

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

**Synthèse de dérivés de l'acide 5-aminolévulinique.  
Applications en synthèse de peptides sur phase solide  
et en thérapie photodynamique**

Thèse

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel

pour l'obtention du grade de docteur ès Sciences

par

**Alain Greppi**

de Neuchâtel

Chimiste diplômé de l'Université de Neuchâtel

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

Septembre 1999

# IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

**Synthèse de dérivés de l'acide  
5-aminolévulinique. Application en synthèse de  
peptides sur phase solide et en thérapie  
photodynamique**

de M. Alain Greppi

---

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de  
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

Mme A. Beck-Sickinger (ETH-Zürich),  
MM. R. Neier (directeur de thèse), R. Tabacchi, et  
H. Rink (Novartis, Bâle)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 5 octobre 1999

Le doyen:



F. Stoeckli

Ce travail de recherche, a été effectué d'avril 1995 à mars 1999 dans les laboratoires de Chimie Organique de Synthèse de l'Université de Neuchâtel, sous la direction de Monsieur le Professeur Dr. Reinhard Neier.

Je le remercie très sincèrement de m'avoir accueilli au sein de son groupe de recherche et je lui suis profondément reconnaissant de la confiance et de la liberté qu'il m'a accordées tout au long de ces quatre années. Ses précieux conseils et son intérêt pour mon travail ont alimenté ma motivation.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury : Madame le Professeur Dr. Annette Beck-Sickinger (ETH Zürich), Monsieur le Professeur Dr. Raffaele Tabacchi (Université de Neuchâtel) et Monsieur Hans Rink (Rink Combichem Technologies Bâle) pour avoir accepté de juger ce travail.

J'aimerais remercier tout particulièrement Yann Berger, qui a contribué à ce travail, tout d'abord dans le cadre d'un stage de laboratoires avancés, puis tout au long d'un travail de diplôme. Mes remerciements vont également à tous les autres collaborateurs du groupe : Anton Aeby, Dr. Favel Bobal, Dr. Janette Bobalova, Dr. Christiane Bobillier, David Carcache, Dr. André Chaperon, Dr. Lenuta Cires, Dr. Thomas Engeloeh, Dr. Mathias Henz, Dr. Caroline Jarret, Pierre-Yves Musard, Klaus Neuschütz, Dr. Cécile Pasquier, Dr. Jean-Philippe Roblin, Jean-Mary Simone, Dr. Olivier Siri, Carole Soldermann, Nicolas Soldermann, Frédéric Stauffer, Dr. Thomas Thyran, Dr. Jörg Veiker et Eleonora Zizzari pour leur disponibilité, leur bonne humeur et leur aide au laboratoire.

Dans le cadre de la collaboration de notre Département avec l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne et le Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, je tiens à remercier très sincèrement Madame le Docteur Lucienne Juillerat et ses collaboratrices (Institut de Pathologie, CHUV) ainsi que le Dr. Norbert Lange et Matthieu Zellweger (Département de Génie Rural, EPFL) pour leur aide et leurs précieux conseils dans les manipulations et les mesures effectuées avec les lignées de cellules en culture.

Suite à mon stage de cinq mois dans le Département "Molecular Diversity" chez CIBA-GEIGY A.G. (maintenant NOVARTIS A.G.), j'aimerais remercier Monsieur le Docteur Peter Schneider, Monsieur le Docteur Eduard Felder, MM. Hans Rink, Erich Spieser et Urs Rindisbacher pour leur aide et leurs précieux conseils dans les manipulations et les synthèses effectuées sur phase solide et en chimie combinatoire.

Je remercie également Cécile Bolle, Christèle Leymarie, Cyril Barzaghi, Carlos Tardon et David Schwab pour leur aide apportée à mon travail dans le cadre de leur apprentissage. Mes remerciements vont également à tous les autres "membres" (apprentis, collaborateurs, professeurs, doctorants et étudiants) de la petite famille de l'Institut.

Pour leurs précieux travaux analytiques et leur assistance technique, je tiens à remercier le Dr. Saturnin Claude, François Bettinelli, Dr. Christiane Bobillier, Heinz Bursian, Christine Poliard, Armelle Michel, Dr. Guy-Marie Dubin, Jean-Pierre Perret-Gentil, Philippe Stauffer, ainsi que Freddy Nydegger de l'Université de Fribourg.

Je remercie également Esther Thonney, Corinne Carraux, Nicole Guggisberg et Sabine Hofmännner pour leur gentillesse, leur sourire et leur disponibilité à l'occasion de mes visites quasi-quotidiennes au secrétariat de l'Institut. Un grand merci aussi à Janick Piccolo, Isabelle Conod et Blaise Dardel pour leurs aides précieuses dans la rédaction de ce travail.

Mes remerciements vont également à l'Eia de Neuchâtel pour m'avoir accordé un poste d'assistant durant trois ans et au Fonds de l'Industrie Chimique Bâloise pour avoir financé ma première année de thèse.

Enfin, pour les remerciements à mes parents en particulier, ma famille et mes amis, l'espace à disposition serait insuffisant, c'est pourquoi je me contenterai d'un grand MERCI.

***A mes parents,***

**à toute ma famille et à mes amis.**

"La honte n'est pas d'être inférieur à  
l'adversaire, mais c'est d'être  
inférieur à soi-même"

**Maxime Mandchoue**

## Résumé

Une partie essentielle de la recherche au sein de notre groupe se concentre sur l'explication du mécanisme de la biosynthèse du porphobilinogène (PBG). A l'aide d'analogues du substrat synthétisés, des intermédiaires postulés et du produit de la biosynthèse, une série d'études d'inhibition de l'enzyme (PBGS, EC 4.2.1.24) ont été entreprises afin d'éclaircir les détails mécanistiques.

Dans le cadre de ce travail, en vue de préparer une série d'analogues de l'intermédiaire postulé par Jordan [1], nous nous sommes principalement intéressés (Figure I) à la synthèse de dérivés peptidiques de l'acide 5-aminotévluniqué (ALA).

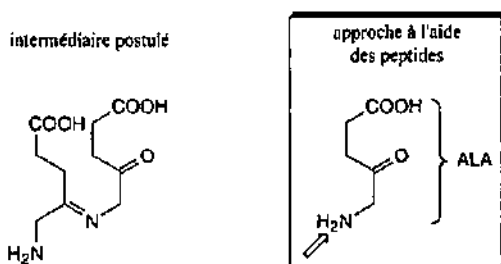


Figure I : Synthèse d'analogues de l'intermédiaire postulé par Jordan à l'aide de la chimie peptidique

Suite à une série d'essais encourageants en solution, nous avons opté pour une application de la préparation des dérivés peptidiques de ALA sur un support solide (Figure II).

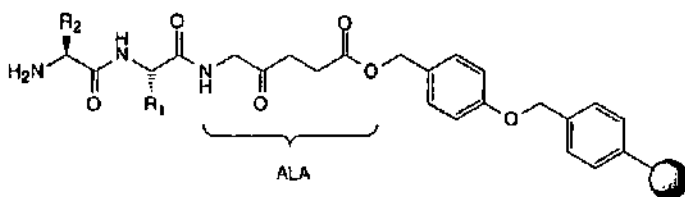


Figure II : Stratégie suivie pour la synthèse peptidique sur phase solide (SPPS)

Des problèmes importants de stabilité de ALA et de ses analogues, notamment en présence d'entités nucléophiles et/ou basiques, ont cependant fait que l'idée de pouvoir construire des bibliothèques de peptides basées sur ALA s'est révélée irréalisable jusqu'à maintenant, et qu'il a par conséquent été nécessaire de revenir à une synthèse de dérivés peptidiques en solution. Dans ce contexte, une série de di- et de tripeptides a été préparée, mais les tests préliminaires d'inhibition sur la PBGS se sont avérés peu concluants, ce qui nous a poussé à trouver une nouvelle application pour ALA et ses dérivés.

Depuis une dizaine d'années, une nouvelle technique appelée thérapie photodynamique (PDT) est en constante évolution. Cette méthode combine l'emploi d'une substance photosensibilisatrice et de la lumière, en général un laser, pour provoquer la mort cellulaire et la destruction des tumeurs. Elle s'est révélée être très efficace dans le traitement d'une grande diversité de cancers (notamment ceux de l'oesophage, de la peau et de la vessie). Plus récemment, de nombreuses recherches se sont dirigées vers l'application de ALA en PDT. En effet, lorsque ce dernier est administré de manière exogène à une lignée de cellules, il est inclus au sein du chemin biosynthétique menant aux porphyrines et conduit ainsi à la formation de protoporphyrine IX (PpIX), qui est un photosensibilisateur puissant. Cependant, l'obstacle principal rencontré dans l'utilisation de l'acide 5-aminolévulinique dans la technique PDT est représenté par sa pénétration limitée au sein des tissus tumoraux, raison pour laquelle des dérivés de ALA sont actuellement étudiés en tant que précurseurs plus efficaces de la PpIX.

Dans le cadre d'une collaboration établie avec le Département de Génie rural de l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne et avec l'Institut de Pathologie du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, nous nous sommes donc intéressés à l'application des dérivés peptidiques de ALA dans la technique PDT et à leur efficacité potentielle en tant que précurseurs de photosensibilisateurs. Des études d'hydrolyse et de déprotection, ainsi que des tests préliminaires de fluorescence effectués sur des lignées de cellules particulières ont permis d'affirmer que les dérivés ci-dessous (Figure III) conduisent à des résultats prometteurs et que cette stratégie mérite d'être étudiée plus profondément.

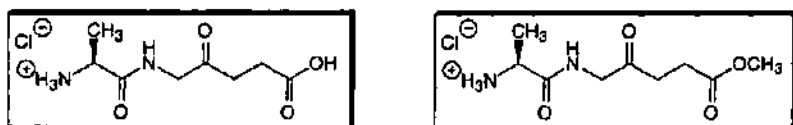


Figure III : Structures potentiellement intéressantes pour une application en PDT

## Abstract

An essential part of our research is focussed on the explanation of the Porphobilinogen (PBG) biosynthesis mechanism. Thus, a series of enzyme (PBGs, EC 4.2.1.24) inhibition studies has been undertaken with the help of synthesized analogues of the substrate, of the postulated intermediate and of the product.

In this work, in order to prepare analogues of the postulated Jordan intermediate [1], our target was the synthesis of 5-aminolevulinic acid (ALA) peptide derivatives.

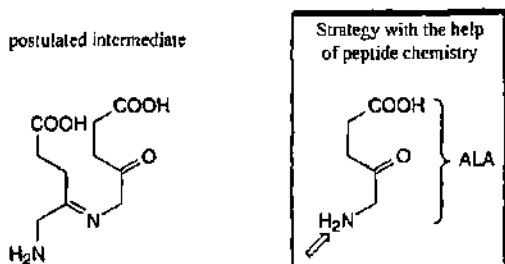


Figure 1 : Synthesis of postulated Jordan intermediate analogues with the help of peptide chemistry

After a promising series of solution trials, we decided on an application of solid supported ALA peptide derivatives synthesis.

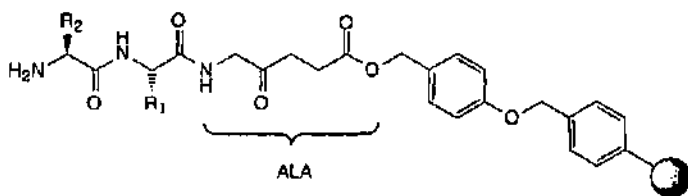


Figure II : Strategy for solid phase peptide synthesis (SPPS)

Important ALA (and analogues) stability problems however, particularly in the presence of nucleophilic and / or basic moieties, made the construction of ALA based peptide libraries impossible until now and it was necessary to return to solution synthesis of peptide derivatives. In this context, a series of di- and tripeptides has been prepared but the preliminary PBGS inhibition tests were disappointing, which was an incentive for us to find a new application for ALA and its derivatives.

In the last ten years a new technique called photodynamic therapy (PDT) has been in constant evolution. This method combines the use of a photosensitizing substance and light (in general a laser) to cause cellular death and tumor destruction. It is very efficient in the treatment of a variety of cancers (particularly oesophagus, skin and bladder cancer). Recently, various applications of ALA in PDT have been developed. In fact, the exogenic administration of ALA to a cellular line causes the incorporation of ALA in the porphyrins biosynthetic path and thus to protoporphyrin IX (PpIX) formation. However, one of the main obstacles to ALA use is its limited penetration into tumoral tissue. Current efforts concentrate on ALA derivatives which would be more efficient PpIX precursors.

Our collaboration with the department of rural engineering in the EPFL (Mrs. M. Zellweger und N. Lange) and with the department of pathology at the CHUV (Ms. L. Juillerat) allowed us to focus on the application of ALA peptide derivatives in the PDT technique and on their potential efficiency as photosensitizer precursors. A series of hydrolysis and deprotection studies, combined with preliminary fluorescence assays on particular cellular lines, led us to promising derivatives (see Figure III) and confirmed the potential of our strategy.

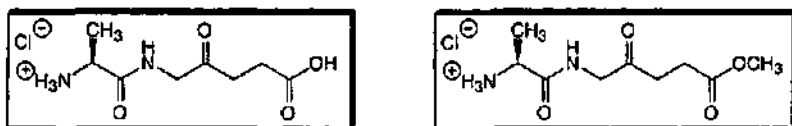


Figure III : Potentially interesting structures for a PDT application

## ABREVIATIONS UTILISEES

ALA.....	acide 5-aminolévulinique
APCI.....	ionisation chimique à pression atmosphérique
APT.....	anglais : Attached proton test
Bn.....	benzyle
Boc.....	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
CCM.....	chromatographie sur couche mince
COSY.....	anglais : <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-Homonuclear shift-correlated 2D NMR
DCI.....	ionisation chimique par désorption
DEPT.....	anglais : distortionless enhancement by polarisation transfer
Ei.....	ionisation par impact électronique
ESI.....	ionisation par électrospray
Et.....	éthyle
Fmoc.....	[ <i>N</i> -(9H-fluorén-9-yl)méthoxy]carbonyle
GC.....	chromatographie en phase gazeuse
HETCOR.....	anglais : <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-Heteronuclear shift-correlated 2D-NMR
HRMS.....	anglais : High Resolution Mass Spectroscopy
HPLC.....	anglais : High Pressure Liquid Chromatography
<sup>i</sup> Pr.....	isopropyle
IR.....	spectroscopie infrarouge
LDL.....	anglais : Low-density lipoproteins
<i>m/z</i> .....	rapport masse sur charge
Me.....	méthyle
MS.....	spectrométrie de masse
MTF.....	bromure de [(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphényle] tetrazolium
PD.....	anglais : Photodynamic detection
PDT.....	anglais : Photodynamic therapy
PM.....	poids moléculaire
Ph.....	phényle
PUVA.....	photothérapie de la psoriasis qui combine psoralènes et lumière UV-A
<i>rac</i> .....	mélange racémique (±)
RMN.....	résonance magnétique nucléaire
RP-18.....	phase inverse en C <sub>18</sub>
RT.....	température ambiante
<i>t</i> .....	<i>tert.</i> = tertiaire
TMS.....	triméthylsilyle

# TABLES DES MATIERES

## INTRODUCTION

<b>Le rôle des porphyrines</b>	<b>2</b>
<b>L'origine des porphyrines</b>	<b>5</b>
<b>La porphobilinogène synthase : une énigme mécanistique</b>	<b>7</b>

## BUT DU TRAVAIL 8

## PARTIE THEORIQUE

<b>I. La chimie combinatoire dans la recherche pharmacologique</b>	<b>10</b>
1.1. Historique	10
1.2. Principes de base	11
1.3. Des bibliothèques de peptides ...	13
1.4. ... à celles des petites molécules organiques	14
1.5. Conception, méthodes et techniques de la chimie combinatoire	14
1.5.1. La conception	14
1.5.2. Les méthodes et les techniques de la synthèse combinatoire	17
1.6. Caractérisation des bibliothèques combinatoires	21
1.7. La synthèse combinatoire en solution	22
1.7.1. La synthèse de mélanges de composés	22
1.7.2. Synthèses parallèles de composés uniques	25
1.8. La synthèse combinatoire sur phase solide	26
1.8.1. Les phases solides employées pour la synthèse de bibliothèques	26
1.8.2. La synthèse d'une bibliothèque combinatoire	29
1.8.3. La détermination structurale des composés actifs de la bibliothèque	30

1.8.3.1.	Structure du produit grâce à son emplacement au sein de la bibliothèque	30
1.8.3.2.	Identification structurale par codage	31
<b>1.9.</b>	<b>Automatisation et interprétation des données</b>	<b>34</b>
<b>1.10.</b>	<b>Développements futurs en chimie combinatoire</b>	<b>35</b>
<b>2.</b>	<b>La thérapie photodynamique</b>	<b>37</b>
2.1.	Historique et généralités	37
2.2.	Les agents thérapeutiques du type photodynamique	40
2.2.1.	Agents photosensibilisateurs de la deuxième génération	44
2.2.2.	Emplacement des photosensibilisateurs	48
2.3.	Domages sur des cibles sous-cellulaires	49
2.4.	Fonctionnement physico-chimique de la thérapie photodynamique	50
2.5.	Utilisation thérapeutique de la PDT	52
2.6.	Les nouvelles applications de la PDT	54
<b>3.</b>	<b>La thérapie photodynamique avec l'acide 5-aminolévulinique et ses dérivés en tant que photosensibilisateurs</b>	<b>56</b>
3.1.	La biosynthèse des pigments de la vie	57
3.1.1.	De la glycine à l'Uroporphyrinogène III	57
3.1.2.	De l'Uroporphyrinogène III à l'hème	61
3.1.3.	De l'Uroporphyrinogène III à la chlorophylle	63
3.1.4.	Pourquoi le modèle de substitution de type III ?	66
3.1.5.	Réglage de la voie biosynthétique conduisant à l'hème	68
3.2.	Modes d'administration de l'acide 5-aminolévulinique	69
3.3.	Les longueurs d'onde caractérisant la lumière photoactivante	69
3.4.	Temps et durée de l'exposition à la lumière photoactivante	70
3.5.	Le processus de photoblanchiment	70

<b>3.6.</b>	<b>Applications cliniques de la technique ALA-PDT</b>	<b>72</b>
<b>3.7.</b>	<b>Stabilité de ALA en solution et désavantages de la technique ALA-PDT</b>	<b>74</b>
<b>3.8.</b>	<b>Modifications chimiques de ALA</b>	<b>76</b>
<b>4.</b>	<b>Autres applications photodynamiques de ALA et de ses dérivés</b>	<b>79</b>
<b>4.1.</b>	<b>Définition d'un système expérimental contenant un herbicide expérimental</b>	<b>79</b>
<b>4.1.1.</b>	<b>Principes de base</b>	<b>79</b>
<b>4.1.2.</b>	<b>Développement du concept</b>	<b>80</b>
<b>4.1.3.</b>	<b>Choix de l'herbicide</b>	<b>81</b>
<b>4.1.4.</b>	<b>Choix du système végétal et du système d'administration de ALA</b>	<b>82</b>
<b>4.1.5.</b>	<b>Etudes préliminaires au sujet de l'impact environnemental</b>	<b>84</b>
<b>4.1.6.</b>	<b>Découverte de l'effet herbicide sélectif de ALA</b>	<b>84</b>
<b>4.2.</b>	<b>Développement d'insecticides porphyriniques</b>	<b>85</b>
<b>4.2.1.</b>	<b>Concept et phénoménologie</b>	<b>85</b>
<b>4.2.2.</b>	<b>Mécanisme d'action des insecticides porphyriniques</b>	<b>85</b>

## DISCUSSION DES RESULTATS

<b>5.</b>	<b>Applications de ALA dans la chimie peptidique</b>	<b>88</b>
<b>5.1.</b>	<b>Considérations générales</b>	<b>88</b>
<b>5.2.</b>	<b>Synthèse en solution de dérivés peptidiques de ALA</b>	<b>90</b>
<b>5.2.1.</b>	<b>Synthèse du dérivé peptidique Fmoc-(Ala-ALA)-OMe</b>	<b>90</b>
<b>5.2.2.</b>	<b>Etude d'efficacité des réactifs de couplage et adaptation des conditions réactionnelles</b>	<b>91</b>
<b>5.2.3.</b>	<b>Synthèses des dérivés peptidiques de ALA</b>	<b>92</b>
<b>5.3.</b>	<b>Synthèse peptidique avec ALA sur la phase solide</b>	<b>94</b>
<b>5.3.1.</b>	<b>Protection du <i>N</i>-terminal de ALA</b>	<b>95</b>
<b>5.3.1.1.</b>	<b>Synthèse de l'acide <i>N</i>-protégé 52</b>	<b>96</b>
<b>5.3.1.2.</b>	<b>Synthèse de l'ester 53</b>	<b>97</b>
<b>5.3.1.3.</b>	<b>Autres essais de <i>N</i>-protection sur ALA</b>	<b>97</b>
<b>5.3.2.</b>	<b>Chargement de Fmoc-(ALA)-OH sur la phase solide</b>	<b>97</b>
<b>5.3.3.</b>	<b>Synthèse sur phase solide de dérivés peptidiques de ALA</b>	<b>100</b>
<b>5.3.3.1.</b>	<b>Essai de synthèse sur phase solide de la séquence Ser-Ala-ALA</b>	<b>100</b>
<b>5.3.3.2.</b>	<b>Essai de synthèse sur phase solide de la séquence Val-Ala-ALA</b>	<b>101</b>
<b>5.3.3.3.</b>	<b>Essai de synthèse sur phase solide de la séquence ALA-Gly</b>	<b>102</b>
<b>5.3.4.</b>	<b>Mise en évidence de l'instabilité de ALA en présence de pipéridine</b>	<b>103</b>
<b>5.3.5.</b>	<b>Essais de synthèse sur phase solide avec ALA modifié</b>	<b>103</b>
<b>5.3.6.</b>	<b>Essais de synthèse sur phase solide avec Boc-(ALA)-OH</b>	<b>104</b>
<b>5.3.7.</b>	<b>Synthèse peptidique sur phase solide avec l'acide 5-aminovalérique</b>	<b>104</b>
<b>5.3.7.1.</b>	<b>Protection du <i>N</i>-terminal de AVA</b>	<b>105</b>
<b>5.3.7.2.</b>	<b>Essais d'estérification de AVA en solution</b>	<b>105</b>
<b>5.3.7.3.</b>	<b>Chargement de Fmoc-(AVA)-OH sur la phase solide</b>	<b>105</b>
<b>5.3.7.4.</b>	<b>Essai de synthèse sur phase solide de la séquence Phe-Ala-AVA</b>	<b>106</b>
<b>5.3.8.</b>	<b>Synthèse peptidique sur phase solide avec l'acide <math>\gamma</math>-aminobutyrique</b>	<b>107</b>
<b>5.3.8.1.</b>	<b>Essais d'estérification de GABA en solution</b>	<b>108</b>
<b>5.3.8.2.</b>	<b>Chargement de Fmoc-(GABA)-OH sur la phase solide</b>	<b>108</b>

5.3.8.3.	Essai de synthèse sur phase solide de la séquence Fmoc-(Phe-Ala-GABA)-OH	108
<b>5.4.</b>	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>109</b>
<b>5.5.</b>	<b>Remplacement de ALA par H-(Gly-Gly)-OH en chimie peptidique</b>	<b>111</b>
5.5.1.	Synthèse peptidique en solution basée sur H-(Gly-Gly)-OH	112
5.5.1.1.	Protection du <i>N</i> -terminal de H-(Gly-Gly)-OH	112
5.5.1.2.	Protection du C-terminal de H-(Gly-Gly)-OH	112
5.5.1.3.	Synthèse de tripeptides basés sur H-(Gly-Gly)-OBn	113
<b>5.6.</b>	<b>Résultats d'inhibition avec les composés du type H-(Gly-Gly)-OH</b>	<b>114</b>
<b>6.</b>	<b>Applications des dérivés peptidiques de ALA dans la PDT</b>	<b>116</b>
<b>6.1.</b>	<b>Résumés des travaux précédents dans le domaine ALA-PDT</b>	<b>117</b>
6.1.1.	Etudes de synthèse et d'hydrolyse d'esters de ALA	117
6.1.1.1.	Synthèse des chlorhydrates d'esters de ALA	117
6.1.1.2.	Etude d'hydrolyse enzymatique des esters synthétisés de ALA	118
6.1.2.	Etudes de paramètres pour l'optimisation de la production de PpIX à partir d'esters de ALA	120
6.1.2.1.	Détermination de la concentration optimale	121
6.1.2.2.	Détermination du pH optimal	122
6.1.2.3.	Transport des produits à travers les membranes cellulaires	123
6.1.2.4.	Conclusions	124
<b>6.2.</b>	<b>Applications des dérivés peptidiques de ALA dans la PDT</b>	<b>124</b>
6.2.1.	Synthèse des dérivés peptidiques de ALA <i>N</i> ( $\delta$ )-Boc protégés	124
6.2.2.	Réactions de déprotection sur les dérivés peptidiques de ALA <i>N</i> ( $\delta$ )-Boc protégés	126
6.2.2.1.	Synthèse de l'acide <i>N</i> -protégé 100	126
6.2.2.2.	Synthèse de l'aminoester 101	127
6.2.2.3.	Synthèse du dipeptide totalement déprotégé 102	127
6.2.3.	Mesures de fluorescence avec les dérivés peptidiques de ALA	128
<b>6.3.</b>	<b>Perspectives</b>	<b>130</b>

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

<b>7.</b>	<b>Méthodes analytiques et appareillages</b>	<b>132</b>
7.1.	Chromatographie	132
7.2.	Chromatographie en phase gazeuse (GC)	132
7.3.	Chromatographie en phase liquide (HPLC)	132
7.4.	Spectroscopie infrarouge (IR)	133
7.5.	Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)	133
7.6.	Spectrométrie de masse (MS)	133
7.7.	Spectrométrie de masse haute résolution (HRMS)	133
7.8.	Analyse élémentaire (EA)	134
7.9.	Point de fusion (F)	134
7.10.	Appareillage pour le pH-stat	134
7.11.	Spectrophotométrie UV-visible	134
7.12.	Lignées de cellules	134
7.13.	Détection de la fluorescence	135
7.14.	Protocole pour l'expérimentation sur culture de cellules	135
7.15.	Test de viabilité des cellules	136
7.16.	Verreries, système de chauffage et de refroidissement	136
7.17.	Solvants	137
7.17.1.	Solvants standards	137
7.17.2.	Solvants séchés	138
7.18.	Réactifs chimiques et gaz	139
<b>8.</b>	<b>Synthèses</b>	<b>141</b>
<b>8.1.</b>	<b>Synthèses de dérivés de l'acide lévulinique</b>	<b>141</b>
8.1.1.	Synthèse du 3- et du 5-bromolévulinate de méthyle (33 et 32)	141
8.1.2.	Synthèse du 5-( <i>N</i> -phthalimido)-lévulinate de méthyle (35)	145
8.1.3.	Synthèse de l'acide 5-aminolévulinique (1)	147
8.1.4.	Synthèse du 3-azoture lévulinate de méthyle (36)	149
8.1.5.	Synthèse du 3-chlorure d'ammonium lévulinate de méthyle (37)	150

8.1.6.	Synthèse du 3- et du 5-bromolévulinate de benzyle (39 et 38)	151
<b>8.2.</b>	<b>Synthèses de dérivés de l'acide 5-aminolévulinique</b>	<b>155</b>
8.2.1.	Synthèses de chlorhydrates d'esters de l'acide 5-aminolévulinique	155
8.2.1.1.	Mode opératoire - Type I	155
8.2.1.2.	Synthèse du chlorure de [(4-méthoxycarbonyl)-(2-oxo)-(1-butyl)] ammonium (41)	156
8.2.1.3.	Synthèse du chlorure de [(4-hexyloxy-carbonyl)-(2-oxo)-(1-butyl)] ammonium (42)	157
8.2.1.4.	Synthèse du chlorure de [(4-cyclohexyloxy-carbonyl)-(2-oxo)-(1-butyl)] ammonium (43)	158
8.2.1.5.	Synthèse du chlorure de [(4-benzyloxy-carbonyl)-(2-oxo)-(1-butyl)] ammonium (44)	159
8.2.1.6.	Synthèse du chlorure de {[4-(2-méthoxy)éthyl-oxy-carbonyl]-(2-oxo)-(1-butyl)} ammonium (45)	160
8.2.1.7.	Synthèse du chlorure de {[4-(2-éthoxy)éthyl-oxy-carbonyl]-(2-oxo)-(1-butyl)} ammonium (46)	161
8.2.1.8.	Synthèse du chlorure de {[4-(2-éthoxy)-(2-éthoxy)éthyl-oxy-carbonyl]-(2-oxo)-(1-butyl)} ammonium (47)	162
8.2.2.	Synthèse de la 2, 5-[( $\beta$ -carboxy)éthyle]pyrazine (51)	163
8.2.3.	Synthèse de l'acide [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(5-amino)-(4-oxo) pentanoïque (52)	165
8.2.3.1.	Synthèse du [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(5-amino)-(4-oxo) pentanoate de méthyle (53)	167
8.2.4.	Synthèse de l'acide [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(5-amino) pentanoïque (55)	169
8.2.4.1.	Synthèse du [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(5-amino) pentanoate de méthyle (56)	171
8.2.4.2.	Synthèse du [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(5-amino) pentanoate de benzyle (57)	174
8.2.5.	Synthèse de dérivés de l'acide [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(2-amino) pentanoïque	175
8.2.5.1.	Synthèse du [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(2-amino) pentanoate de méthyle (59)	175
8.2.5.2.	Synthèse du [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(2-amino) pentanoate de benzyle (60)	177
8.2.6.	Synthèse de dérivés de l'acide [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(4-amino) butanoïque	179
8.2.6.1.	Synthèse du [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(4-amino)	

	butanoate de méthyle (62)	179
8.2.6.2.	Synthèse du [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(4-amino)butanoate de benzyle (63)	181
8.2.7.	Synthèse de l'acide [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-amino-acétylamino-acétique (65)	183
8.2.8.	Synthèse du <i>p</i> -toluènesulfonate de [(benzyloxy)carbonyl]méthyl-carbamoyl d'ammonium (66)	185
<b>8.3.</b>	<b>Synthèses de dérivés peptidiques</b>	<b>187</b>
8.3.1.	Synthèses de dipeptides contenant l'acide 5-aminolévulinique	187
8.3.1.1.	Mode opératoire - Type II	187
8.3.1.2.	Synthèse de Fmoc-[Ala-(ALA)]-OMe (80)	189
8.3.1.3.	Synthèse de Fmoc-[Phe-(ALA)]-OMe (81)	190
8.3.1.4.	Synthèse de Fmoc-[Lys(Boc)-(ALA)]-OMe (82)	192
8.3.1.5.	Synthèse de Fmoc-[Asp(O <sup>t</sup> Bu)-(ALA)]-OMe (83)	193
8.3.1.6.	Synthèse de Fmoc-[Asp(O <sup>t</sup> Bu)-(ALA)]-OBn (84)	195
8.3.1.7.	Synthèse de Boc-[Ala-(ALA)]-OMe (85)	197
8.3.1.8.	Synthèse de Boc-[Phe-(ALA)]-OMe (86)	198
8.3.1.9.	Synthèse de Boc-[Lys(Boc)-(ALA)]-OMe (87)	199
8.3.1.10.	Synthèse de Boc-[Asp(O <sup>t</sup> Bu)-(ALA)]-OMe (88)	201
8.3.2.	Synthèses de dipeptides naturels	202
8.3.2.1.	Synthèse de Fmoc-[Ala-Ala]-OMe (89)	202
8.3.3.	Synthèses de tripeptides naturels	204
8.3.3.1.	Mode opératoire - Type III	205
8.3.3.2.	Synthèse de Fmoc-[Ala-Gly-Gly]-OBn (90)	206
8.3.3.3.	Synthèse de Fmoc-[Val-Gly-Gly]-OBn (91)	208
8.3.3.4.	Synthèse de Fmoc-[Phe-Gly-Gly]-OBn (92)	209
<b>8.4.</b>	<b>Réactions de déprotection sur les dérivés peptidiques</b>	<b>211</b>
8.4.1.	Synthèse de Boc-[Ala-(ALA)]-OH (100)	211
8.4.2.	Synthèse de H-[Ala-(ALA)]-OMe (101)	213
8.4.3.	Synthèse de H-[Ala-(ALA)]-OH (102)	214

<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>216</b>
----------------------	------------

## ANNEXES

1.	Historique de la thérapie photodynamique	1
----	--	---

---

## INTRODUCTION

Pourquoi l'herbe est-elle verte ? Pour quelle raison le sang est-il rouge ? Il y a plus de 400 ans, ce type de questions occupait exclusivement les grands esprits de l'époque, comme les métaphysiciens. De nos jours, grâce à la chimie moderne, tout le monde sait désormais que le monde rouge et le monde vert dérivent tous deux d'une seule et unique famille de pigments ayant comme base un macrocycle constitué d'atomes de carbone et d'azote. Les exemples les plus connus de ce type de macromolécules sont les porphyrines contenant un atome de fer (hème ou hémoglobine) et les porphyrines réduites (chlorines) contenant un atome de magnésium trouvées dans la chlorophylle, le pigment responsable de la couleur verte des plantes. Sans les porphyrines (Figure No.1) et leurs dérivés, la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui n'aurait pas été possible.

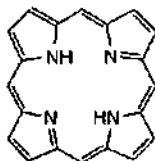


Figure No.1 : Le macrocycle porphyrinique non-substitué (appelé également porphine)

Les plantes se servent de la chlorophylle pour collecter l'énergie photonique émise par le soleil; cette énergie permet la conversion du dioxyde de carbone et de l'eau en hydrates de carbone. Ce processus photosynthétique est vital dans l'écosystème du monde vivant, car les plantes ont besoin des hydrates de carbones pour croître, des animaux se nourrissent avec ces plantes, puis d'autres animaux mangent ces animaux, etc. Plus simplement, on pourrait écrire : pas de chlorophylle, pas de photosynthèse, pas de vie (exception faite de certaines bactéries qui tirent leur énergie vitale de sources chimiques uniquement).

De la même manière, sans la présence d'hème dans l'hémoglobine, les grands vertébrés n'auraient pu évoluer puisqu'ils n'auraient pas eu les moyens de transporter rapidement de l'oxygène à travers leurs organismes complexes. Leurs cellules, en manque d'oxygène et d'énergie, n'auraient pas été en mesure de se développer. En d'autres termes, où il y a de la vie, il y a les "pigments de la vie".

Un fait remarquable est que, où il y a eu la vie, les restes fossiles de ces mêmes pigments sont toujours présents. Dans les profondeurs terrestres, les processus géologiques qui ont permis une conversion graduelle des plantes mortes et de la matière animale en carburants fossiles, en charbon et en huiles, ont en effet également transformé la chlorophylle verte en

pétroporphyrines rouges. De nos jours, les géologistes se servent de ces dérivés comme marqueurs chimiques dans leurs découvertes de nouvelles huiles [2].

Un autre point soulignant notre complète dépendance de ces pigments est que les dysfonctionnements appelés porphyries affectent ceux et celles caractérisés par un mauvais métabolisme porphyrique. Ces dysfonctionnements peuvent avoir comme conséquence une sensibilité accrue à la lumière, voire la démence. La légende prétend également que les vampires auraient pu souffrir d'une forme de porphyrie ...

D'autre part, les porphyrines sont employées dans la recherche de nouvelles sources d'énergie et dans des essais en vue de trouver des nouvelles thérapies pour les cancers. La grande capacité d'absorption des porphyrines et de leurs dérivés peut être exploitée pour piéger l'énergie solaire. Cette sensibilité à la lumière est également susceptible de rendre les porphyrines plus précises que les rayons X dans la destruction de cellules tumorales.

De la même manière, les porphyrines pourraient prochainement participer à une révolution dans le monde électronique, où des ordinateurs moléculaires basés sur les atomes de carbone (des milliers de fois plus petits et des millions de fois plus puissants) remplaceraient les machines existantes [2].

En bref, le domaine des porphyrines touche clairement plusieurs disciplines, telles que la chimie, la biochimie, la médecine, l'ingénierie chimique, la paléocécologie, l'énergie alternative et la micro-électronique.

## **Le rôle des porphyrines**

Une particularité intéressante des porphyrines est le fait que de petites variations au niveau de la structure du macrocycle tétrapyrrolique sont en mesure de générer une grande diversité dans leurs fonctions biochimiques (Figure No.2).

Au premier coup d'oeil, il peut sembler illusoire de penser que l'hème et la chlorophylle sont deux composés de la même famille. Toutefois, tous deux partagent la même voie biosynthétique jusqu'à un certain point, et c'est uniquement dans les étapes finales que leurs biosynthèses respectives sont différentes. Même la vitamine B<sub>12</sub>, macrocycle basé sur le chromophore corrine, peut être considérée, dans ce contexte, comme apparentée [3].

La fonction principale des porphyrines et de leurs dérivés dans la Nature est de se lier à des atomes métalliques qui agissent en tant que centres pour un grand nombre d'actions biochimiques. Ainsi, la PpIX de l'hème complexe le fer qui se lie de manière réversible à

l'oxygène et qui peut ainsi être transporté à travers le corps (hémoglobine) ou stocké au sein du tissu musculaire (myoglobine).

Dans le coenzyme de la vitamine B<sub>12</sub> (unique composé organométallique naturel), la Nature se sert du complexe de cobalt pour induire des réactions radicalaires, telles que réduction et migration. La carence en cette vitamine conduit à l'anémie pernicieuse, maladie reflétant une pénurie de globules rouges qui, durant leur développement, sont transformés en mégalo blasts, au lieu d'incorporer l'hémoglobine. Un deuxième symptôme observé est la détérioration du système nerveux central. Cette carence n'est que rarement due à une mauvaise alimentation mais généralement la conséquence d'une absorption imparfaite de la vitamine par l'intestin.

