. Préparation du sel sodé de la 18-carboxylate-2 β ,3 β -dihydroxy-17-hydroxyméthyl-5 β -estrane (1)⁽⁷⁹⁾.



Au mélange constitué du stéroïde **17** (0.025 g, 0.072 mmol) et de 4 ml de MeOH est ajouté 0.3 ml d'une solution aqueuse de NaOH 1 M et 0.7 ml d'eau. Comme le mélange n'est toujours pas homogène, on chauffe à reflux pendant 30 minutes (le mélange devient alors homogène). La solution est ensuite agitée pendant 3 jours à la température de la pièce. On évapore alors les solvants pour obtenir une poudre blanche. On dissout la poudre dans un minimum de DMF et on purifie le produit en le passant dans une colonne de Sephadex® (en utilisant DMF comme éluant). On obtient, après évaporation du solvant, le composé **1** (0.024 g, rendement de 96 %) sous forme de solide blanc.

RMN ¹H (400 MHz, DMF)

δ 3.06 (se, 1H, OH), 3.16 (m, 1H, H 2), 3.49 (se, 1H, H 3), 3.59 (se, 1H, OH), 3.70 (d, J = 6.45 Hz, 1H, H 20 β), 3.78 (se, 1H, OH), 3.97 (dd, J = 6.51 Hz, 3.73 Hz, 1H, H 20 α);

RMN ^{13}C (100 MHz, DMF)

δ 25.4, 26.6, 27.6, 29.4, 30.3, 30.9, 31.4, 31.5, 32.9, 38.2, 39.9, 41.6, 45.5, 53.6, 54.2, 66.8, 69.9, 72.4, 179.6;

SPECTRE DE MASSE

Calculée pour $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_5$ (M^+) 337.2, trouvée 337.2

BIBLIOGRAPHIE

1. D. N. Granger, G. Schmid-Schonbein; *Physiology and Pathophysiology of Leukocyte Adhesion*, Oxford University Press Inc., New York, 1995, 43-80.
2. S. A. DeFrees, J. C. Paulson, Y. Ichikawa, C. H. Wong; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 66-79.
3. A) S. Borman; *C&EN*, **1993**, 27-34. B) A. Etzioni, M. Frydman, S. Pollack, I. Avidor, M.L. Phillips, J. C. Paulson, R. Gershoni-Baruch, *The New England J. of Med.*, **1992**, *327*, 1789-1792.
4. M. S. Mulligan, P. A. Ward; *J. Exp. Med.*, **1992**, *178*, 623-631.
M. Buerke, A. M. Lefer; *J. Clin. Invest.*, **1993**, *93*, 1140-1148. A. Seekamp, P. A. Ward; *Am. J. Pathol.*, **1993**, *44*, 592-598.
5. R. A. Laine; *Pure & Appl. Chem.*, **1997**, *69*, 1867-1873.
6. U. Sprengard, G. Kretzschmar; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 509-514.
7. C. R. Bertozzi, S. Fukuda, S. D. Rosen; *Biochemistry*, **1995**, *34*, 14271-14278.
8. J. Y. Ramphal, S. A. DeFrees; *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 1357-1360.
9. H. Ohmoto, H. Kondo; *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 1339-1343.
10. D. D. Manning, C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling; *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 6254-6255.
11. D. D. Manning, C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling; *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 1953-1956.
12. Y. Wada, H. Kondo; *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 2055-2059.
13. G. Thomas, F. Schwarzenbach, R. O. Duthaler; *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 514-524.

14. H. C. Kolb, B. Ernst; *Chem. Eur. J.*, **1997**, 3, 1571-1578.
15. S. A. DeFrees, Y. C. Lin, Y. Ichikawa, C. H. Wong; *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 7549-7550.
16. A. Toepfer, E. Bartnik; *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 9161-9164.
17. H. C. Kolb; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 2629-2634.
18. M. J. Bamford, V. Saez; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1996**, 6, 239-244.
19. G. Kretzschmar, M. Krause; *Tetrahedron*, **1997**, 53, 1485-2494.
20. T. Uchiyama, C-C Lin, C-H Wong; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 5395-5396.
21. A. A. Birkbeck, S. V. Ley, J. C. Prodger; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5, 2637-2642.
22. S. Hanessian, H. Prabhanjan; *Synlett*, **1994**, 868-870.
23. N. M. Allanson, A. H. Davidson, F. M. Martin; *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 3945-3948.
24. B. Dopré, T. P. Kogan; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1996**, 6, 569-572.
25. A. Toepfer, G. Kretzschmar; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 1311-1316.
26. A. Toepfer, G. Kretzschmar; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 1317-1322.
27. T. Uchiyama, C-H Wong; *Bioorg. & Med. Chem.*, **1996**, 4, 1149-1165.
28. R. Wang, C. H. Wong; *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 5427-5430.
29. S. H. Wu, C. C. Lin, C. H. Wong; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 88-90.
30. C. C. Lin, C. H. Wong; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 6826-6840.

31. B. N. N. Rao, B. K. Brandley; *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 19663-19666.
32. K. Hiruma, C. H. Wong; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 9265-9270.
33. T. Sunazuka, S. Omura; *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 10247-10248.
34. G. Baisch, R. Öhrlein; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 1812-1815.
35. U. Sprengard, H. Kunz; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 321-324.
36. H. Miyauchi, M. Hayashi; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 985-988.
37. H. Miyauchi, M. Hayashi; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 989-992.
38. G. Kretzschmar, D. Seiffge; *Tetrahedron*, **1995**, 51, 13015-13030.
39. W. I. Weis, K. Drickamer, W. A. Henrickson; *Nature*, **1992**, 360, 127-134.
40. B. J. Graves, D. K. Burns; *Nature*, **1994**, 367, 532-538.
41. Y. C. Lin, Y. Ichikawa, C. H. Wong; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 5452-5454.
42. Y. Ichikawa, Y. C. Lin, C. H. Wong; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 9283-9298.
43. R. M. Cooke, M. P. Weir; *Biochemistry*, **1994**, 33, 10591-10596.
44. P. Hensley, K. Johanson; *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 23949-23958.
45. K. Scheffler, T. Peters; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, 1841-1844.
46. L. Poppe, B. H. Shah; *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 1727-1736.

47. A) T. H. Kogan, P. J. Beck; *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 14047-14055.
B) T. P. Kogan, D. Scott; *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 4976-4984.
48. D. H. Boschelli; *Drugs of the Future*, **1995**, 20, 805-816.
49. Y. Hiramatsu, H. Kondo; *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 4547-4553.
50. C. Brosa, J. M. Amezaga; *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 3985-3987.
51. A) J. P. Kutney, S. J. Rettig; *Can. J. Chem.*, **1989**, 67, 580-587. B)
R. Kanojia, S. Rovinsky, I. Scheer; *Chem. Comm.*, **1971**, D, 1581.
52. A. L. Krubiner, E. P. Oliveto; *J. Org. Chem.*, **1965**, 31, 24-31.
53. A) H. C. Brown, J. C. Chen; *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 3978-3988. B)
U. Klein, W. Sucrow; *Chem. Ber.*, **1977**, 110, 2401.
54. A. Akutagawa, S. I. Murahashi, T. Saito; *J. Org. Chem.*, **1993**, 58,
2929-2930.
55. D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz Jr; *Introduction to organic
laboratory techniques. A contemporary approach*, 2^{ième} éd., CBS
College Publishing, Washington, 1982.
56. M. Lökös, I. Vincze, *Stéroïds*; **1993**, 58, 185-189.
57. S. Nishimura, M. Shimahara; *Chem. And Ind.*, **1966**, 1796-1797.
58. D. N. Kirk; *Steroid Reaction Mecanism. Catalytic Reduction of
Double Bonds*, University College, London, 1970. P. N. Rylander,
Catalytic Hydrogenation in Organic Syntheses, Academic Press, New
York, 1979, p. 53. R. L. Augustine, *Adv. Catal.*, **1976**, 25, 63.
59. A) S. K. Malhotra, H. J. Ringold; *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1997-
2003. B) J. W. Huffman, W. H. Balke; *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 3828.
60. M. Sobukawa, K. Koga; *Tetrahedron Assymetry*, **1990**, 1, 295-298.
61. R. Shirai, K. Koga; *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, 42, 690-693.