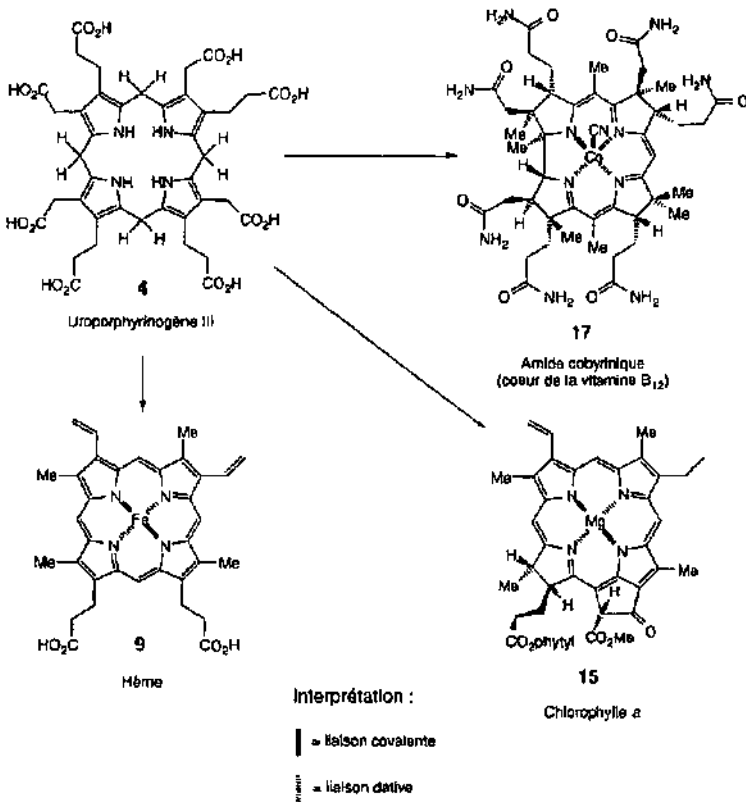


Figure No.2 : Liens de parenté entre l'hème, la chlorophylle a et le cœur de la vitamine B<sub>12</sub>. Tous trois partagent un précurseur biosynthétique commun : l'Uroporphyrinogène III

## La photosynthèse

Comme il l'a été expliqué plus haut, la vie telle que nous la connaissons serait impossible sans la photosynthèse. Au sein de la chlorophylle, le métal lié est le magnésium. Dans ce cas, le rôle du macrocycle est de capturer les photons de la lumière dans la région de l'ultraviolet proche (400 nm) et dans la région rouge (650-700 nm) du spectre visible. En fait, au sein du macrocycle porphyrinique réduit de la chlorophylle, le système conjugué de double-liaisons est idéal pour ce genre de fonction, alors que les substituants fixés sur ce même macrocycle permettent de régler ses capacités d'absorption de lumière et de transfert d'électrons.

En fait, les molécules de chlorophylle ne fonctionnent pas de manière isolée. Elles s'arrangent en effet plutôt en séries de 2 à 300 molécules pour former des antennes minuscules capables de récolter de grosses quantités de photons en peu de temps et de les diriger sur une "paire spéciale" de molécules de chlorophylle. Là, l'énergie des photons est piégée sous la forme d'électrons excités qui sont transportés via une série de chlorophylles et quinones incorporées dans les protéines du photocentre. De cette manière, un potentiel est généré à travers la membrane, et ce potentiel permet la conversion du dioxyde de carbone en hydrates de carbone.

Parallèlement, l'oxygène de l'eau est oxydé en oxygène moléculaire. Afin d'utiliser une quantité maximale de lumière, les chlorophylles sont réunies en antennes qui rassemblent les photons et qui les conduisent au photocentre pour assurer une oxydation, sans la génération d'une grosse quantité d'intermédiaires dangereux (comme les peroxydes et les superoxydes) susceptibles de causer des dommages irréversibles aux biomolécules et aux membranes.

## L'hémoglobine et les hémoprotéines

Le métabolisme cellulaire est en fait une succession de réactions d'oxydation couplées, qui débute avec des substrats hauts en énergie (par ex. les hydrates de carbone) et qui se termine avec la formation de dioxyde de carbone. Une série d'enzymes redox est utilisée pour accomplir graduellement l'oxydation totale des substrats, tout en créant au cours du processus des molécules de haute énergie utiles pour la cellule, telles que l'adénosine triphosphate (ATP) et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP).

A la fin de ce processus, c'est-à-dire quand toute l'énergie utilisable a été pompée des électrons, ces derniers sont transportés en dehors de la cellule par des molécules d'oxygène (quatre électrons par molécules d'oxygène), qui, après avoir récupéré chacune quatre protons, sont elles converties en molécule d'eau. L'oxygène, en fait, élimine une partie des "cendres" causées par la "combustion" des hydrates de carbone.

Il est par conséquent dans l'intérêt des organismes vivants avancés de recevoir de l'oxygène à différents niveaux aussi rapidement et efficacement que possible (les petits organismes unicellulaires ne requièrent pas de système transporteur d'O<sub>2</sub> puisqu'ils profitent du phénomène de diffusion), d'être en mesure de stocker cet O<sub>2</sub> (en particulier au sein des cellules musculaires), mais aussi d'être en mesure d'éliminer l'autre composant principal de ces "cendres" métaboliques : le dioxyde de carbone. Ces différentes fonctions sont assurées dans notre corps par l'hémoglobine et la myoglobine, respectivement transporteur et "stockeur" d'oxygène.

L'hémoglobine transporte donc l'oxygène à partir de sa source au sein de l'organisme, c'est-à-dire des poumons, de la peau jusqu'à l'endroit où il en est fait usage, les muscles principalement. L'hémoglobine se charge également d'éliminer le dioxyde de carbone en le transportant aux endroits où il est facilement expulsé. L'oxygène est en fait transféré à la myoglobine où il y est stocké et prêt à être métabolisé. Le métabolisme, lui, met en jeu une série d'hémoprotéines (protéines contenant de l'hème, de la PpIX liée à du fer ou à un de ses dérivés) appelées cytochromes qui sont caractérisées par un potentiel redox réglé de manière à ce que le flux électronique permette, à la fin du processus, de générer l'oxygène moléculaire. Le point intéressant à souligner ici est que les différentes hémoprotéines, hémoglobine, myoglobine et cytochromes sont toutes caractérisées par un groupe prosthétic similaire, basé sur l'hème 9. Le mode de fonctionnement de ce groupe, que ce soit le transport d'oxygène, le stockage ou le transfert électronique est en fait réglé par les substituants se trouvant autour du système porphyrine et par les autres ligands liés à l'atome de fer central.

Il est encore important de noter qu'il existe d'autres types d'hémoprotéines, comme les dismutases, les peroxydases et les catalases, qui protègent notre corps contre les ravages pouvant être causés par l'oxygène. Des hémoprotéines sont également impliquées dans la régulation des gènes, le métabolisme du fer, ainsi que dans la synthèse des hormones. C'est une des explications à la fameuse devise : où il y a de la vie, il y a les porphyrines.

## L'origine des porphyrines

Certains acides aminés, en plus de leur fonction majeure en tant qu'élément de base pour la construction de protéines, sont des précurseurs essentiels d'une variété de biomolécules importantes telles que les nucléotides (coenzymes nucléotidiques, l'hème, divers hormones et neurotransmetteurs, ou le glutathione).

Par exemple, l'acide 5-aminolévulinique (ALA) 1, le précurseur universel de tous les tétrapyrroles, peut être produit par l'intermédiaire d'un ou de deux chemins biosynthétiques (nommés chemins C<sub>4</sub> et C<sub>5</sub>), alors que les étapes de la voie amenant de ALA au premier

tetrapyrrole cyclique, l'Uroporphyrinogène III (Uro'gen III) 4, sont identiques dans tous les organismes étudiés jusqu'à maintenant.

Ainsi, la voie biosynthétique des tetrapyrroles peut être représentée par un arbre, caractérisé par un système dichotomique de racines constituées des premières étapes conduisant à la production de ALA, par un tronc représentant les étapes communes de la biosynthèse tetrapyrrolique au sein de tous les organismes, et par un dais formé par les étapes conduisant aux produits finaux uniques de la voie biosynthétique (Figure No.3).

Au sein de ce dais, il y a tout d'abord les corrinoides (vitamine B<sub>12</sub> 17), qui contiennent un ion cobalt au sein du macrocycle, et le sirohème, qui est le groupe prosthétique caractérisant les réductases de nitrites ou sulfites. A noter que ces entités dérivent d'une première ramification du tronc principal au niveau de l'Uro'gen III 4. Les chlorophylles, quant à elles, représentent les produits d'une deuxième ramification principale débutant avec la chélation d'un ion magnésium à l'intérieur du macrocycle tetrapyrrolique, alors que les différents hèmes représentent les produits d'une troisième ramification débutant par la chélation d'un ion fer à l'intérieur du même macrocycle.

A noter encore que les phycobillines et que le phytochrome (chromophore du pigment photomorphogénétique), tous deux des structures linéaires secondaires, représentent également des produits de la "ramification-hème".

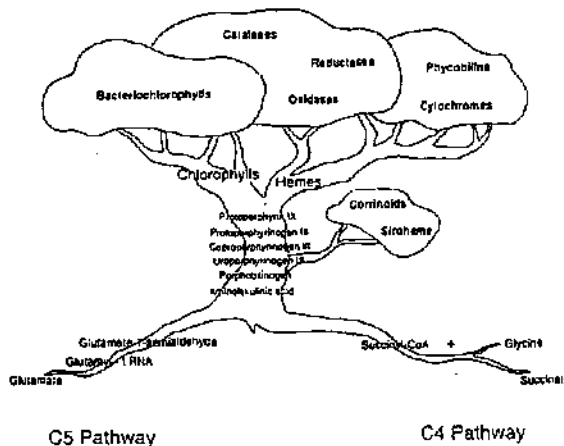


Figure No.3 : La biosynthèse des tetrapyrroles : une voie à la fois convergente et divergente

## La porphobilinogène synthase : une énigme mécanistique

La *Porphobilinogène synthase* (PBGS, EC 4.2.1.24) est le second enzyme intervenant dans la biosynthèse des pigments de la vie [4] et il catalyse la formation de porphobilinogène (PBG) 2 à partir de deux molécules d'acide 5-aminolévulinique (ALA) 1 [5]. PBG est transformé à l'aide de deux autres enzymes en Uro'gène III 4, qui est le dernier précurseur commun dans tous les organismes.

Malgré des études approfondies sur des PBGS issues de diverses sources, le mécanisme exact de la formation du PBG n'est pas encore définitivement éclairci. Différents postulats ont été proposés pour cette condensation similaire à une condensation de Knorr [6]. Le mécanisme de cette réaction catalysée enzymatiquement doit permettre d'expliquer les points communs entre la condensation chimique et la transformation biochimique. La différence existant entre la réactivité et la biosynthèse représente également un point important dans la considération des pigments de la vie comme des composés prébiotiques [7].

Dans la première proposition, Shemin a postulé la formation d'une liaison C-C via une réaction du type aldolique en tant qu'étape centrale du mécanisme biosynthétique [8,9]. La réaction aldolique génère un intermédiaire qui relie les deux aminolévulinates pour la première fois ensemble. En se basant sur ce mécanisme, une synthèse biomimétique a pu être effectuée dans notre groupe [10] avec un rendement satisfaisant. Dans cette séquence, la connexion des deux analogues de ALA se fait tout d'abord grâce à la formation d'une liaison C-C via une réaction aldolique. L'intermédiaire formé cyclise alors spontanément pour former le pyrrole désiré avec tous les substituants à la bonne place.

Quelques années plus tard, Jordan a postulé la formation d'une liaison C-N en tant qu'étape initiale pour relier les deux substrats [1]. Dans le même travail, il a également proposé une alternative mécanistique qui se rapproche du postulat de Shemin. Or, aucun mécanisme n'a pu être prouvé jusqu'à aujourd'hui. Le manque d'information structurale solide ne permet pas de privilégier une solution parmi les propositions mécanistiques émises jusqu'à maintenant.

Depuis plusieurs années, notre groupe s'intéresse au mécanisme d'action de la PBGS à travers des études systématiques d'inhibition [11-15]. Afin de tester les sites de reconnaissance de la PBGS issue de *E. coli* et *R. spheroides*, des séries d'analogues du substrat, du produit et des intermédiaires postulés ont été synthétisées et leur potentiel d'inhibition déterminés. Le but de ces études est de contribuer à la connaissance du site actif de l'enzyme, d'élucider des mécanismes possibles pour la formation et d'analyser les différences caractérisant les enzymes issus de diverses sources.

## BUT DU TRAVAIL

Dans le cadre des études systématiques d'inhibition de PBGS, nous nous intéressons à la synthèse d'une série d'analogues d'un des intermédiaires postulés par Jordan. Notre stratégie consistera à nous baser sur la structure du substrat ALA et à introduire une chaîne peptidique au niveau de son *N*-terminal (Figure No.4).

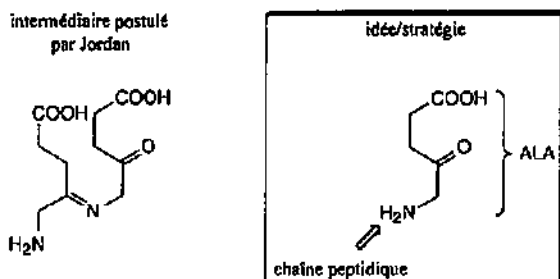
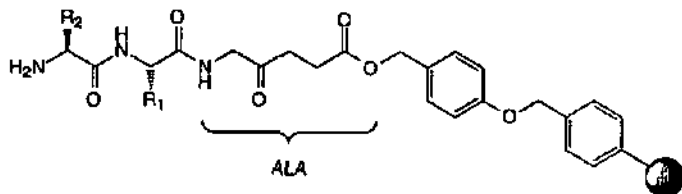


Figure No.4 : Illustration de la stratégie suivie pour la synthèse d'analogues de l'intermédiaire postulé par Jordan

L'intérêt de travailler avec des peptides dans cette approche réside principalement dans la possibilité d'envisager rapidement la construction d'une série de bibliothèques combinatoires de composés, en se servant des connaissances acquises à l'occasion d'un stage de cinq mois chez CIBA-GEIGY A.G. (Département de diversité moléculaire, Laboratoires de M. H. Rink) dans le domaine de la synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) (Figure No.5). De cette manière, en combinant cette idée avec les indications apportées par des études d'inhibition précédentes [13,15], la stratégie à suivre sur le support solide deviendrait la suivante :



Linker de type WANG  
Résine du type polystyrène

Conditions employées en SPPS :

20% pipéridine dans DMA pour la déprotection Fmoc  
DIC / HOBt pour la C-activation des unités synthétiques  
Stratégie de double-couplage  
DMA et Isopropanol pour les étapes de rinçage  
DMA / Pyridine / Anhydride acétique 8:1:1 pour l'étape de quiffage  
TFA(aq) 95% pour le clivage du support solide

Figure No.5 : Stratégie employée en SPPS pour la construction de bibliothèques combinatoires

Les conditions pour la synthèse sur phase solide sont celles employées traditionnellement pour la construction de bibliothèques de peptides en chimie combinatoire. Le dérivé peptidique synthétisé pourra ensuite être séparé du support solide et être testé en solution, afin de déterminer son potentiel d'inhibition.

Cependant, avant de se lancer dans une synthèse sur phase solide, il sera tout d'abord nécessaire de procéder à une étude de réactivité de ALA au niveau de la chimie peptidique en solution en déterminant les réactifs les plus efficaces ainsi que les conditions réactionnelles optimales, de manière à savoir s'il sera vraiment utile et possible de se concentrer sur une approche combinatoire.

Dans un autre contexte, la voie conduisant à la biosynthèse des tetrapyrroles à partir de ALA peut être exploitée dans une nouvelle technique en oncologie : la thérapie photodynamique ou PDT, qui combine l'emploi d'une substance photosensibilisatrice (notamment la protoporphyrine IX ou PpIX) et de la lumière pour provoquer la destruction sélective des tissus tumoraux.

Dans le cadre d'une collaboration récente établie avec le Département de Génie rural de l'EPFL (MM. N. Lange et M. Zellweger) et avec l'Institut de Pathologie du CHUV (Mme. L. Juillerat), il serait donc très intéressant d'étudier l'utilisation des dérivés peptidiques de ALA dans la technique PDT et de déterminer leur efficacité en tant que précurseurs potentiels de la PpIX.

Du point de vue pratique, cela représentera, dans un premier temps, une série d'études de déprotection et d'hydrolyse enzymatique sur les dérivés de ALA, nous permettant ainsi de définir l'influence des chaînes latérales et de la nature des terminaisons peptidiques. Ensuite, des études de fluorescence sur trois types de lignées de cellules particulières à l'aide de certains dérivés de ALA nous donneront des indications précieuses sur la structure potentielle optimale pour une éventuelle utilisation dans la technique PDT.

---

# PARTIE THEORIQUE

## 1. La chimie combinatoire dans la recherche pharmacologique

Le but principal de la recherche pharmacologique est de trouver un médicament pour résoudre un problème. Deux approches différentes ont été développées dans ce sens. La première approche est représentée par un "drug design" que l'on caractérise de rationnel. En fait, grâce aux connaissances acquises en biochimie et dans le domaine de la génétique, le chercheur peut déterminer la protéine sur laquelle agir ; il est donc en mesure de l'isoler et d'analyser sa structure de manière suffisamment précise pour pouvoir caractériser son site actif. Ainsi, le chercheur peut prédire les propriétés physiques et chimiques du médicament qu'il a à développer. Ce concept de "drug design" rationnel permet donc de se lancer dans une recherche avec une idée relativement précise de la constitution de la molécule à synthétiser. Un désavantage de cette approche est certainement la durée de cette analyse, raison pour laquelle cette dernière décennie a vu naître une alternative plus rapide.

Dans cette nouvelle approche, appelée "irrational drug design", le chercheur ne s'intéresse qu'à la forme grossière du récepteur, sans besoin d'analyses détaillées. Une fois la protéine définie grossièrement, des techniques innovatrices permettront de synthétiser une grande diversité de structures susceptibles d'être pharmacologiquement actives. Ensuite, à l'image d'un cambrioleur se trouvant face à un coffre-fort à combinaisons multiples, la prochaine étape consistera à tester toutes les structures, sans exception. C'est la raison principale pour laquelle cette approche est appelée chimie combinatoire.

En fait, une fois la structure grossière du récepteur déterminée, le travail du chercheur consiste tout d'abord à synthétiser une grande diversité de molécules, puis à les tester, soit individuellement les unes après les autres, soit toutes simultanément afin de déterminer la ou les structures les plus actives.

### 1.1. Historique

Le domaine de la chimie combinatoire trouve ses racines dans la chimie des acides nucléiques et des biooligomères peptidiques. Dans la nature en effet, la recombinaison de sous-unités moléculaires est à la base des systèmes immunitaires et des mécanismes d'évolution. La synthèse chimique d'oligodeoxynucléotides était alors déjà si perfectionnée que les fragments artificiels de gène ne représentaient plus aucun obstacle dans le contrôle de mutations génétiques [16]. Des méthodes fiables pour la synthèse de peptides ont été développées même

avant que l'on arrive à un tel degré avec les oligonucléotides. C'est pourquoi les premières bibliothèques de peptides ont été préparées en premier, par simple synthèse de séquences-cible [16].

Le principe de la "split synthesis" d'autre part, appliqué dans un premier temps aux bibliothèques de peptides, peut être considéré comme une révolution conceptuelle. La méthode a été formulée [17] et présentée par le chercheur hongrois Arpad Furka [18], qui réalisa qu'une stratégie pour une synthèse combinatoire contrôlée pouvait être conçue à partir de moyens modestes. Des publications présentées dans le même numéro de *Nature* [19,20] présentaient des méthodologies combinatoires affinées permettant une identification rapide de structures actives à partir des bibliothèques de peptides. A partir de là, il était clair que la chimie combinatoire allait s'étendre à d'autres domaines de la chimie organique. A priori, il n'y a effectivement aucune raison de se limiter à des structures oligomériques ayant comme base les acides aminés naturels ou des nucléotides.

En fait, n'importe quelle séquence de modifications structurales (couplages, dérivatisations, etc.) se prête en principe à une approche combinatoire, à condition que la chimie impliquée soit applicable et mutuellement compatible. Ces conditions, ainsi que le besoin de rendements élevés évitant le passage par des étapes de purifications longues, sont de bonnes raisons pour que le développement de bibliothèques de petites molécules non-peptidiques représente un défi à ne pas sous-estimer. Un premier pas dans cette direction a été effectué par Ellman [21], avec la synthèse d'une bibliothèque de benzodiazépines sur phase solide.

## 1.2. Principes de base

La découverte de nouvelles structures potentiellement intéressantes est un défi permanent. Habituellement, la source principale de composés biologiquement actifs est représentée par la famille des produits naturels isolés de plantes, des animaux ou des sources de fermentation. Toutefois, malgré la grande diversité structurale des produits naturels, la détermination de l'activité d'une cible spécifique s'avère souvent difficile. Les groupes pharmaceutiques se sont longtemps servis de leurs larges collections de substances comme sources de nouvelles structures présentant une activité biologique; d'autre part, des méthodes automatiques développées pour un screening rapide ont permis de tester des milliers de substances par semaine. Un défaut de cette approche est que la diversité caractérisant ces collections de composés est limitée par le nombre de structures étudiées précédemment par la société.

De cette manière, la recherche pharmacologique a atteint un niveau, où toujours plus de récepteurs et d'enzymes sont identifiés en tant que cibles thérapeutiques, mais où les chercheurs sont contraints de sélectionner des candidats parmi des extraits de produits naturels ou parmi des collections vétustes de composés, pour finalement trouver une trace

d'affinité et lancer de nouveaux programmes synthétiques. Dans cette situation plutôt frustrante, l'attrait d'une bibliothèque de substances, construite de manière à simplifier ce processus de recherche, est évident.

La découverte de structures potentiellement intéressantes est premièrement un processus empirique. Initialement en effet, le but final n'est pas de développer un composé actif. C'est en fait plutôt le nombre et la variété des structures qu'offrent les bibliothèques de substances qui représentent leur intérêt. Souvent, n'importe quelle prédiction structurale à propos de ce qui devrait présenter une affinité pour la protéine-cible est généralement ignorée en faveur de la découverte rapide d'une nouvelle structure intéressante. Cela ne signifie cependant pas qu'il n'y a pas de place pour un design rationnel en chimie combinatoire. Au contraire, une idée de la structure du récepteur ou de l'enzyme, bien que limitée, peut être considérée, de manière à construire une bibliothèque de composés d'un type structural bien défini. Dans un cas extrême, la connaissance de la structure d'un composé potentiellement intéressant est en mesure de permettre la construction d'une bibliothèque constituée d'analogues directs de cette structure. Dans ce cas, la synthèse combinatoire est utilisée dans le processus d'optimisation, et non de découverte de nouvelles structures potentiellement intéressantes.

Le but de la synthèse combinatoire est de produire simultanément une grande diversité de molécules avec une structure bien définie. Ce principe est basé sur le fait que la Nature a été en mesure d'obtenir avec succès, à partir de quelques unités synthétiques (comme les vingt acides aminés par exemple), un grand nombre de produits avec des fonctions diverses (les peptides) grâce aux principes combinatoires. Par exemple, la combinaison de tous les acides aminés naturels pour donner tous les hexapeptides possibles amène au chiffre impressionnant de  $20^6 = 64'000'000$  de substances !

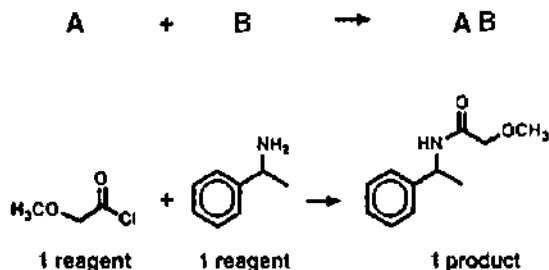


Figure No.6 : La synthèse organique conventionnelle

La chimie combinatoire est basée sur le principe simple, mais révolutionnaire suivant : au lieu de lier les réactifs A et B pour former le produit univoque AB (Figure No.6), diverses unités synthétiques du type A ( $A_1 - A_{10}$ ) sont traitées avec diverses unités synthétiques du type B ( $B_1 - B_{10}$ ) selon des principes combinatoires; en fait, chaque substance réagit avec l'autre

réactif (Figure No.7). Cet ensemble de réactions peut avoir lieu simultanément dans un mélange, ou chaque réaction peut se dérouler séparément dans un récipient.

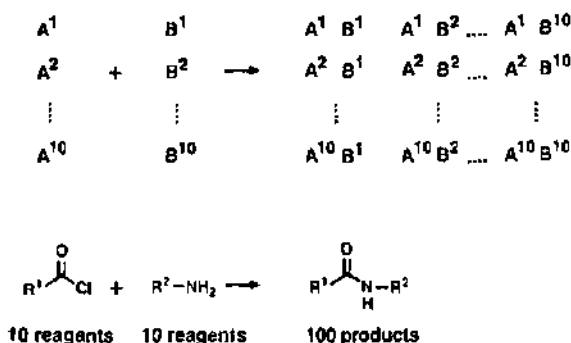


Figure No 7 : La synthèse organique combinatoire

Dans l'exemple ci-dessus, dix réactifs du type A et dix réactifs du type B conduisent à cent produits, suite à une réaction combinatoire. Si ce principe est appliqué aux synthèses en plusieurs étapes, qui sont fréquentes en recherche pharmacologique, on obtient rapidement un nombre considérable de produits à partir de quelques unités synthétiques. La collection de tous les composés produits dans une synthèse combinatoire est appelée bibliothèque. Pour le cas de synthèses en plusieurs étapes, la taille d'une telle bibliothèque, qui correspond au nombre total de toutes les substances synthétisées, est déterminée par le nombre de réactifs ou d'unités synthétiques utilisées par réaction (relation linéaire) et par le nombre d'étapes réactionnelles (relation exponentielle).

### 1.3. Des bibliothèques de peptides ...

Le fait que des bibliothèques de composés puissent être créées par synthèse combinatoire a été reconnu pour la première fois au cours des années 80 par des chimistes spécialisés dans les peptides. Des pionniers comme Geysen [22,23] (méthode "multipin") et Houghton [24] (méthode des sachets de thé) ont ouvert la voie. Ils ont développé différentes méthodes pour la synthèse parallèle de peptides [25], basées sur les techniques de synthèse peptidique sur phase solide introduites par Merrifield [26]. Des progrès ont été apportés dans ce domaine, entre autres par Frank [27] ("spot synthesis") et par Fodor [28], qui ont permis une miniaturisation de la méthode. La synthèse combinatoire de peptides au sens strict a été introduite en faite par Furka [17,18,29,30], et ces travaux peuvent être considérés comme la "naissance" de la chimie combinatoire. Ils mettaient en jeu la soi-disant méthode "split synthesis" [20] ou méthode "divide-couple-and-recombine" [19], qui permet la synthèse

simple et efficace de bibliothèques de peptides de n'importe quelle taille [31], sous la forme de mélanges équimolaires bien définis.

#### 1.4. ... à celles de petites molécules organiques

Les peptides sont caractérisés, en tant que médicaments, par une faible biodisponibilité et par une facile dégradation protéolytique, ce qui les désavantage. En outre, la conversion d'une structure peptidique active en une structure non-peptidique est lente et compliquée. Pour ces différentes raisons, la recherche en chimie combinatoire, ces dernières années, s'est concentrée sur le développement de bibliothèques de petites molécules organiques [32-36], dynamisant ainsi ce domaine de recherche. En effet, il y a cinq ans, seules certaines sociétés pionnières et certains groupes académiques étaient impliqués en synthèse combinatoire, alors que de nos jours, la plupart des grands groupes industriels et académiques s'intéressent à ce domaine.

### 1.5. Conception, méthodes et techniques de la chimie combinatoire

#### 1.5.1. La conception

Différents aspects doivent être considérés au moment de la conception d'une synthèse combinatoire :

- Nécessité d'avoir une séquence, durant laquelle le maximum de réactions permettent la formation de liaisons (C-C ou C-hétéroatome). La molécule-cible est ainsi formée par des réactions successives d'unités synthétiques.
- Les unités synthétiques nécessaires pour ces réactions de "construction" doivent être disponibles au sein de diverses collections.
- Le défi le plus important est représenté par la chimie : la formation d'une nouvelle liaison doit se faire indépendamment de la structure déjà synthétisée et de l'unité synthétique à ajouter; le produit désiré doit par conséquent être obtenu avec un bon rendement et une haute sélectivité. Cela représente évidemment le cas idéal; un des buts à atteindre en chimie combinatoire est d'identifier les séquences réactionnelles permettant une diversité maximale au sein des unités synthétiques.
- Les produits devraient être aussi diversifiés que possible. Cela signifie que des groupes fonctionnels en mesure de participer à des interactions non-covalentes (interactions

hydrophobes et ioniques, ponts-H) avec une molécule-cible devraient être substitués dans le plus de configurations possibles.

- Enfin, les conditions réactionnelles, aussi bien pour les réactions individuelles que pour la séquence entière, devraient être compatibles avec une automatisation.

La synthèse de peptides remplit toutes ces conditions. Il n'y a qu'un seul type de réaction de couplage qui est répété, à savoir la formation d'une amide à partir d'une espèce acyle activée et d'une amine.

Pour la synthèse de petites molécules organiques, le champ d'application de chaque réaction d'une séquence choisie doit être étudié de manière individuelle. Le but est d'étendre le champ d'application par un choix subtil des conditions réactionnelles ou d'identifier les conditions adéquates pour une collection particulière de différentes unités synthétiques. En connaissant exactement la portée et les limites de chaque pas synthétique individuel d'une séquence donnée, il est possible de faire un bon choix au niveau des unités synthétiques et ainsi de procéder à une synthèse de bibliothèques concluante.

Finalement, il reste à traiter la question de la stratégie pour une synthèse combinatoire efficace (Figure No.8). Dans le cas de la synthèse de peptides, il y a liaison entre des unités monomériques doublement fonctionnalisées (A); c'est le cas de la synthèse d'oligomères également. En revanche, plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour la synthèse de petites molécules organiques non-oligomériques. Par exemple, il est possible de partir d'un modèle déjà équipé avec différents groupes fonctionnels. Diverses unités synthétiques peuvent alors être attachées à ces groupes, soit à travers une ou une série d'étapes (B). Alternativement, il peut être fait usage de réactions permettant d'introduire une nouvelle fonctionnalité dans le produit, sur laquelle la prochaine étape réactionnelle (C) s'opère.

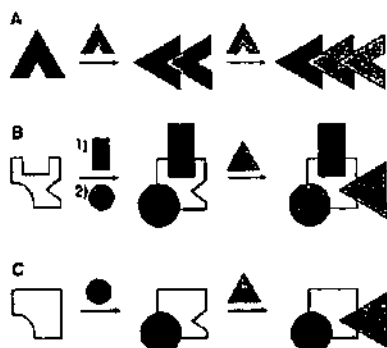


Figure No.8 : Stratégies en chimie combinatoire

Les réactions à plusieurs composants représentent un exemple extrême de cette stratégie, dans laquelle des intermédiaires réactionnels participent directement à d'autres réactions à des conditions stables.

Si l'on considère que le nombre de composés organiques possibles possédant un poids moléculaire inférieur à 750 est estimé à  $10^{200}$  [37], on peut facilement comprendre qu'il serait impossible, malgré le potentiel énorme de la synthèse combinatoire, de synthétiser et de tester tous les composés potentiellement actifs. Même dans le cas d'une synthèse combinatoire parfaite caractérisée par une chimie permettant la synthèse de bibliothèques de n'importe quelle taille, il est nécessaire de procéder à une sélection des unités synthétiques à employer et des produits à faire.

Les bibliothèques de substances sont généralement synthétisées avec l'optique d'un test biologique subséquent. La probabilité de trouver des composés actifs dans une bibliothèque augmente avec la diversité et la disparité des composants de la bibliothèque. Les substances à tester doivent par conséquent être aussi différentes que possible, en fonction du système permettant ce test; la diversité est en fait dépendante de la structure du site moléculaire de l'interaction. Exprimer la diversité en fonction du site d'action biologique semble attrayant mais n'est pas applicable en pratique. La structure du site d'action est souvent inconnue, en particulier lors de la recherche de nouvelles molécules potentiellement intéressantes, et une bibliothèque de substances devrait être testée sur plusieurs cibles. Il est donc plus utile, lorsqu'on envisage une bibliothèque combinatoire de substances, de procéder à une définition abstraite de la diversité sur une échelle absolue.

Ainsi, dès maintenant, une collection de composés sera définie comme variée, si des groupes fonctionnels en mesure de provoquer des interactions non-covalentes avec un récepteur sont disponibles dans autant de configurations que possible. La méthode de Martin est basée sur cette définition de la diversité [38].

Une bibliothèque permettant la découverte de nouvelles structures intéressantes devrait être composée d'un grand nombre de petites molécules organiques possédant un haut degré de diversité ("random library"). En revanche, si une structure connue doit être optimisée, ou si l'information à propos du site d'action est disponible, la bibliothèque doit être comparativement caractérisée par une petite diversité ("focused or biased library") [39,40].

Une bibliothèque peut contenir des mélanges de basse ou haute complexité ou des composés individuels distincts. La décision quant à utiliser un format particulier, c'est-à-dire tester soit des composés séparés soit des mélanges de substances, influence leur synthèse et la procédure à suivre pour le test biologique. Si des mélanges sont considérés, plus de substances peuvent être synthétisées et testées par unité de temps. En revanche, la synthèse doit produire tous les composés dans le mélange à des concentrations approximativement identiques. Des

problèmes sont rencontrés dans les tests de mélanges, avec des "faux" positifs et négatifs: mais il est généralement admis que l'on puisse oublier une des substances actives durant le screening puisque, grâce au grand nombre de substances testées, un nombre suffisant de substances intéressantes sera toujours détecté [41]. Cela se justifie autant longtemps qu'aucune étude à propos des relations structure-activité n'est envisagée. Le temps épargné grâce au travail avec des mélanges peut toutefois être partiellement ou entièrement perdu à cause de l'effort nécessaire pour la "deconvolution", c'est-à-dire la nouvelle synthèse de sous-bibliothèques moins complexes ou de substances individuelles, cela dans le cas où les composants actifs ne peuvent être identifiés que par ce biais-là.

Puisqu'une bibliothèque de substances sera employée idéalement dans plusieurs tests, il est statistiquement possible que chaque mélange de substances donnera tôt au tard un résultat positif au test et qu'il sera donc décomposé en ses constituants. Dans un vuc extrême, il serait donc raisonnable de se servir de substances individuelles dès le départ. Cependant, des bibliothèques de substances séparées ne sont pas susceptibles d'atteindre la taille désirée pour l'identification de structures potentiellement intéressantes. Des bibliothèques très grandes (> 10'000 composés) peuvent uniquement être produites en tant que mélanges.

L'expérience montre que l'optimisation de structures potentiellement intéressantes conduit à de nombreuses substances dotées d'une activité biologique. Dans ce cas, il est judicieux de se servir de bibliothèques de substances séparées dès le début, plutôt que de procéder par la suite à une "deconvolution" de mélanges. Ici, les unités synthétiques sont sélectionnées plus précisément et des bibliothèques plus petites (< 1000 composés) sont synthétisées.

Il est difficile de prédire aujourd'hui quelle stratégie générale va prévaloir dans le futur, puisque le choix du format dépendra toujours du problème particulier auquel on sera confronté. Une autre décision de base concerne l'étude de la bibliothèque de substances synthétisées dans les tests biologiques : les substances doivent-elles être testées en solution ou sur un support (puisqu'elles sont obtenues initialement en synthèse sur phase solide) ? La tendance générale penche vers des tests en solution, puisque les résultats ne sont pas influencés par des interactions non-désirées avec le support et, surtout, parce que les systèmes de tests connus jusqu'à aujourd'hui ont été développés en solution. Mais cette tendance ralentit peu à peu et de plus en plus de tests innovateurs sont développés sur phase solide.

### 1.5.2. Les méthodes et les techniques de la synthèse combinatoire

En principe, les synthèses combinatoires peuvent être effectuées aussi bien en solution que sur phase solide (Figure No.9). La synthèse de petites molécules organiques sur un support solide n'est pas aussi aisément optimisée que celle de peptides ou d'oligonucléotides. Par conséquent, l'effort à fournir pour développer ce type de synthèses est important. A noter

toutefois que la synthèse sur phase solide présente un certain nombre d'avantages par rapport à la synthèse en solution plus conventionnelle.

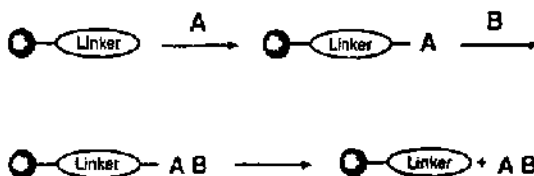


Figure No.9 : Principe de la synthèse sur phase solide. Sphère = support polymérique.

La réaction est en effet accélérée grâce à l'emploi d'un excès du partenaire réactionnel soluble, et une conversion complète peut aussi être atteinte. Les étapes complexes d'extraction et de purification sont remplacées par un simple rinçage du support à la fin de chaque étape réactionnelle. De cette manière, la synthèse sur phase solide permet d'envisager une automatisation de chaque opération, même dans le cas de synthèses à plusieurs étapes. Ce n'est donc pas surprenant de remarquer qu'un grand nombre de synthèses combinatoires de petites molécules organiques ont été opérées sur support solide ces dernières années. En fait, cela a conduit à la renaissance des synthèses sur phase solide de molécules organiques développées dans les années 70 et 80 (en particulier celles de Fréchet [42] et de Leznoff [43]).