62. A) Y. Osawa, J. O. Gardner; *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 3246-3247. B) C. Djerassi, G. Rosenkranz, J. Romo, S. Kaufmann, J. Pataki, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 4534.
63. A) A. Akhila, P. K. Sharma; *Indian J. Chem.*, **1991**, 30, 557-559. B) A. Akhila, P. K. Sharma; *Indian J. Chem.*, **1993**, 32, 229-233.
64. G. M. Rubottom, D. R. Pelegrina; *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 49-50, 4319-4322.
65. X. Su, Z. Li; *Synth. Commun.*, **1995**, 25, 2807-2811.
66. G. M. Rubottom, J. M. Gruber; *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 1599-1602.
67. F. A. Davis, M. S. Haque; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 6679-6690.
68. W. Kemp, *Organic Spectroscopy*, 3^{ième} éd., W. H. Freeman and Company, New York, 1991.
69. A) H. Grasshof; *Z. Physiol.*, **1934**, 223, 249. B) S. Nishimura, M. Shiota; *J. Org. Chem.*, **1966**, 31, 2394. C) R. Yashin, C. Djerassi; *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 4654. D) voir réf. 57.
70. N. Tsuji, M. Shiota; *J. Org. Chem.*, **1980**, 45, 2729-2731.
71. R. L. Augustine; *Organic Reaction in Steroid Chemistry. Steroid Hydrogenation.*, Van Nostrand-Reinold, New York, 1972.
72. R. Contreas, L. Mendoza; *Steroids*, **1979**, 34, 121-124.
73. P. Buchschacher, J. Kalvoda; *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 5209.
74. G. Cainelli, O. Jeger; *Helv. Chim. Acta*, **1959**, 42, 1124.
75. A. L. Nussbaum, C. H. Robinson; *Tetrahedron*, **1962**, 17, 35.
76. M. Akhtar, D. H. R. Barton; *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83, 2213.
77. A) K. Heusler, J. Kalvoda; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1964**, 3, 525-538. B) J. Kalvoda, K. Heusler; *Synthesis*, **1971**, 501-526. C) Ch. Meystre, K. Heusler, J. Kalvoda; *Helv. Chim. Acta*, **1962**, 155-156, 1317-1343. D) E. J. Corey, W. E. Russey; *Organic Synthesis*,

- Collective vol. V, **1973**, 692-698. E) W. D. Slaunwhite, A. J. Solo; *J. Pharm. Sciences*, **1975**, 64, 168-169. F) G. R. Lenz, C. R. Dorn; *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 2696-2704. G) A. Kuhl, A. Kornth, H. Preut, W. Kreiser; *Acta Cryst.*, **1998**, C54, 1115.
78. R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie; *J. Org Chem.*, **1967**, 32, 296-300.
79. O. H. Wheeler, D. S. Gamble; *J. Org Chem.*, **1960**, 26, 3221-3223.
80. W.C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 2923.
81. E. J. Gabe, Y. Le Page, *J. Appl. Cryst.*, **1989**, 22, 384-387.
82. G. M. Sheldrick, Program for the solution of *Crystal Structures*, **1990**, University of Göttingen, Germany.
83. G. M. Sheldrick, Program for the Refinement of *Crystal Structures*, **1996**, University of Göttingen, Germany.
84. *International Tables for Crystallography*, **1992**, Vol. C. Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4, Dordercht: Kluwer Academic Publishers.
85. T. P. Kogan, B. Dupré, R. A. F. Dixon; *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 1099-1111.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier d'une façon toute particulière mon directeur de recherche, le professeur Denis Gravel, pour avoir consacré temps et énergie afin de répondre à toutes mes questions. Sa passion pour la chimie est inspirante et m'a poussé à toujours aller de l'avant, malgré les moments difficiles.

Merci aussi à tous mes collègues de laboratoire qui m'ont fait profiter de leurs conseils judicieux et en particulier à Pierre Robitaille, qui m'a donné beaucoup de son temps lors de mon arrivé dans le laboratoire.

Je veux également remercier Nathalie Goudreault qui a effectué la modélisation moléculaire et Marc Vaillancourt qui, au laboratoire de chimie bioorganique du Dr. Yvan Guindon à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal, a mis au point les tests permettant de mesurer les IC₅₀ des composés synthétisés dans notre laboratoire. Merci aussi à Mme Gariépy-Bélanger qui a effectué l'étude cristallographique de la 2 β -hydroxy-17-hydroxyméthyl-5 β -estran-3-one.

Je ne voudrais pas oublier les membres du personnel du département de chimie, administrateurs et techniciens, dont le support fut précieux.

Finalement, j'aimerais remercier les fonds C.R.S.N.G. pour m'avoir octroyé une bourse de recherche.

Un gros merci!