En revanche, comme le montre le Tableau No.1, la synthèse combinatoire en solution présente divers avantages qui ne devraient pas être sous-estimés, surtout parce que les synthèses organiques en plusieurs étapes sur phase solide se trouvent actuellement encore au stade de débutant. La synthèse combinatoire en solution ne requiert effectivement aucune étape supplémentaire pour le couplage ou le clivage d'un support polymérique. La stabilité et la réactivité des linkers et des résines ne doivent pas être prises en compte pour faire un choix au niveau des conditions réactionnelles. Mais le plus gros avantage réside dans le fait qu'il n'est pas impératif d'adapter les conditions réactionnelles aux exigences imposées par la synthèse sur phase solide. En outre, des supports polymériques fonctionnalisés plutôt onéreux ne sont pas requis et une augmentation relativement simple des quantités est possible. Toutefois, le développement de concepts simples pour une purification automatique des produits bruts sera vital pour un développement ultérieur de la synthèse combinatoire en solution. Si des produits secondaires ou des réactifs en excès sont éliminés définitivement par ce biais-là, le nombre de réactions utiles va rapidement s'accroître. Pour cette raison, la synthèse combinatoire en solution est considérée surtout pour des réactions incluant une ou deux étapes. Pour le futur, le choix entre une synthèse sur phase solide ou en solution dépendra des besoins. On peut également imaginer de combiner des réactions sur phase solide et en solution au sein d'une séquence, comme l'a décrit récemment Armstrong [44].

**Tableau No.1** Comparaison des synthèses combinatoires sur phase solide et en solution

<b>Synthèse combinatoire</b>	
<b>Phase solide</b>	<b>Solution</b>
<b>Avantages</b>	
Les réactifs peuvent être utilisés en excès sans soucis de séparation par la suite, ainsi, les réactions sont en mesure d'atteindre l'achèvement.	Toutes les réactions organiques peuvent être en principe considérées.
Purification du produit par simple rinçage du support solide.	Aucune adaptation d'une réaction connue n'est requise.
Automatisation complète et facile des séquences réactionnelles.	Aucune étape supplémentaire nécessaire pour le couplage ou le clivage du support.
Possibilité de "split synthesis" ("un grain-un composé").	Des quantités illimitées de produit peuvent être synthétisées.
<b>Désavantages</b>	
Peu développée → temps nécessaire pour un développement plus approfondi.	Les réactifs ne peuvent être employés en excès sans qu'il n'y ait plus de travail au niveau de la purification finale.
Etapas supplémentaires pour le couplage et le clivage du support.	Automatisation de l'extraction et de la purification pas évidente.
Le support et le linker limite la chimie envisagée.	
Méthodes pour le contrôle analytique des réactions en voie de développement.	

Aussi bien les substances séparées que les mélanges définis peuvent être synthétisés selon les principes combinatoires. Les substances individuelles peuvent être obtenues par le biais des synthèses parallèles rapides ( $n$  substances synthétisées dans  $n$  récipients). Une réaction efficace et automatisée est la condition de base pour réaliser ce type de synthèses. La synthèse de mélanges définis requiert des conditions réactionnelles permettant d'obtenir un grand nombre de composés définis structurellement en quantités équimolaires, avec le moins

d'étapes réactionnelles possibles. De cette manière, des mélanges de réactifs pourraient être employés à chaque étape réactionnelle, afin que le maximum de produits de réaction soient formés simultanément dans le même récipient. C'est le mode opératoire usuel suivi pour la synthèse combinatoire de mélanges en solution.

En revanche, dans le cadre d'une synthèse sur phase solide, ce concept s'est avéré convaincant principalement dans le cas de synthèses de composés amides, pour la construction de bibliothèques de peptides [45,46] et pour la synthèse de nucléotides [47,48]. Bien que cette stratégie ait initialement été considérée pour la synthèse de petites molécules organiques [49], seuls des réactifs possédant la même réactivité furent employés.

Normalement, des différences importantes dans la réactivité doivent être prises en compte pour la construction d'importantes bibliothèques de petites molécules organiques. Cela signifie que certains produits de réactions sont susceptibles d'être formés en petites quantités, voire pas du tout. De telles conditions réactionnelles ne possèdent pas l'un des avantages principaux de la synthèse sur phase solide, à savoir que les réactifs peuvent être utilisés en excès pour amener la réaction à son terme.

Le problème des vitesses de réaction différentes est contourné élégamment par la "split synthesis" développée par Furka et al. [17,18], qui permet une synthèse efficace de mélanges équimolaires. Comme le montre la Figure No.10, le support solide est tout d'abord divisé, par exemple en trois parts égales, et chacune des trois parties aliquotes est traitée avec une unité synthétique de type A. Les résines produites sont alors mélangées puis redivisées pour donner trois mélanges, où les composants liés à la résine  $A^1$ ,  $A^2$  et  $A^3$  sont présents en quantités équimolaires. Ces derniers sont traités avec  $B^1$ ,  $B^2$  et  $B^3$ , étape qui conduit à neuf produits définis au total. Puisqu'il n'y a qu'un seul réactif en solution dans chaque récipient et qui, à chaque fois réagit avec un nombre réduit ou avec beaucoup de partenaires liés au polymère en fonction du plan de la synthèse, chaque réaction peut évoluer jusqu'à conversion complète, indépendamment des cinétiques différentes.

La répétition du cycle de division, réaction et mélange conduit, en peu de temps, à d'importantes bibliothèques de composés, au sein desquelles chaque substance est présente sur le même grain ("un grain - un composé" [20]). L'avantage clair est que 27 produits sont obtenus en 9 étapes réactionnelles et avec neuf unités synthétiques, alors que leurs synthèses en tant que composés individuels nécessiteraient 81 étapes réactionnelles. Tous les 8000 tripeptides obtenus à partir des 20 acides aminés naturels peuvent être synthétisés en 20 mélanges de 400 composés chacun par la même méthode, en employant 60 réactions de couplage uniquement. Ces tripeptides peuvent être considérés quasiment comme composés séparés, tant qu'ils sont couplés à la phase solide.

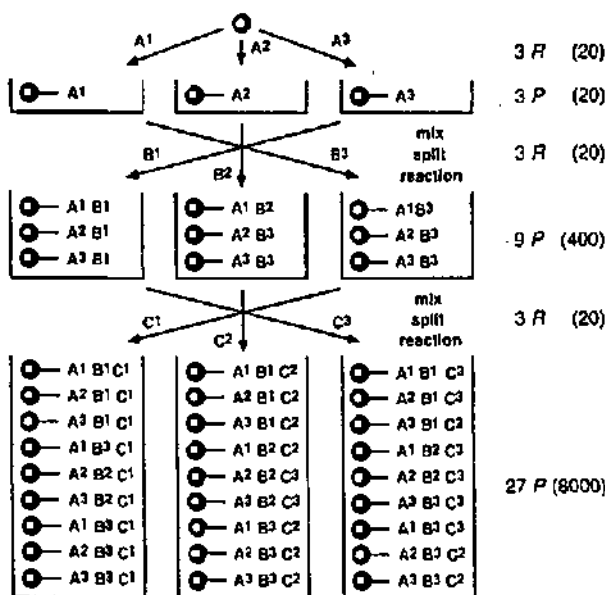


Figure No.10 : "Split synthesis". Sphère = support polymérique. *R* exprime le nombre de réactions réalisées en parallèle. *P* est le nombre de produits différents

Une approche intéressante en vue de minimiser le nombre de substances à synthétiser est représentée par l'emploi d'algorithmes génétiques [50]. Cette stratégie est employée généralement pour l'optimisation de systèmes à plusieurs paramètres et elle représente une bonne solution avec une haute probabilité. Grâce à l'emploi des opérations génétiques comme la réplique et la mutation, de nouvelles solutions sont déduites d'une collection de solutions de départ ayant amélioré leurs propriétés de génération en génération. En important cette idée dans la chimie combinatoire, le but est d'optimiser une caractéristique bien précise d'une substance désirée, telle que l'activité biologique, tout en gardant le nombre de substances à synthétiser et à tester le plus bas possible.

## 1.6. Caractérisation des bibliothèques combinatoires

Le mode de caractérisation des bibliothèques de substances dépend de leur format. Si des substances individuelles sont produites par le biais d'une synthèse parallèle, l'analyse est la même que pour des substances synthétisées de manière conventionnelle. La situation est similaire si une bibliothèque de composés est synthétisée par la "split synthesis". En effet, dans ce cas, chaque grain portant une seule et unique substance, l'analyse de telles

bibliothèques peut être réduite à l'analyse de substances individuelles, aussi longtemps qu'elles sont liées à la résine. Etant donné que la quantité de substance liée à une particule polymérique est de l'ordre de 100 pmol, les méthodes de spectrométrie de masse sont les méthodes de choix, même si de gros progrès ont été accomplis dernièrement dans le domaine de la spectroscopie IR [51] et RMN [52-54]. Le clivage de la liaison produit-linker peut être effectué à l'occasion d'une étape séparée avant la mesure, à l'aide d'acide trifluoroacétique ou par voie photochimique [55], ou directement au sein du spectromètre dans des conditions bien précises [56].

Dans le cas où les bibliothèques se trouvent être sous la forme de mélanges après le clivage du support, une caractérisation analytique fiable est difficile et devient même impossible avec une certaine complexité du mélange. Les premières études pour la caractérisation de ce type de bibliothèque (à l'aide de méthodes spectroscopiques) proviennent, ici aussi, du domaine des peptides [57,58].

En plus des méthodes directes pour la détermination structurale décrites ci-dessus, il existe également des méthodes indirectes, particulièrement adaptées au travail avec des mélanges produits par "split synthesis". Dans ce cas, la structure est déduite par déchiffrement d'un code généré en parallèle à la synthèse de la bibliothèque et qui représente un enregistrement des étapes synthétiques opérées.

## 1.7. La synthèse combinatoire en solution

Il existe en fait deux stratégies principales pour la synthèse combinatoire en solution. Certains groupes de recherche se servent d'approches impliquant la synthèse de mélanges de composés de complexité variable, alors que d'autres groupes se servent de la synthèse parallèle, qui conduit à moins de composés mais qui possède des avantages au moment de la caractérisation et de la détermination de l'activité biologique des substances individuelles. Les avantages et désavantages des deux stratégies ont déjà été discutés dans la partie 1.5.2.

### 1.7.1. La synthèse de mélanges de composés

La synthèse de mélanges non-désirés représente un grand problème en chimie classique, auquel chaque chercheur est confronté un jour. Cela justifie le scepticisme affiché face à la chimie combinatoire lorsque l'on parle de synthèse fortuite. Par exemple, le cas de la réaction de Maillard [59] et des travaux de Chen et Radmer peut être considéré comme un exemple de synthèse fortuite pour la création de diversité moléculaire [60]. Mais étant donné que les synthèses fortuites ne représentent qu'une minorité en chimie combinatoire, nous ne nous étendrons pas plus sur ce sujet dans le cadre de cette introduction.

Le type de synthèses combinatoires, où deux molécules provenant de seulement deux différentes classes de composés participent à une réaction définie ou une séquence de réactions (comme les chlorures d'acide avec les amines pour conduire aux amides) par étape réactionnelle, sont mieux caractérisées que les synthèses fortuites. Si des réactions séquentielles sont évitées, des produits secondaires non-désirés ne seront pas accumulés.

Toutefois, cet avantage est limité sévèrement par le nombre réduit de produits pouvant être obtenu, puisque seuls deux différents composants sont incorporés dans chaque molécule formée. Des exemples de ce type de synthèse ont été publiés par des groupes de recherche de l'Université de Duke aux États-Unis et par Glaxo en Grande-Bretagne [61,62]. Des exemples relatant des réactions en deux, voire trois étapes ont été publiés dernièrement, mais nous préférons passer directement au cas des synthèses "one-pot".

D'autres séquences de réactions en plusieurs étapes pour la production de bibliothèques de molécules ont été publiées par Rebek Jr. et al. [63,64]. Les réactions considérées se résument à la formation d'amides à partir d'amines et de chlorures d'acides, et à la réaction d'isocyanates avec des amines. Ils ont été en mesure de coupler simultanément quatre groupes différents à une architecture moléculaire centrale en une réaction et d'obtenir ainsi une grande diversité de composés.

Ce type de réaction "one-pot" permet aussi la production très rapide et efficace d'importants mélanges de substances, à partir de réactions connues en solution. Si les composants de cette réaction sont disponibles en formes structurales très différentes – ce qui est certainement le cas des amines – la restriction à un type de réaction ne signifie pas que les bibliothèques de composés en résultant seront caractérisées par une diversité moins importante. Ce qui est plus important est le fait que seules les réactions ayant lieu à partir de réactifs similaires peuvent être utilisées, et que cette méthode ne permet que la synthèse de mélanges.

Mais cette stratégie est devenue moins populaire avec la perte d'intérêt pour la synthèse d'importants mélanges. Rebek Jr. a également présenté une stratégie pour la détection de composés biologiquement actifs au sein d'une bibliothèque de substances [63], et l'a utilisée pour identifier un inhibiteur de la trypsine. La méthode de "deconvolution" employée dans ce cas est intéressante, dans le sens que ce n'est pas le mélange de composés les plus actifs qui détermine le choix des unités synthétiques; c'est plutôt les mélanges les moins actifs qui permettent de définir les critères pour l'exclusion de certaines molécules. Une restriction importante de ce procédé itératif est que ce ne sont pas nécessairement les composés les plus actifs qui sont identifiés. Rebek Jr. a cependant présenté une hypothèse plausible en se servant d'une simulation informatique, dans laquelle – même si les composés identifiés ne sont pas les plus actifs – un composé caractérisé plus actif ne serait pas omis [64]. De plus, les groupes fixés sur les composés actifs sont identifiés, vu qu'un seul composé actif peut difficilement être identifié au sein d'un mélange de dizaines de milliers de substances inactives.

Les réactions à multicomposants (ou réactions MCC) représentent un exemple à part au sein de la synthèse combinatoire de bibliothèques de substances [65]. Ugi, un pionnier dans ce domaine, s'est occupé de cette stratégie durant plusieurs années [66]. En 1961 (c'est-à-dire bien avant que le terme de chimie combinatoire ne soit introduit), Ugi et Steinbrückner déclarèrent qu'il devrait être possible de produire un grand nombre de composés à l'aide des réactions MCC : "Etant donné que ce type de réactions de condensation a lieu entre quatre (voire plus) composants, le nombre de possibilités est très élevé. L'emploi de dix composés pour chacune des quatre condensations conduit à  $10^4$  combinaisons possibles. Par conséquent, il nous semble utile de déterminer rapidement la portée et les restrictions de la méthode, en fonction des composants individuels, à l'aide d'études sur des systèmes simplifiés, au sein desquels un maximum de variables sont gardées constantes" [67].

Il n'est donc pas surprenant de noter que, presque 35 ans plus tard, c'est-à-dire après l'arrivée de la chimie combinatoire, Ugi et al. se servent encore de cette "chimie" pour générer des mélanges de composés (Figure No.11).

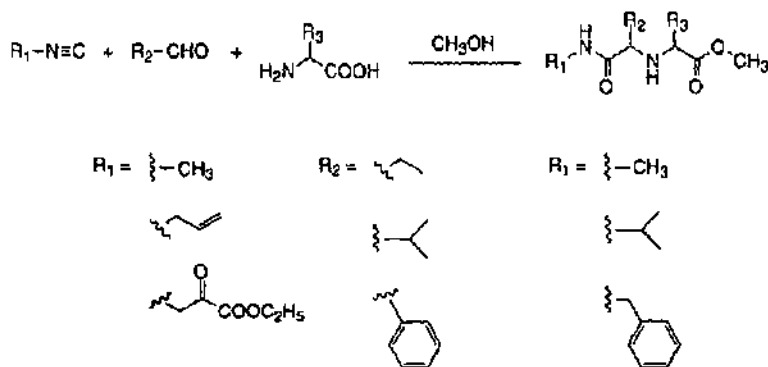


Figure No.11 : Une variation de la réaction de Ugi

Le traitement de trois acides aminés avec trois isonitriles et trois aldéhydes, ainsi que du méthanol, permet d'obtenir une bibliothèque, constituée théoriquement de 54 composés (les stéréoisomères étant considérés comme composés séparés). Mais vu que seulement 37 composés ont été détectés suite à une analyse GC-MS, trois sous-bibliothèques de 18 composés chacune ont été créées. L'étude de ces dernières a permis d'affirmer que presque tous les composés attendus avaient été formés. De la même manière que les réactions "one-pot" sont simples à manipuler, les réactions MCC représentent une manière efficace de générer des bibliothèques de composés, malgré le risque que les produits soient formés à des concentrations différentes. Grâce à son expérience accumulée dans le domaine, Ugi sélectionna les réactifs de réactivités similaires. Un choix réfléchi du réactif assure également que les produits seront formés avec un excellent rendement et une pureté satisfaisante.

### 1.7.2. Synthèses parallèles de composés uniques

Afin d'éviter les désavantages, énumérés plus haut, de la synthèse des mélanges de composés, plusieurs groupes de recherche se sont engagés dans la synthèse combinatoire de composés uniques en solution. La synthèse la plus efficace possible d'un grand nombre de composés individuels définis à l'aide de principes combinatoires étant maintenant le but à atteindre, la limite entre chimie classique et combinatoire devient flexible dans le cas de ces types de réactions.

Comme Ugi, Armstrong [68] et Holmes [69] se servent également des réactions MCC pour la synthèse combinatoire mais, dans leur cas, ils génèrent des composés uniques. Alors que les travaux de Holmes se concentrent sur l'optimisation de la synthèse sur phase solide, Armstrong a publié la synthèse d'une bibliothèque constituée de 64  $\alpha$ -acyloxyamides à partir d'une combinaison systématique de 8 aldéhydes, 8 acides carboxyliques et d'un isonitrile dans une réaction de Passerini.

Cette variante, proposée par Armstrong se trouve à la frontière entre une dérivation classique et la synthèse combinatoire puisque, malgré le fait que des composés intéressants sont isolés, il a obtenu des mélanges isomériques; en outre, la récupération de chaque produit requiert une séparation chromatographique. Les restrictions au niveau des réactifs limitent toutefois la création de bibliothèques de molécules à l'aide des réactions d'Ugi ou de Passerini. En effet, malgré le fait de l'existence commerciale d'un grand nombre d'aldéhydes, d'acides carboxyliques et d'amines, le nombre d'isonitriles existant sur le marché est restreint.

L'approche la plus évidente pour la synthèse combinatoire de composés uniques est de se servir en parallèle de réactions connues. Ces dernières doivent se dérouler très doucement avec d'excellents rendements et ne devraient idéalement pas nécessiter d'étapes supplémentaires de purification. En d'autres termes, n'importe quel réactif susceptible d'être retrouvé à la fin de la réaction devrait pouvoir être éliminé par simple évaporation.

La combinaison de synthèses en solution avec une synthèse sur phase solide a déjà été présentée dans la stratégie adoptée par Armstrong [70], où il a couplé le produit de la réaction de Ugi à un support polymérique dans une étape supplémentaire (capture de la résine).

Jusqu'ici, la synthèse en solution s'est présentée comme la solution de choix pour les synthèses de bibliothèques. Ainsi, certains problèmes de la phase solide ont pu être évités, mais, simultanément, les avantages de cette méthode sacrifiés.

Pour cette raison, Janda et al. [71] ont employé une stratégie qui combine les avantages de la synthèse en solution avec ceux de la synthèse sur phase solide. Du polyéthylène glycol (PEG) a été utilisé en tant que support solide. Ce polymère est soluble dans la plupart des solvants et peut facilement être précipité par simple adjonction d'éther diéthylique. La réactivité de

substrats libres ou liés au PEG peut différer selon les cas; toutefois, les conditions réactionnelles déterminées pour la synthèse peuvent souvent être appliquées. Cela économise le temps d'adaptation d'une synthèse à des conditions sur phase solide. La purification d'un mélange réactionnel peut se faire par précipitation et l'extraction par cristallisation, grâce aux propriétés des dérivés du PEG.

Mais la synthèse sur polymères solubles a été jusqu'à maintenant incapable de faire concurrence aux synthèses sur phase solide dans le domaine des peptides. Il reste maintenant à déterminer si – vu aussi les problèmes au niveau de l'automatisation – cela sera également le cas pour la synthèse combinatoire de petites molécules organiques.

## **1.8. La synthèse combinatoire sur phase solide**

### **1.8.1. Les phases solides employées pour la synthèse de bibliothèques**

Les techniques développées pour la synthèse sur phase solide sont basées sur les travaux de Merrifield [26], qui fut le premier à se servir de résines substituées en tant que support solide pour la synthèse de peptides.

La synthèse sur phase solide se prête naturellement à la construction de peptides, du fait du nombre limité de transformations nécessaires à leur synthèse, et également parce que chacune des étapes-clés a été optimisée, de manière à produire les peptides d'une longueur désirée avec un excellent rendement.

L'emploi d'un support solide pour la synthèse organique se base sur trois conditions interdépendantes :

- (a) un matériel polymérique, réticulé, insoluble et inerte aux conditions de la synthèse,
- (b) divers moyens de coupler le substrat à cette phase solide, mais aussi de cliver sélectivement certains ou tous les produits du support solide au cours de la synthèse, afin d'analyser l'avancement de la réaction, et, pour finalement conduire au produit final qui nous intéresse,
- (c) une stratégie de protection chimique permettant une protection et déprotection orthogonale sélective des groupes fonctionnels réactifs au sein des monomères.

Les premiers types de résine employés furent des grains de polystyrène partiellement réticulé (le styrène est en fait lié transversalement avec 1% de divinylbenzène, pour lui donner une force mécanique et une insolubilité, mais également pour lui laisser cette flexibilité apparente lors de son gonflement par l'action du solvant) de tailles variables, préparés par

polymérisation catalysée, soit par un radical, soit photochimiquement, dans un mélange organoaqueux. La polymérisation a en fait lieu au sein des microgouttelettes, donnant ainsi naissance à des grains sphériques. La reproductibilité de la taille est ensuite assurée par le biais d'un tamis.

La première forme de résine de type polystyrène (résine Merrifield) employée pour la synthèse de peptides était substituée par un groupe chlorométhyle, sur lequel des acides aminés pouvaient être couplés via une substitution nucléophile. La liaison ester résultante était alors stable aux conditions du couplage peptidique et était clivée sous conditions fortement acides (HF) pour conduire à des produits carboxyliques.

Plusieurs alternatives pour les chaînes liantes sur le polystyrène (permettant la libération d'acides carboxyliques à des conditions beaucoup plus douces) ont été décrites. Ces résines, toujours de type polystyrène, ont été employées intensivement durant plusieurs années, jusqu'à ce que l'on réalise que la nature de l'environnement local autour de la chaîne moléculaire croissante avait un effet significatif sur la vitesse et l'avancement de la réaction. Le polystyrène est en effet complètement hydrophobe, alors que la chaîne peptidique croissante est beaucoup plus hydrophile, et cette différence a comme conséquence un effet pliant sur la chaîne, ce qui force le peptide à se satisfaire de ses liaisons hydrogène intramoléculaires, plutôt qu'à être solvaté.

Ce phénomène est en mesure de limiter sérieusement l'accès synthétique à une terminaison de la chaîne croissante et des conditions alternatives ont été étudiées pour éviter ce problème. Par exemple, divers types de supports solides, tels que les résines du type polyamide [72], ont été développés; ces derniers sont hydrophiles comme la chaîne peptidique croissante et ils peuvent donc tous les deux être aisément solvatés par des solvants dipolaires et aprotiques (par ex. DMF, NMP).

Pour la construction de bibliothèques combinatoires de composés autres que les peptides, des supports solides de constitution différente sont envisagés, comme la résine de type Tentagel™ [73], qui est constituée d'environ 80% de PEG greffé à du polystyrène réticulé. En règle générale, le milieu réactionnel considéré pour ce type de résine est l'éther ou le THF, d'où le potentiel d'être compatible avec le grand nombre de réactions étudiées, en vue de développer de nouvelles bibliothèques de substances.

Les résines et les autres matériaux solides employés en synthèse sur phase solide peuvent exister sous diverses formes. La forme la plus répandue étant celle sphérique, une collection d'extrusions de polyéthylène greffées sur un dérivé polyacrylique et appelées "pins" a été préparée, de manière à mettre à disposition une surface maximale et ainsi optimiser la capacité de production [24].

La nature de la phase solide influence aussi énormément la vitesse et la nature des réactions ayant lieu à sa surface. D'autres matières ont été considérées pour la synthèse sur phase solide : la cellulose [74], le papier [27] et le coton.

Les résultats les plus concluants ont été obtenus avec le papier, certainement grâce au fait que l'environnement plus protique provoque moins d'effet pliant sur la chaîne et permet ainsi la préparation de séquences plus difficiles. La fonctionnalisation de surfaces en verre et leur usage possible en synthèse sur phase solide ont également été considérés, en particulier pour la synthèse parallèle d'oligonucléotides.

Le groupe permettant de lier le substrat au grain de résine représente une partie essentielle de la synthèse sur phase solide et ainsi, de la technologie des bibliothèques de substances, puisqu'il détermine aussi bien la méthode employée pour le clivage de la phase solide que la fonctionnalité terminale qui est dévoilée. Du point de vue de la construction de bibliothèques combinatoires, l'emploi du même linker pour une bibliothèque complète imposera le même groupe fonctionnel terminal pour chaque composé, bien qu'il n'y ait aucune raison de stopper l'emploi en parallèle de plusieurs linkers, en vue de donner naissance à différentes fonctionnalités au sein de la même bibliothèque.

Les méthodes préférées pour la formation d'acides carboxyliques dans les bibliothèques combinatoires font usage de la résine de type Wang (Figure No.12). Les substrats sont liés à ce linker de type alcool benzylique à travers la formation d'un ester stable à quasiment toutes les conditions (exception faite d'acides forts protiques). Ce linker est idéal pour la synthèse de peptides, en particulier si une stratégie de protection basico-labile est choisie (par exemple, protection de l'amine par le groupe Fmoc, qui est éliminé par l'emploi de la pipéridine [75]).

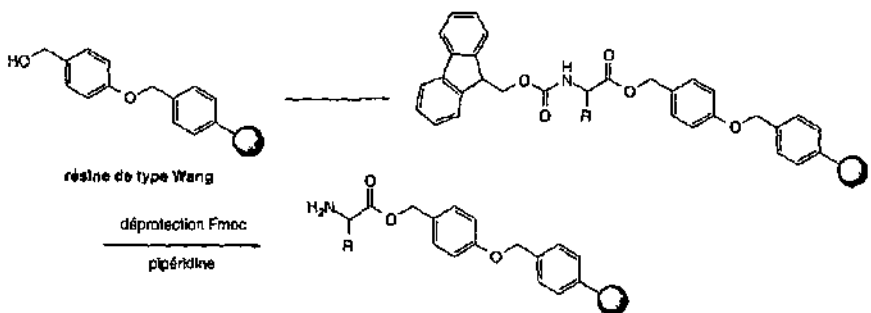


Figure No.12 : L'utilisation de la résine de type Wang pour le couplage d'acides carboxyliques

Les conditions pour le clivage des produits à la fin de la synthèse comprennent généralement l'emploi d'un acide fort protique (TFA 1% à 95%). A noter que cette étape permet également le clivage des groupes de protection orthogonaux de type *tert*-butyle.

Une autre résine est préférée pour conduire aux amides primaires : l'emploi de la résine développée par Rink [76], qui est également clivée à l'aide de TFA (Figure No.13).

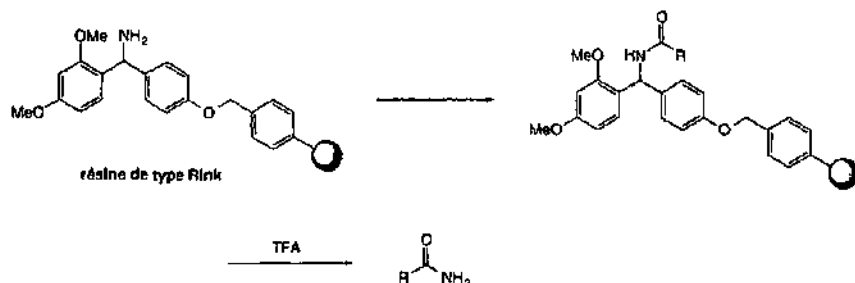


Figure No.13 : L'utilisation de la résine de type Rink pour conduire à des carboxamides, suite à un clivage par le TFA

Plusieurs autres groupes liants ont été développés, afin de permettre la libération d'acides carboxyliques : par clivage induit photochimiquement [77], par clivage d'un ester allylique catalysé par du palladium [78] ou par clivage d'esters substitués avec du silicium [79].

D'autres groupes fonctionnels ont été couplés et clivés du support solide. Ellman, par exemple, a publié une méthode utile pour coupler des groupes hydroxyles, grâce à une résine fonctionnalisée de type dihydropyranne [80].

Les linkers basés sur le principe "safety catch" ont donné des résultats prometteurs dans le domaine de la chimie organique sur phase solide, du fait qu'ils sont compatibles avec la plupart des conditions réactionnelles dans leur état non-activé. Backes et Ellman [81], entre autres, se sont servis du linker du type sulfonamide, décrit par Kenner [82], pour la synthèse de dérivés de l'acide phénylacétique.

A noter également qu'un nouveau type de linker, développé initialement pour la synthèse sur phase solide de fragments peptidiques totalement protégés, s'est avéré dernièrement applicable à un grand nombre de synthèses organiques : la résine de type SASRINT<sup>TM</sup> ("Super Acid - Sensitive Resin") [83].

### 1.8.2. La synthèse d'une bibliothèque combinatoire

Comme nous l'avons vu plus haut, la synthèse combinatoire la plus utilisée est basée sur le principe "split and mix" de Furka [17,18], principe qui a été exploité par beaucoup d'autres groupes de recherche depuis.

Par exemple, Houghten [24] s'est servi du principe, à une échelle macro, dans sa technique des sachets de thé pour la génération de vaste bibliothèques de peptides. Houghten s'est

également servi d'une variation de la technique pour la production de bibliothèques du type "positionnal scanning" [84]. Cette stratégie, dans laquelle les mêmes composés sont préparés plusieurs fois, est caractérisée par le fait que, au sein de chaque bibliothèque construite, un résidu différent de la séquence est gardé constant. Par exemple, une bibliothèque d'hexapeptides constituée de 34 millions ( $18^6$ ) de composés a été construite en six collections de mélanges, où chaque mélange contient 1'889'568 ( $18^5$ ) peptides. La première collection de mélanges sera caractérisée par la *N*-terminaison de l'acide aminé gardée constante. L'identité du résidu fixé au sein de chaque mélange est une conséquence de la méthode d'assemblage de la bibliothèque, ce qui signifie que le mélange le plus actif identifié après le test définira le résidu *N*-terminal préféré. La deuxième bibliothèque garde le deuxième résidu constant dans chacun des mélanges, et là aussi, suite au test, une deuxième position préférée peut être identifiée. La même approche est suivie pour la construction des quatre autres bibliothèques. Le test de tous les mélanges permettra ainsi d'identifier les résidus préférés à chacune des six positions.

### 1.8.3. La détermination structurale des composés actifs de la bibliothèque

Dans les exemples étudiés jusqu'à maintenant, la détermination structurale des composants actifs de la bibliothèque s'est faite :

- (a) soit par une nouvelle synthèse itérative systématique et par un nouveau test spécifique des mélanges et composés,
- (b) soit par le microséquençage d'une séquence peptidique encore attachée à la résine.

Cependant, beaucoup de recherches ne permettent pas de s'investir dans une nouvelle synthèse de composants de la bibliothèque, ou, si ces derniers ne sont pas des peptides, dans un microséquençage. C'est pourquoi une grande partie des études récentes s'est concentrée sur le développement d'autres moyens pour déterminer les structures des composants actifs au sein de la bibliothèque. En particulier, des structures ont été identifiées à l'aide de l'emplacement du produit ou à l'aide de techniques de "codage".

#### 1.8.3.1. Structure du produit grâce à son emplacement au sein de la bibliothèque

Des bibliothèques construites dans un format, où le support solide est physiquement retenu (sur du papier, coton, des tiges de polypropylène ou des grains de résine au sein de sachets de thé), sont caractérisées par des structures de composés définies par leur position (normalement exprimée grâce à une marque).

Une extension élégante de ce concept est illustrée par Affymax (Figure No.14) dans sa synthèse chimique parallèle dirigée par la lumière (également connue sous l'abréviation VLSIPS – "Very Large Scale Immobilised Polymer Synthesis") [28].

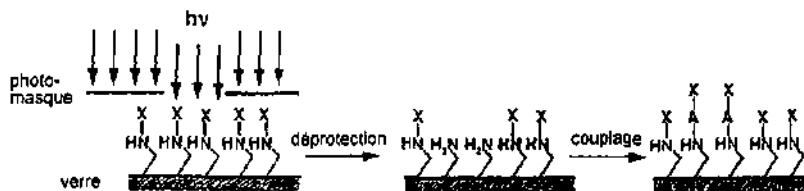


Figure No.14 : L'utilisation de la lumière dans la déprotection de substrats couplés au support solide

Une combinaison de photolithographie et de synthèse sur phase solide est employée pour la génération d'une série de peptides sur une surface microscopique de verre. Tous les groupes amines libres présents sur la surface sont initialement protégés avec le groupe photolabile Nvoc (6-nitroveratryloxycarbonyle). L'utilisation d'un masque permet l'irradiation de zones prédéfinies de la surface et ainsi, la déprotection de certains groupes aminés, qui peuvent ensuite être fonctionnalisés. L'emploi d'une série de masques-modèles tout au long de la synthèse a ainsi permis la création d'une série de 1024 peptides différents, au sein d'éléments mesurant 50  $\mu\text{m}$  sur 50  $\mu\text{m}$ . Le test peut se faire sur le chip-même et la structure des composants actifs est déduite grâce à leur position sur la surface.

#### 1.8.3.2. Identification structurale par codage

La méthode "split and mix" pour les résines est en mesure de générer des milliers, voire des millions de produits différents. Bien que la synthèse soit rapide, le pouvoir des bibliothèques combinatoires est évident, uniquement si l'information structurale au niveau des composants actifs peut être obtenue aisément.

Une nouvelle synthèse itérative et un nouveau test représentent une solution, mais principalement à cause de sa lenteur, cette méthode a été remplacée par d'autres stratégies, où l'information concernant le composé actif peut être transportée sur le grain sous la forme d'un code. Trois méthodes principales de codage chimique ont été décrites, et toutes trois proposent la cosynthèse d'un code chimique (ou d'un identificateur) sur le même grain de résine.

Selectide a proposé une méthode permettant la détermination de la structure de substances non-peptidiques ou de produits de bibliothèques non-séquençables [85]. Cette méthode implique la synthèse simultanée, sur le même grain, d'un composé-test et d'un peptide qui code ce composé non-séquençable (Figure No.15). Pour rendre cette synthèse parallèle

possible, Selectide a conçu un linker multiple, contenant un point de ramification représenté par la lysine, en mesure d'attacher les deux séquences.

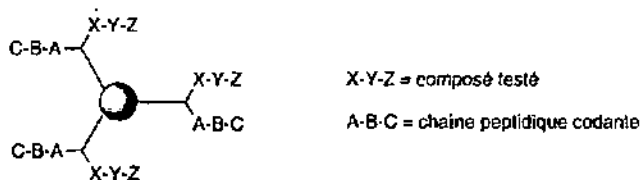


Figure No.15 : Grain de résine avec des linkers ramifiés, permettant la synthèse d'un composant de la bibliothèque et la construction d'une chaîne peptidique codante (A-B-C)

La chaîne codante est constituée d'un tripeptide, au sein de laquelle chaque acide aminé représente un composant de la chaîne non-séquençable. En fait, à chaque couplage d'une unité synthétique sur le composé succède le couplage d'un acide aminé sur le bras codant du linker (Figure No.16). La bibliothèque de composés est libérée par clivage d'un linker du type "safety-catch". La structure de n'importe quel composé de la bibliothèque est confirmée par la dégradation d'Edman du code peptidique encore attaché au grain.

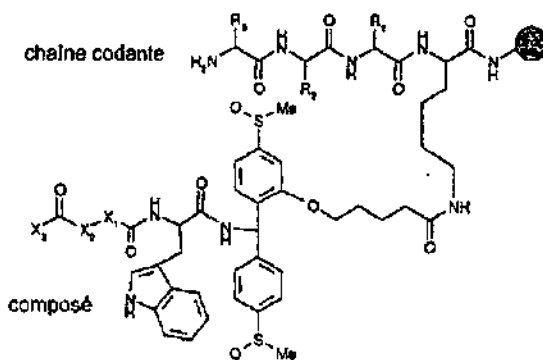


Figure No.16 : Un linker ramifié est nécessaire pour l'assemblage des composés non-peptidiques en compagnie d'une chaîne peptidique codante

Dans cet exemple, il y a une corrélation 1:1 entre les acides aminés et les composés non-peptidiques. Cela signifie qu'il n'est possible que d'utiliser 20 unités synthétiques, mais grâce à la considération de séquences dipeptidiques codantes pour chaque composant, leur nombre peut être augmenté à 400.

Une deuxième méthode de codage est représentée par l'emploi d'oligonucléotides en tant qu'éléments de codage de la structure des composants de la bibliothèque [86]. Dans ce cas, il y a une succession d'étapes alternantes, au cours desquelles chaque réaction chimique dans la

construction des membres de la bibliothèque est suivie par une réaction parallèle permettant le codage à l'aide d'une séquence unique oligonucléotidique. Le code génétique attaché aux grains portant des composés actifs est ensuite amplifié par réplication, et le code est lu par séquençage de l'ADN. Divers linkers sont décrits, qui dépendent tous de l'emploi d'un résidu sérine permettant la synthèse parallèle des chaînes peptidiques et oligonucléotidiques. Des conditions réactionnelles orthogonales ont été trouvées pour la synthèse de chacune des chaînes.

Une troisième méthode de codage se sert également de la synthèse parallèle, mais dans ce cas, le code est basé sur une série d'alcane haloaromatiques substitués [87]. Au cours de chaque étape de la synthèse d'une bibliothèque de peptides, des molécules codantes sont attachées au grain, de manière à coder aussi bien le nombre d'étapes que l'unité synthétique chimique employée.

A la différence des codes de type peptidique ou oligonucléotidique décrits ci-dessus, les codes ne sont pas construits au sein d'une chaîne parallèle, mais sont en fait additionnés sur la terminaison amine libre des peptides en construction (Figure No.17). Etant donné qu'une quantité minimale de molécule-code est utilisée à chaque fois, seul environ 0.5% du peptide en construction est terminé par chaque étape de codage. Par conséquent, il n'est pas nécessaire de développer un linker spécial ramifié, et la quantité totale de code représente uniquement quelques pour-cents du matériel fixé sur le grain. A noter que, plus récemment, des dérivés du diazométhane ont été employés, de manière à ajouter des codes directement sur la résine, grâce à la génération d'acylcarbènes [88].

L'identité des peptides actifs est déterminée à l'aide de l'analyse des codes après clivage par radiation UV d'un linker labile, puis par interprétation à l'aide de chromatographie en phase gazeuse par capture d'électrons (ECGC). Les codes sont construits, de façon à ce que le signal GC puisse être interprété comme un code binaire, en mesure de révéler les acides aminés utilisés et leur position dans la synthèse.

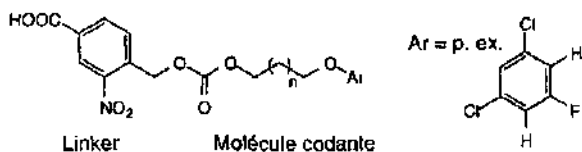


Figure No. 17 : Les molécules codantes réactives, employées par Pharmacoepia pour le codage de séquences non-peptidiques

Il est à noter que, dans chacune des trois méthodes décrites ci-dessus, l'emploi de groupes codants permet la synthèse de n'importe quel composé au sein de la bibliothèque. Les

molécules-codes sont en effet en mesure de coder n'importe quelle unité synthétique et n'importe quelle transformation synthétique.

En outre, du fait des incertitudes caractérisant la chimie de synthèse, le code peut être considéré, non pas comme une molécule codant une structure spécifique, mais comme une molécule codant un processus synthétique. Ainsi, même si le composé désiré n'est pas synthétisé mais l'activité biologique est détectée, le système de codage facilite la répétition des étapes chimiques nécessaires à la production du composé actif, et, par conséquent, apporte une aide dans la détermination de la structure.

### 1.9. Automatisation et interprétation des données

La résolution des problèmes de synthèse n'est pas la réponse à tout. Seul un concept intégré englobant la chimie, l'automatisation, l'interprétation électronique des données et des tests hautement performants est promis au succès. Un recueil des progrès faits dans l'automatisation a été publié par DeWitt [89], qui s'est également concentrée sur le développement d'une approche devenue commerciale : la technologie DIVERSOMER™ [89].

Certains développements sont également étudiés au niveau de nouveaux systèmes, construits sur une base modulaire pouvant être adaptée à un grand nombre de conditions réactionnelles. Au sein d'un système de ce genre, tous les transferts de liquides (additions de solvants ou de réactifs, étapes de rinçage) ont lieu dans un module central construit autour d'un robot-pipetteur. Les récipients de réaction sont ensuite transférés au sein de modules spéciaux d'incubation, où ils sont maintenues pour la durée de la réaction, tandis que le module central est à nouveau disponible pour la préparation de nouvelles réactions.

Du fait du nombre énorme de données collectées, la chimie combinatoire est impossible sans le support d'une interprétation électronique des données [90]. C'est pourquoi les applications suivantes ont pris récemment de l'importance :

- des logiciels pour le contrôle du robot synthétiseur
- la sélection de réactifs via une recherche dans les bases de données chimiques
- le support dans la sélection et l'optimisation des réactions grâce à la recherche dans des bases de données sur les réactions (REACCS™, CROSSFIRE™),
- mise au point et recherches au sein de bibliothèques (virtuelles) de composés (LEGION™, UNITY™).

Un défi important est également représenté par le développement de programmes en mesure de permettre une sélection intelligente des composés à synthétiser, et donc, de viser une diversité maximale avec un nombre minimal de composés.

### 1.10. Développements futurs en chimie combinatoire

Avec les progrès significatifs atteints dans plusieurs disciplines technologiques et l'avènement d'innovations conceptuelles, une nouvelle voie dans l'approche de la découverte de nouveaux médicaments a débuté.

Alors que la phase de développement des médicaments est bien réglée, et qu'elle ne peut être raccourcie pour des raisons de sécurité, l'opération consistant en la découverte d'une nouvelle structure potentiellement intéressante représente un domaine plus ouvert et susceptible d'inclure des nouvelles stratégies. En plus de faire épargner du temps, une identification plus rapide des structures est en mesure d'offrir une couverture plus large de territoires inexplorés, vu qu'elle se fait dans la phase de découverte, avant que l'on se concentre sur un composé particulier ou sur une famille d'analogues.

Les technologies combinatoires nous permettent d'approcher de manière satisfaisante cette lutte pour une recherche exhaustive d'une structure. Le bénéfice immédiat est le fait de pouvoir tester un grand nombre de composés au cours d'un test primaire, mais, plus important est le fait que la composition des bibliothèques et leur préparation sont en mesure d'être décidées et organisées d'une manière systématique, au contraire de la situation avec d'autres sources de composés, telles que les extraits naturels. Actuellement, la chimie combinatoire sur des cibles provenant d'autres sources (par exemple les produits naturels) est une mission difficile et peu compétitive, dans le cas où la synthèse sur phase solide n'est pas encore développée. Avec un répertoire élargi de réactions à étudier dans les années à venir, ce type d'application deviendra aussi plus attractif.

Une question à se poser est : "Combien de combinaisons est-il possible de synthétiser et de tester en un temps  $t$  ?". Cela revient en fait à essayer d'exploiter ce nombre limité avec un choix optimal des candidats, mais aussi à reconnaître les expériences accumulées dans les dernières années : c'est-à-dire que la prédiction de nouvelles structures intéressantes par le modélisme est extrêmement vague, même dans le cas de sites bien caractérisés. Les forces du modélisme moléculaire deviennent évidentes, au moment où une source énorme d'information minimise l'incertitude des hypothèses.

Dans le futur, grâce à une base plus forte de connaissances des mécanismes gouvernant les interactions des médicaments dans le site du récepteur, un saut vers des approches de nouvelles découvertes pharmaceutiques orientées vers des prédictions sera possible.

Un point persistant de controverse chez les chimistes est la question de savoir jusqu'à quel niveau le test de mélanges est fiable. Le potentiel de succès des mélanges est plus évident en considérant le flux prolifique de structures actives isolées d'extraits naturels. Les bibliothèques synthétiques présentent l'avantage que les concentrations relatives et une classification systématique en groupes organisés est modulable, ce qui ouvre de nouvelles portes à la manière de traiter la complexité.

La perspective à plus long terme, d'un autre côté, qui représente un but ultime pour les technologies combinatoires, est de fournir la capacité de tester un grand nombre de composés individuels dérivés via le procédé "split and mix" sur des grains individuels. Si l'automatisation de la synthèse et du test progresse effectivement comme on le pense, la technologie d'information va devenir une partie indispensable de la découverte de nouveaux médicaments [91].

Le nombre de composés en mesure d'être mis sur le marché ne pouvant pas augmenter considérablement d'un seul coup, un processus inévitable de convergence d'intérêts doit prendre en compte les forces et les faiblesses de chaque nouvelle structure et estimer la probabilité de succès pour chaque composé. Le nombre absolu de structures intéressantes produites est moins critique que la capacité à générer toujours plus de structures actives. L'aspect nouveau le plus significatif entrant alors en jeu est la possibilité de choisir parmi une large sélection de candidats divers, avec une probabilité croissante que seules les meilleures structures intéressantes seront étudiées plus intensément. Pour appuyer cette perspective, des essais de haut débit, caractérisés par des valeurs annonçant des propriétés toxicologiques et une biodisponibilité, sont nécessaires.

Après avoir mis en relief la valeur distincte des technologies combinatoires pour le processus de la découverte de médicaments, il est important de noter que le succès des applications dépendra de l'établissement d'une bonne balance, à l'aide de ressources complémentaires, au niveau des efforts plus traditionnels de la chimie médicale.

---

## 2. La thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique ou PDT [92], appelée également thérapie de photoradiation ou photothérapie implique l'administration d'un agent photosensibilisateur capable de localiser (et/ou de détruire) une tumeur. Cet agent peut être issu d'une synthèse métabolique suivie de son activation par la lumière à une longueur d'onde bien définie. Cette thérapie est caractérisée par une série de processus photochimiques et photobiologiques responsables de dégâts irréversibles aux tissus tumoraux.

Les résultats récoltés à partir d'une série d'études cliniques et précliniques au cours des 25 dernières années ont permis de considérer la thérapie photodynamique comme traitement de base pour certains types de cancers. Depuis 1993, en effet, cette technique est régulièrement appliquée aux cancers de la peau et aux cancers des organes creux (vessie, prostate, tube digestif, etc.) dans un grand nombre de pays (Canada, Pays-Bas, France, Allemagne, Japon et Etats-Unis principalement) [93,94].

### 2.1. Historique et généralités

L'emploi de la lumière en tant qu'outil thérapeutique est connu depuis longtemps [95]. Pourtant, ce n'est que dans les dernières décennies que certaines techniques photothérapeutiques ont été reconnues [96]. Cet écart dans le temps s'explique par la quantité importante d'informations récoltées récemment dans des domaines très différents mais interdépendants, tels que les propriétés optiques des tissus des mammifères, le développement de techniques électrooptiques très sophistiquées qui permettent l'étude des processus photophysiques et photochimiques impliquant certaines biomolécules au sein de systèmes complexes et microhétérogènes, mais aussi par une compréhension plus accrue des réponses biologiques et physiologiques exprimées par les cellules suite à un dommage photoinduit.

Ainsi, de nos jours, plusieurs dizaines de milliers de patients à travers le monde sont ou ont été traités, non seulement par irradiation à la lumière bleue pour la thérapie de la jaunisse néonatale [97] (où de la bilirubine, un tétrapyrrole linéaire qui, en excès, est transformée en un isomère plus hydrosoluble, donc facilement éliminé), mais aussi par irradiation PUVA (psoralène, lumière UV-A) pour la thérapie de maladies cutanées spécifiques [98], où l'accumulation cellulaire est inhibée par des dégâts au niveau de l'ADN induits photochimiquement par le psoralène.

Les premiers travaux de recherche datent du début du siècle, où Raab, qui étudiait alors les effets de la lumière, ainsi que ceux des colorants sur des micro-organismes du type paramécies, observa que, lorsqu'il exposait ces derniers à la lumière du soleil en présence d'une solution colorante d'acridine, ils mouraient. En revanche si l'exposition à la lumière du soleil se faisait sans colorant, ils survivaient [99]. En fait, ce système biologique était rendu sensible à la lumière à cause d'une molécule se trouvant à la base d'une réaction photochimique impliquant des molécules d'oxygène.

Mais il faudra attendre la fin des années 70 pour qu'une technique photothérapeutique innovatrice soit proposée : la thérapie photodynamique, appelée ainsi parce qu'elle requiert simultanément la présence de trois éléments : la lumière, l'oxygène et un photosensibilisateur. A titre de comparaison, ni la photothérapie à la lumière bleue de l'hyperbilirubinémie ni la thérapie PUVA ne comportent l'emploi de l'oxygène.

Blum [100] a proposé que cette définition soit appliquée uniquement à des réactions photochimiques durant lesquelles il y a consommation d'oxygène. De telles réactions sont également appelées processus photosensibles de type I et de type II, en fonction de la nature des étapes primaires, c'est-à-dire la participation initiale d'intermédiaires radicalaires, par la suite piégés par l'oxygène, ou la génération d'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) hautement cytotoxique par transfert d'énergie à partir du sensibilisateur photoexcité. A noter que  $^1O_2$  est caractérisé par un temps de demi-vie extrêmement court dans les systèmes biologiques ( $< 0.04 \mu s$ ) et, par conséquent, par un rayon d'action très réduit ( $< 0.02 \mu m$ ) [101].

L'ère actuelle de la PDT a véritablement démarré avec les études de Lipson et de Schwartz à la clinique Mayo, où ils ont observé que l'injection de préparations brutes d'hématoporphyrines extraites directement du sang conduisait à la fluorescence de tumeurs localisées au cours de l'opération. Afin d'obtenir une préparation permettant une localisation optimale de la lésion, Schwartz traita l'hématoporphyrine 18 avec de l'acide acétique et de l'acide sulfurique pour isoler un mélange porphyrique qu'il denomina "dérivé hématoporphyrinique" (HpD) [102]. Ce mélange (appelé également "stage I") est en fait constitué de dcuteroporphyries 3,8-disubstituées, au sein desquelles les substituants sont des combinaisons de groupes vinyle, 2-acétoxyéthyle et 2-hydroxyéthyle. Le composant principal de ce mélange HpD<sup>1</sup> est le dérivé diacétoxylé (Figure No.18). Afin de rendre ce mélange assimilable par le corps, il est dissout dans un milieu alcalin (appelé "stage II"). Cette opération provoque l'hydrolyse ou l'élimination des groupes acétoxy et conduit au complexe

---

<sup>1</sup>HpD a été partiellement purifié (notamment via l'élimination des porphyrines monomériques) pour former le Photofrin<sup>®</sup>, le photosensibilisateur le plus utilisé en PDT clinique [218]

appelé "witches brew", composé de porphyrines monomériques, dimériques et oligomériques [103]. Seuls certains de ces composés du mélange sont connus pour leur activité PDT *in vivo* : les dimères et les oligomères.

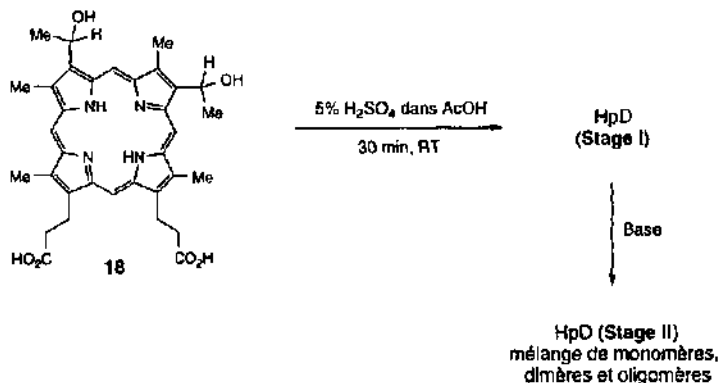
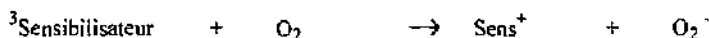
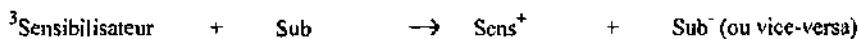


Figure No.18 : Synthèse de HpD

Le mélange HpD (Stage II) fut utilisé par Lipson et al. [104] dans la détection de tumeurs.

Mais revenons aux modes d'action des photosensibilisateurs. Ces agents photodynamiques peuvent donc agir selon deux voies principales appelées mécanisme de type I et mécanisme de type II. Tous deux mettent en jeu l'état triplet le moins excité du photosensibilisateur à une vitesse contrôlée par la diffusion [105]. Dans les mécanismes du type I, il y a **transfert d'électrons** du sensibilisateur à l'état triplet à l'oxygène ou à une molécule du substrat (d'où la formation d'un anion du substrat ou d'un anion superoxyde) :



Ce transfert est accompagné de la formation d'espèces radicalaires, qui réagissent successivement avec d'autres composants du système, en particulier avec l'oxygène, pour conduire aux produits oxydés. Dans les mécanismes du type II, le **transfert d'énergie**<sup>1</sup> du

<sup>1</sup>Un transfert d'énergie à d'autres cibles est peu probable, puisque la plupart des biomolécules sont caractérisées par des états triplets énergétiquement plus élevés que ceux des porphyrines

sensibilisateur à l'état triplet au dioxygène provoque la formation de l'agent hautement cytotoxique oxygène singulet.



Mécanismes du type I et du type II comptent tous deux des espèces réactives, ce qui a pour conséquence que les sites cellulaires riches en électrons, tels que les nucléotides contenant de la guanine, les acides aminés aromatiques et soufrés et les double-liaisons des stéroïdes et des lipides insaturés, sont rapidement modifiés. Dans tous les cas, le photoprocessus initial est limité par un rayon spatial très réduit ( $< 0.02 \mu\text{m}$ ) entourant le sensibilisateur photoexcité (en raison de la haute réactivité des intermédiaires photogénérés). Néanmoins, les peroxydes générés par la photooxydation permettent de propager les effets à des sites localisés à une distance significative de l'endroit d'origine où il y a eu absorption de lumière [106].

C'est pourquoi il est important de procéder à un contrôle strict de la biodistribution des agents photosensibilisateurs au niveau cellulaire et tissulaire, en particulier dans le cas d'injections systémiques. L'emploi de techniques d'application appropriées a permis d'effectuer des progrès considérables dans l'efficacité et la sélectivité de la PDT. Par exemple, certains photosensibilisateurs hydrophobes peuvent être incorporés sous leur forme stable dans la partie lipidique d'un sérum constitué de lipoprotéines à basse densité (LDL). Or, ces dernières sont caractérisées par une affinité prononcée pour une interaction avec plusieurs types de cellules tumorales à travers une endocytose réglée par le récepteur [107].

Le photosensibilisateur est donc libéré à hautes concentrations dans les tissus néoplasiques et localisé en larges quantités au sein des membranes cellulaires. La première conséquence est que le dommage photoinduit se traduit par une modification de l'architecture native et par une altération des propriétés fonctionnelles des membranes. En revanche, aucun effet mutagène n'a jamais été observé [107], ce qui confirme la sécurité de cette technique photothérapeutique et permet la succession de plusieurs applications dans les cas de récurrence ou de lésions plus étendues.

## 2.2. Les agents thérapeutiques du type photodynamique

Comme il l'a été expliqué plus haut, un agent PDT potentiellement intéressant pour une utilisation clinique doit être caractérisé par un temps de demi-vie prolongé à l'état triplet et il doit être en mesure de réagir efficacement, aussi bien avec des molécules de substrat voisines

qu'avec de l'oxygène moléculaire. D'autre part, il doit émettre d'intenses bandes d'absorption pour des longueurs d'onde supérieures à 600 nm. Ces deux propriétés peuvent être régulées grâce à l'ingénierie moléculaire, par exemple à travers l'insertion de fonctionnalités chimiques au sein de la molécule photosensibilisatrice. En général, les porphyrinoïdes dépourvus de ions métalliques sont caractérisés par un temps de demi-vie de l'ordre de la milliseconde avec un rendement quantique de 0.7 - 0.9 (pour l'oxygène singulet, le rendement quantique est de 0.5 [108]).

De telles valeurs peuvent toutefois être sensiblement réduites grâce à l'agrégation du photosensibilisateur, possible dans un environnement aqueux tel que ceux rencontrés dans un milieu biologique. Ce phénomène est principalement dû à la forte contribution hydrophobe induite par la surface étendue caractéristique du macrocycle tétrapyrrolique aromatique.

Toutefois, cette tendance peut être inhibée par la présence de substituants périphériques chargés positivement et négativement, qui sont en mesure de générer une répulsion électrostatique intermoléculaire. A ce sujet, des porphyrinoïdes polycarboxylés ou -sulfonés ont été testés à plusieurs reprises *in vivo* et *in vitro* [109]. Les résultats les plus satisfaisants ont été observés avec des dérivés amphiphiles, comme les porphyrines disulfonées, où les deux fonctions en question sont localisées dans deux cycles pyrroliques adjacents, alors que les cycles non-substitués jouent le rôle de matrice hydrophobe, facilitant ainsi la traversée de la membrane cellulaire par le photosensibilisateur ou par l'association de ce dernier avec des transporteurs lipophiles issus de la circulation sanguine.

Cette approche est cependant limitée par la formation non-contrôlée d'une variété de composés (divers états de substitution, divers isomères de position) au cours de la synthèse chimique, induisant successivement des méthodes de purification compliquées et onéreuses. Alternativement, l'agrégation peut être évitée grâce à l'insertion de ions métalliques étant en mesure d'être hexacoordinés (Zn(II), Sn(IV), Ge(IV), Si(IV)). En effet, la présence de substituants axiaux encombrants a pour conséquence principale une gêne stérique significative. Ils peuvent également être employés pour transmettre à la molécule des niveaux prédéterminés d'amphiphilicité [110].

Alors que l'intensité et la position de la bande d'absorption de longueur d'onde la plus élevée chez les porphyrinoïdes sont généralement à mettre en relation avec l'étendue du nuage électronique aromatique, un réglage fin du maxima d'absorption peut être obtenu grâce au contrôle de la nature du ion métallique et des ligands axiaux, mais également grâce au contrôle de la position des substituants périphériques (Tableau No.2).

Ainsi, les dérivés du type hématorphyrine **18** utilisés jusqu'à aujourd'hui en PDT sont progressivement remplacés par des photosensibilisateurs de la deuxième génération [106]. En

effet, leur coefficient d'extinction étant sensiblement réduit dans la région spectrale 600-700 nm, l'efficacité de la photoactivation s'en voit diminuée et, par conséquent, l'obtention d'un résultat clinique satisfaisant passe par l'application de temps d'irradiation prolongés.

Les phthalocyanines **19** (Figure No.19) et les chlorines **21** (Figure No.20) sont caractérisées par un coefficient d'extinction molaire dans le rouge supérieur à celui des porphyrines. Il en résulte une réponse phototherapeutique importante et des injections de doses nettement inférieures [111].

Un intérêt particulier se concentre sur l'emploi d'agents photosensibilisateurs dérivés de la famille des bacteriochlorines **22** (Figure No.20) et des naphthalocyanines **20** (Figure No.19), qui mettent en évidence des bandes d'absorption très intenses ( $\epsilon = 400'000 - 500'000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) dans la région infrarouge, intervalle où la mélanine absorbe très faiblement; par conséquent, la PDT est susceptible d'être appliquée au traitement de tumeurs hautement pigmentées, telles que le mélanome, toujours plus fréquent en Europe [112].

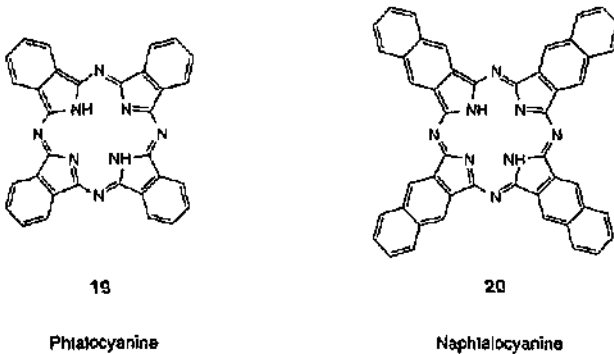


Figure No.19 : Structure d'une phthalocyanine et d'une naphthalocyanine

Vu que la pénétration de la lumière est dépendante de la longueur d'onde, il est possible d'envisager l'emploi de photosensibilisateurs préparés sur mesure pour des tumeurs d'une épaisseur donnée ou, une fois que ces photosensibilisateurs sont fixés de manière spécifique à un sérum LDL, qui permettra leur pénétration dans des tissus tumoraux avec une haute sélectivité [108]. Une autre alternative est représentée par la considération de propriétés optiques prédéfinies grâce à l'emploi de composés absorbant dans la région spectrale la plus appropriée.

**Tableau No.2** Propriétés d'absorption d'agents photosensibilisateurs potentiels dans la région spectrale rouge

Classe de photosensibilisateur	Maxima d'absorption [nm]	Coefficient d'extinction molaire [mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>2</sup> ]
<b>Porphyrine 18-π</b> (β-substituée)	630	10'000 <sup>1</sup>
<b>Porphyrine 18-π</b> (subst. en meso)	650	18'000
<b>Porphycènes</b> (isomères des porphyrines 18-π)	630-670	30'000
<b>Porphyrines 22-π</b> (porphyrines étendues)	670	130'000
<b>Porphyrines 34-π</b> (porphyrines étendues)	860	370'000
<b>Phtalocyanines</b> (non-subst. ou β-subst.)	670-690	200'000
(α-subst.)	720-760	230'000
<b>Chlorines</b>	680	40'000
<b>Bacteriochlorines</b>	780	150'000
<b>Naphtalocyanines</b> (non-subst.)	770-800	450'000
(subst. α-alkoxylées)	820-840	400'000

<sup>1</sup>Récemment, une porphyrine, substituée en β avec un groupe nitro, a montré un coefficient d'extinction molaire de 30'000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> à une longueur d'onde de 630 nm [218]

Récemment, des règles (ou conditions) ont été émises [113] pour la constitution d'un bon agent photosensibilisateur en PDT :

1. L'agent doit être un composé pur caractérisé par une synthèse reproductible.
2. Il doit pouvoir être activé à des longueurs d'onde supérieures à 650 nm, de manière à assurer une meilleure absorption de la lumière rouge qui pénètre plus profondément dans les tissus, et ainsi une meilleure sensibilisation par une source lumineuse externe.
3. Il doit être non-toxique en absence de lumière.
4. Ses états excités (en particulier l'état excité triplet) doivent être de durée de vie suffisamment longue pour lui permettre de photosensibiliser la production d'oxygène singulet (responsable de l'effet PDT).
5. Il doit être en mesure de se localiser de manière spécifique dans la tumeur.
6. Il doit pouvoir être éliminé rapidement du corps après son action.
7. Il doit être soluble dans les fluides tissulaires du corps, de manière à ce qu'il puisse être injecté et qu'il puisse être transporté à travers le corps jusqu'à l'emplacement de la tumeur.

### 2.2.1. Agents photosensibilisateurs de la deuxième génération

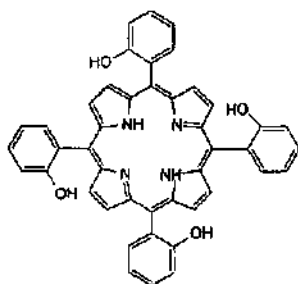
Le Tableau No.2 montre qu'il existe actuellement un nombre croissant de molécules en mesure de posséder un pouvoir photosensibilisateur. La plupart de ces molécules sont dérivées de l'agent partiellement purifié et commercialisé sous le nom de Photofrin® [114]. Comme nous l'avons vu dans la Figure No.18, ce dernier, après traitement acide de l'hématoporphyrine 18, est composé d'un mélange de plusieurs substances.

Un problème rencontré lors de l'utilisation clinique des dérivés du Photofrin® [115] est leur solubilité réduite dans un solvant essentiel comme l'eau. Un autre désavantage dans l'utilisation du Photofrin® est sa phototoxicité de longue durée sur la peau [116]; d'autre part, son absorption à plus faible énergie se situe à une longueur d'onde de 630 nm; or, la lumière absorbée à des valeurs plus élevées pénètre plus profondément dans le tissu [117].

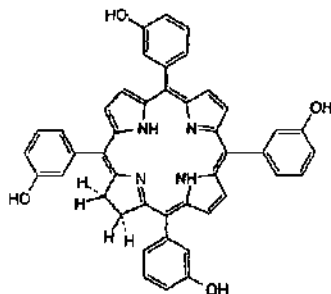
C'est pourquoi de nouveaux photosensibilisateurs, appelés agents de la deuxième génération et basés sur des systèmes porphyriques existants ont été développés. Par exemple, diverses classes de composés ont été synthétisées en se basant sur la structure de la meso-

tetrakistétraphénylporphyrine (TPP) : les porphyrines de type hydroxyphényle **23** (Figure No.20) et les chlorines **21**.

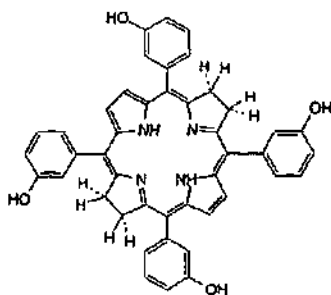
Ces composés sont caractérisés par une forte absorption à des longueurs d'onde plus élevées (643 nm pour la porphyrine et 715 nm pour la chlorine) que pour HpD ou le Photofrin® et ils sont mieux solubles dans l'eau grâce à leurs groupes hydroxyyles.

**23**

5, 10, 15, 20-Tetra(o-hydroxyphényl)porphyrine  
o-THPP

**21**

5, 10, 15,  
20-Tetra(m-hydroxyphényl)chlorine  
m-THPC

**22**

5, 10, 15, 20-Tetra(m-hydroxyphényl)bactériochlorine

Figure No.20 : Une sélection de porphyrines et de porphyrines réduites issue de la série des *meso*-tetra(hydroxyphényle)

Les chlorines **21**, regroupées sous le nom commercial Foscan® [240,241], représentent des agents PDT particulièrement prometteurs du fait qu'elles absorbent beaucoup plus fortement dans l'extrémité rouge du spectre visible. La Figure No.21 rassemble certains dérivés de la chlorine régulièrement appliqués en PDT clinique.

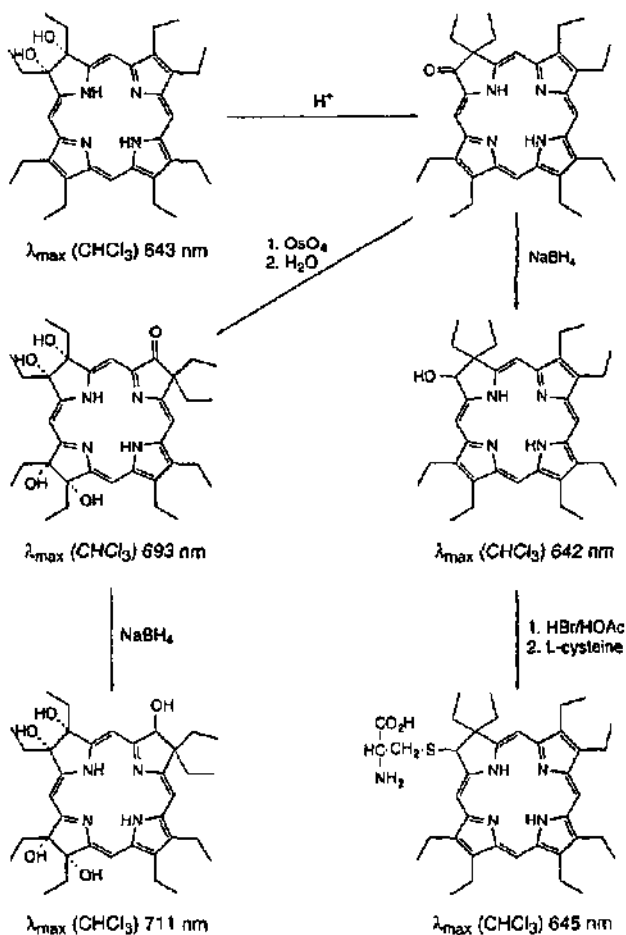


Figure No.21 : Synthèse de chlorines  $\beta$ -hydroxylées et  $\beta$ -cétosubstituées pour leur utilisation en PDT

Des sept conditions énumérées plus haut, une a particulièrement préoccupé l'esprit des chimistes : l'assurance que le chromophore absorbe à des longueurs d'onde élevées. La réduction d'une des double-liaisons du macrocycle pour donner les chlorines ci-dessus représente une des stratégies concluantes.

Une autre stratégie est celle de substituer les pyrroles avec des cycles aromatiques. Ainsi, les phthalocyanines 19 ont été étudiées intensivement : elles absorbent typiquement dans la région 675 - 700 nm et l'introduction de groupes de type sulfonate leur confère une solubilité dans l'eau. En revanche, comme nous l'avons expliqué plus haut, leur complexation par un métal

diamagnétique augmente leur phototoxicité (les phthalocyanines sont non-toxiques en l'absence de lumière). L'extension du cycle représente un défi intéressant pour le chimiste de synthèse. En effet, des systèmes étendus de porphyrines, tels que les saphyrines, les pentaphyrines, les porphycènes, les texaphyrines et des vinylogues de porphyrines ont été préparés (Figure No.22). En plus d'être intéressants dans le cadre de considérations théoriques (ils représentent un défi à la validité de la règle  $[4n + 2]$  de Hückel à propos de l'aromaticité, puisque certaines de ces architectures, comme les pentaphyrines, possèdent  $22 e^- \pi$ ), ils sont tous caractérisés par une absorption à des longueurs d'onde élevées et se présentent donc comme agents PDT potentiels [118].

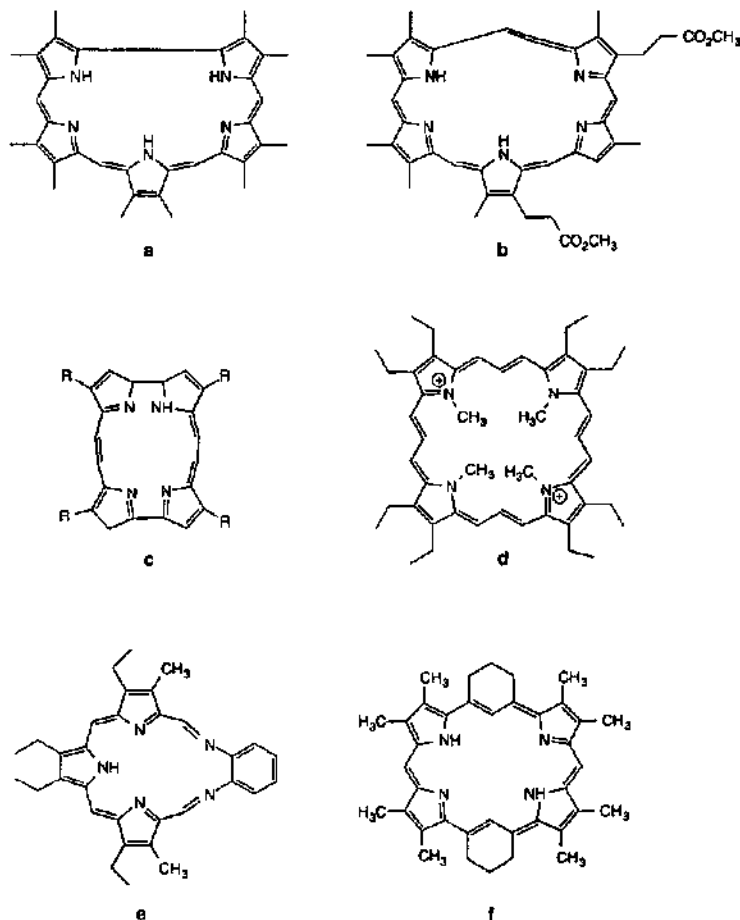


Figure No. 22 : Une sélection de porphyrines "étendues" : (a) saphyrine, (b) pentaphyrine, (c) porphycène, (d) vinylogue porphyrine, (e) texaphyrine (et son complexe avec le lutetium : Lu-Tex [241]), (f) platyrine

Une des difficultés principales rencontrées dans l'utilisation de la plupart de ces photosensibilisateurs est que leur spécificité pour les cellules tumorales n'est pas optimale. Par exemple, dans le cas des phthalocyanines solubles dans l'eau, cette spécificité n'est que de 4 : 1 par rapport aux cellules saines. Cela signifie que, durant l'exposition à la lumière, les tissus sains sont également susceptibles de subir certains dommages photoinduits.

La recherche de nouvelles structures de ce type est évidemment en constante évolution [119], le but final étant d'isoler un composé le plus efficace possible dans le cadre d'une application clinique. Cette recherche passe principalement par l'optimisation de plusieurs paramètres, tels que l'absorption, le transport dans l'organisme, la toxicité ou la sélectivité.

### 2.2.2. Emplacement des photosensibilisateurs

Pourquoi les sites cellulaires/tissulaires dans lesquels se loge le photosensibilisateur sont-ils de première importance ? Afin de rendre l'optimisation d'un médicament plus abordable, il est généralement préférable d'identifier une cible. Une étude systématique des relations structure-activité peut alors simplifier le traitement thérapeutique.

Au cours du développement de nouveaux sensibilisateurs, des études sur l'emplacement au niveau tissulaire et sous-cellulaire peuvent être effectuées. A ce propos, un résumé d'informations acceptées au sujet des sites de localisation a récemment été publié [120]. Les mitochondries, les lysosomes, les membranes plasmatiques ainsi que les noyaux des cellules tumorales ont été évalués en tant que cibles PDT potentielles.

Puisque la majeure partie des agents photosensibilisateurs est fluorescente, l'emplacement du principe actif peut être déterminé à l'aide de la microscopie par fluorescence [120]. Un système très sensible est toutefois nécessaire, du fait que le photoblanchiment (voir signification dans la partie 3.5.) est en mesure de gêner l'acquisition d'images et que l'emploi d'irradiations trop puissantes peut provoquer des dégâts et une relocalisation du colorant. Le rendement de fluorescence peut, lui, varier avec le site de liaison, si bien que les emplacements du dommage causé par la PDT sont susceptibles de ne pas être localisés exactement à l'aide de la fluorescence. Etant donné que le produit cytotoxique (oxygène) n'est en mesure de migrer que de 0.02  $\mu\text{m}$  au maximum après sa formation, les sites des dégâts sont représentatifs de l'emplacement du photosensibilisateur au moment de l'irradiation. C'est pourquoi un grand nombre d'études sont conduites au niveau des sites sous-cellulaires pour des altérations provoquées par la PDT et qu'elles ne se contentent pas de rechercher des sites de liaison pour le sensibilisateur. Une série de rapports [121,122] ont étudié les mitochondries comme cibles d'un dommage provoqué par la PDT. En accord avec ces observations, une sous-ligne cellulaire sélectionnée pour sa résistance à la PDT a montré des altérations mitochondriales de grande envergure [123].