ANNEXE 1

SPECTRES RMN DES COMPOSÉS 1, 12 et 14

FIGURE 17 Spectre RMN ¹H du composé 12

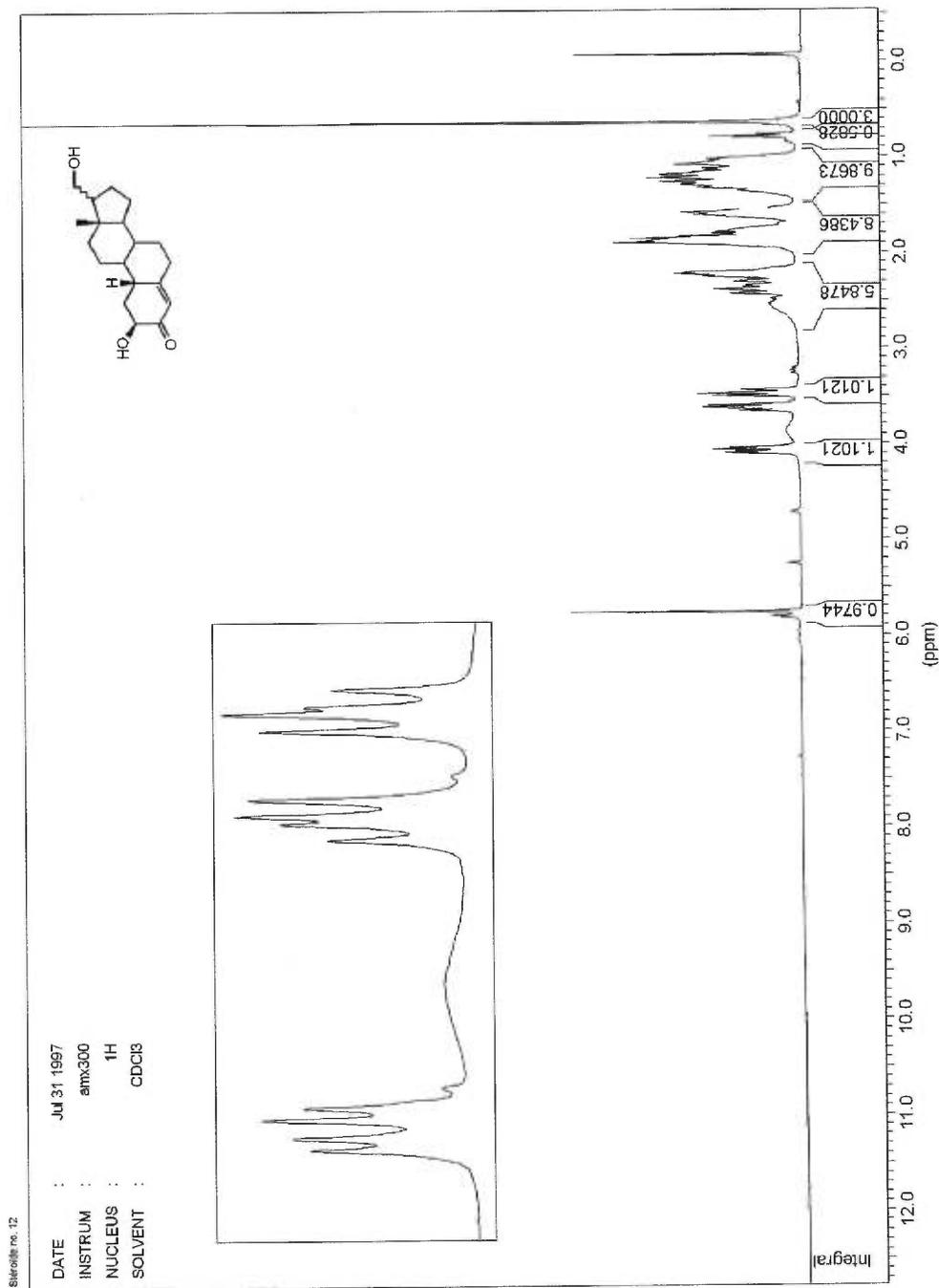


FIGURE 18 Spectre RMN ¹H du composé 14

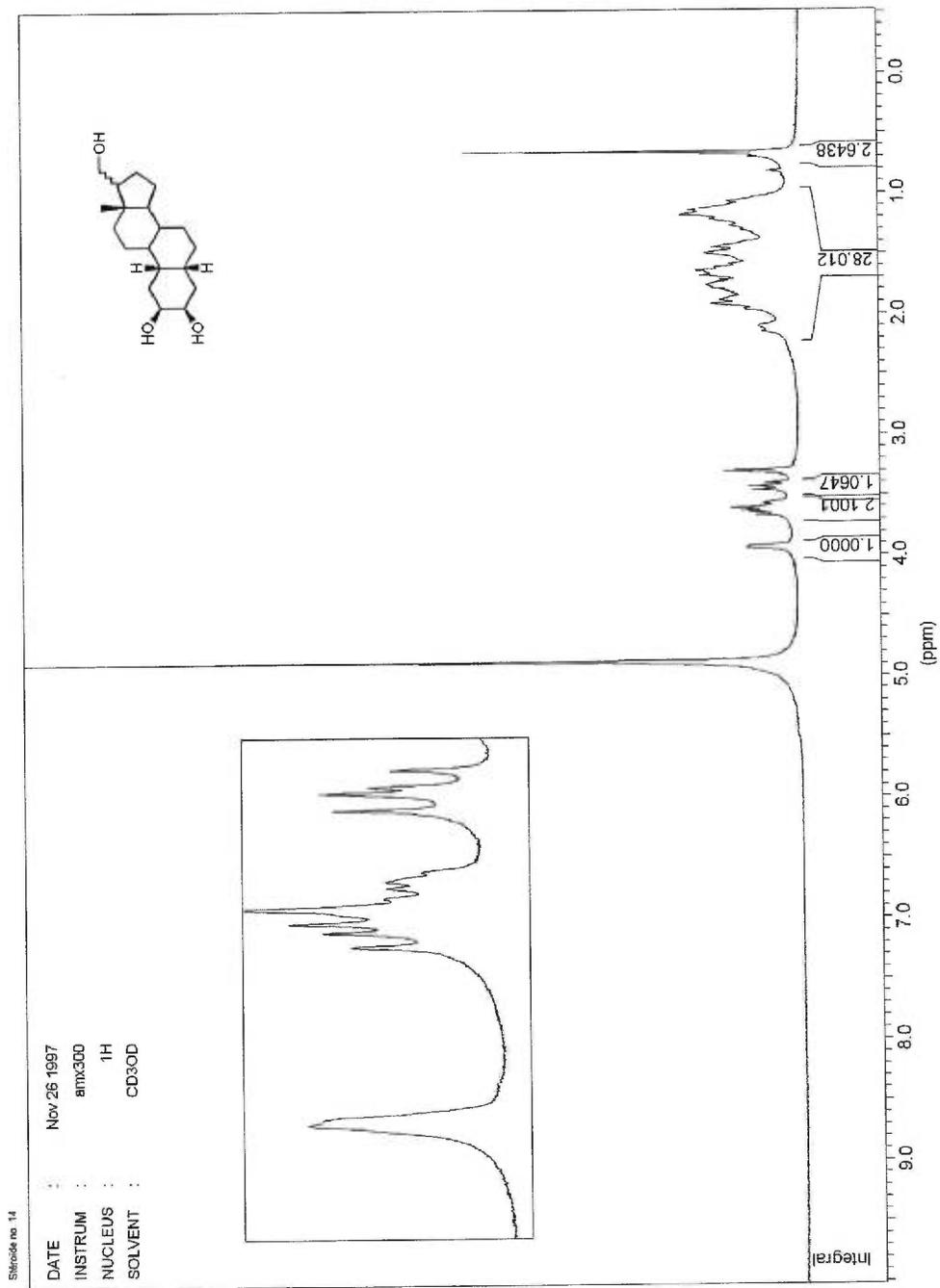


FIGURE 19 Spectre RMN ¹H du composé 1

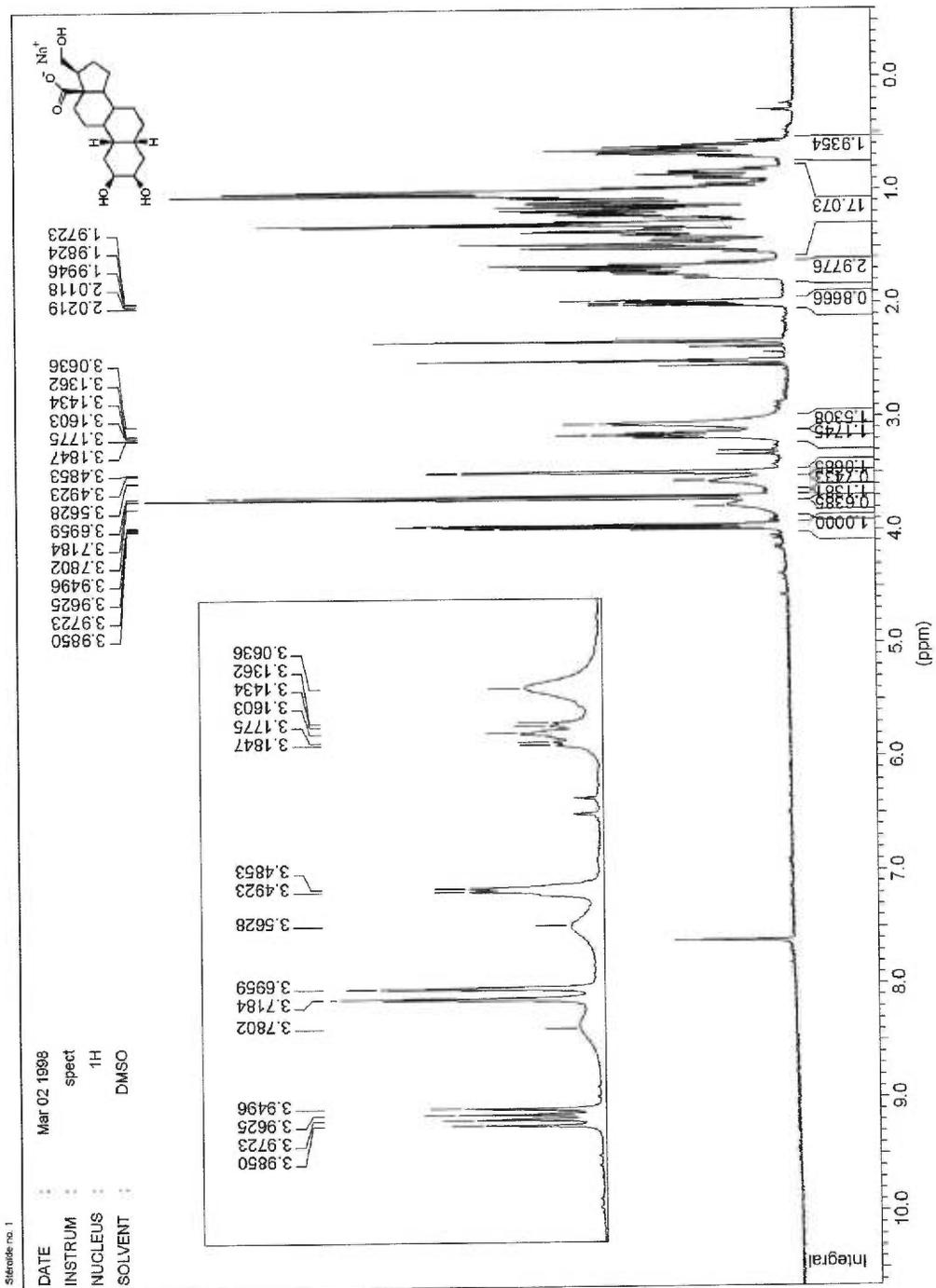
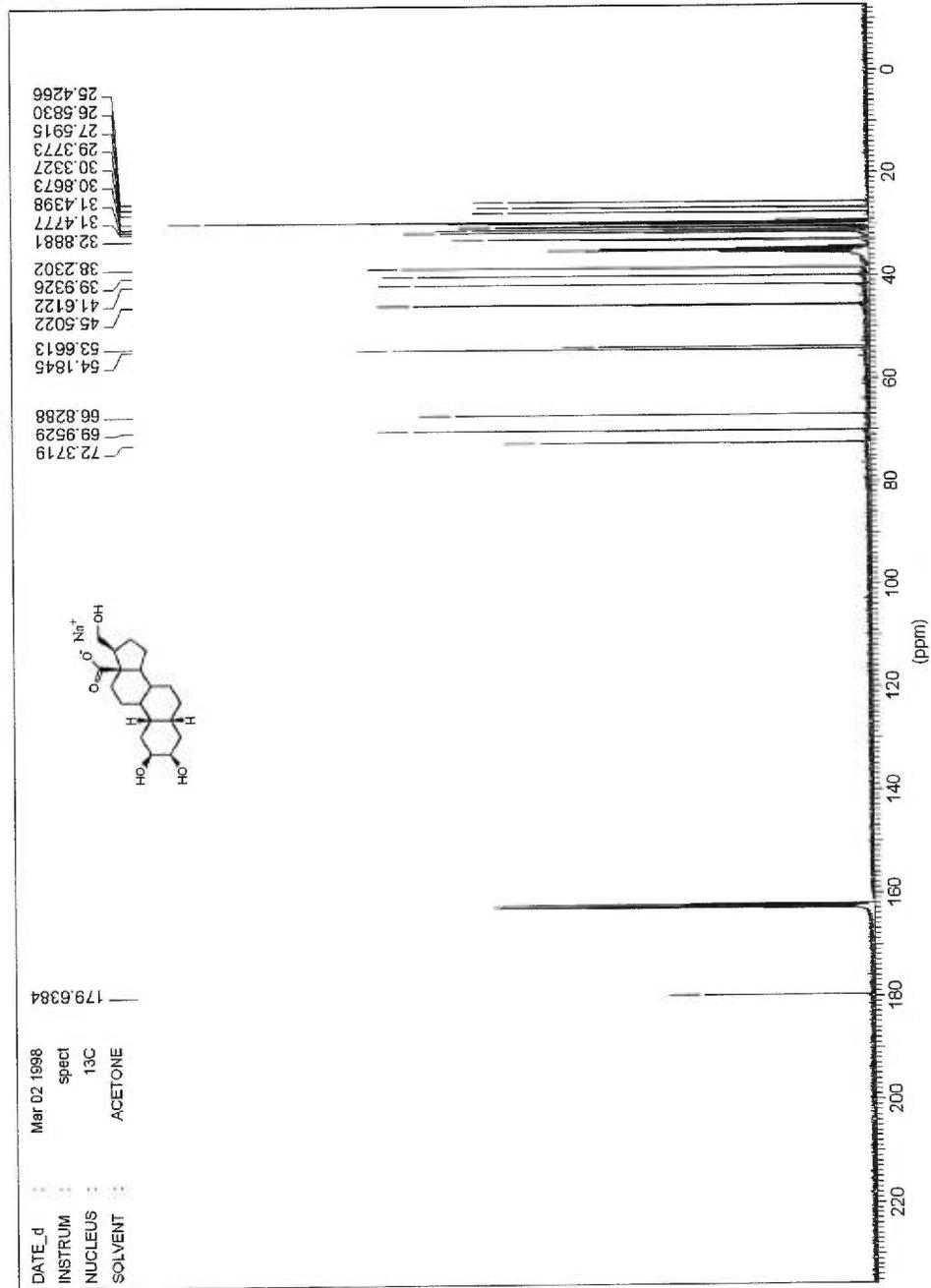


FIGURE 20

Spectre RMN ¹³C du composé 1



ANNEXE 2

COORDONNÉES CRISTALLOGRAPHIQUE DU COMPOSÉ 13

1. Crystal data

$C_{19}H_{30}O_3$	Masse moléculaire = 306.430	$T = 293 (2) \text{ K}$
Orthorhombic	$P2_12_12_1$	$Z = 4$
$a = 7.222 (2) \text{ \AA}$	$b = 10.485 (4) \text{ \AA}$	$c = 22.277 (10) \text{ \AA}$
$V = 1686.9 (11) \text{ \AA}^3$	$D_x = 1.2066 \text{ Mg m}^{-3}$	$\mu = 0.592 \text{ mm}^{-1}$
$\lambda(\text{CuK}\alpha) = 1.54056 \text{ \AA}$	Grosseur du cristal = $0.75 \times 0.25 \times 0.06 \text{ mm}^3$	