A l'occasion d'une des premières études systématiques, Henderson et al. [124] ont examiné les relations structure-activité au sein d'une famille de pheophorbides. D'une part, ils ont démontré l'importance du caractère hydrophobe du photosensibilisateur. D'autres études [125] ont suggéré qu'un facteur encore plus important est représenté par l'affinité de ces agents pour un site de liaison du plasma en mesure de se lier également aux benzodiazépines. Mais les données récoltées jusqu'à maintenant ne permettent pas d'affirmer quelle hypothèse est la plus représentative pour un traitement PDT efficace.

### 2.3. Dommages sur des cibles sous-cellulaires

Du fait de la migration limitée de l'oxygène à partir du lieu de sa formation, les sites du dommage cellulaire/tissulaire causé par la PDT sont en relation directe avec l'emplacement du sensibilisateur [120]. Les sensibilisateurs les plus hautement sélectifs sont la porphyrine monocationique pour les membranes [126] et le monomère porphycène (voir Figure No.22) pour les mitochondries [127]. Les sensibilisateurs qui ne sont pas assimilés par les cellules, comme par exemple l'uroporphyrine, sont extrêmement peu actifs, malgré le fait que certains d'entre eux sont caractérisés par un rendement en oxygène singulet.

En outre, puisque la plupart des sensibilisateurs ne s'accumulent pas dans le noyau cellulaire, la PDT a généralement peu de probabilités de causer des dégâts au niveau de l'ADN, et de provoquer ainsi des mutations [103]. Les sensibilisateurs situés dans les mitochondries, comme le Photofrin<sup>®</sup>, ou alors produits au sein des mitochondries, comme la PpIX dérivée de ALA, sont en mesure de déclencher le phénomène d'apoptose [128], alors que les sensibilisateurs localisés au sein de la membrane plasmique sont susceptibles de provoquer une nécrose lors de l'exposition à la lumière. Les sensibilisateurs hydrophyles, pour leur part, sont susceptibles d'être absorbés par endocytose, raison pour laquelle ils se situent préférentiellement dans les lysosomes. L'exposition à la lumière est donc en mesure de provoquer une perméabilité de ces derniers qui permet ainsi aux sensibilisateurs et aux hydrolases d'être libérés au sein du cytosol. Des colorants présents dans ce dernier sont alors en mesure de rendre la tubuline sensible à un dommage provoqué par la PDT [129]. Ce phénomène conduit à l'accumulation de cellules au niveau de la mitose, et peut mener à la mort cellulaire [130]. A noter que la probabilité d'inactivation cellulaire en fonction de la quantité de lumière absorbée varie selon le sensibilisateur PDT considéré [130].

Un dommage causé par la PDT à la membrane plasmique peut être observé quelques minutes seulement après l'exposition à la lumière. Ce type de dégât se traduit, entre autres, par des gonflements [131], par une réduction sensible du transport actif [132], par une dépoliarisation de la membrane plasmique [133], par l'assimilation marquée d'un photosensibilisateur [134].

par l'inhibition de l'activité de certains enzymes présents dans la membrane, comme la  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  - adénosine triphosphatase (ATPase) et la  $\text{Mg}^{2+}$  - ATPase [135], par la peroxydation de lipides [136] pouvant mener à la réticulation des protéines [137], ou encore par des dommages causés aux transporteurs non spécifiques ("multidrug transporters") [126].

## 2.4. Fonctionnement physico-chimique de la thérapie photodynamique

Suite à l'application d'un photosensibilisateur, les zones cancéreuses traitées sont exposées à la source lumineuse. La longueur d'onde du laser est choisie avec un soin particulier, de manière à assurer l'activation de l'agent. Il faut tenir compte du fait que, lorsqu'un rayon lumineux traverse un objet, par exemple une cellule, plusieurs phénomènes optiques sont possibles : la réflexion, la transmission, la dispersion, l'absorption ou une combinaison des quatre. Dans le cas de la PDT, le phénomène exploité est l'absorption; il est donc impératif d'optimiser ce paramètre en sélectionnant précisément la longueur d'onde du laser. Il est également très important de connaître les propriétés d'absorptions des différents tissus, ainsi que celle du sensibilisateur, afin d'obtenir une meilleure efficacité et sélectivité.

L'agent photosensibilisateur accumulé dans les cellules traitées absorbe donc le rayon lumineux et est ensuite en mesure, après "intersystem crossing ou ISC", soit d'émettre de la phosphorescence, soit de produire une forme très active de molécules d'oxygène : l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ , destructeur de cellules (les effets du mécanisme du type I sont négligeables). L'explication de la production de l'oxygène singulet peut être illustrée par un diagramme de Jablonski simplifié (Figure No.23) [138].

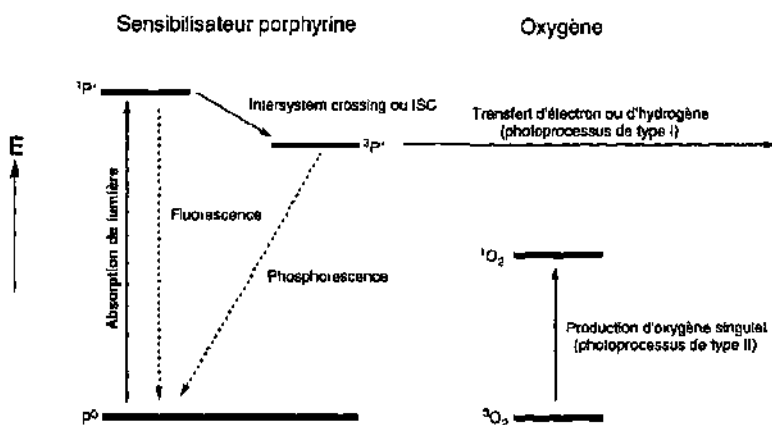


Figure No.23 : Diagramme de Jablonski

Dans le cas présent, l'exposition d'un agent photosensibilisateur à la lumière adéquate provoque son passage à l'état singulet excité ( $^1P^*$ ). Ce dernier peut alors revenir à son état initial en dispersant son excès d'énergie sous la forme de fluorescence (conversion interne ou IC). Dans ce cas, lors du traitement du patient, les cellules cancéreuses peuvent être détectées (on parle alors de détection photodynamique ou PD), mais leur élimination demande une autre technique.

Mais si les conditions pour le chromophore, c'est-à-dire : (a) le temps de vie de l'état triplet excité ( $^3P^*$ ) est suffisamment long (de l'ordre de plusieurs microsecondes) et (b) l'"intersystem crossing ou ISC" (ce processus est généralement interdit car il implique une inversion de spin) est caractérisé par un bon rendement<sup>1</sup>, sont remplies, comme pour les porphyrines, l'état singulet est en mesure d'être converti en état triplet excité ( $^3P^*$ ). L'énergie stockée par ce dernier peut alors être transférée à un autre état triplet. Or, une des rares molécules à posséder un état triplet fondamental stable est l'oxygène ( $^3O_2$ ) trouvé en abondance au sein de toutes les cellules. Le transfert d'énergie du photosensibilisateur à l'oxygène provoque le passage de l'état triplet stable de l'oxygène à un niveau de haute énergie extrêmement toxique pour les cellules : l'oxygène singulet  $^1O_2$  (ce phénomène est défini comme étant le rendement quantique de l'oxygène singulet). Ce transfert est rendu possible par le fait que l'état  $^3P^*$  est énergétiquement plus élevé que l'état  $^1O_2$ .

Les effets de la lumière ou du rayon laser dépendent fortement de la longueur d'onde optimale requise pour initialiser la réaction<sup>2</sup>. Par exemple, le Photofrin<sup>®</sup> est caractérisé par un pic d'absorption principal vers 405 nm (bleu-violet) et par un pic d'absorption nettement plus faible (rapport d'intensités d'env. 15:1) à 630 nm (rouge). Or, étant donné que la longueur d'onde du bleu est inférieure à celle du rouge, cette dernière pénètre plus profondément dans les tissus et son application thérapeutique est par conséquent préférée.

Au moment où un rayon lumineux traverse un tissu, les théories classiques, telles que la loi de Lambert-Beer, réglant le phénomène de l'absorbance au sein des milieux homogènes ne sont plus applicables. En revanche, une nouvelle théorie, appelée "théorie de la diffusion", valable en premier lieu pour des milieux turbulents [239], peut être considérée pour une approximation suffisamment précise dans le cas de l'optique au sein des tissus.

---

<sup>1</sup>Pour avoir un bon rendement, les processus en concurrence avec l'ISC doivent être les plus faibles possibles, de manière à ce que le maximum de molécules passent à l'état triplet excité ( $^3P^*$ )

<sup>2</sup>La première condition pour observer une réaction est que la longueur d'onde du laser doit être absorbée par le photosensibilisateur

La mesure de l'atténuation du rayon lumineux est appelée coefficient d'extinction; il est donné pour une molécule à une longueur d'onde donnée (voir Tableau No.2). Il peut être mesuré à plusieurs longueurs d'onde simultanément et un graphique représentant le spectre d'absorption en fonction de la longueur d'onde peut en être déduit.

En résumé, il est nécessaire de considérer deux phénomènes : l'absorption de la lumière par le photosensibilisateur et la pénétration de la lumière à travers les tissus pour aboutir à ce même photosensibilisateur. Idéalement, l'agent devrait absorber à une longueur d'onde infrarouge, de manière à ce que l'énergie d'activation pénètre le plus profondément possible et ainsi permettre un traitement en profondeur des tumeurs.

## 2.5. Utilisation thérapeutique de la PDT

La thérapie photodynamique a comme origine la recherche de moyens de posséder des techniques permettant de localiser et de détruire les tumeurs. Dans la lutte contre le cancer, il est impératif d'agir le plus rapidement possible, de façon à augmenter les chances de réussite du traitement. Cependant, dans la plupart des cas, les tumeurs ne peuvent être décelées que très difficilement à un stade précoce.

La propriété qu'ont certaines porphyrines d'être accumulées en grosses quantités et d'être conservées pour de longues périodes dans des tissus tumoraux est connue depuis le début de ce siècle [95]. Il a été démontré plus tard [107] que la haute affinité des porphyrines pour les tumeurs est en fait à mettre en relation avec leur affinité pour le sérum du type LDL.

L'emplacement préféré des porphyrines a été déterminé principalement pour tous les types de tumeurs solides [112], plus particulièrement pour celles caractérisées par une vitesse de prolifération cellulaire élevée. C'est pourquoi la PDT impliquant l'emploi de porphyrines ou de photosensibilisateurs de la deuxième génération est appliquée de nos jours pour le traitement de tumeurs d'un grand nombre de sites anatomiques; la lésion néoplasique est irradiée directement avec un laser dans le cas de tumeurs de la peau, alors que pour des tumeurs localisées dans des cavités atteignables depuis l'extérieur (par ex. bronches, oesophage, vagin), le rayon lumineux est amené sur la lésion à l'aide d'une fibre optique couplée avec une source laser.

Le traitement PDT est habituellement efficace dans le cas de tumeurs dont le diamètre n'exécède pas 2 cm, alors qu'il peut être appliqué à titre palliatif dans le traitement de masses néoplasiques plus épaisses [112,139]. Les applications usuelles de la PDT comprennent l'ouverture de voies bloquées ou la réduction d'une tumeur cérébrale, en particulier chez les patients ne pouvant pas être opérés rapidement. Dans ce contexte, une synergie positive peut

être obtenue en appliquant la PDT de manière intraopératoire, par exemple immédiatement après la limitation chirurgicale de la lésion néoplasique. Il est important de souligner que des patients traités par PDT peuvent profiter d'une qualité de vie supérieure à celle de la plupart des patients traités par radio- ou chimiothérapie. Cette propriété rend cette technique photothérapeutique encore plus attractive, même si elle ne conduit pas forcément à une espérance de vie plus longue ou à un intervalle de temps plus large avant une éventuelle rechute. L'absence d'effets secondaires graves (exception faite d'une photosensibilité cutanée généralisée pouvant durer 3-4 semaines) permet en outre la répétition du traitement, ce qui peut être utile dans le cas de lésions multiples ou de néoplasies avec métastases.

Le traitement PDT classique implique [139] l'administration par voie intraveineuse de doses du photosensibilisateur variant d'env. 2.0 mg/kg de poids pour les porphyrines à 0.1 - 0.5 mg/kg de poids pour des photosensibilisateurs plus récents. Ces quantités sont bien inférieures aux doses de porphyrines nécessaires (300 - 500 mg/kg) pour entraîner des effets toxiques dans le corps humain. L'irradiation est appliquée 24 - 48h après l'injection, de façon à permettre une élimination plus rapide des porphyrines au sein des tissus péri-tumoraux.

Des rapports de concentration de photosensibilisateur du type tumeur/tissu sain supérieurs à 10 peuvent être atteints en appliquant un traitement adéquat, ce qui garantit également des dégâts sélectifs au niveau de la tumeur ou, au moins, n'exclut pas une guérison rapide du tissu sain péri-tumoral. Un paramètre important est représenté par le degré d'irradiation, qui doit être maintenu en-dessus des 200 mW/cm<sup>2</sup> de manière à éviter l'intervention brutale d'effets thermiques, qui pourraient prendre le dessus sur les processus photochimiques et ainsi limiter la sélectivité des dégâts au niveau de la tumeur.

Les développements les plus récents permettent d'envisager la possibilité d'introduire une certaine flexibilité au niveau des traitements PDT connus jusqu'à maintenant. Des études pharmacocinétiques conduites à l'aide d'une série de dérivés du type porphycène (voir Figure No.22) montrent qu'une tetraméthoxylation induit une augmentation sensible de la vitesse de disparition du photosensibilisateur dans les tissus néoplasiques et dans les tissus sains; aucun agent résiduel n'est détecté dans l'organisme 60 min. après l'injection [140]. De cette manière, le traitement PDT peut être appliqué plus rapidement après l'administration systémique<sup>1</sup> du photosensibilisateur, alors que ses problèmes de photosensibilité cutanée sont écartés.

---

<sup>1</sup>On parle d'application systémique quand le photosensibilisateur est administré au patient, soit par injection, soit par voie orale. Quand le photosensibilisateur est appliqué directement sur la zone à traiter, par exemple en remplissant un organe creux ou en l'appliquant sous forme d'émulsions pour les traitements de la peau, on parle d'application topique

La technique PDT est particulièrement indiquée pour le traitement de tumeurs bénignes des poumons, du fait qu'elle préserve le fonctionnement pulmonaire, et qu'elle peut donc être répétée aussi longtemps qu'une récurrence est observée, mais également parce qu'elle n'exclut pas l'éventualité d'intervention chirurgicale. Chez des patients atteints de tumeurs bénignes aux poumons de moins de 2 ans, l'apparition de métastases au niveau du nœud lymphatique s'est avérée basse, voire inexistante, ce qui rend adéquat l'emploi de traitements modérés [141].

Edell et Cortese [142] ont rapporté les résultats obtenus avec un groupe de 13 patients atteints de 14 types de cancers bénins des poumons. Ces patients ont subi des séances d'irradiation à 630 nm de 200 - 400 J/cm<sup>2</sup>. Deux à quatre jours après l'injection de 2.5 mg/kg de HpD. Onze tumeurs ont réagi après un seul traitement et les trois restantes après un second traitement; 77% des tumeurs n'ont montré aucune récurrence après une période de 7 à 49 mois. D'autre part, aucune complication substantielle n'a été observée chez les patients traités. Seuls trois individus ont présenté une réaction contenue de photosensibilisation. Les auteurs ont donc conclu que la PDT représente une alternative idéale à une intervention chirurgicale pour des patients souffrant de tumeurs bénignes de la peau.

Furuse et al. [143] ont rapporté les résultats obtenus sur 54 patients souffrant de 64 types de cancers bénins des poumons. Le traitement a inclut l'emploi de Photofrin® (2.0 mg/kg) et des séances d'irradiation de 100-200 J/cm<sup>2</sup> à 630 nm. Des 59 tumeurs évaluées, 50 ont été considérées comme réponse complète, six comme des réactions partielles et trois sans réponse. Cinq des réponses complètes ont montré une récurrence 6 à 18 mois après le traitement. Une condition pour une éventuelle réaction était représentée par la longueur de la tumeur, où celles inférieures ou égales à 1 cm ont conduit au même résultat. La survie générale des patients a été de 50% après une période d'environ 3 ans.

Kato et al [144], eux, ont décrit une étude impliquant une combinaison Photofrin® - PDT appliquée à 95 lésions chez 75 patients traités pour des cancers bénins des poumons. La proportion de réponse complète a été mis en relation avec la taille de la tumeur, avec une proportion de 96.8% pour des lésions inférieures à 0.5 cm, mais de seulement 37.5% pour des lésions supérieures à 2 cm. Le taux de survie à 5 ans des 75 patients, à comparer avec les prévisions calculées selon l'analyse de Kaplan-Meier, a été de 68.4%.

## 2.6. Les nouvelles applications de la PDT

Les études des mécanismes intervenant dans le transport des porphyrinoïdes à travers les tissus et leur distribution parmi les structures sous-tissulaires et sous-cellulaires ont permis de réunir

un large éventail d'informations, qui sont actuellement évaluées afin d'élargir les domaines d'application de la PDT [145].

En général, chaque application présentée se base sur la haute affinité des porphyrines et de leurs analogues pour les cellules en mesure de déclencher un phénomène d'hyperprolifération : c'est l'explication des résultats encourageants obtenus à l'occasion d'essais expérimentaux impliquant la PDT de la psoriasis.

D'autre part, le contrôle du comportement pharmacocinétique de ces photosensibilisateurs offre la possibilité [146] de se servir de la PDT, par le biais d'une méthodologie non-invasive incluant une irradiation externe de segments définis de veines sélectionnées directement après l'injection systémique du photosensibilisateur, dans la photostérilisation du sang en cas d'infections virales.

En réalité, les porphyrines s'associent rapidement et spécifiquement aux lymphocytes activés, alors que leur accumulation dans la peau n'atteint des niveaux significatifs qu'après des périodes de trois heures; cela laisse un espace temporel suffisamment large pendant lequel l'illumination transdermale peut se dérouler sans causer de dommages significatifs aux tissus traités. Le filtre optique causé par l'absorbance de l'hémoglobine est négligeable.

Il est probable et souhaitable que d'autres applications de la PDT du même type seront développées au fur et à mesure que nos connaissances des divers facteurs physiques, chimiques et biologiques inhérents à cette technique seront approfondies.

---

### 3. La thérapie photodynamique avec l'acide 5-aminolévulinique et ses dérivés en tant que photosensibilisateurs

Comme il l'a déjà été souligné plus haut, la technique de la PDT peut être considérée comme un traitement "doux", dans lequel le mode d'irradiation et l'agent photosensibilisateur sont tous deux relativement inoffensifs. En effet, dans la PDT, il n'est question ni de radiation ionisante ni de lumière UV; d'autre part, la réaction permettant de générer de l'oxygène singulet n'affecte en rien l'ADN, au contraire de la thérapie PUVA.

Il existe toutefois certaines limitations dans ce procédé photodynamique. Tout d'abord, la lumière visible considérée pour exciter le photosensibilisateur est désavantagée par un pouvoir de pénétration très limité (env. 1 cm) dans les tissus de nature humaine. C'est la raison principale pour laquelle la PDT est généralement limitée au traitement de lésions superficielles. Deuxièmement, de nombreux photosensibilisateurs artificiels ont tendance à être partiellement retenus, pour une période pouvant aller jusqu'à plusieurs semaines, au sein des tissus normaux. Par conséquent, des patients traités par PDT doivent éviter une exposition prolongée à la lumière vive pendant plusieurs semaines après le traitement. Il est important de noter que cette photosensibilité prolongée de la peau peut s'avérer cumulative. Ainsi, si une première médication n'a pas permis une éradication satisfaisante de la tumeur, le nombre de traitements PDT subséquents est limité par le temps nécessaire à la guérison de la lésion.

Afin d'élargir le domaine d'application de la PDT, la recherche de cette dernière décennie s'est concentrée en particulier sur le développement de photosensibilisateurs en mesure d'absorber à des longueurs d'ondes plus élevées, ce qui rendrait le traitement plus efficace en profondeur.

D'autres efforts se sont également portés sur la manière de diminuer cet effet de phototoxicité prolongée sur la peau. Ce travail de grand envergure a finalement conduit à l'idée de s'intéresser à des précurseurs d'agents photosensibilisateurs efficaces, la stratégie se traduisant par l'emploi d'un composé ne présentant à priori aucune propriété intéressante, mais qui, à travers une ou plusieurs étapes biosynthétiques, est en mesure de conduire à un agent photosensibilisateur efficace et sélectif. Dans ce contexte, il est curieux de relever qu'une porphyrine rapidement éliminée, telle que celle présente dans nos propres corps (la PpIX) ait été ignorée. En fait, la raison de cette lacune réside dans les résultats trompeurs issus d'études *in vitro*, au cours desquelles le caractère hydrophile des groupes périphériques présents chez plusieurs porphyrines serait à mettre en relation avec les délais de disparition de ces dernières. En effet, au sein de systèmes *in vivo*, PpIX est éliminée très rapidement des tissus normaux en étant partiellement convertie en hème.

C'est la raison pour laquelle ALA, précurseur unique de l'hème et à la base de la formation de la PpIX, a été récemment reconnu en tant qu'excellent agent PDT. Mais avant de discuter cette technique photodynamique novatrice plus en détails, il est nécessaire de situer et de caractériser les structures et les chromophores dans un contexte biosynthétique.

### 3.1. La biosynthèse des pigments de la vie

#### 3.1.1. De la glycine à l'Uroporphyrinogène III

Un regard attentif aux structures des principaux pigments de la vie (nom créé par le Professeur A. Battersby à l'Université de Cambridge [4]), c'est-à-dire, entre autres, l'hème, la chlorophylle, la bacteriochlorophylle et la vitamine B<sub>12</sub>, met en relief leurs liens de parenté (voir Figure No.2). En effet, ils se composent tous d'un cycle tetrapyrrolique, caractérisé par un degré de saturation variable selon le macrocycle considéré, et ils sont tous substitués de manière plutôt inhabituelle au niveau de leurs carbones périphériques en position  $\beta$ . La PpIX, par exemple, affiche trois types différents de substituants en  $\beta$  : des groupes méthyle, vinyle et des chaînes latérales propioniques.

Dans les tissus des mammifères, la biosynthèse de l'hème se déroule en huit étapes distinctes catalysées par un enzyme (Figure No.24). Ces étapes se déroulent dans deux parties distinctes de la cellule : la mitochondrie, où la plupart des réactions métaboliques ont lieu, et le cytosol, qui est simplement la phase aqueuse se trouvant au sein du cytoplasme.

La première étape de la voie biosynthétique est la condensation d'un intermédiaire du cycle de l'acide citrique, le succinyl coenzyme A (CoA) avec l'acide aminé le plus simple, la glycine<sup>1</sup>. Le premier produit issu de cette condensation est ALA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme *ALA synthase* et par le cofacteur pyridoxyl phosphate. La synthèse de ALA se déroule entièrement au sein de la matrice de la mitochondrie et elle est finement réglée, tout d'abord par le contrôle de l'enzyme catalyseur, puis par le contrôle du transport de l'enzyme

---

<sup>1</sup>Le cycle de l'acide citrique est aussi connu sous le nom de cycle de Krebs. C'est une séquence cyclique de réactions biochimiques fondamentales pour le métabolisme d'organismes aérobiques. Les enzymes du cycle de Krebs sont situés dans la mitochondrie et s'associent étroitement avec les enzymes impliqués dans la chaîne de transport des électrons. La découverte de la glycine en tant que point de départ de la biosynthèse de l'hème chez les animaux se base sur les travaux de Shemin qui, en 1945, tenta l'expérience d'avaler 66 grammes de glycine marquée au <sup>15</sup>N sur une période de trois jours. Il préleva alors régulièrement de son sang, isola l'hème et prouva que les atomes d'azote marqués se retrouvaient dans la structure de la porphyrine [3].

du cytosol à la mitochondrie, et finalement par l'inhibition de l'ALA synthase par le produit final, l'hème.

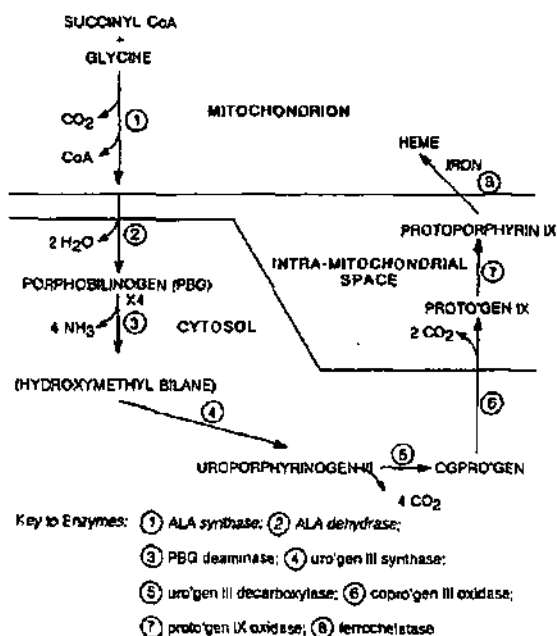


Figure No.24 : Vue d'ensemble et localisation de la biosynthèse de l'hème

La voie menant à ALA est appelée voie de Shemin. ALA est un meilleur précurseur de l'hème que la glycine, la preuve étant apportée par des expériences de marquage au  $^{14}\text{C}$  et au  $^{15}\text{N}$ . Récemment toutefois, il a été mis en évidence que les plantes, les algues, ainsi que les bactéries anaérobiques fabriquent ALA par une autre voie : directement à partir d'acide glutamique [147], via le 2-oxoglutarate selon un chemin qu'on a baptisé voie  $\text{C}_3$  (Figure No.25). Il est possible que cette dernière soit une forme ancestrale de la biosynthèse de ALA, adaptée pour des organismes ne possédant pas de cycles de l'acide citrique complets et survivant dans une atmosphère anaérobique. En fait, c'est seulement une fois que les taux d'oxygène ont augmenté et que les organismes aérobiques sont devenus dominants, que la voie Shemin menant à ALA serait apparue. Les chloroplastes seraient censés avoir évolué à partir d'organismes de même origine que les cyanobactéries anaérobiques. Afin de survivre dans une atmosphère oxygénée, ils se sont liés en symbiose parfaite avec des organismes aérobiques et ont finalement été incorporés au sein des plantes. C'est une explication plausible au fait que les plantes exploitent la voie  $\text{C}_3$  pour produire ALA.

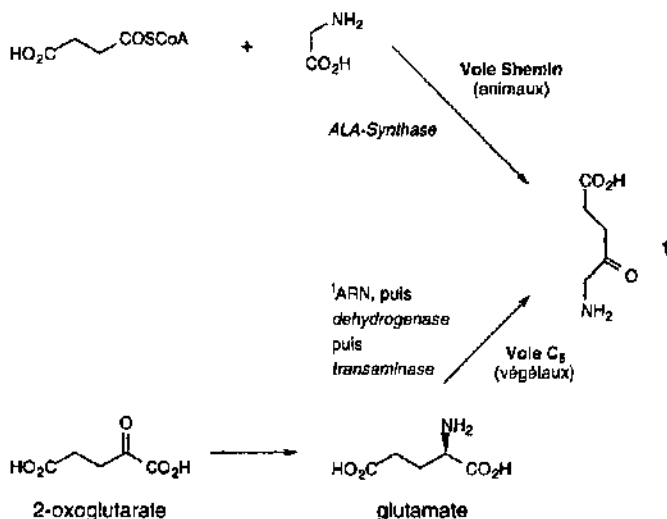


Figure No.25 : Les deux voies biosynthétiques menant à ALA

Le pas suivant dans la biosynthèse de l'hème est représenté par la condensation de deux molécules de ALA, via l'enzyme *Porphobilinogène synthase* (ici noté *ALA déhydratase*), pour donner le pyrrole nommé porphobilinogène (ou PBG). Ce composé a été identifié pour la première fois dans l'urine de patients souffrant de porphyrie. Un point important au niveau de la biosynthèse du PBG est qu'elle est très similaire aux méthodes de synthèses habituelles de pyrroles au laboratoire, c'est-à-dire la synthèse de pyrroles selon Knorr [148] (Figure No.26).

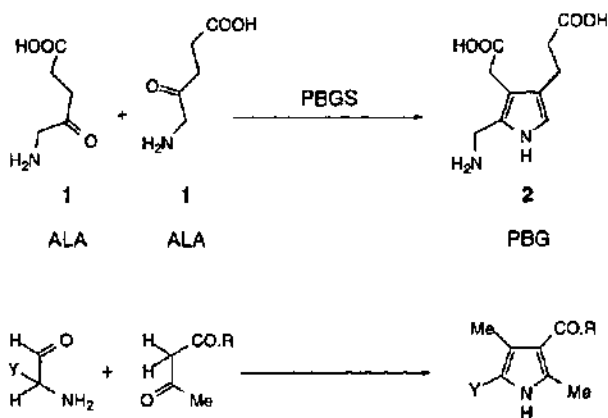


Figure No.26 : Formation du PBG et comparaison avec une synthèse de pyrrole du type Knorr

La formation de PBG est ensuite suivie de la condensation en deux étapes de quatre molécules de PBG pour conduire à l'Uroporphyrinogène III (les porphyrinogènes sont en fait des porphyrines réduites). C'est ici que la substitution insolite en  $\beta$  est rencontrée pour la première fois. L'emplacement des chaînes acétiques reflète le positionnement des groupes méthyle dans la PpIX. La condensation des quatre unités PBG nécessite non pas un, mais deux enzymes : la *PBG deaminase* et la *Uroporphyrinogène III cosynthetase*. Ce qui est fascinant dans cette étape est le fait que les quatre unités PBG identiques sont liées ensemble dans un arrangement tête-queue (cycle A à D), mais le cycle D semble avoir subi une inversion pour donner l'isomère III. Ce phénomène nécessite les deux enzymes, dans le sens qu'en l'absence de la cosynthetase, seul l'Uroporphyrinogène I (ou Uro'gène I) est produit et ce dernier ne peut être converti par la cosynthetase dans l'isomère de type III (Figure No.27)

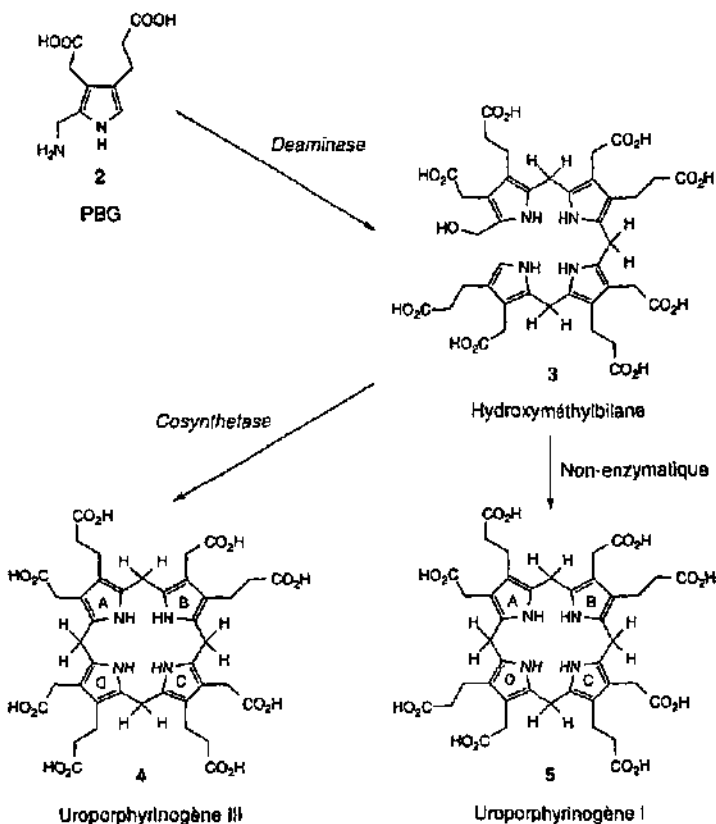


Figure No.27 : Formation enzymatique de l'Uro'gène III 4 (à noter le réarrangement intramoléculaire du cycle D) et formation non-enzymatique de l'Uro'gène I 5

### 3.1.2. De l'Uroporphyrinogène III à l'hème (Figure No.28)

Les quatre chaînes acétique subissent une décarboxylation (par l'enzyme *Uro'gen décarboxylase*) en groupes méthyle pour conduire au Copro'gen III 6. Cette première transformation est suivie de la décarboxylation oxydative des deux chaînes propionique substituées sur les cycles A et B en groupes vinyle (via l'enzyme *Copro'gen oxydase*) pour conduire au Pro'togen IX 7.

L'oxydation de ce dernier en PpIX 8 est alors catalysée par la *pro'togen oxydase*, suivie par l'insertion de fer catalysée par un enzyme très semblable : la *ferrochelatase* [149]. A noter que ces deux enzymes sont liés à la membrane mitochondriale interne.

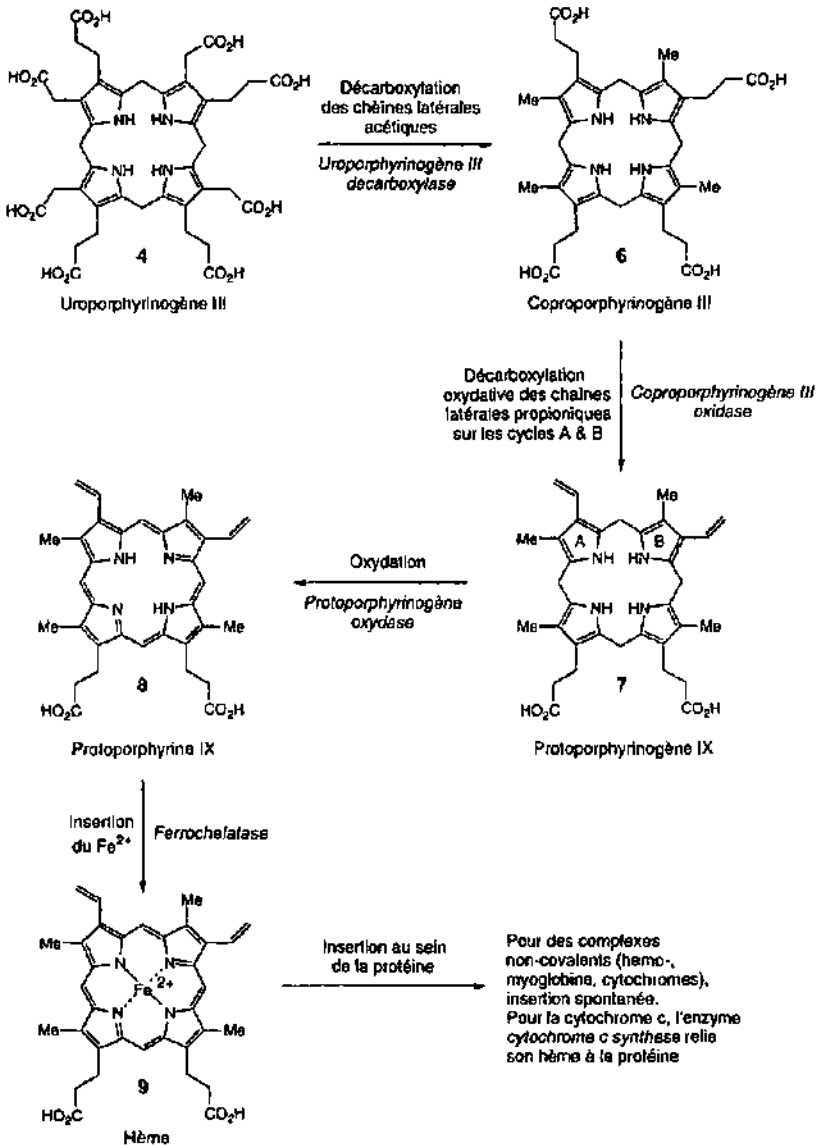


Figure No.28 : De l'Uro'gène III à l'hème

L'hème est alors inséré au sein d'une protéine pour devenir une hémoprotéine. Dans le cas d'hèmes liés de manière non-covalente (par exemple dans l'hémoglobine, la myoglobine, les

cytochromes b et P450, la catalase et les peroxydases), l'association entre l'hème et l'apoprotéine est spontanée et ne requiert par conséquent aucun catalyseur. En revanche, les hèmes liés de manière covalente (par exemple dans la cytochrome c) nécessitent une catalyse enzymatique pour former les liens de type thioéther avec les groupes vinyle de l'hème. L'enzyme permettant cette opération, la *cytochrome-c synthase*, est localisée, soit sur la face externe de la membrane mitochondriale interne, soit dans l'espace intermembranaire [150].

### 3.1.3. De l'Uroporphyrinogène III à la chlorophylle (Figures No.29 & No.30)

La biosynthèse des chlorophylles [151] diverge de celle de l'hème à l'étape d'insertion du métal. En effet, dans le cas présent, un ion de magnésium est inséré au sein de la PpIX par un enzyme peu connu, appelé *magnesium chelatase*, opération suivie de l'estérfication de la chaîne latérale propionique substituée sur le C-13 par transfert d'un groupe méthyle à partir de la *S*-adényl-méthionine (SAM). Après cela, le groupe vinyle en C-8 peut ou ne peut pas être réduit en groupe éthyle, cette opération dépendant de l'espèce de la plante et de l'intensité de la lumière externe. Il est à noter que cette réduction peut intervenir également plus loin dans la biosynthèse (plus exactement au niveau des chlorophyllides).