Unité de cellule de 25 réflexions centrées entre $20 \leq \theta \leq 25^\circ$. Diffractomètre Nonius CAD-4, radiation monochromatique de graphite $\text{CuK}\alpha$, technique de scan ω , $2\theta_{\text{max}} = 139.84^\circ$ ($-8 \leq h \leq 8$, $-12 \leq k \leq 12$, $-27 \leq l \leq 27$). L'orientation est vérifiée à chaque 200 mesures et l'intensité est vérifiée toutes les heures en utilisant 5 réflexions standards, la plus grande fluctuation d'intensité étant de $\pm 3.8\%$. Une série de 3205 réflexions indépendantes ont été collectées à 200 K dans lesquelles 1641, dont $I \geq 2\sigma(I)$, ont été retenues pour la détermination de la structure et son raffinement. L'absorption a été corrigée par intégration ABSORP in NRCVAX⁸¹ ($T_{\text{min}} = 0.8091$, $T_{\text{max}} = 0.9641$).

La structure a été déterminée par les méthodes directes (SHELXS96)⁸² et par transformation de Fourier (SHELXL96⁸³ et NRCVAX) avec un coefficient d'extinction de $0.0032 (3)$. Fonction minimisée: $1/\omega = [\sigma^2(F_0^2) + ((0.0502/3)(F_0^2 + 2F_c^2))^2]$. Finalement, $R = 0.0475$, $\omega R = 0.1082$ and $S = 1.026$ pour 203 paramètres raffinés. Bruits de fond général de l'ordre $-0.818, +0.172 \text{ e/\AA}^3$. Les courbes de dispersion pour les atomes autres que l'hydrogène ont été prises de *International Tables for Crystallography* (Vol. C)⁸⁴.

FIGURE 21 Représentation ORTEP de la structure du composé 13

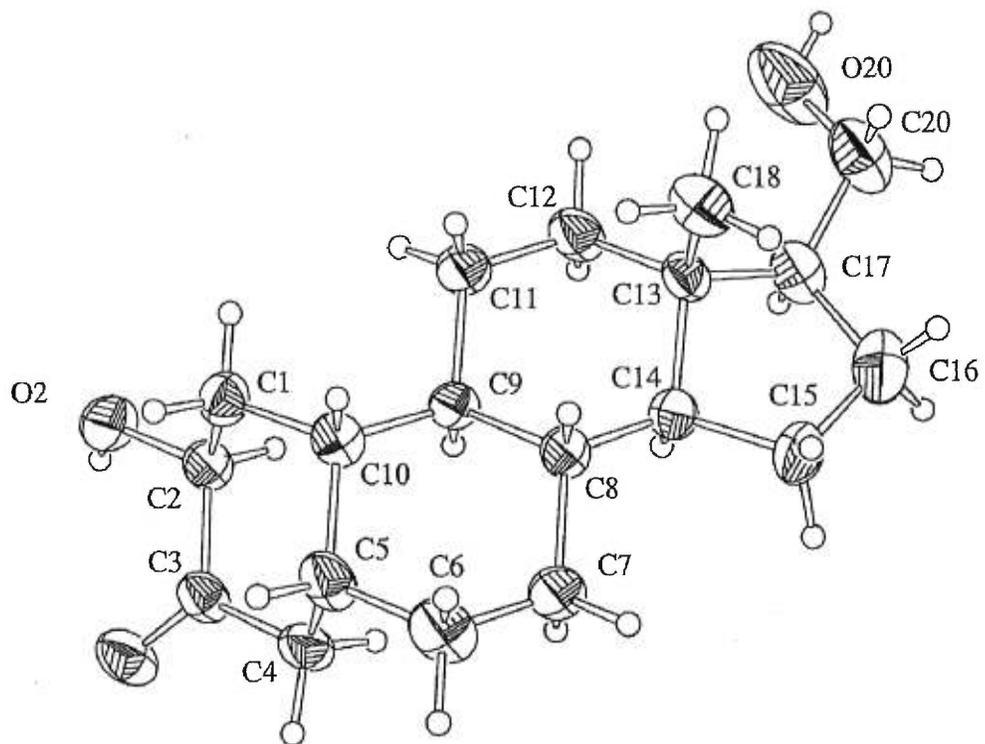


TABLEAU 9 **Coordonnées atomiques et paramètres équivalents**
de déplacement isotropique (\AA^2)

	x	y	z	Ueq
C1	0.9250 (4)	0.0217 (3)	0.10772 (13)	0.0522 (8)
O2	1.1388 (3)	-0.0753 (2)	0.04048 (10)	0.0696 (7)
C2	0.9966 (4)	-0.1020 (3)	0.08253 (14)	0.0499 (8)
O3	0.8469 (3)	-0.2206 (2)	0.00556 (10)	0.0723 (8)
C3	0.8415 (4)	-0.1788 (3)	0.05588 (13)	0.0498 (8)
C4	0.6804 (4)	-0.1991 (3)	0.09759 (13)	0.0625 (10)
C5	0.6120 (4)	-0.0752 (4)	0.12452 (14)	0.0611 (9)
C6	0.4534 (4)	-0.0969 (4)	0.16918 (14)	0.0797 (13)
C7	0.5172 (4)	-0.1573 (4)	0.22685 (14)	0.0708 (11)
C8	0.6679 (4)	-0.0767 (3)	0.25705 (12)	0.0491 (8)
C9	0.8326 (4)	-0.0581 (3)	0.21371 (12)	0.0422 (7)
C10	0.7716 (4)	0.0008 (3)	0.15464 (12)	0.0494 (8)
C11	0.9885 (5)	0.0178 (3)	0.24415 (14)	0.0604 (9)
C12	1.0460 (4)	-0.0355 (4)	0.30487 (13)	0.0638 (11)
C13	0.8811 (4)	-0.0506 (3)	0.34747 (12)	0.0467 (8)
C14	0.7365 (4)	-0.1330 (3)	0.31493 (13)	0.0526 (9)
C15	0.6011 (5)	-0.1679 (4)	0.36495 (14)	0.0845 (13)
C16	0.7186 (6)	-0.1783 (4)	0.42183 (16)	0.0943 (14)
C17	0.9157 (5)	-0.1317 (4)	0.40324 (14)	0.0670 (10)
C18	0.8078 (5)	0.0791 (3)	0.36544 (14)	0.0717 (11)
O20	1.1998 (4)	-0.0489 (5)	0.43843 (12)	0.1356 (14)
C20	1.0163 (6)	-0.0748 (4)	0.45639 (16)	0.0903 (13)

TABLEAU 10

Distances Interatomiques (Å)

C1-C2	1.504 (4)	C9-C10	1.519 (4)
C1-C10	1.539 (4)	C9-C11	1.536 (4)
O2-C2	1.418 (3)	C11-C12	1.521 (4)
C2-C3	1.502 (4)	C12-C13	1.531 (4)
O3-C3	1.204 (3)	C13-C18	1.513 (4)
C3-C4	1.504 (4)	C13-C17	1.526 (4)
C4-C5	1.513 (4)	C13-C14	1.537 (4)
C5-C6	1.534 (4)	C14-C15	1.527 (4)
C5-C10	1.554 (4)	C15-C16	1.529 (4)
C6-C7	1.505 (4)	C16-C17	1.561 (5)
C7-C8	1.534 (4)	C17-C20	1.512 (4)
C8-C14	1.502 (4)	O20-C20	1.411 (4)
C8-C9	1.545 (3)		

TABLEAU 11

Angles de valence(°)

C2-C1-C10	112.2 (2)	C9-C10-C5	112.4 (3)
O2-C2-C3	112.6 (2)	C1-C10-C5	108.3 (2)
O2-C2-C1	109.0 (2)	C12-C11-C9	113.7 (3)
C3-C2-C1	110.7 (2)	C11-C12-C13	112.1 (3)
O3-C3-C2	122.6 (3)	C18-C13-C17	110.0 (3)
O3-C3-C4	123.3 (3)	C18-C13-C12	110.1 (3)
C2-C3-C4	114.1 (2)	C17-C13-C12	115.8 (3)
C3-C4-C5	112.1 (3)	C18-C13-C14	113.1 (3)
C4-C5-C6	112.0 (3)	C17-C13-C14	100.5 (3)
C4-C5-C10	111.7 (2)	C12-C13-C14	107.1 (2)
C6-C5-C10	110.5 (2)	C8-C14-C15	120.6 (3)
C7-C6-C5	112.8 (3)	C8-C14-C13	114.1 (3)
C6-C7-C8	111.1 (3)	C15-C14-C13	103.0 (2)
C14-C8-C7	113.2 (3)	C14-C15-C16	105.4 (3)
C14-C8-C9	109.4 (2)	C15-C16-C17	105.3 (3)
C7-C8-C9	110.0 (2)	C20-C17-C13	119.8 (3)
C10-C9-C11	112.6 (3)	C20-C17-C16	110.7 (3)
C10-C9-C8	111.7 (2)	C13-C17-C16	104.0 (3)
C11-C9-C8	110.7 (2)	O20-C20-C17	107.8 (3)
C9-C10-C1	115.9 (2)		

TABLEAU 12

Angles de torsion(°)

C10-C1-C2-O2	-179.1 (2)	C10-C9-C11-C12	177.2 (3)
C10-C1-C2-C3	56.5 (3)	C8-C9-C11-C12	51.4 (4)
O2-C2-C3-O3	5.4 (4)	C9-C11-C12-C13	-53.7 (4)
C1-C2-C3-O3	127.7 (3)	C11-C12-C13-C18	-68.5 (4)
O2-C2-C3-C4	-174.9 (3)	C11-C12-C13-C17	166.0 (3)
C1-C2-C3-C4	-52.6 (4)	C11-C12-C13-C14	54.9 (4)
O3-C3-C4-C5	-128.8 (3)	C7-C8-C14-C15	-53.8 (4)
C2-C3-C4-C5	51.4 (3)	C9-C8-C14-C15	-176.8 (3)
C3-C4-C5-C6	-177.4 (2)	C7-C8-C14-C13	-177.3 (3)
C3-C4-C5-C10	-53.0 (3)	C9-C8-C14-C13	59.6 (3)
C4-C5-C6-C7	71.7 (4)	C18-C13-C14-C8	61.4 (3)
C10-C5-C6-C7	-53.4 (4)	C17-C13-C14-C8	178.7 (3)
C5-C6-C7-C8	57.2 (4)	C12-C13-C14-C8	-60.0 (3)
C6-C7-C8-C14	180.0 (3)	C18-C13-C14-C15	-71.1 (3)
C6-C7-C8-C9	-57.3 (4)	C17-C13-C14-C15	46.1 (3)
C14-C8-C9-C10	-179.0 (3)	C12-C13-C14-C15	167.4 (3)
C7-C8-C9-C10	56.0 (4)	C8-C14-C15-C16	-161.6 (3)
C14-C8-C9-C11	-52.7 (3)	C13-C14-C15-C16	-32.9 (4)
C7-C8-C9-C11	-177.7 (3)	C14-C15-C16-C17	6.9 (4)
C11-C9-C10-C1	55.6 (3)	C18-C13-C17-C20	-46.3 (4)
C8-C9-C10-C1	-179.1 (3)	C12-C13-C17-C20	79.3 (4)
C11-C9-C10-C5	-179.2 (2)	C14-C13-C17-C20	-165.7 (3)
C8-C9-C10-C5	-53.9 (3)	C18-C13-C17-C16	78.0 (4)
C2-C1-C10-C9	69.4 (3)	C12-C13-C17-C16	-156.5 (3)
C2-C1-C10-C5	-57.9 (3)	C14-C13-C17-C16	-41.5 (3)
C4-C5-C10-C9	-73.7 (3)	C15-C16-C17-C20	151.7 (4)
C6-C5-C10-C9	51.6 (4)	C15-C16-C17-C13	21.8 (4)
C4-C5-C10-C1	55.6 (3)	C13-C17-C20-O20	-66.0 (5)
C6-C5-C10-C1	-179.1 (3)	C16-C17-C20-O20	173.1 (4)

TABLEAU 13 **Géométrie des ponts hydrogène**

D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A
O2-H2...O3 ⁱ	0.82	2.02	2.809 (3)	160.9
O20-H20...O2 ⁱⁱ	0.82	2.06	2.867 (4)	168.2

Codes de symétrie: (i) $\frac{1}{2} + x, -\frac{1}{2} -y, -z$; (ii) $\frac{5}{2} - x, -y, \frac{1}{2} + z$.