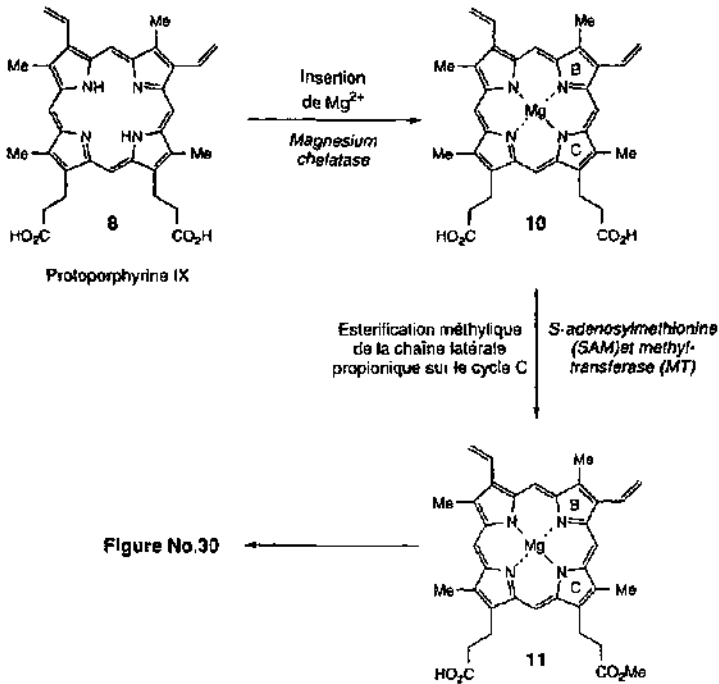


Figure No.29 : Biosynthèse de la chlorophylle à partir de PpIX

L'étape suivante est représentée par la conversion de la chaîne latérale propionique en C-13 en  $\beta$ -céto ester puis par sa cyclisation en exocycle, caractéristique des chlorophylles, pour donner la protochlorophyllide 13.

Cette étape est catalysée par une *cyclase oxydative* et requiert de l'oxygène et du NADPH. Les protochlorophyllides subissent alors une réduction photochimique via l'enzyme *protochlorophyllide reductase*, qui est NADPH-dépendante, pour conduire à la chlorophyllide 14. Il a été prouvé qu'il existe, dans certaines plantes du moins, des voies non-photochimiques permettant la réduction du cycle D.

L'étape finale dans la voie biosynthétique menant aux chlorophylles est l'estérification des chlorophyllides à l'aide du phytyl diphosphate ou du géranylgéranyl diphosphate via l'enzyme *chlorophyllide synthetase*.

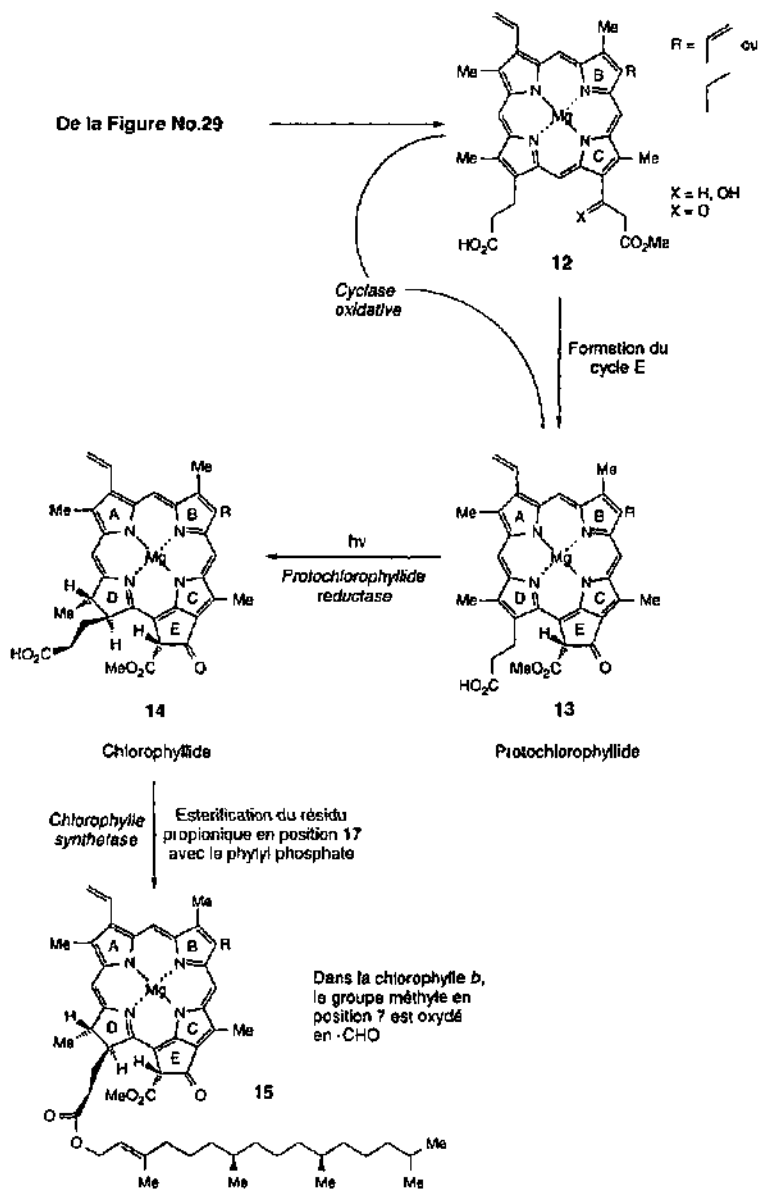


Figure No.30 : Biosynthèse de la chlorophylle : formation du cycle E, réduction du cycle D et estérification par le phytyle

En plus des deux voies biosynthétiques résumées ci-dessus, il est important de savoir qu'il existe une autre voie non-oxydative et impliquant des méthylations au niveau de plusieurs atomes de carbone du macrocycle se trouvant au centre de la vitamine B<sub>12</sub> 17.

Le fait qu'aucune réaction d'oxydation n'intervienne dans la biosynthèse de la vitamine B<sub>12</sub> est certainement relié au fait que les corrines - le nom donné au macrocycle se trouvant au centre de la vitamine - sont fonctionnellement plus anciennes que les porphyrines, étant donné que des bactéries strictement anaérobiques produisent uniquement des corrines mais pas de porphyrines [7].

#### 3.1.4. Pourquoi le modèle de substitution de type III ?

La question est de savoir pourquoi la Nature a choisi l'isomère de type III parmi les quatre isomères possibles pour l'Uro'gen en vue de construire les pigments de la vie. Certains indices peuvent être trouvés dans la manière que PBG se réarrange dans des conditions non-enzymatiques et anaérobiques.

Les quatre unités PBG s'arrangent rapidement pour former le produit cinétique Uro'gen I 5. Cependant, tous les porphyrinogènes étant acido-labiles, la conséquence est que le déroulement réactionnel devient rapidement contrôlé thermodynamiquement à travers l'isomérisation de l'architecture moléculaire et conduit à un mélange de quatre uroporphyrinogènes isomériques dans un rapport statistique de 12.5% pour le type I, 12.5% pour le type II, 50% pour le type III et 25% pour le type IV.

Eschenmoser et al. [152] ont démontré cette répartition en se servant de nitriles en lieu et place des acides aminés précurseurs du PBG (Figure No.31). Leur conclusion est que l'arrangement des chaînes latérales acétique et propionique autour de la périphérie des pigments de la vie (par exemple pour l'arrangement de type III) correspond au type de structure favorisé thermodynamiquement.

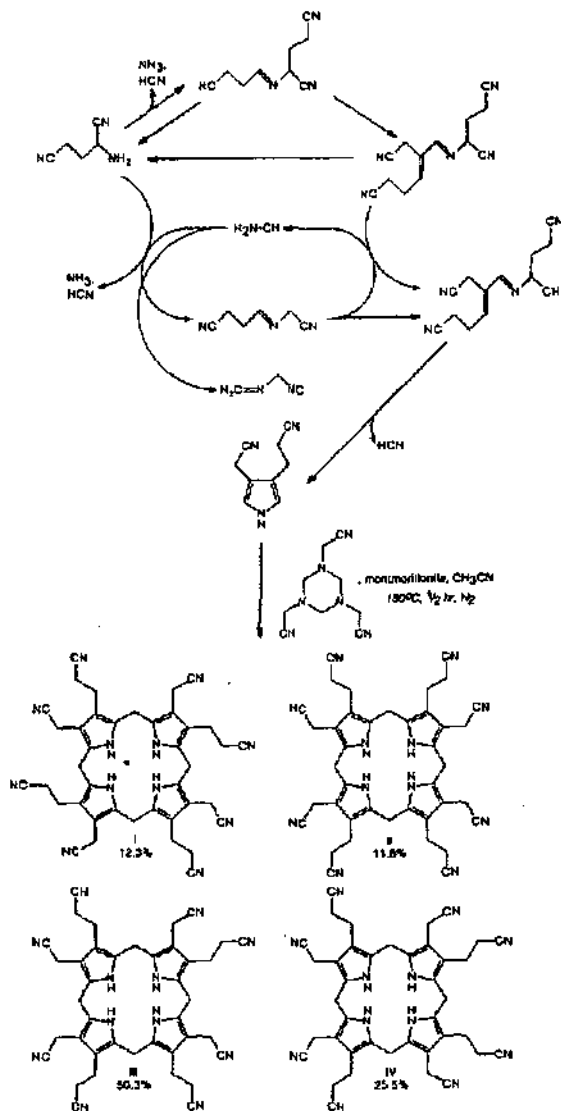


Figure No.31 : Voie prébiotique des Uro'gen (octanitriles) proposée par Eschenmoser

### 3.1.5. Réglage de la voie biosynthétique conduisant à l'hème

Tous les enzymes de la voie de l'hème agissent de manière irréversible. La voie est partiellement réglée par la disponibilité du substrat et par l'inhibition en feed-back de *ALA synthase* (ALAS). Les concentrations respectives de substrats et d'intermédiaires sont la plupart du temps inférieures aux constantes de Michaelis de tous les enzymes impliqués [153]. De tous les enzymes intervenant dans la voie biosynthétique, ALAS (ou PBGS) possède l'activité la plus faible, elle est suivie de la *PBG deaminase* (PBGD), alors que les autres enzymes sont caractérisés par des activités bien plus élevées. Au sein des cellules érythroïdes humaines, l'activité de la *ferrochelatase* est également basse, de l'ordre de trois fois supérieure à celle de ALAS [153]. Un pas de réglage important dans la voie de l'hème est lié à l'activité de ALAS (Figure No.32). L'hème est en effet en mesure d'inhiber directement l'enzyme [154] en plus de bloquer la transcription, la translation ainsi que le transport de la protéine au sein de la mitochondrie. L'inhibition directe de l'enzyme peut cependant être d'importance mineure, puisqu'elle n'intervient qu'à partir d'une concentration de  $10^{-5}$  M alors que la formation de ALAS est contrôlée à partir de  $10^{-7}$  M.

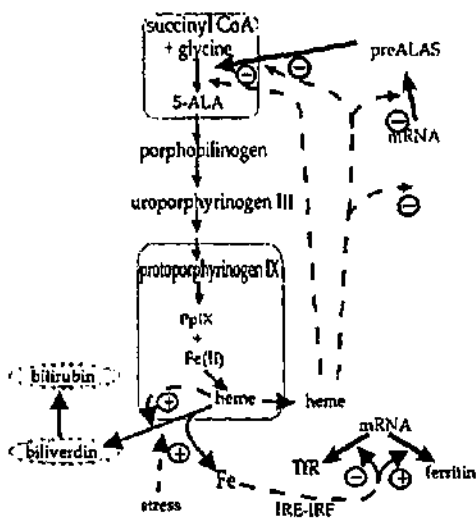


Figure No.32 : Réglage de la biosynthèse de l'hème. Les étapes biosynthétiques sont représentées par des flèches pleines, alors que les réglages sont représentés par des flèches en traits-tillés. Les signes "+" et "-" entourés indiquent les effets stimulateurs et inhibiteurs. Les mitochondries sont représentées par les boîtes grises, le noyau par l'ovale foncé et le cytosol comme surface incolore. La bilrubine et la biliverdine sont toutes deux localisées dans le réticulum endoplasmique. IRE : élément répondant du fer. IRF : facteur régulateur du fer. TfR : récepteur de la transferrine

### 3.2. Modes d'administration de l'acide 5-aminolévulinique

Lorsque des photosensibilisateurs préformés sont appliqués, leur taille moléculaire et leur solubilité empêchent certains types d'administration. Les porphyrines, les chlorines ainsi que les phthalocyanines ne peuvent que très rarement être appliquées de façon topique et sont donc généralement administrées par voie intraveineuse. Mais la plupart de ces composés ayant tendance à être retenus sélectivement dans le foie, l'application systémique comporte elle aussi certains désavantages.

En revanche, dans le cas de la technique ALA-PDT, la molécule administrée est relativement petite et bien soluble; elle peut donc être appliquée aussi bien de manière systémique [155] (soit par le biais d'injections sous-cutanées, ou intraveineuses, soit oralement) que de manière topique et locale (par le biais d'injections localisées ou par infusion dans la vessie [156], l'utérus ou dans d'autres cavités du corps). Si l'administration se fait de manière systémique, des quantités importantes de ALA sont converties en PpIX dans le foie pour être excrétées via la bile. Les doses systémiques doivent par conséquent être bien plus importantes que les doses appliquées localement afin d'obtenir le même degré de photosensibilisation.

### 3.3. Les longueurs d'onde caractérisant la lumière photoactive

Le procédé ALA-PDT est déclenché par photoactivation. La PpIX absorbe fortement vers 410 nm (bande SORET) et présente quatre bandes Q plus faibles (interdites d'après les règles de symétrie) dans le visible. La considération de différentes zones du spectre d'absorbance de la PpIX peut donc être exploitée dans diverses applications. Ainsi, dans le cas de lésions superficielles telles que la psoriasis, il est plus efficace de se servir de la bande à 410 nm. En revanche, dans le cas de tumeurs plus épaisses ou plus profondes, la dernière bande Q à 635 nm est préférée du fait de sa pénétration plus profonde dans le tissu. D'un point de vue purement énergétique, toute longueur d'onde présente dans le spectre d'absorbance de la PpIX pourrait être considérée dans un traitement ALA-PDT, puisque l'énergie absorbée à chaque longueur d'onde serait réduite jusqu'au niveau énergétique de la première bande Q (avec un peu d'énergie évacuée sous forme de chaleur). D'un point de vue clinique, il est uniquement nécessaire que la lumière active atteigne l'emplacement où le photosensibilisateur PpIX est localisé. De cette manière, la profondeur de pénétration dans le tissu atteinte par la longueur d'onde sélective devient un facteur important pour tout type de liaison traitée.

Des longueurs d'onde supérieures à 630 nm ne seraient pas trop efficaces en début de traitement, puisque PpIX n'absorbe pas à de telles valeurs. Cependant, grâce à sa photolabilité, PpIX est en mesure d'être convertie rapidement en photoproduits qui eux,

absorbent à des longueurs d'onde plus élevées. Ces photoproduits sont ensuite eux-mêmes rapidement photodégradés (ce processus est nommé photoblanchiment) et peuvent ou ne peuvent pas jouer un rôle dans la technique ALA-PDT.

### 3.4. Temps et durée de l'exposition à la lumière photoactivante

Pour le traitement de lésions cutanées, la durée optimale d'exposition pour ALA à la lumière est celle où le rapport de PpIX dans la tumeur et de PpIX dans les tissus normaux adjacents est le plus élevé, avec la condition supplémentaire que la concentration de PpIX dans la tumeur soit suffisante pour une éradication totale de la lésion. Cette durée est généralement considérée comme étant le temps nécessaire pour atteindre une fluorescence maximale. Un délai de trois heures après l'administration de ALA est souvent admis dans la technique ALA-PDT, mais des temps plus longs (16-20 heures) dans le cas d'applications topiques occasionnent des fluorescences PpIX plus fortes.

Même s'il n'est actuellement pas possible de disposer d'un traitement générique en termes d'énergie lumineuse totale libérée pour n'importe quel type de tumeur, quelques généralités peuvent être émises. Par exemple, pour des carcinomes de cellules squameuses<sup>1</sup> ou basales<sup>2</sup>, une dose de lumière libérée d'env.  $100 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  est généralement appliquée. Ainsi, en admettant une source lumineuse dans laquelle une bande entre 600 et 700 nm passe avec une puissance de  $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ , des temps d'irradiation de 15 à 30 minutes sont typiques, en fonction de l'épaisseur de la tumeur à traiter.

### 3.5. Le processus du photoblanchiment

Le phénomène de photosensibilisation, tel que nous le connaissons, implique la régénération du photosensibilisateur et le retour à son état de base au cours du processus de transfert d'énergie du photosensibilisateur excité à l'oxygène moléculaire. Vu ainsi, le

---

<sup>1</sup>Les cellules squameuses sont des cellules flexibles, qui tapissent divers organes (par ex. l'estomac). Elles assurent, d'une part une protection contre les attaques externes et, d'autre part un transport des aliments vers les intestins

<sup>2</sup>Les cellules basales se trouvent à la base des cellules squameuses et elle sécrètent les acides et les autres substances vitales

photosensibilisateur pourrait donc être considéré comme un "catalyseur", où son rôle se résumerait à la capture puis au transfert d'énergie phototonique à l'oxygène.

En réalité, le photosensibilisateur est dans la plupart du temps attaqué par l'oxygène singulet excité très réactif, conduisant ainsi à des modifications au sein de sa structure. [157-160]. PpIX est particulièrement sensible à ce type de photodégradation. Elle est en effet rapidement convertie en un ou plusieurs composés verts appelés photoporphyrines, ces dernières sont elles-mêmes rapidement transformées en entités capables d'absorber un minimum ou même pas de lumière visible (d'où le terme de photoblanchiment).

Le processus de photoblanchiment passe par la formation de photoproduits intermédiaires producteurs efficaces d'oxygène singulet. Etant donné que ces derniers peuvent être présents dans les tissus atteints durant le traitement, il est possible qu'ils soient en mesure d'agir en synergie et ainsi augmenter l'efficacité de la technique ALA-PDT. D'autre part, puisque les longueurs d'ondes nécessaires à une absorbance optimale de la part de ces photoproduits se situent dans le rouge des bandes Q caractéristiques de la PpIX, il devrait être possible d'optimiser ultérieurement le procédé ALA-PDT, en activant dans un premier temps la PpIX, puis les photoproduits issus de cette dernière dans la phase terminale de la photolyse.

Le processus complet de photoblanchiment engendre diverses conséquences sur la technique ALA-PDT. En effet, puisque la PpIX représente une des porphyrines les plus photolabiles, il est important de connaître les répercussions que le photoblanchiment peut avoir sur ce procédé. D'un point de vue clinique, il se manifeste par une perte de fluorescence au cours de la photolyse. L'extension de la durée d'exposition à la lumière activante serait par conséquent insignifiant, vu que la PpIX ne serait plus présente pour jouer le rôle de photosensibilisateur.

Alors qu'un phénomène de cette nature pourrait, dans un premier temps, sembler un facteur limitant à une bonne efficacité, il est en fait bénéfique dans le contexte d'une éventuelle phototoxicité sur la peau, puisqu'il peut être considéré comme une sécurité contre une overdose de lumière. En effet, avec l'existence du phénomène de photoblanchiment, l'effet phototoxique sur un tissu n'est quasiment plus dépendant que de la concentration de la PpIX au sein des cellules de ce tissu, et, après l'application d'une certaine dose lumineuse, la phototoxicité n'augmente plus avec l'intensification des doses lumineuses.

Par conséquent, étant donné que des tissus ne contenant qu'une quantité réduite de ALA-PpIX ne sont pas touchés suite à une exposition même prolongée à une "overdose" de lumière, il n'est pas nécessaire de diminuer l'intensité de la lumière appliquée à un tissu atteint pour préserver les tissus sains périphériques. Cela permet donc une simplification dans le dosage de la lumière en vue d'une éventuelle application clinique. Toutefois, les relations existant

entre l'intensité de la lumière activante, la consommation d'oxygène et le phénomène de photoblanchiment ne commencent que maintenant à être élucidées [161].

Un autre avantage possible du photoblanchiment est qu'il permet le traitement efficace de tumeurs plus profondes. En effet, le processus se déroule tout d'abord aux abords de la surface tissulaire, endroit où l'intensité lumineuse est la plus intense. Or, en retirant cette "couche absorbante" à la surface de la peau, la lumière activante pourrait ainsi pénétrer plus profondément dans le tissu et exciter la PpIX à des niveaux plus bas, sans toutefois causer des dégâts ultérieurs aux tissus superficiels [162].

Le partage des doses de lumière activante est également une stratégie à mettre en relation avec le processus de photoblanchiment. En effet, lorsque ALA est appliqué localement, un réservoir de ALA est alors créé dans la peau. Etant donné que la lumière activante n'a aucun effet direct sur ALA, l'existence de ce réservoir permet de remplacer rapidement la PpIX disparue suite au phénomène de photoblanchiment. De cette manière, c'est-à-dire grâce à des applications intermittentes de lumière activante, l'efficacité finale de la technique ALA-PDT peut être améliorée. Ce type d'expérience a été testé récemment [163] et s'est avéré concluant. Il est important de noter, à ce sujet, que le temps de régénération de l'oxygène au sein des tissus irradiés est un facteur important de régulation.

### 3.6. Applications cliniques de la technique ALA-PDT

C'est donc grâce aux propriétés fluorescentes de la PpIX que ALA a commencé à être utilisé dans le traitement clinique de divers types de tumeurs, principalement celles affectant la vessie. Et c'est vers la fin des années 80 que les premiers tests faisant intervenir ALA ont été développés. Le potentiel de causer une augmentation de la production de PpIX en ajoutant ALA à des cellules a alors été mis en évidence. Le premier test a été réalisé en laissant agir la solution de ALA pendant 24 heures, mais aucune fluorescence n'a été détectée. L'explication est donnée dans la période trop longue écoulée entre l'adjonction de ALA et la mesure, période durant laquelle la PpIX produite est convertie ultérieurement en hème. De nos jours, les temps d'attente [164] ont été raccourcis à 1-6 heures après une administration systémique de ALA.

En 1990, Kennedy et al. [165] ont traité, pour la première fois avec succès, des problèmes de peau grâce à la technique ALA-PDT appliquée localement. Depuis, cette nouvelle approche jouit d'un intérêt croissant et elle est actuellement examinée intensivement pour une éventuelle utilisation en tant que traitement ou/et détection d'une large gamme de tumeurs de nature superficielle [166,167]. Pour un total de 826 carcinomes superficiels touchant les

cellules basales traités à l'aide de la technique ALA-PDT appliquée localement dans neuf hôpitaux en Europe et au Canada, le taux moyen de rémission complète, partielle et d'aucune réaction a été respectivement de 87%, 5% et 8% [167].

En outre, des résultats cliniques encourageants ont été enregistrés avec différentes tumeurs malignes et non-malignes de la peau, comme les carcinomes touchant les cellules squameuses, la maladie de Bowen, la psoriasis, etc. [166,167]. Par exemple, DUSA Pharmaceuticals Inc. (Toronto, Canada) a publié récemment les résultats de deux essais cliniques parallèles en phase III faisant intervenir du Levulan™ (ALA) pour le traitement PDT de patients atteints de kératose actinique (une tumeur bénigne superficielle en mesure d'évoluer en carcinome) au visage et sur le crâne. Deux-cents quarante patients, au total, ont reçu, soit 20% de ALA de manière topique, soit un placebo pour la nuit suivie d'une irradiation à la lumière bleue d'intensité égale à  $10 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Dans les deux essais, 86%, respectivement 81% des tumeurs traitées ont été éradiquées à la suite d'un seul traitement et 94%, respectivement 91% à la suite d'un second traitement. Ces taux sont à comparer avec les 32%, respectivement 20% d'éradication observée avec le placebo.

D'autre part, du fait que ALA peut être administré directement dans les cavités naturelles de notre corps, la technique ALA-PDT peut s'appliquer également en gynécologie. Elle a en effet été employée dans l'ablation endométrique et pour empêcher l'implantation embryonique chez les animaux de laboratoire [168]. La même technique s'est avérée efficace dans le traitement clinique de carcinomes ovariens touchant la cavité vaginale. Rossi et al. [169] ont mis en évidence une efficacité *in vitro* encourageante pour des couches cellulaires issues de tumeurs d'origine cervicale, ovarienne et mammaire.

Une administration orale de ALA a d'autre part été appliquée dans le traitement PDT de cancer colorectal [170] ou de néoplasies diverses touchant le système gastro-intestinal [171,172]. Malgré le fait que d'autres tumeurs semblent, à premier abord, plus difficiles à combattre à cause de problèmes au niveau de la libération de la lumière, un certain nombre d'essais préliminaires a d'ores et déjà été conduit afin de vérifier l'efficacité de la technique ALA-PDT dans le traitement du cancer des poumons [173], des mycoses [174] et de la leucémie [175].

Les protocoles suivis pour l'application topique de la technique ALA-PDT ne sont en revanche pas optimaux dans le traitement de tumeurs nodulaires de la peau. En effet, pour un total de 208 carcinomes nodulaires touchant les cellules basales traités dans six hôpitaux, les taux moyens de rémission complète, partielle et d'absence de réaction ont été respectivement de 53%, 35% et 12% [167]. Par contre, l'application locale du P-1202 (ester méthylique de ALA), un produit développé actuellement par Photocure AS (Oslo, Norvège), a permis d'obtenir des résultats prometteurs à l'occasion d'essais cliniques récents dans le traitement de

tumeurs de la peau, en particulier dans le cas de lésions épaisses. Parmi 506 tumeurs traitées, le taux de rémission complète pour la kératose actinique (52 lésions), pour les carcinomes superficiels touchant les cellules basales (217 lésions) et pour les carcinomes nodulaires touchant les cellules basales (237 lésions) a été respectivement de 89%, 86% et 84%.

Ce taux particulièrement élevé s'explique par une production intense de PpIX dérivée du P-1202 au sein des lésions. En outre, le P-1202 produit sensiblement moins de PpIX dans les tissus sains que dans les lésions, d'où une sélectivité de la technique améliorée. En règle générale, la technique PDT impliquant l'application topique de ALA ou de son ester méthylique comporte certains avantages par rapport aux traitements conventionnels; elle est en effet non-invasive, pratique et bien acceptée par les patients; elle peut être appliquée plusieurs fois, et elle conduit à des résultats esthétiques excellents indépendamment de la taille de la tumeur.

Il n'est toutefois pas encore définitivement clair s'il n'existe pas d'effets secondaires dans l'administration systémique de ALA. Il semble pourtant que ni l'administration orale de ALA (< 60 mg/kg) ni l'injection par voie intraveineuse (< 30 mg/kg) ne conduise à des symptômes neurotoxiques, bien que certains patients présentent des nausées passagères et/ou des troubles de fonctionnement du foie [166,176].

Le traitement de patients souffrant de carcinomes touchant les cellules squameuses de la cavité orale a été publié : peu de rémissions complètes, mais les parties traitées des 12 autres patients présentant des lésions de nature dysplasique ont été soignées sans laisser aucune trace. Aucun patient ne souffrait de photosensibilité cutanée prolongée après 48 heures [177]. Barr et al. [178] ont enregistré des résultats prometteurs dans le cadre du traitement de cinq patients souffrant de dysplasie profonde au niveau de l'oesophage. Ces études suggèrent que la technique ALA-PDT appliquée de manière systémique est potentiellement intéressante pour le traitement de tumeurs précancéreuses et cancéreuses des muqueuses superficielles du tube aérodigestif et qu'elle ne présente, a priori, aucun risque de phototoxicité prolongée sur la peau [179].

### 3.7. Stabilité de ALA en solution et désavantages de la technique ALA-PDT

A l'occasion de son utilisation clinique ou lors des tests enzymatiques sur ses dérivés, ALA se trouve en solution à des pH variables. Il est par conséquent intéressant de connaître sa réactivité sous ce type de conditions [180]. Durant la préparation de solutions aqueuses de ALA à instiller dans la vessie des patients, ces dernières passent de l'incolore à une coloration jaune en quelques minutes, au moment d'être tamponnées à pH neutre. De plus, l'intensité de

la couleur diminue avec le temps et le pH décroît rapidement, même en présence du tampon phosphate. Ces variations révèlent l'existence d'une réaction chimique non-désirée mettant en jeu ALA. Les produits en découlant peuvent s'avérer gênants dans le cadre d'une utilisation clinique, puisqu'il est très difficile de déterminer leur quantité, leur toxicité ainsi que le rôle qu'ils peuvent jouer.

Il est bien connu, qu'en présence de PBGS, ALA dimérise pour conduire finalement au Porphobilinogène (voir la biosynthèse des pigments de la vie, partie 3.1.). Mais, en l'absence d'enzyme et en solution alcaline, Granick et Mauzerall [181] ont montré une dimérisation spontanée de ALA en 2,5-( $\beta$ -carboxyéthyle) dihydropyrazine (CHPY). La condensation des deux molécules de ALA conduit à la formation de deux produits hétérocycliques dans des proportions 1 : 10; ils ont proposé le PBG comme structure pour le produit de réaction minoritaire, et la CHPY, composé instable et difficile à identifier, comme structure pour le produit de réaction majoritaire.

Récemment, Butler et George [182] ont identifié trois produits dans la condensation de ALA en milieu aqueux. Ces composés, dépendants des conditions réactionnelles, sont : la CHPY, formée à un pH modéré et dans des conditions anaérobiques, la 2,5-( $\beta$ -carboxyéthyle) pyrazine ou CPY, formée suite à l'oxydation de la CHPY, et finalement le pseudo-PBG, formé dans des conditions très alcalines simultanément avec la CHPY (Figure No.33). En revanche, aucune formation de PBG n'a été observée lors de la dimérisation non-enzymatique de ALA.

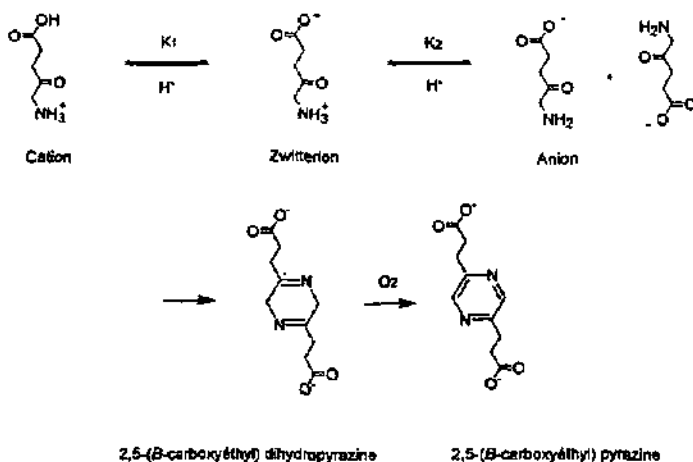


Figure No.33 : Mécanisme de dimérisation de ALA

Une solution aqueuse de ALA n'est donc stable qu'à un pH acide où la forme anionique ne peut exister (à pH = 5,2, la concentration anionique représente 0,07% de la concentration totale de ALA). Par conséquent, il est impératif de maîtriser le pH des solutions de ALA afin d'éviter des réactions parasites, aussi bien dans des applications cliniques que dans des travaux de synthèses.

Un autre point important ne jouant pas en faveur de l'utilisation de ALA dans la technique PDT est le fait que le traitement peut occasionner, notamment lors de la formation d'oxygène singulet, des dégâts au niveau de l'ADN [183]. Des tests ont été réalisés sur des cultures de cellules, ainsi que sur des rats, suite à l'observation faite que 10 à 30% des patients traités avec des médicaments contre le cancer développaient des tumeurs secondaires. Les concentrations utilisées : 0, 10, 100 et 1000 µg de ALA par millilitre, avec des durées d'incubation variant entre 2 et 24 heures, ont permis d'arriver à la conclusion que ALA, à une concentration de 1 µg/ml et même en l'absence de lumière, est en mesure de causer des dégâts au niveau de l'ADN [183].

D'autre part, des problèmes sont rencontrés avec ALA lors de son utilisation *in vivo* [184]. En effet, sa nature hydrophile fait qu'il ne traverse que difficilement la partie lipophile des membranes cellulaires. Suite à une application systémique [185], ALA diffuse au sein de tout l'organisme du fait qu'il rencontre des difficultés pour diffuser à l'intérieur des cellules. Pour un traitement qui doit être local, les conséquences peuvent être extrêmement fâcheuses. Par conséquent, lors d'une application topique [386], il est nécessaire d'utiliser des doses importantes de ALA [165,187], vu sa difficulté à franchir les parois cellulaires et, ensuite, laisser le produit agir plus longtemps pour obtenir des résultats satisfaisants. Or, l'emploi de quantités importantes de ALA conduit irrémédiablement à un risque de toxicité au sein de l'organisme traité.

Une solution à ces problèmes est représentée par la modification chimique de ALA sans toutefois perdre les propriétés lui permettant d'être utilisé dans la technique PDT ou dans la détection de cancers (PD).

### 3.8. Modifications chimiques de ALA

Comme il l'a été expliqué précédemment, ALA rencontre des difficultés, à cause de son caractère hydrophile, pour traverser les membranes cellulaires. Il est donc indispensable de remédier à ce problème : une solution est représentée par la considération de "prodrugs" [188].

Un "prodrug" est un dérivé chimique d'un médicament possédant des propriétés pharmacologiques plus favorables que ce dernier. Le "prodrug" est en fait lui-même pharmaceutiquement parlant inactif, mais il est converti en médicament par des enzymes ou par d'autres facteurs sur le lieu de son action. Dans le cas du développement de "prodrugs" de ALA, la voie de synthèse conduisant à la PpIX reste inchangée, exception faite d'une étape initiale supplémentaire pour l'hydrolyse enzymatique de l'ester correspondant.

Les "prodrugs" peuvent être synthétisés pour différentes raisons : par exemple, pour aboutir à une meilleure stabilité du produit [189], ou afin de faciliter l'accès de la zone à traiter à la substance active. Dans le cadre d'une application en dermatologie, le but est d'obtenir un composé caractérisé par un meilleur taux de pénétration dans les tissus. Pour ALA, il est donc nécessaire de développer un composé moins hydrophile.

L'intérêt de considérer un "prodrug" en lieu et place de ALA est toutefois limité par deux facteurs : la vitesse de diffusion du composé dérivé de ALA à travers les membranes cellulaires et la vitesse à laquelle ce même composé est converti par les enzymes en produit actif. Il est en fait très important de définir lequel de ces deux facteurs contribue le plus à une haute concentration de PpIX dans les cellules tumorales, de manière à pouvoir prévoir le comportement chimique de nouveaux dérivés de ALA. En effet, il existe actuellement aussi bien des "prodrugs" nécessitant une hydrolyse enzymatique rapide pour une meilleure action thérapeutique que des dérivés devant être convertis plus lentement pour favoriser la réaction.

Une série d'esters aliphatiques de ALA ont déjà été synthétisés et testés [190]. Des mesures de fluorescence *in vitro* (culture des cellules) et *in vivo* ont été effectuées afin de déterminer leur potentiel en tant qu'agent photosensibilisateur.

D'autres expériences ont également été réalisées afin de vérifier si les alcools, libérés suite à l'hydrolyse enzymatique de l'ester correspondant, avaient une influence sur la quantité de PpIX produite dans les cellules. Mais les résultats obtenus n'ont pas permis de démontrer cette tendance. Les résultats des mesures avec les cellules intactes ont montré que l'ester méthylique n'est pas plus actif que ALA non-modifié. En effet, la chaîne alkyle trop courte ne modifie par la lipophilicité du dérivé. Les meilleurs résultats<sup>1</sup> ont été obtenus avec l'ester pentylique de ALA, alors que les dérivés caractérisés par une chaîne alkyle plus longue ont induit la production de moins de PpIX, donc une fluorescence moins forte (Figure No.34). La variation du temps d'incubation (120, 240 et 360 minutes) n'apporte aucune modification dans

---

<sup>1</sup>Ces mesures ont été effectuées dans le cadre du travail de diplôme de Y. Berger [234], qui en a tiré un graphique du type de la Figure No.34

l'ordre d'efficacité des dérivés de ALA, mais les meilleurs résultats ont été enregistrés après 6 heures d'incubation.

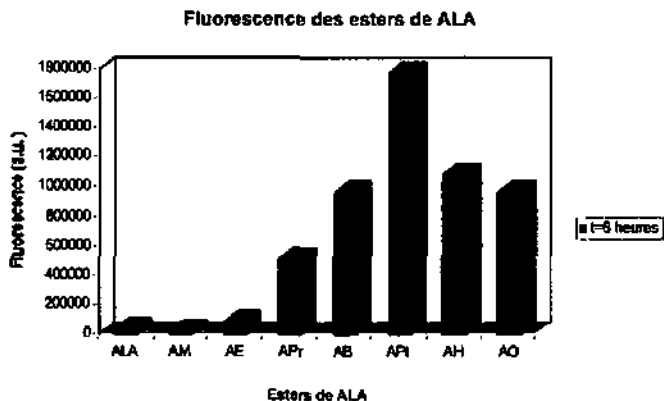


Figure No.34 : Fluorescence émise par des esters aliphatiques de ALA après six heures d'incubation (AM : ALA méthylester; AE : ALA éthylester; APt : ALA propylester; AB : ALA butylester; APi : ALA pentylester; AH : ALA hexylester; AO : ALA octylester)

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les dérivés de ALA deviennent toujours plus lipophiles, ce qui a pour effet d'augmenter leur affinité pour les membranes cellulaires. En fait, ils auraient tendance à rester bloqués à l'intérieur de ces dernières. D'autre part, il faut également noter que les différences entre les dérivés de ALA diminuent avec la vitesse de production cellulaire de PpIX.