ANNEXE 3

EXPÉRIENCES DE DOUBLE RÉSONNANCE

FIGURE 24 Spectre RMN ¹H du triacétate avec irradiation du proton 3

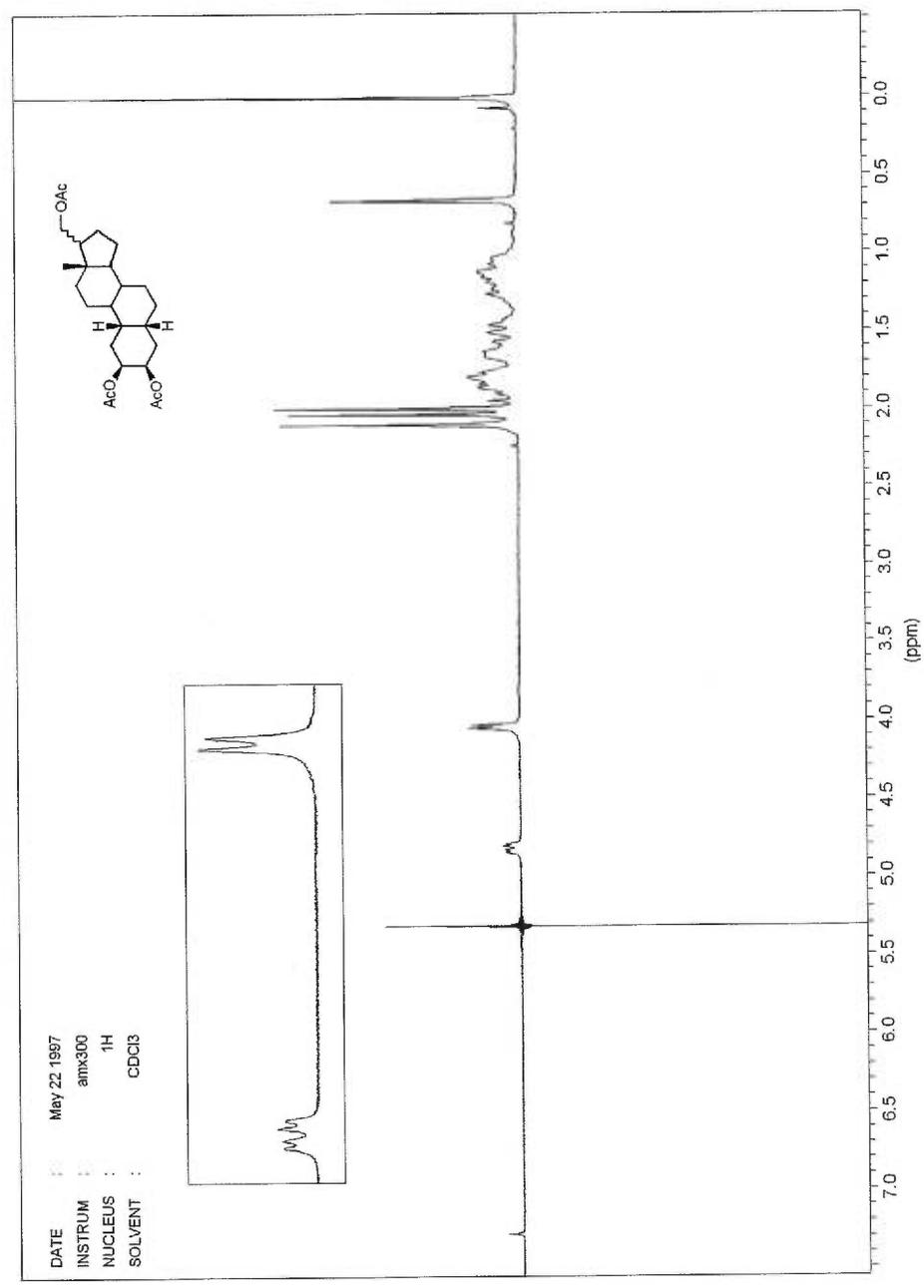


FIGURE 23 Spectre RMN ¹H du triacétate avec irradiation du proton 2

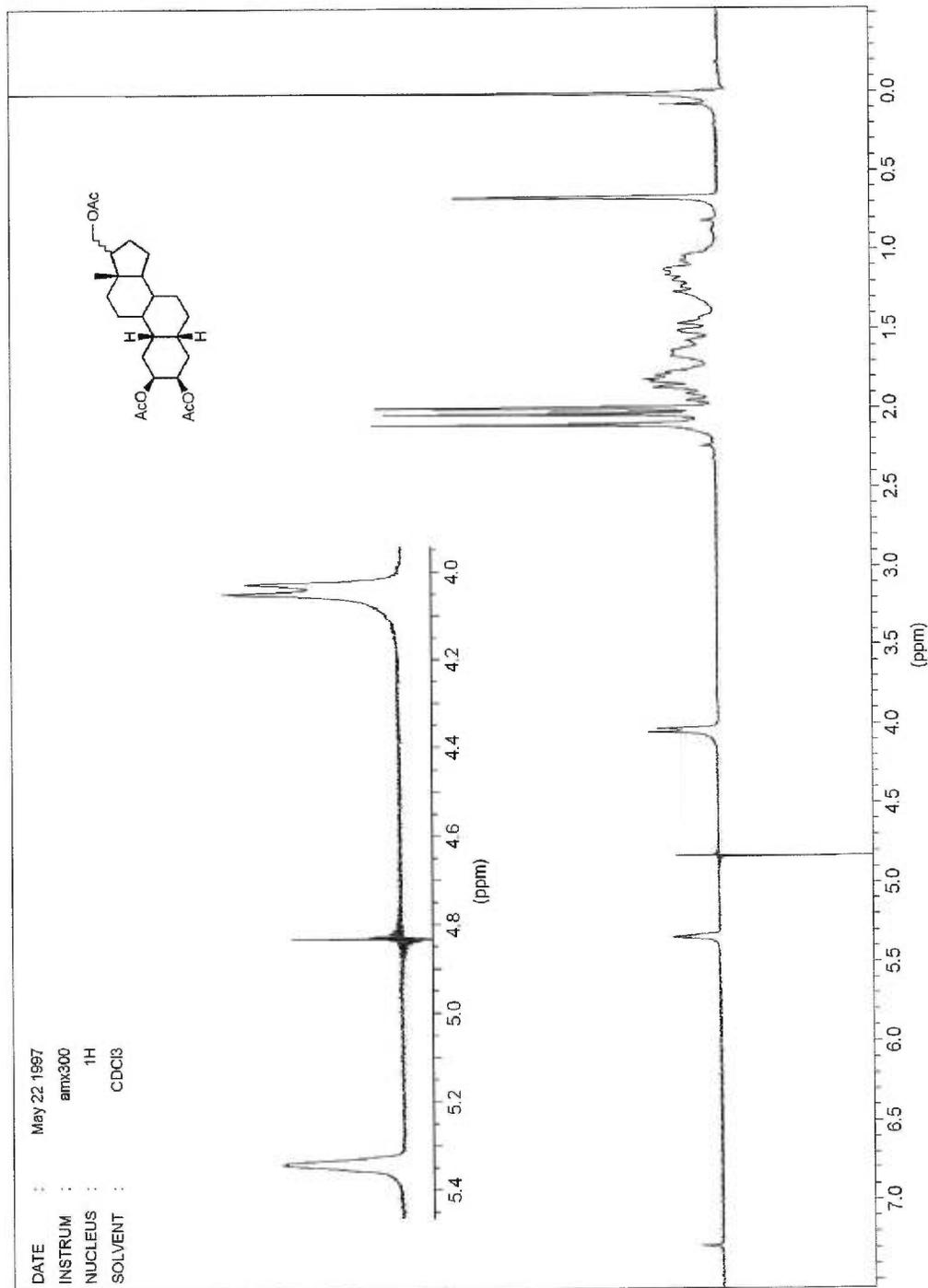
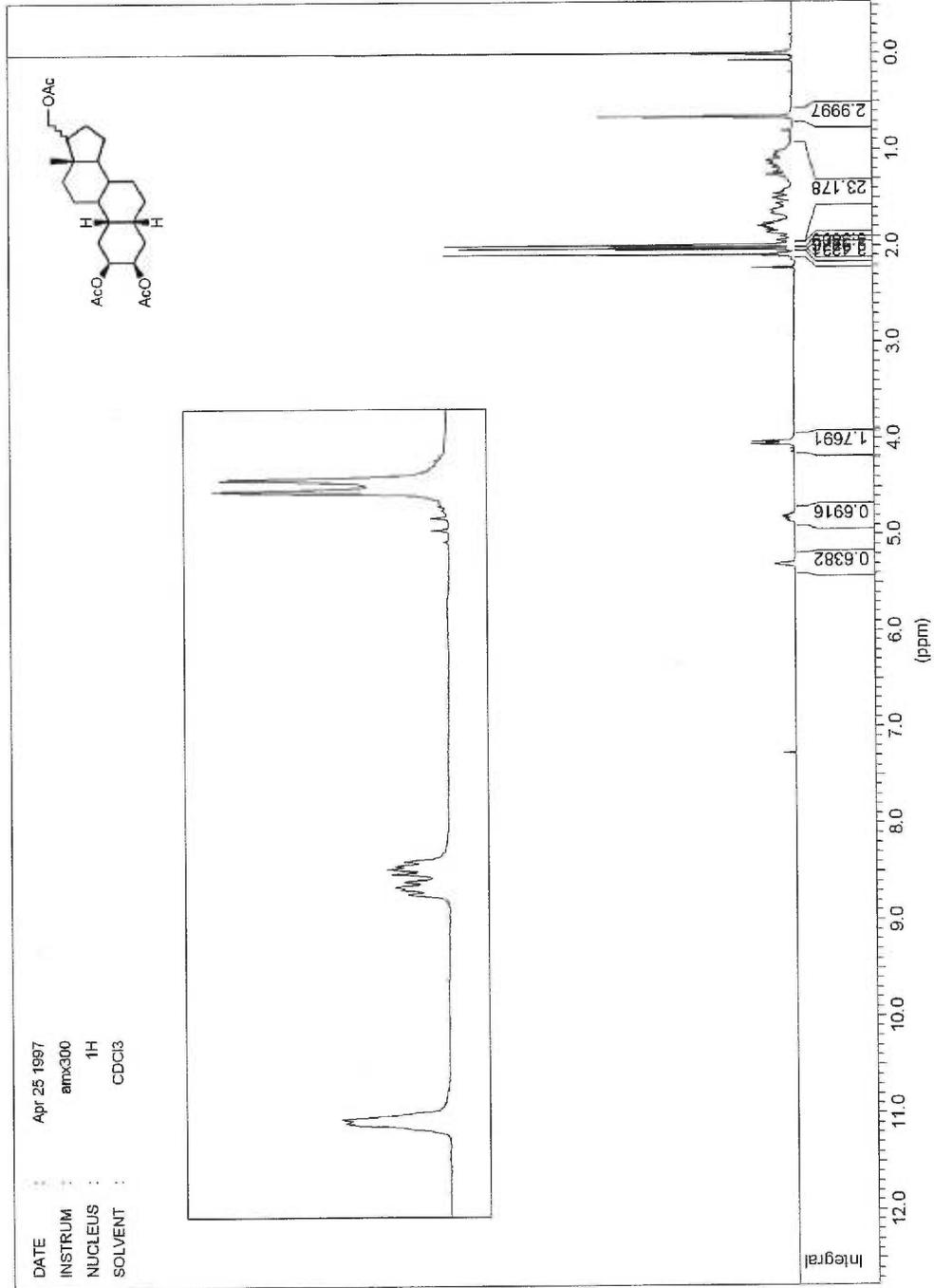