---

## **4. Autres applications photodynamiques de ALA et de ses dérivés**

Durant ces dernières années, les substances photodynamiques ont été étudiées pour leur application en tant qu'herbicides potentiels. En particulier, les éthers du type diphényle ont été bien caractérisés, pratiquement appliqués et commercialisés. Cependant, ces composés, qui ne peuvent être isolés que par voie synthétique, se sont avérés être irritants pour les yeux et la peau.

Une nouvelle approche pour le développement d'herbicides/insecticides a donc été introduite en 1984 [191]. Le concept et la phénoménologie sont illustrés par la description d'un herbicide/insecticide expérimental photodynamique dérivé de ALA. Depuis, de considérables progrès ont été accomplis en élargissant le champ de ce système expérimental, en étudiant son mode d'action, et en le modifiant de façon à obtenir un herbicide/insecticide pratique et sélectif.

### **4.1. Définition d'un système expérimental contenant un herbicide photodynamique**

#### **4.1.1. Principes de base**

Jusqu'à nos jours, la découverte de nouveaux pesticides a généralement été le fruit d'un screening aveugle, par exemple le résultat d'une expérience impliquant un grand nombre d'essais et d'incertitudes. Au cours d'une année-type, une usine agrochimique pouvait tester à l'aveugle 20000 à 50000 substances afin de mesurer leur activité herbicide et insecticide. Le nombre restreint de substances présentant une activité prometteuse était alors étudié plus profondément et son efficacité, sélectivité, impact environnemental, et phytotoxicité évalués. Lors de ce processus, la compréhension du mode d'action d'un pesticide particulier n'était pas une priorité. Il pouvait même arriver qu'il ne soit ni étudié ni compris.

En 1982, une recherche de Rebeiz et al. amena au développement d'herbicides innovateurs, en adoptant une approche totalement différente de celle traditionnelle utilisée dans l'industrie. L'idée était d'établir une connaissance biologique de base et de développer donc un herbicide adoptant un mode d'action préconçu.

#### 4.1.2. Développement du concept

Le développement d'un nouveau type d'herbicide a naturellement été influencé par l'expérience recueillie au niveau de la chimie et de la biochimie du processus de verdissement. Ce dernier est l'un des cinq phénomènes biologiques les plus importants intervenant sur la biosphère, les quatre autres étant la photosynthèse, la respiration, la reproduction, la différenciation et le développement de la croissance. Il est plus prononcé au cours du printemps, période durant laquelle les plantes à feuilles annuelles et vivaces adoptent leur coloration verte.

Le phénomène visuel du verdissement est une expression chimique de la biosynthèse et de l'accumulation de chlorophylle (Chl) par les chloroplastes en développement. Ces organelles verts sont responsables de la conversion de l'énergie solaire en énergie chimique via le processus de la photosynthèse. Sans le processus de verdissement, la photosynthèse serait impossible et la vie organique telle que nous la connaissons aujourd'hui ne pourrait exister sur notre planète.

Puisque le phénomène du verdissement occupe une position aussi centrale dans l'économie de la biosphère, le raisonnement de Rebeiz et al. [191] s'est basé sur l'hypothèse qu'il serait possible de développer un herbicide caractérisé par un mode d'action trouvant ses origines dans certaines facettes de ce processus. La question étant de savoir quel aspect de ce phénomène pourrait le mieux se prêter à cette étude.

La première alternative prise en considération fut le développement d'un herbicide pouvant intervenir directement au niveau de la biosynthèse de Chl. Un tel herbicide pourrait empêcher les plantes traitées de remplir de Chl leurs feuilles complètement formées, tout en annulant la biosynthèse de la nouvelle Chl qui, elle, faciliterait l'expansion de nouvelles feuilles. Cette stratégie ne fut pas retenue car, lors de l'application à grande échelle, de jeunes plants purent émerger du sol déjà pratiquement verts. Or, en leur sein, la vitesse de biosynthèse de Chl était aussi lente que celle de conversion de Chl et que de leur vitesse de croissance et de développement. En d'autres mots, il était acquis d'avance qu'un herbicide de ce type serait un herbicide d'action très lente, en particulier au niveau de mauvaises herbes ayant atteint des dimensions relativement importantes.

Une autre stratégie semblait plus prometteuse. Il fut spéculé que, si les plantes vertes pouvaient être induites à accumuler des quantités importantes de précurseurs de Chl (par exemple les tetrapyrroles) en les giclant avec certaines substances, ces dernières seraient susceptibles, par modification, de devenir de bons herbicides non-sélectifs. Cette approche fut également sélectionnée pour deux raisons principales. Tout d'abord, les tetrapyrroles, en particulier les Mg-tetrapyrroles, sont connus comme étant des photosensibilisateurs de type II

[191-193]. Ils ont tendance à absorber de l'énergie lumineuse et, ainsi, à photosensibiliser la formation d'oxygène à l'état singulet. Ce dernier est un oxydant très puissant et peut déclencher une réaction en chaîne de type radical libre qui conduit à la destruction des membranes biologiques, des acides nucléiques, des enzymes, et de beaucoup d'autres protéines [193].

D'autre part, les Mg-tetrapyrroles métaboliques sont facilement biodégradables [194-197] et leur impact environnemental est par conséquent négligeable. En revanche, ce qui était inconnu était de savoir, si la plante verte étant en mesure de procéder à la biosynthèse de Chl à des vitesses de l'ordre de celles intervenant dans la transformation de Chl et dans sa croissance, pouvait être induite, par l'intermédiaire d'un traitement chimique, à accumuler suffisamment de tetrapyrroles pour provoquer un dommage photodynamique. L'élucidation de ce processus passait par la détermination de petites quantités de porphyrines en présence de grosses quantités de Chl. Heureusement, ce problème analytique avait été résolu 10 ans auparavant. Cela rendit donc possible la mise en condition des caractéristiques de ce nouveau concept : la possibilité d'une induction de l'accumulation de tetrapyrroles dans les plantes vertes par le biais d'un traitement chimique.

#### 4.1.3. Choix de l'herbicide

Le choix de l'herbicide est devenu évident au fur et à mesure du raisonnement décrit ci-dessus. Il était connu depuis des années que des plantes cultivées à l'obscurité étaient en mesure d'accumuler des quantités significatives de tetrapyrroles suite à un traitement avec ALA [198-200]. Ce comportement trouvait son explication dans trois phénomènes bien distincts.

1. ALA, un acide aminé à 5 atomes de carbone, est un précurseur de l'hème et de Chl dans la Nature [201,202].
2. Au sein des cellules vivantes, la quantité de ALA formé disponible pour la formation de Chl est réglée par un système de feed-back (voir Figure No.32) [203,204].
3. Etant donné que les plantes étiolées ne contenaient qu'une quantité restreinte de Protochlorophyll(ides) (Pchl(ides)) [205] (les précurseurs immédiats de la chlorophyllide [Chl démunie de phytol] et de Chl) mais pas de Chl, la voie biosynthétique conduisant à Chl dans ces plantes était extrêmement active [206].

En d'autres termes, les plantes étiolées étaient maintenues en vie afin de former des quantités massives de Chl, au cas où la demande augmenterait suite à une exposition à la lumière [207]. Lors du traitement de ces plantes avec ALA, un pas biosynthétique régulateur important était

onis, à savoir la régulation de la formation de ALA et, par conséquent, sa disponibilité pour la plante. Confrontée avec de larges quantités de ALA, la machinerie biosynthétique conduisant à Chl des plantes étioilées était forcée de convertir ALA en Mg-protoporphyrines et en Pchl dans l'obscurité et ces dernières en chlorophyllides et Chl, respectivement, par exposition à la lumière [206-208].

Une conséquence des considérations faites ci-dessus et des effets photodynamiques connus des tetrapyrroles (*vide supra*) fut que ALA semblait être le candidat idéal pour un type nouveau d'herbicide. En outre, étant donné que ALA était une acide aminé présent dans toutes les cellules vivantes et qu'il faisait partie intégrante de la chaîne alimentaire, son impact environnemental devrait être minime. Ce qu'il restait donc à vérifier était de savoir si les plantes vertes mûres étaient en mesure de réagir au traitement avec ALA de la même manière que les plantes étioilées et, ainsi, accumuler suffisamment de tetrapyrroles pour subir un dommage photodynamique.

#### 4.1.4. Choix du système végétal et du système d'administration de ALA

Avant de mettre en oeuvre cette nouvelle stratégie, deux points importants devaient être définis, à savoir le choix d'un matériel végétal approprié et le mode d'administration de ALA à la plante.

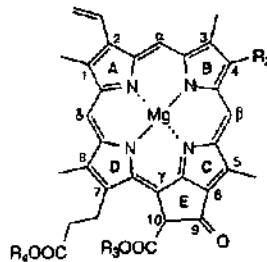
Le choix du matériel végétal expérimental s'orienta, pour toute une série de raisons, sur le concombre (*Cucumis sativus* L.). En effet, le métabolisme du verdissement de cette espèce était bien connu, ses graines facilement disponibles, sa germination reproductible, sans oublier que le concombre était en mesure de croître en 5-8 jours pour se présenter sous la forme de jeunes plants verts resplendissants. Cette sélection fut donc basée plus sur des raisons de facilité expérimentale que sur des considérations purement biochimiques.

Puisque le but était de développer un herbicide expérimental, l'idée de fournir ALA au tissu végétal sous forme de spray plutôt que d'incuber le tissu dans une solution aqueuse de ALA semblait fondée. Malgré divers problèmes techniques (solvant, concentration, pH), une méthode de travail fut mise au point [205].

Des tests préliminaires purent démontrer que la plupart des jeunes plants, 17 heures après avoir été giclés avec une solution de ALA (pH ajusté à 4.15), puis enrobés dans du papier aluminium et laissés au repos dans l'obscurité à une température de 28°C, étaient en mesure d'accumuler des quantités importantes de tetrapyrroles. Or, une fois exposés à la lumière, ces jeunes plants mouraient en quelques heures. Une analyse quantitative relative aux tetrapyrroles put révéler une conversion massive de ALA giclé en Mg-protoporphyrines (Mg-Protos) 24 et en protochlorophyllides (Pchlides) 13. En revanche, des plants traités, qui

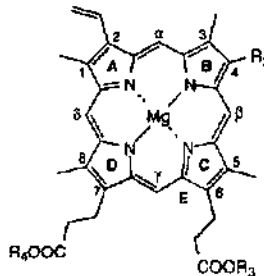
avaient accumulé beaucoup de tetrapyrroles, n'étaient pas affectés, tant qu'ils n'étaient pas exposés à la lumière.

Dans la Figure No.35 sont présentées quelques structures chimiques de ces tetrapyrroles accumulés durant l'expérience.



PROTOCHLOROPHYLL(IDE)S 13

- a.  $R_2$  :  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ;  $R_3$  :  $-\text{CH}_3$ ;  $R_4$  : FAI; DV, 7-FALE, Pchl
- b.  $R_2$  :  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ;  $R_3$  :  $-\text{CH}_3$ ;  $R_4$  : FAI; 2-MV, 7-FALE, Pchl
- c.  $R_2$  :  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ;  $R_3$  :  $-\text{CH}_3$ ;  $R_4$  : H; DV, 7-COOH, 10-COOMe, Pchlde
- d.  $R_2$  :  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ;  $R_3$  : H;  $R_4$  : Alk; DV, 7-AIKE, 10-COOH, Pchlde
- e.  $R_2$  :  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ;  $R_3$  :  $-\text{CH}_3$ ;  $R_4$  : H; 2-MV, 7-COOH, 10-COOMe, Pchlde
- f.  $R_2$  :  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ;  $R_3$  : H;  $R_4$  : Alk; 2-MV, 7-AIKE, 10-COOH, Pchlde



Mg PROTO diester et Mg PROTO monoester 24

- a.  $R_2$  :  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ;  $R_3$  :  $-\text{CH}_3$ ;  $R_4$  : FAI; DV, 7-FALE, 6 Me.P, DV Mg Proto diester
- b.  $R_2$  :  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ;  $R_3$  :  $-\text{CH}_3$ ;  $R_4$  : FAI; 2-MV, 7-FALE, 6 Me.P, MV Mg Proto diester
- c.  $R_2$  :  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ;  $R_3$  :  $-\text{CH}_3$ ;  $R_4$  : H; DV, 7-COOH, 6 Me.P, DV Mg Proto 6ME
- d.  $R_2$  :  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ;  $R_3$  : H;  $R_4$  : Alk; DV, 7-AIKE, 6-COOH, DV Mg Proto 7 ester
- e.  $R_2$  :  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ;  $R_3$  :  $-\text{CH}_3$ ;  $R_4$  : H; 2-MV, 7-COOH, 6 Me.P, MV Mg Proto 6ME
- f.  $R_2$  :  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ;  $R_3$  : H;  $R_4$  : Alk; 2-MV, 7-AIKE, 6-COOH, MV Mg Proto 7 ester
- g.  $R_2$  :  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ;  $R_3$  : H;  $R_4$  : H; DV Mg Proto
- h.  $R_2$  :  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ;  $R_3$  : H;  $R_4$  : H; 2-MV Mg Proto

Figure No.35 : Structures chimiques représentatives des monoesters de MV et DV Mg-protoporphyrines (MPE) 24 et de protochlorophyllides (Pchlde) 13

#### 4.1.5. Etudes préliminaires au sujet de l'impact environnemental

Puisque de nombreux problèmes environnementaux sérieux ont déjà été causés par l'emploi d'herbicides et d'insecticides peu biocompatibles, la sécurité environnementale est devenue un facteur limitant de première importance dans le développement de pesticides. Etant donné que ALA est une substance naturelle faisant partie intégrante de la chaîne alimentaire, son impact sur la nature devrait être minime. Des études préliminaires à ce sujet ont été conduites des manières suivantes :

- (1) détermination de la vitesse de disparition (ou métabolisme) de ALA sprayé (ou giclé)
- (2) détermination de la vitesse de disparition (dans le tissu végétal) des tetrapyrroles formés à partir de ALA.

Les résultats découlants de ces deux expériences ont montré que le métabolisme rapide de ALA dans les tissus sprayés, associé à la disparition rapide des tetrapyrroles accumulés dans le tissu végétal ainsi qu'à la faible toxicité mammaire apparente de ALA font que, ni ce dernier ni les produits découlant de son métabolisme sont susceptibles d'avoir des effets néfastes vis-à-vis de l'environnement.

#### 4.1.6. Découverte de l'effet herbicide sélectif de ALA

A la base, l'herbicide basé sur ALA ne devait pas être sélectif. En effet, puisqu'il agissait via la voie biosynthétique conduisant à CHl, qui est un processus fondamental commun à toutes les plantes vertes, il n'y avait aucune raison de suspecter une quelconque sélectivité.

Toutefois, lorsque l'effet herbicide de ALA vis-à-vis de plantes herbives de type monocotylédone, telles que maïs, blé, avoine et orge fut testé, ces dernières se révélèrent insensibles au traitement. Cette observation entraîna un élargissement de l'étude de la susceptibilité de ALA à une variété de plantes de type mono- et dicotylédone. Trois genres de réponses herbicides furent essentiellement distinguées, suite à un traitement avec ALA + 2,2'-dipyridyle [191].

1. La réponse de type I est caractéristique des plantes comme le concombre qui, après traitement, meurent rapidement.
2. La réponse de type II est caractéristique des plantes comme le soja qui accumulent les tetrapyrroles au niveau des feuilles mais pas dans les tiges et les cotylédons. Par conséquent, seules les feuilles subissent un dommage photodynamique, alors que les plantes continuent de croître et se développent en plantes saines.

3. La réponse de type III est caractéristique des espèces monocotylédones telles que maïs, blé, avoine et orge. Dans ce cas, malgré le fait que les tissus giclés accumulent des quantités non-négligeables de tétrapyrroles, le dommage photodynamique est minime et les jeunes plants traités continuent de croître et de se développer en plantes saines.

## 4.2. Développement d'insecticides porphyriniques

Dans les paragraphes précédents, il a été montré comment des plantes, contraintes à accumuler des tétrapyrroles indésirables suite à un traitement chimique, pouvaient être détruites très rapidement en les exposant à la lumière. La question est maintenant de savoir si le même phénomène peut être adapté à un contrôle photodynamique des insectes.

### 4.2.1. Concept et phénoménologie

Rebeiz et al [209,210] ont montré que, en traitant des larves de *Trichoplusia ni* avec ALA et 2,2'-dipyridyle (DPY), ces dernières accumulaient des quantités importantes de divinyle (DV) PpIX. Or, il est également prouvé dans ce travail que l'accumulation de ce tétrapyrrole provoque la mort des larves traitées aussi bien dans l'obscurité qu'à la lumière (PpIX disparaissant des tissus de l'insecte en quelques heures), à la différence du cas des plantes où le dommage n'était visible que suite à une exposition à la lumière et exclusivement photodynamique dans la Nature.

### 4.2.2. Mécanisme d'action des insecticides porphyriniques

Chez les plantes, les tétrapyrroles les plus nocifs étaient ceux intervenant dans la voie biosynthétique conduisant à Chl. En revanche, la "branche Mg" de la voie biosynthétique impliquant des tétrapyrroles dans la biosynthèse de Chl n'est pas fonctionnelle chez les insectes. Par conséquent, il n'a pas été possible de détecter une biosynthèse d'intermédiaires complexés par Mg découlant de la voie biosynthétique qui conduit à Chl dans *T. ni* traitée avec ALA ou ALA+DPY [211].

C'est pourquoi la couleur jaune-verte de la larve découle certainement des pigments chlorophylliens trouvés dans son alimentation. Toutefois, chaque insecte dans la Nature contient des cytochromes, qui agissent en tant que transporteurs d'électrons dans le cadre du phénomène de la phosphorylation oxydative. Il est donc fondé de présumer que l'espèce hème des cytochromes est formée à partir de PpIX, qui est elle-même synthétisée à partir d'ALA via la voie biosynthétique porphyrinique. L'accumulation de PpIX dans *T. ni*, dépendante de ALA, est compatible avec cette hypothèse. Il est donc plausible que l'induction d'une accumulation

de PpIX à la suite d'un traitement chimique implique une sorte de modulation de la voie porphyrine-hème, qui résulte dans l'accumulation de quantités importantes de PpIX dans l'obscurité. La base moléculaire de cette synergie détectée entre DPY et ALA pour l'incitation à accumuler massivement PpIX dans l'obscurité n'est pas encore totalement éclaircie. Il n'est cependant pas erroné de proposer que DPY, comme d'autres modulateurs de la biosynthèse des porphyrines tels que la 1,10-phénanthroline et le disulfure du 2,2'-dipyridyle [212-214], qui agissent en tant que activateurs-amplificateurs de l'accumulation de PpIX, peuvent avoir un double rôle :

- (1) en débloquent un pas régulateur fermé impliqué dans la biosynthèse de ALA, ils sont en mesure de provoquer la biosynthèse de quantités importantes de ALA à partir de précurseurs endogènes
- (2) en activant une ou plusieurs étapes de la chaîne biosynthétique des porphyrines, ils sont en mesure d'accélérer la conversion en PpIX de ALA exo- et endogène.

Contrairement à ce qui a été observé chez les plantes, l'accumulation de PpIX dans l'obscurité chez *T. ni* est accompagnée par la mort de la larve. La base moléculaire de ce phénomène est encore inconnue de nos jours. A la lumière, une production massive de PpIX ne semble pas être une condition impérative pour qu'il y ait dommage photodynamique. Cette conclusion est basée sur trois observations : (a) à la lumière, une accumulation massive de PpIX n'est pas observée, certainement à cause de la photodestruction "steady-state" de PpIX biosynthétisée, (b) dans l'obscurité, malgré l'application de sprays, aucune accumulation de PpIX n'est observée et (c) les sprays diurnes, qui n'impliquent pas de période d'incubation nocturne subséquente pour l'accumulation de PpIX, se sont avérés aussi efficaces pour provoquer la mort de la larve que les sprays nocturnes, qui eux, sont associés à une période d'incubation nocturne subséquente avant une exposition à la lumière [215,216].

Des pesticides potentiels de ce type doivent être inclus dans des produits chimiques et biochimiques qui induisent la biosynthèse et l'accumulation de PpIX chez les insectes traités. Le fait que ce type exogène de PpIX et de Mg-PpIX soit également en mesure de provoquer la mort photodynamique de la larve confirme la possibilité de procéder au design de tétrapyrroles synthétiques potentiellement plus intéressants. En outre, ce type de tétrapyrroles peuvent être développés non pas uniquement pour un meilleur transfert de ALA dans les tissus internes de l'insecte traité, mais également pour une meilleure absorption et orientation au sein des membranes lipoprotéiques des tissus internes et pour un rendement quantitatif plus important dans le phénomène de la génération d'oxygène singulet.

Par exemple, le fait que l'accumulation de PpIX et que la mort de la larve soient plus lentes chez *H. zea* traité avec ALA + DPY que chez *T. ni* traité n'est pas totalement élucidé. La

raison pourrait être : (a) les différences dans le transfert des substances appliquées jusqu'aux tissus internes de l'insecte ou (b) des différences intervenant dans la régulation de la voie porphyrine-hème chez les deux espèces. En fait, la susceptibilité différentielle parmi les espèces d'insectes à des substances en mesure d'induire l'accumulation de PpIX pourrait être exploitée pour le développement d'insecticides porphyriniques spécifiques à chaque espèce.

Un des problèmes majeurs rencontrés dans le développement de nouveaux insecticides est le nombre croissant d'insectes devenus résistants aux insecticides. C'est généralement une conséquence des mutations, qui sont en mesure d'accroître les mécanismes de désintoxication de l'insecte ou de changer les propriétés lipophiliques de la toxine, réduisant ainsi sa perméabilité membranaire. Ce phénomène réduit considérablement le temps de vie utile des insecticides développés récemment et réduit également leur valeur économique.

Par conséquent, étant donné que la modulation chimique de la voie porphyrine-hème semble impliquer plus d'une étape métabolique (*vide supra*), il devrait être plus difficile pour les insectes de développer une résistance aux herbicides porphyriniques. Et même si certains parvenaient à développer une résistance à l'accumulation de tetrapyrroles en mettant au point des moyens pour détruire rapidement ces derniers, il est improbable que l'insecte ne subisse aucun dommage suite à une exposition à la lumière. En effet, malgré le fait que PpIX soit probablement détruite aussi rapidement qu'elle est formée à la lumière, la larve subit un dommage photodynamique irréversible. D'autre part, il est difficile d'imaginer comment une mutation bloquant simultanément les biosynthèses de PpIX et des cytochromes puisse être supportable. Finalement, même si, à l'aide de moyens inconnus, la résistance aux insecticides porphyriniques est optimisée par certaines espèces d'insectes, le potentiel à disposition pour développer de nouveaux insecticides porphyriniques garantit un avenir serein. Par exemple, simplement avec 25 modulateurs porphyriniques en mesure d'agir en synergie avec ALA pour l'accumulation de PpIX, il est possible de différencier 2600 insecticides, avec la condition que les modulateurs soient employés deux à la fois en combinaison avec ALA.

En guise de conclusion, les pesticides faisant intervenir des tetrapyrroles sont en mesure d'agir en tant qu'insecticides et/ou d'herbicides. D'autre part, la possibilité de découvrir des modulateurs développés d'une manière rationnelle à partir des connaissances accumulées au niveau de la biosynthèse ("biorational design") de la porphyrine pour un emploi avec ALA, permet de penser à un développement de préparations herbicide-insecticide totalement biodégradables.

A noter que ALA, en plus de ses propriétés en tant qu'insecticide ou herbicide, peut également être utilisé à faibles concentrations, en tant que stimulateur de croissance. ALA agit en fait en accélérant la photosynthèse, en supprimant la respiration et en stimulant l'absorption de dioxyde de carbone [217].

# DISCUSSION DES RESULTATS

## 5. Applications de ALA dans la chimie peptidique

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail sont présentés en fonction de l'évolution de nos idées au cours de notre recherche. Les choix et motivations sont précisés si nécessaire.

### 5.1. Considérations générales

Comme nous l'avons déjà souligné précédemment, une partie essentielle de la recherche au sein de notre groupe se concentre sur l'explication du mécanisme de la biosynthèse du PBG. Dans ce sens, une série d'études d'inhibition de l'enzyme PBGS ont été entreprises, à l'aide d'analogues synthétisés du substrat, des intermédiaires postulés et du produit. Dans le cadre de la préparation d'analogues du substrat, plusieurs conditions (Figure No.36) nécessaires pour une inhibition efficace de PBGS ont été déduites de travaux précédents [13,15,219].

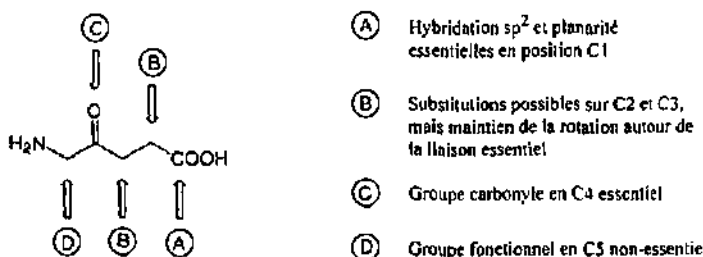


Figure No.36 : Conditions structurales nécessaires pour une inhibition efficace de PBGS

D'autre part, 30 et 31 (Figure No.37) ont donné les résultats suivants [13] à l'occasion des études d'inhibition :

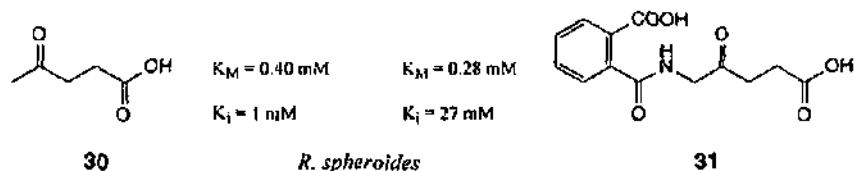


Figure No.37 : Résultats d'inhibition à la base de notre raisonnement

Ces observations nous permettent d'affirmer que l'introduction d'une gêne stérique sur l'amine influence négativement la constante d'inhibition  $K_i$ . En revanche, la confirmation que cette même fonction amine n'est pas essentielle pour une inhibition efficace de PBGS est apportée par les résultats obtenus avec 30.

Une des méthodes considérées de nos jours pour analyser simultanément l'espace à disposition à l'intérieur d'un site actif et l'influence des substituants positionnés sur le substrat est le développement de bibliothèques de peptides en tant qu'inhibiteurs potentiels de la protéine-hôte. Dans cette approche, la structure rigide et fixée est représentée par la chaîne peptidique, alors que la variabilité stérique et électronique est rendue possible par l'existence des chaînes latérales. De cette manière, il est possible de procéder à la réalisation d'une empreinte digitale du site actif étudié.

Notre stratégie consiste, par conséquent, à introduire des acides  $\alpha$ -aminés au niveau du *N*-terminal de ALA. La Figure No.38 illustre la similitude entre le dipeptide envisagé et un des intermédiaires postulés par Jordan [1]. En fait, du point de vue purement structural, la fonction imine de l'intermédiaire est substituée par une fonction amide, double-liaison partielle.

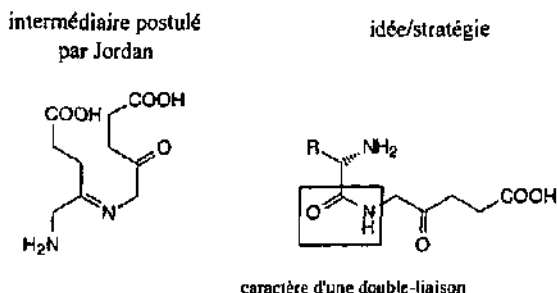


Figure No.38 : Stratégie suivie pour la synthèse d'analogues de l'intermédiaire selon Jordan

Il est important de noter que les peptides présentent quatre avantages principaux par rapport à d'autres familles de biopolymères :

- l'existence d'un grand nombre de chaînes latérales permet de générer une grande diversité dans les structures peptidiques
- la détermination de la séquence, dans le cas d'une structure potentiellement intéressante, est aisée (par exemple par l'intermédiaire de la dégradation d'Edman)
- l'analyse conformationnelle des peptides est bien maîtrisée, notamment grâce au modélisation moléculaire

- l'application de la chimie peptidique sur phase solide s'est démontrée facilement abordable.

## 5.2. Synthèse en solution de dérivés peptidiques de ALA

En vue de la construction sur phase solide de bibliothèques combinatoires de tripeptides basés sur ALA, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la synthèse en solution de dipeptides contenant ALA sur leur C-terminal. Le premier dipeptide considéré est celui constitué de ALA couplé sur son N-terminal avec l'alanine (ou Ala).

Les conditions réactionnelles appliquées sont celles considérées dans une approche SPPS classique : protection du N-terminal à l'aide du groupe Fmoc et activation du C-terminal à l'aide d'un carbodiimide.

### 5.2.1. Synthèse du dérivé peptidique Fmoc-(Ala-ALA)-OMe

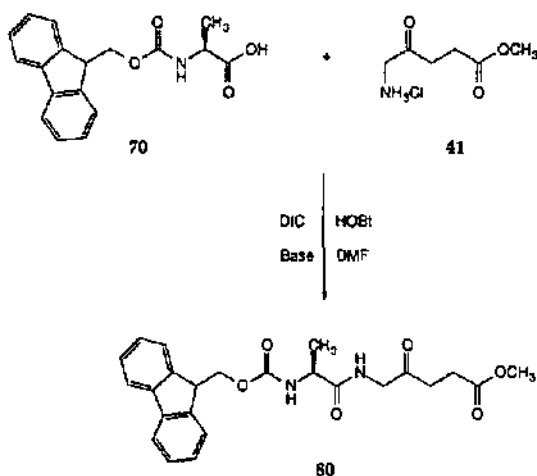


Figure No.39 : Synthèse en solution du dérivé peptidique 80

Le couplage peptidique de 70 avec 41 s'effectue selon un mode opératoire-type dérivé de la synthèse sur phase solide. Le choix du *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) à la place du *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) plus classique, s'explique par le fait que le premier génère une urée soluble dans la plupart des solvants organiques, ce qui représente un avantage évident en vue d'une application en SPPS. L'emploi du 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) permet d'éviter une racémisation du peptide synthétisé, même si ce phénomène n'est pas de

première importance dans le cadre de notre travail. Enfin, le choix du DMF en tant que solvant de réaction s'explique par la solubilité médiocre des acides aminés du type 70-77 dans les solvants organiques traditionnels.

L'acide  $\alpha$ -aminé *N*-protégé 70 est dissout dans le DMF, puis il est préactivé en présence d'un léger excès de HOBt et de DIC pour une durée de 45 min. à température ambiante. Ce mélange, devenu légèrement trouble, est alors ajouté, en plusieurs portions, à une solution concentrée de 41 dans le DMF. La solution trouble résultante est agitée durant 10 min. à RT, puis la base est ajoutée en une portion, de manière à libérer l'amine de 41 pour le couplage peptidique. Cette action se traduit par la coloration jaune du mélange réactionnel, qui est ensuite agité à RT durant 50 heures. Le contrôle de l'avancement de la réaction se fait à l'aide de CCM (AcOEt).

L'extraction du produit de réaction se fait, tout d'abord à l'aide d'une distillation au four à boules du DMF en excès, puis par le biais d'une extraction liquide-liquide à l'aide d'AcOEt et d'une série de phases aqueuses ( $H_2O$ , acide citrique 1N,  $H_2O$ ,  $NaHCO_3$  sat.,  $H_2O$  et NaCl sat.). Les phases organiques lavées permettent, après concentration, l'isolement d'une pâte amorphe de couleur jaune-orange, qui est purifiée par chromatographie-éclair sur gel de silice. Récupération d'un solide blanc compact avec un rendement de 52 %<sup>1</sup>.

Afin d'optimiser le rendement de ce couplage et avant de nous intéresser à d'autres acides  $\alpha$ -aminés, nous nous sommes concentrés sur l'efficacité des réactifs de couplage existants sur le marché et des conditions réactionnelles.

#### 5.2.2. Etude d'efficacité des réactifs de couplage et adaptation des conditions réactionnelles

Nous avons procédé à cette étude, en réalisant pour chaque essai le même couplage peptidique : réaction de 1.0 éq. de 41 avec 2.0 éq. de 70, à l'aide de 1.1 éq. du réactif de couplage, 1.1 éq. de HOBt et 1.0 éq. de base dans un volume total de 10 ml de DMF.

Le produit brut de réaction, après distillation au four à boules et extraction liquide-liquide, est purifié par l'intermédiaire d'une ou plusieurs chromatographies-éclair sur gel de silice. Le dipeptide protégé 80 est isolé à l'état pur sous la forme d'un solide blanc compact.

---

<sup>1</sup>Le rendement final plutôt faible de ce couplage peptidique s'explique par la répétition des étapes de purification par chromatographie, rendues nécessaires par la présence en quantités importantes de l'impureté géoérée par DIC : la *N*, *N'*-diisopropylurée (DIU)

Tableau No.3 Récapitulation des essais réalisés pour la synthèse de 80

Essai	Réactif de couplage	Base	Température	Rendement
(a)	DIC	NMM	RT	52 %
(b)	DIC	NMM	50°C	50 %
(c)	EDC	DIPEA	RT	28 %
(d)	DCC	NEt <sub>3</sub>	0°C à RT	36 %
(e)	BOP	DIPEA	RT	18 %
(f)	HBTU	DIPEA	RT	25 %
(g)	PyBOP	DIPEA	RT	23 %
(h)	PyBROP	DIPEA	RT	12 %
(i)	TPTU	DIPEA	RT	16 %

(Signification des abréviations pour les réactifs de couplage : DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide; BOP : hexafluorophosphate du (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium; HBTU : hexafluorophosphate du *O*-(1H-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetraméthyluronium; PyBOP : hexafluorophosphate du (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium; PyBROP : hexafluorophosphate du bromotripyrillidinophosphonium; TPTU : tétrafluoroborate du *O*-(1, 2-dihydro-2-oxo-pyridyl)-*N,N,N',N'*-tetraméthyluronium.

Cette étude nous confirme que le premier choix était le bon et que nous appliquerons dorénavant la stratégie DIC/HOBt à la synthèse en solution d'autres dérivés peptidiques de ALA. En fait, les réactifs de couplage commerciaux les plus récents sont efficaces pour la synthèse de peptides constitués uniquement d'acides  $\alpha$ -aminés.

### 5.2.3. Synthèses des dérivés peptidiques de ALA

Maintenant que les conditions réactionnelles sont définies, nous pouvons nous concentrer sur les couplages d'autres acides  $\alpha$ -aminés sur le *N*-terminal de ALA. Notre idée est de considérer quatre dérivés peptidiques se distinguant par la nature de la chaîne latérale couplée : une chaîne latérale neutre aliphatique (Ala), une chaîne latérale neutre aromatique (phénylalanine ou Phe), une chaîne latérale basique (lysine ou Lys) et une chaîne latérale acide (acide



Les bons rendements s'expliquent par la considération d'une seule étape de purification par chromatographie.

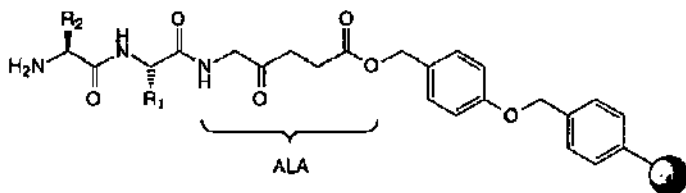
A noter que nous avons procédé à la synthèse du dérivé peptidique 84, analogue du dérivé 83, mais qui possède un C-terminal sous forme de benzyloxyester à la place du méthylester. Les conditions réactionnelles pour la synthèse de 84 sont les mêmes que pour les autres dérivés peptidiques : NMM en tant que base, 100 heures d'agitation à RT et rendement de 53 % après deux étapes de purification par chromatographie.

Ces rendements, sauf pour celui obtenu dans la synthèse de 80, nous permettent donc d'envisager avec optimisme la considération de ces conditions réactionnelles et de ces réactifs pour une synthèse sur phase solide de ces dérivés peptidiques, où les rendements peuvent être optimisés ultérieurement grâce à l'emploi de larges excès de réactifs.

### 5.3. Synthèse peptidique avec ALA sur la phase solide

Cette partie essentielle du travail a été réalisée dans les laboratoires du Département de diversité moléculaire chez CIBA-GEIGY A.G., avec l'aide de MM. H. Rink et E. Spieser).

La stratégie planifiée pour la synthèse sur phase solide de dérivés peptidiques de ALA serait, comme nous l'avons vu plus haut, la suivante (Figure No.41):



Linker de type WANG  
Résine de type polystyrène

Conditions employées en SPPS :

20% pipéridine dans DMA pour la déprotection Fmoc  
DIC / HOBt pour la C-activation des unités synthétiques  
Stratégie de double-couplage  
DMA et isopropanol pour les étapes de rinçage  
DMA / Pyridine / Anhydride acétique 6:1:1 pour l'étape de couplage  
TFA(aq) 95% pour le clivage du support solide

Figure No.41 : Stratégie suivie en SPPS

Plus précisément, notre idée comporterait tout d'abord le greffage, par l'intermédiaire d'une liaison de type ester, de ALA par son C-terminal sur un linker du type Wang (voir Figure

No.12), puis les couplages successifs, sur le *N*-terminal de ALA, de deux acides  $\alpha$ -aminés différents. Ainsi, il serait possible de libérer l'éventuel tripeptide synthétisé sous la forme d'un acide carboxylique, fonction définie essentielle pour une bonne reconnaissance par l'enzyme PBGS. Une fois ALA chargé sur le support solide, la suite du travail se déroulerait selon le schéma classique d'une synthèse peptidique : déprotection du *N*-terminal, puis couplage du premier acide  $\alpha$ -aminé sous les conditions réactionnelles optimisées en solution (voir partie 5.3.3.1.), nouvelle déprotection du *N*-terminal, couplage du second acide  $\alpha$ -aminé sous les mêmes conditions réactionnelles et déprotection finale du *N*-terminal.