FIGURE 22 Spectre RMN ¹H du triacétate



ANNEXE 4

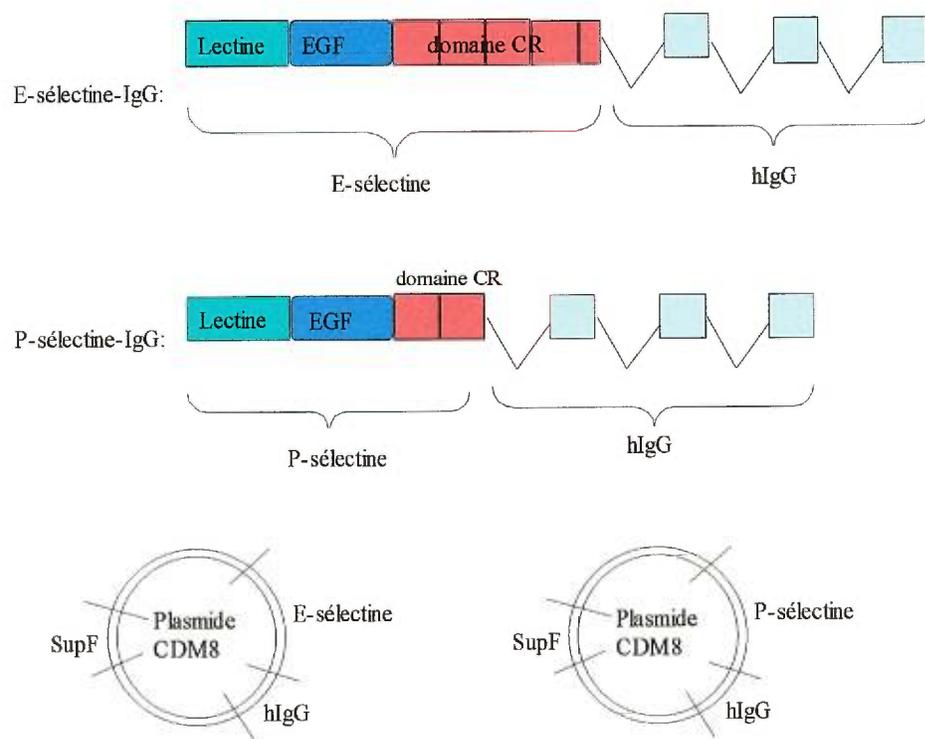
TEST D'ADHÉSION

Nous décrivons ici la méthode employée pour mesurer l'affinité relative des antagonistes à la E- et la P-sélectine. Avant de débiter la description du test, il faut s'attarder sur la production de la E- et de la P-sélectine.

Production de la E- et de la P-sélectine

1. On doit d'abord modifier des plasmides en y intégrant une séquence d'ADN qui exprime les protéines suivantes:

FIGURE 25. MODIFICATION DES PLASMIDES



On intègre une séquence qui exprime une immunoglobuline afin de faciliter la fixation de la E- et de la P-sélectine sur les plaques où les tests seront effectués. En fait, les immunoglobulines sont connues

depuis longtemps et les protocoles ayant pour but de les fixer sur les plaques sont décrits dans la littérature.

2. On introduit ensuite ces vecteurs d'expression dans les cellules COS en les traitant avec du diéthyl aminoéthyl-dextran/chloroquine sulfate. Ce traitement rend leurs membranes plasmiques perméables.
3. Une fois le vecteur d'expression inséré dans la cellule, ces dernières se répliquent jusqu'à confluence.
4. La machinerie cellulaire devient alors disponible à la synthèse de protéines telles que les sélectines. Ces dernières sont excrétées dans le milieu extracellulaire. On les récupère dans le surnageant.

Description du test (voir figure 26).

1. On fixe tout d'abord les anticorps de chèvres anti IgG humain sur une plaque de liaison en polystyrène.
2. On bloque ensuite les sites libres à l'aide de l'albumine de sérum bovin.
3. On fixe les sélectines-hlgG via l'interaction avec les anticorps de chèvres anti IgG humain.
4. On ajoute alors les cellules HL-60 marquées au Tritium $^3\text{[H]}$ qui expriment les récepteurs PSGL-1 et ESL-1. Ces derniers présentent à leur surface des SLe^x qui peuvent interagir avec les sélectines.

5. Finalement, on ajoute les antagonistes. Ils vont déplacer les cellules HL-60 s'ils ont plus d'affinité. On peut alors mesurer le nombre de cellules HL-60 qui demeurent sur les plaques. Cette valeur est donc une mesure de l'affinité relative des antagonistes.

FIGURE 26 Interaction possibles lors des tests d'adhésion.