L'avantage principal de cette approche est la possibilité de travailler avec de larges excès de réactifs, les rendements des différentes étapes (*N*-déprotection - couplage - *N*-protection) pouvant ainsi être optimisés en-dessus de 95 %. A noter que le second couplage envisagé dans notre approche présenterait l'avantage de faire réagir deux acides  $\alpha$ -aminés, qui sont appréciés pour leur bonne réactivité (le fait de coupler deux unités synthétiques sur ALA chargé sur le support solide permettrait d'envisager, à moyen terme, en considérant simplement les 20 acides  $\alpha$ -aminés naturels, la synthèse sur phase solide de 400 tripeptides de séquence différente).

De cette manière, nous serions en mesure d'obtenir, à la conclusion de la synthèse sur phase solide, un tripeptide *N*-déprotégé mais estérifié sur le support solide. Le clivage s'effectuerait grâce à l'emploi de TFA et le composé pourrait être récupéré par précipitation suivie d'une lyophilisation. Finalement, le test d'inhibition<sup>1</sup> se ferait avec le tripeptide en solution, comme pour les autres composés testés jusqu'à aujourd'hui.

### 5.3.1. Protection du *N*-terminal de ALA

Avant de passer à la synthèse sur phase solide proprement dite, il est nécessaire de procéder à la protection du *N*-terminal de ALA en solution, de manière à imposer un chargement de ce dernier via son *C*-terminal sur le support solide.

Le groupe protecteur classique considéré en SPPS est le groupe Fmoc introduit par Carpino et al. [220]. L'avantage principal du Fmoc est représenté par le fait que, lors de sa déprotection par  $\beta$ -élimination sous l'effet d'une base faible (pipéridine ou diéthylamine) [75], un acide carbanioïque est généré qui, par perte de CO<sub>2</sub>, libère l'amine libre et le dibenzofulvène (Figure No.42). Ce dernier réagit avec la pipéridine pour former l'adduit A, qui est caractérisé par une forte absorption dans le domaine UV ( $\lambda = 300$  nm).

---

<sup>1</sup> Une autre possibilité est représentée par un test d'inhibition très sensible à développer directement sur phase solide, mais la recherche d'un test de ce type sera envisagée une fois la synthèse sur phase solide mise au point

La molécule aromatique A permet, grâce à la spectroscopie UV, de déterminer l'efficacité, donc le rendement de la *N*-déprotection, par simple comparaison des absorbances avant et après le couplage d'un acide aminé Fmoc-protégé.

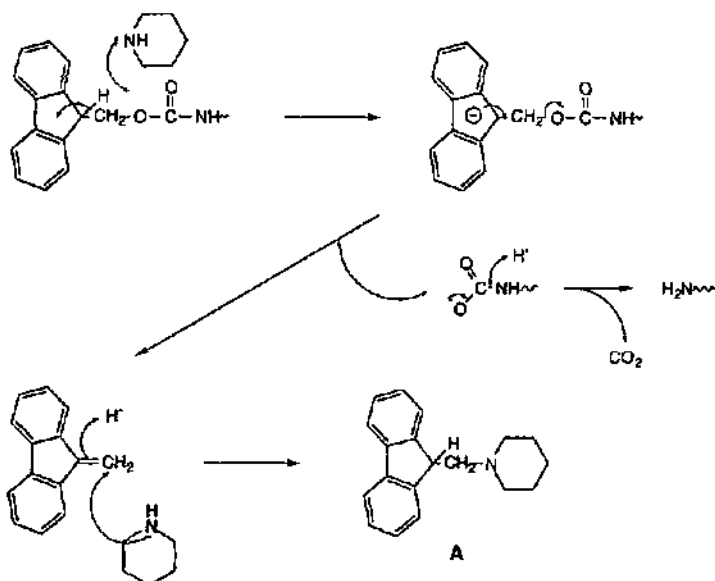


Figure No.42 : Mécanisme de la déprotection Fmoc sur le *N*-terminal (conditions : 20 % pipéridine/DMF)

### 5.3.1.1. Synthèse de l'acide *N*-protégé 52

Nous avons appliqué la méthode classique de protection développée par Laptopsis [221].

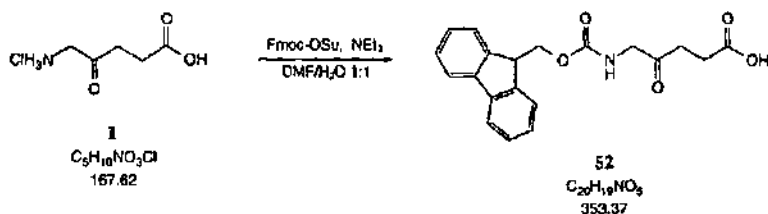


Figure No.43 : Protection Fmoc du *N*-terminal de ALA

L'acide aminé 1 est dissout dans un mélange 1:1 de DMF/H<sub>2</sub>O. Le pH de la solution est alors ajusté à 9 à l'aide de NEt<sub>3</sub>, puis un gros excès de réactif permettant d'introduire le groupe protecteur (Fmoc-OSu) est ajouté en plusieurs portions successives. L'excès de réactif reste en

suspension dans le mélange réactionnel. Le produit **52** est précipité par le versement du mélange réactionnel dans HCl 2N puis par refroidissement à 5°C. L'isolement de **52** s'avère être délicat, du fait de la présence d'une grande quantité de Fmoc-OSu non-réagi. Le rendement médiocre de cette étape (60 %) s'explique principalement par la stabilité limitée de ALA à des pH basiques (voir Figure No.33), et donc par l'existence de réactions secondaires non-désirées (formation de la pyrazine par dimérisation de ALA).

### 5.3.1.2. Synthèse de l'ester **53**

Afin de tester la réactivité de ALA sur son C-terminal, et en vue de charger **52** sur la résine de type Wang, nous nous sommes intéressés à l'estérification la plus simple de **52**, c'est-à-dire à la synthèse de méthylester **53**. La méthode synthétique choisie est celle des anhydrides mixtes [222] : **52** est dissout dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et refroidi à 0°C sous atmosphère inerte, puis adjonctions successives de NEt<sub>3</sub>, ClCOOMe et DMAP. Purification par chromatographie-éclair sur gel de silice (rendement : 71 %).

Ce résultat est encourageant et confirme que la réactivité du C-terminal de ALA est similaire à celle de ses homologues  $\alpha$ -aminés.

### 5.3.1.3. Autres essais de N-protection sur ALA

Afin de mieux comprendre la réactivité de ALA au niveau de son N-terminal, nous nous sommes intéressés à la synthèse de deux autres ALA N-protégés : Boc-(ALA)-OH et Ac-(ALA)-OH. Toutefois, ces deux composés présentent le double désavantage de ne pas être UV-actifs et d'être purifiés difficilement par chromatographie sur gel de silice, d'où des rendements inférieurs à 20 %. Or, pour une éventuelle application sur phase solide, le rendement de la N-protection doit être supérieur à 60 % et la possibilité de suivre la N-déprotection par spectroscopie UV-visible cruciale, d'où notre choix définitif pour le groupe Fmoc.

Maintenant que l'étape de N-protection de ALA est définitivement mise au point, nous sommes en mesure de nous concentrer sur la prochaine étape : le chargement de **52** sur le support solide.

### 5.3.2. Chargement de Fmoc-(ALA)-OH sur la phase solide

L'étape suivante dans notre stratégie SPPS est représentée par le chargement de **52** sur le support solide (Figure No.44). Comme nous l'avons précisé plus haut, notre choix s'est porté sur le support polymérique de type Wang [223] qui, après clivage par le TFA, permet de libérer le peptide synthétisé sous la forme d'un acide carboxylique. La résine Wang étant du

type hydroxyméthyle, le chargement de 52 se fait par réaction d'estérification, comme le démontre la figure ci-dessous.

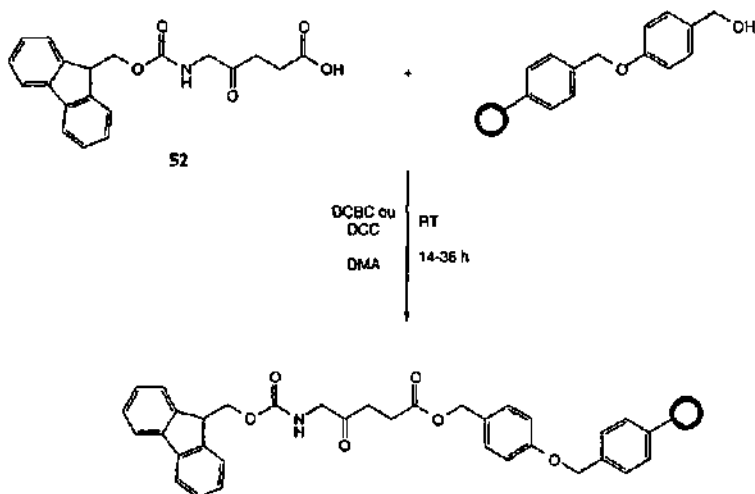


Figure No.44 : Chargement par estérification de 52 sur une résine de type Wang

La réaction d'estérification se fait en milieu hétérogène sous atmosphère inerte et à RT. En règle générale, le support polymérique nu (charge : 0.780 mmol/g, 1.1 mmol, 1.0 éq.) est agité durant 10 min. dans un volume réduit de DMA dégazé<sup>1</sup> (noté dorénavant DMA), de manière à permettre le gonflement des grains de la résine. Ensuite, l'acide  $\delta$ -aminé protégé 52, en excès (2.0 éq.), est ajouté au mélange brunâtre avec les réactifs nécessaires (2.0 éq.). La durée de la réaction varie en fonction de la méthode d'estérification considérée.

Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à deux variantes possibles :

Méthode A : l'utilisation de DCC en présence de DMAP et de NMM.

Méthode B : l'utilisation du chlorure de 2, 6-dichlorobenzoyl (DCBC) en présence de pyridine.

Les résultats sont résumés dans le Tableau No.5 :

<sup>1</sup>L'emploi de DMA dégazé (agité durant 15 min. sous vide afin d'éliminer le maximum de dioxyde de carbone dissout) s'explique, d'une part, par son grand pouvoir de solvation et, d'autre part, par sa basicité moins prononcée que le DMF plus communément utilisé

**Tableau No.5** Détails et rendements des méthodes d'estérification considérées pour le chargement de **52** sur la résine de type Wang

Essai	Réactifs	Durée	Rendement
<b>A</b>	DCC, NMM (2.0 éq.)	24-36 h	60-75 %
	DMAP (0.1 éq.)		
<b>B</b>	DCBC, Pyridine (2.0 éq.)	12-18 h	70-80 %

Une fois la durée nécessaire au chargement complet de **52** sur le support polymérique écoulée, la résine est filtrée puis elle est lavée à l'aide d'une séquence alternée DMA/*i*-PrOH, de manière à débarrasser les grains des réactifs en excès. Avant le séchage, une étape cruciale est représentée par l'étape de "coiffage" (en anglais : "capping") qui induit, à travers une acétylation grâce à une solution 10 % d'anhydride acétique dans le DMA, un blocage des groupes hydroxyles libres présents sur la surface du support solide et n'ayant pas réagi avec **52**. Cette étape permet d'éviter des réactions secondaires et ainsi, la formation sur le support de séquences peptidiques non-désirées.

Après les étapes de lavage et de coiffage, la résine chargée est séchée sous vide durant 24 heures et elle est conservée à une température de 5°C sous atmosphère inerte. La détermination de la charge de la résine de type Wang se fait à travers la déprotection Fmoc du *N*-terminal de **52** chargé et grâce à la comparaison de l'intensité du signal UV avant et après la réaction d'estérification. En règle générale, les charges habituelles obtenues avec ces méthodes d'estérification varient entre 0.500 mmol/g et 0.800 mmol/g.

Par conséquent, malgré une réactivité inférieure dans les couplages peptidiques en solution et dans la protection de son *N*-terminal par rapport à ses homologues  $\alpha$ -aminés, le chargement de ALA par estérification sur une résine de type Wang se déroule avec des rendements satisfaisants, même si les rendements habituels se situent en-dessus de 90 %. Mais ces résultats nous permettent d'envisager avec optimisme la prochaine étape dans notre stratégie SPPS : la construction d'une séquence peptidique basée sur ALA.

### 5.3.3. Synthèse sur phase solide de dérivés peptidiques de ALA

Maintenant que ALA est fixé sur le support polymérique, la suite de notre travail consiste en une synthèse peptidique adaptée à la phase solide. Les conditions réactionnelles sont identiques à celles considérées dans la partie 5.2., c'est-à-dire en solution, avec l'avantage

supplémentaire, toutefois, de pouvoir utiliser de grands excès de réactifs pour pousser la réaction jusqu'à conversion maximale.

La réaction de couplage peptidique est réalisée pratiquement à l'aide de frites et de pompes, en mesure d'ajouter et d'éliminer les solutions contenant les réactifs et les solvants de lavage à l'abri de l'humidité; d'autre part, l'utilisation d'ordinateurs pour la direction des diverses opérations mécaniques nous permet de quantifier les adjonctions, les lavages et les éliminations de liquides.

Mais, avant de nous concentrer sur la construction d'une séquence peptidique basée sur ALA, nous nous sommes intéressés à la construction d'une séquence-modèle simple composée de trois acides  $\alpha$ -aminés naturels. Toutes les opérations sont détaillées pour cet exemple.

### 5.3.3.1. Essai de synthèse sur phase solide de la séquence-modèle Ser-Ala-Ala

Pour la construction de ce tripeptide, notre point de départ est représenté par le couplage de Fmoc-(Ala)-OH 70 sur une résine de type Fmoc-(Ala)-Wang (charge : 0,600 mmol/g). Afin de travailler avec 0,150 mmol environ, nous démarrons avec env. 250 mg de résine chargée.

Dans un premier temps, la résine chargée est lavée plusieurs fois à l'aide de la séquence alternée DMA/*i*-PrOH, puis elle est traitée avec une solution 20 % dans le DMA de pipéridine afin de déprotéger le *N*-terminal de Ala chargée. La mesure de l'intensité du signal UV relatif à l'absorption de l'adduit A (voir Figure No.42) libéré nous permet alors de déterminer le nombre de moles exact de résine engagées dans cette synthèse : 0,155 mmol.

Le couplage du premier acide aminé *N*-protégé se fait grâce à l'emploi de 3,0 éq. de Fmoc-(Ala)-OH 70 dissous dans 0,99 ml (3,3 éq.) d'une solution 0,5 M d'HOBt dans le DMA et 0,25 ml (3,3 éq.) d'une solution 2,0 M de DIC dans le DMA. Cette solution incolore est alors préactivée à RT durant 40 min., puis elle est ajoutée en une portion à la résine chargée déprotégée. Le mélange hétérogène est alors agité durant 45 min., puis le liquide est éliminé et la résine lavée plusieurs fois avec DMA et *i*-PrOH, avant d'être finalement coiffée par acétylation.

Le rendement du couplage est calculé par la mesure de l'intensité du signal UV relatif à l'absorption caractéristique de l'adduit A libéré suite à la déprotection Fmoc sur Ala fraîchement couplée, puis par comparaison des absorbances avant et après le couplage. Pour cette étape, le rendement du couplage Ala-Ala est de 97 %.

De la même manière, le couplage du second acide aminé *N*-protégé est effectué à l'aide de 3,0 éq. de Fmoc-(Phe)-OH 71. Les mêmes opérations sont réalisées pour la préactivation et la

durée du couplage est cette fois de 40 min. Après l'étape de coiffage, le calcul du rendement permet d'affirmer que le couplage peptidique Phe-Ala s'est fait avec un rendement de 95 %<sup>1</sup>.

Maintenant que le tripeptide est synthétisé, il est nécessaire de nous concentrer sur l'étape de clivage du support solide. Cette opération est réalisée par simple agitation de la résine chargée et coiffée dans TFA durant 15 min., puis par lavage de la résine à l'aide de trifluoroéthanol (TFE) et de 1,2-dichloroéthane (DCE). Les filtrats sont réunis et concentrés, d'où la récupération d'une pâte brune, qui est précipitée dans un mélange 1:1 de diisopropyléther (DIPE) / pétroléther (PE). Isolement d'un solide beige, qui est séché puis analysé à l'aide de la technique LC-MS, qui nous confirme l'existence du tripeptide désirée par la présence d'un signal à  $m/z = 248.1 \text{ Da } [M + H]^+$ .

### 5.3.3.2. Essai de synthèse sur phase solide de la séquence Val-Ala-ALA

Pour la construction de cette séquence, notre point de départ est représenté par une résine du type Fmoc-(ALA)-Wang. La charge, après déprotection Fmoc, étant de 0.300 mmol/g, nous avons opté pour le couplage de 3.0 mmol de Fmoc-(Ala)-OH **70**, de manière à travailler avec 10 éq. en excès. Le couplage peptidique requiert donc 3.3 mmol d'une solution 0.5 M de HOBt et 3.3 mmol d'une solution 2.0 M de DIC. Après une préactivation de 45 min., résine chargée déprotégée et solution d'acide  $\alpha$ -aminé préactivé sont mélangés et agités ensemble durant 30 min. Ces opérations sont répétées une deuxième fois pour un double-couplage de Fmoc-(Ala)-OH **70** (durée : 60 min.). Lavage et étape finale de coiffage.

Toutefois, lors de l'étape de déprotection Fmoc de l'unité Ala fraîchement couplée, l'intensité du signal relatif à l'absorption UV du composé est plus fort que celui donné par la résine de départ, ce qui signifie un rendement du couplage peptidique supérieur à 100 % !

- Explications :
- a) les étapes de lavage, après le double-couplage, ont été trop courtes et le signal UV est faussé par les molécules de Fmoc-(Ala)-OH **70** encore présentes dans le mélange final
  - b) l'étape de coiffage trop courte a permis aux groupes hydroxyyles libres n'ayant pas réagi ( $\eta < 100\%$ ) d'être estérifiés par le grand excès (10 éq.) de Fmoc-(Ala)-OH **70**, d'où le risque de se retrouver en fin de synthèse avec des séquences non-désirées du type Val-Ala.

---

<sup>1</sup>La synthèse sur phase solide de cette séquence naturelle peut être considérée comme réussie, même si les rendements peuvent être optimisés à > 98 %

Malgré ce résultat surprenant, nous avons procédé au double-couplage de Fmoc-(Val)-OH 79 (4.0 mmol) en suivant le même mode opératoire et en rallongeant sensiblement les étapes de lavage et de coiffage. Dans ce cas, le signal relatif à l'absorption UV après la déprotection Fmoc du second acide  $\alpha$ -aminé *N*-protégé nous permet d'estimer le rendement du couplage Val-Ala à 98 %. Le deuxième couplage ne semble donc pas être influencé par le premier couplage inhabituel.

Le tripeptide synthétisé sur phase solide est alors clivé de la résine à l'aide d'une solution 30 % de TFA dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (conditions volontairement douces), le filtrat est concentré puis précipité dans un mélange 1:1 de DIPE/PE. Isolement d'une pâte beige. Une analyse HPLC du produit brut de réaction nous confirme l'existence de deux produits principaux, qui s'avèrent être, après une analyse plus détaillée LC-MS, majoritairement (> 80 %) le dipeptide Val-Ala accompagné de quelques traces (< 20 %) du tripeptide Val-Ala-ALA désiré.

La synthèse sur phase solide d'une séquence peptidique basée sur ALA n'a effectivement pas fonctionné et il nous faut par conséquent penser à une alternative.

#### 5.3.3.3. Essai de synthèse sur phase solide de la séquence ALA-Gly

Vu que le chargement de ALA sur la résine de type Wang est caractérisé par des rendements moyens, il serait intéressant de vérifier la réactivité de ALA lors de son couplage avec un acide  $\alpha$ -aminé déjà chargé sur le support polymérique.

Point de départ : résine acide du type Fmoc-(Gly)-Wang (charge : 0.300 mmol/g) et emploi de 3.0 éq. pour le couplage de 52.

Mode opératoire : stratégie de double-couplage et étape finale de coiffage conduisent à une résine orange.

Mais, lors de la déprotection Fmoc du *N*-terminal de ALA fraîchement couplé, le signal UV relatif à l'absorption de l'adduit A (voir Figure No.42) libéré correspond, après comparaison avec le signal UV de la résine chargée, à un rendement de 12 % pour le couplage ALA-Gly !

- Hypothèses :
- a) ALA semble poser des problèmes, aussi bien au niveau de son chargement sur la résine de type Wang qu'au niveau du couplage avec d'autres acides  $\alpha$ -aminés
  - b) le groupe carbonyle positionné en  $\gamma$  dans la structure de ALA semble jouer un rôle prépondérant dans sa réactivité en SPPS.

### 5.3.4. Mise en évidence de l'instabilité de ALA en présence de pipéridine

Maintenant que nous avons émis des hypothèses au sujet des problèmes rencontrés dans l'application sur phase solide de ALA, il est nécessaire de procéder à une étude de la stabilité de ce dernier sous les conditions réactionnelles considérées en SPPS. Pour cela, des études sur CCM de la stabilité de ALA (**1**) et de **52** en présence de pipéridine (nécessaire pour la déprotection Fmoc) ont prouvé que la réactivité de **1** sur la phase solide est comparable à celle en solution, c'est-à-dire que nous assistons probablement à la dimérisation de **1** en pyrazine correspondante **51** (voir figure No.33).

En fait, malgré une charge relativement basse (0.500 mmol/g - 0.800 mmol/g), les molécules de ALA fixées sur le support polymérique sont suffisamment proches pour participer à la dimérisation et, ainsi, rendre la synthèse d'une séquence peptidique basée sur ALA pratiquement impossible.

Ces résultats et conclusions nous ont amenés à réfléchir sur l'utilisation en SPPS de ALA sous une forme masquée ou modifiée, par exemple en rendant momentanément le groupe positionné en  $\gamma$  dans la structure inactif.

### 5.3.5. Essais de synthèse sur phase solide avec ALA modifié

Notre première idée a consisté à masquer momentanément le groupe carbonyle positionné en  $\gamma$  de deux manières :

- soit via la formation d'un dioxolane à l'aide de diéthylène glycol
- soit par réduction du groupe carbonyle en hydroxyle à l'aide de  $\text{NaBH}_4$  [224].

Malheureusement, le masquage via la formation d'un dioxolane a été rapidement abandonné, parce que le composé formé est trop sensible à l'hydrolyse et qu'il est très difficile de garantir des conditions réactionnelles anhydres lors de manipulations sur phase solide.

Dans le cas de la réduction à l'aide de  $\text{NaBH}_4$ , la réaction s'est avérée réalisable en solution ( $\eta < 50\%$ ), mais la protection Fmoc du *N*-terminal du composé hydroxylé pose de sérieux problèmes ( $\eta < 20\%$ ), ce qui pénalise sérieusement cette alternative.

En conclusion, l'idée de modifier ALA pour son utilisation dans la construction de peptides semble être applicable à la synthèse en solution, mais pas à la synthèse sur phase solide, qui s'est avérée être beaucoup plus sensible à la nature des conditions environnantes. En effet, des réactions, telles que l'oxydation ou la réduction, ne sont pas, de nos jours, encore totalement maîtrisées sur phase solide.

### 5.3.6. Essais de synthèse sur phase solide avec Boc-(ALA)-OH

En dépit du rendement médiocre relatif à la protection Boc du *N*-terminal de ALA, nous sommes tout de même intéressés à la construction d'une séquence du type Phe-Ala-ALA-Gly en considérant Boc-(ALA)-OH 67 comme unité synthétique. L'avantage principal de cette approche étant évidemment l'emploi d'un acide, en lieu et place d'une base faible, pour la déprotection du *N*-terminal.

Le mode opératoire et la stratégie synthétique suivis pour la construction du tetrapeptide sont identiques à ceux considérés dans la partie 5.3. L'utilisation du groupe Boc ne nous permet cependant pas de quantifier le rendement du couplage de ALA sur la résine chargée, mais les rendements des couplages subséquents de Fmoc-(Ala)-OH 70 et de Fmoc-(Phe)-OH 71 sont tous deux estimés à 83 %<sup>1</sup>, ce qui confirme que ALA est sensible à la pipéridine, même s'il est déjà fixé sur le support polymérique au sein d'une séquence peptidique.

- Conclusions :**
- (a) l'utilisation du groupe Fmoc pour la protection du *N*-terminal des unités synthétiques s'avère **primordiale** en SPPS, car elle permet le calcul des rendements des différents couplages
  - (b) le groupe carbonyle positionné en  $\gamma$  au sein de la structure de ALA étant source de problèmes de réactivité et de stabilité de la molécule, il est désormais nécessaire de se concentrer sur l'emploi d'analogues de ALA pour une application de la chimie peptidique sur phase solide.

### 5.3.7. Synthèse peptidique sur phase solide avec l'acide 5-aminovalérique

La possibilité la plus sûre d'éviter des problèmes causés par l'existence d'un groupe carbonyle positionné en  $\gamma$  dans ALA est de supprimer ce dernier et de s'intéresser ainsi à l'acide 5-aminovalérique ou AVA 54.

Mais, comme pour ALA, avant de développer une chimie peptidique sur phase solide basée sur AVA, il est nécessaire de procéder à une étude de réactivité de ce composé en solution.

---

<sup>1</sup>Ces rendements ont fait que nous ne sommes pas intéressés à l'analyse détaillée LC-MS du composé isolé après clivage du support solide

### 5.3.7.1. Protection du N-terminal de AVA

Comme dans le cas de ALA, le groupe protecteur désigné est le groupe Fmoc, d'autant plus que nous savons maintenant que le groupe Boc se prête mal à une application en SPPS.

Le mode opératoire, ainsi que les conditions réactionnelles considérés sont identiques à ceux appliqués pour la protection du N-terminal de ALA, exception faite de l'emploi du dioxane à la place du DMF (AVA est nettement mieux soluble dans les solvants organiques que ALA).

Le rendement obtenu pour la synthèse de **55** (83 %) confirme la meilleure réactivité<sup>4</sup> de AVA, ce qui de bonne augure en vue d'une application en SPPS.

### 5.3.7.2. Essais d'estérification de AVA en solution

La prochaine étape intéressante est représentée par l'estérification du C-terminal de **55** en solution. La méthode envisagée pour la synthèse du méthylester **56** est celle des anhydrides mixtes [222] : **55** est dissout dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et refroidi à 0°C sous atmosphère inerte, puis adjonctions successives de  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{ClCOOMe}$  et  $\text{DMAP}$ .

Dans le cas du benzylester **57**, nous avons appliqué la méthode de synthèse mise au point par Eschenmoser [225], où l'agent d'estérification est représenté par un acétal du DMF  $[(\text{CH}_3)_2\text{NCH}(\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5)_2]$  avec le benzène comme solvant. Ainsi, nous avons pu synthétiser, après purification, **56** avec un rendement de 64 % et **57** avec un rendement de 66 %.

### 5.3.7.3. Chargement de Fmoc-(AVA)-OH (**55**) sur la phase solide

L'étape suivante dans notre stratégie mise au point est, comme nous le savons maintenant, le chargement de **55** sur une résine de type Wang (charge : 0.780 mmol/g), afin d'obtenir, après clivage du support polymérique, un acide carboxylique sur le C-terminal.

Le chargement, comme dans le cas de ALA (voir partie 5.3.2.), se fait à travers une réaction d'estérification. La stoechiométrie est, cette fois-ci, de 3:1 en faveur de **55**, avec 3.3 éq. de DCC, 0.3 éq. de  $\text{DMAP}$  et 1.0 éq. de  $\text{NMM}$ , le tout mélangé selon le mode opératoire dans 20 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La durée de la synthèse est de 20 heures à RT et la charge obtenue est de 0.622 mmol/g, ce qui correspond à un rendement réactionnel de 80 %. La résine chargée et

---

<sup>4</sup>Le rendement obtenu pour **55** s'explique principalement par la meilleure solubilité de AVA dans les solvants organiques

déprotégée est alors lavée à l'aide d'*i*-PrOH, séchée sous vide et conservée à 5°C sous atmosphère inerte.

#### 5.3.7.4. Essai de synthèse sur phase solide de la séquence Phe-Ala-AVA

Cet essai de synthèse sur phase solide a été réalisé chez CIBA-GEIGY A.G. par M. E. Spiesser.

Le point de départ de cette synthèse est représenté par la résine chargée H-(AVA)-Wang (charge : 0.622 mmol/g). Emploi de 0.080 mmol de AVA (0.129 g de résine chargée H-(AVA)-Wang) et de 5.0 éq. de Fmoc-(Ala)-OH 70 pour le premier couplage peptidique : préactivation de 40 min. et double-couplage (120 min. + 110 min.); étapes de lavage, coiffage et déprotection Fmoc finale. Rendement calculé : 99 %.

Pour le deuxième couplage, utilisation de 5.0 éq. de Fmoc-(Phe)-OH 71 : préactivation durant 40 min. et double-couplage (60 min. + 70 min.); étapes de lavage, coiffage et déprotection Fmoc finale. Rendement calculé : 99 %.

Le clivage de la résine est réalisé à l'aide de TFA<sub>aq</sub> (95 %), de DCE et de TFE successivement. Les filtrats sont ensuite réunis, concentrés et le résidu pâteux jaune est précipité dans un mélange 1:1 DIPE/PE. Isolation d'un solide beige.

L'analyse LC-MS nous permet d'identifier le signal principal (> 90 %) comme étant le signal caractéristique du dipeptide Phe-Ala (seulement < 10 % du tripeptide Phe-Ala-AVA désiré).

**Hypothèse<sup>1</sup> :** L'acide 5-aminovalérique 54 semble également être sensible à la présence de pipéridine nécessaire à la déprotection Fmoc de son *N*-terminal. Comme dans le cas de ALA en effet, la réaction d'estérification semble se dérouler normalement, mais au moment de la déprotection, le *N*-terminal libre, rendu très nucléophile, est en mesure de provoquer l'ammonolyse du linker de type ester et d'induire ainsi la cyclisation de 54 en valérolactame. Ce dernier, qui n'est plus fixé sur le support solide, peut être ensuite éliminé lors du lavage du mélange réactionnel, et le linker de se retrouver nu comme au départ, d'où l'explication de la formation majoritaire du dipeptide Phe-Ala.

---

<sup>1</sup>La formation de valérolactame n'ayant pas été prouvée jusqu'à maintenant, il n'est pas possible d'expliquer avec certitude ces résultats, d'où la notion d'hypothèse

La figure No.45 illustre bien cette explication :

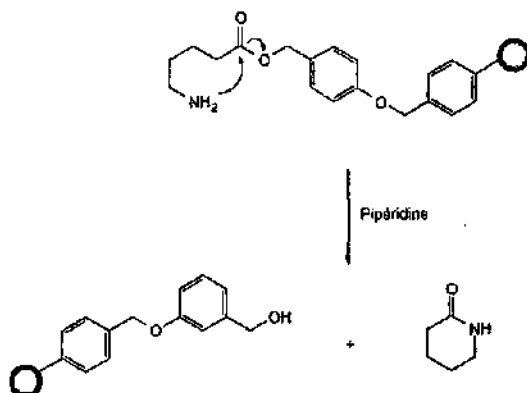


Figure No.45 : Explication de la formation éventuelle du valérolactame par ammonolyse du linker Wang

Ce phénomène éventuel d'auto-ammonolyse<sup>1</sup> s'avère être décisif pour la non-réalisation de séquences peptidiques basées sur AVA 54.

Etant donné les divers problèmes rencontrés avec les acides  $\delta$ -aminés, très peu stables sur phase solide, nous avons décidé de nous concentrer sur l'emploi d'un acide  $\gamma$ -aminé : l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique ou GABA. Dans le cas de GABA en effet, la synthèse d'une séquence peptidique sur phase solide semble, à priori, envisageable, puisque la dimérisation est impossible, vu qu'il ne possède aucun groupe carbonyle au sein de sa structure.

### 5.3.8. Synthèse peptidique sur phase solide avec l'acide $\gamma$ -aminobutyrique

La décision de nous intéresser à la synthèse peptidique sur phase solide de dérivés basés sur GABA a été prise afin de vérifier si notre stratégie SPPS mise au point est applicable aux acides aminés autres que les vingt acides  $\alpha$ -aminés naturels.

Comme pour chaque nouveau composé de base considéré, il est tout d'abord nécessaire de procéder à une étude de réactivité de GABA en solution. L'avantage principal de GABA, un acide aminé déjà étudié profondément pour d'autres applications, est l'existence d'un certain nombre de ses dérivés sous forme commerciale; le dérivé *N*-protégé, notamment, est commercial (Novabiochem) et nous permet ainsi d'épargner une étape de protection sur son *N*-terminal.

<sup>1</sup>Cette réactivité, où un résidu déjà chargé sur le support solide est éliminé suite à une réaction secondaire, est déjà connue pour des séquences peptidiques du type Gly-Pro

En revanche, avant de nous intéresser au chargement de GABA sur un support polymérique, nous avons décidé de nous concentrer sur l'estérification de son C-terminal en solution.

#### 5.3.8.1. Essais d'estérification de GABA en solution

Dans le cas de GABA, nous avons procédé aux synthèses respectives du méthylester **62** et du benzylester **63**. Le premier a été obtenu via la méthode des anhydrides mixtes ( $\eta = 61\%$ ), alors que **63** a été synthétisé selon la méthode développée par Wipf [226] : mélange, à RT, de 1.0 éq. de Fmoc-(GABA)-OH **61** avec 1.2 éq. de BnOH, 1.5 éq. de EDC et 0.1 éq. de DMAP dans 10 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Agitation à RT durant 24 heures, extraction liquide-liquide et purification par chromatographie-éclair sur colonne ( $\eta = 34\%$ ). (A noter que nous avons choisi cette méthode de synthèse, car le réactif nécessaire à l'estérification selon Eschenmoser [225] n'était plus disponible).

Malgré ces rendements d'estérification en solution plutôt décevants, nous avons décidé de tester la réactivité de GABA sur la phase solide.

#### 5.3.8.2. Chargement de Fmoc-(GABA)-OH (**61**) sur la phase solide

Le support polymérique choisi est toujours une résine du type Wang, de manière à synthétiser un acide carboxylique. La charge de la résine de départ est de 0,780 mmol/g et la réaction d'estérification est réalisée à l'aide de 3.0 éq. de **61**, 3.3 éq. de DCC, 0.1 éq. de DMAP et 0.3 éq. de  $\text{NEt}_3$  dans 10 ml de DMA. Durée de la réaction : 8 heures. La résine est alors lavée, puis acétylée avant d'être séchée et conservée à 5°C, sans avoir déprotégé le groupe Fmoc.

#### 5.3.8.3. Essai de synthèse sur phase solide de la séquence Fmoc-(Phe-Ala-GABA)-OH

Cet essai de synthèse sur phase solide a été réalisé chez CIBA-GEIGY par M. E. Spieser.

La résine préparée fraîchement ci-dessus est déprotégée sur son N-terminal et la charge de GABA est estimée à env. 0.300 mmol/g, ce qui représente un rendement réactionnel de 38 % très faible.

Pour le premier couplage, utilisation de 0.050 mmol de GABA et de 4.0 éq. de Fmoc-(Ala)-OH **70** : préactivation durant 40 min. à RT, double-couplage (60 min. + 40 min.), étapes de lavage, coiffage et déprotection Fmoc, d'où un rendement de 91 % pour le couplage Ala-GABA. Pour le deuxième couplage, emploi de 4.0 éq. de Fmoc-(Phe)-OH **71** : préactivation durant 40 min. à RT, double-couplage (70 min. + 40 min.).

La résine chargée est alors lavée, mais ni coiffée ni Fmoc-déprotégée. Le peptide construit est en fait clivé du support polymérique à l'aide  $\text{TFA}_{\text{aq}}$  (95 %), DCE et TFE, les filtrats sont

réunis pnis concentrés, et le résidu huileux est précipité dans un mélange 1:1 de DIPE/PE. Isolement d'une pâte beige, qui s'avère, après analyse détaillée LC-MS, être le tripeptide désiré ( $C_{31}H_{33}N_3O_6$  M calc. : 543.6, mes. : 544.0  $[M + H]^+$ ). RP-HPLC (10 - 90 % ACN en 30 min.;  $C_8$ )  $t_R$  = 29.3 min., pureté > 78 %.

En conclusion, même si les rendements individuels ne sont pas optimaux, la synthèse peptidique sur phase solide de dérivés basés sur GABA est possible. Ce résultat est rassurant quant à la considération des conditions réactionnelles retenues pour la SPPS, mais confirme les difficultés rencontrées avec les acides  $\delta$ -aminés.

#### 5.4. Conclusions et perspectives

L'idée de pouvoir construire sur phase solide une série de tripeptides basés sur ALA s'est malheureusement révélée irréalisable jusqu'à aujourd'hui. En effet, malgré des résultats encourageants en solution, la chimie peptidique sur phase solide basée sur ALA est pénalisée par l'instabilité de ce dernier en présence d'une base, même très faible (par ex. la pipéridine ou la diéthylamine). Ce phénomène nous a incité à travailler avec des acides  $\delta$ -aminés dépourvus de groupe carbonyle positionné en  $\gamma$ .

Cependant, l'alternative consistant à masquer le groupe carbonyle positionné en  $\gamma$  dans la structure de ALA, qui semblait excellente pour la chimie en solution, s'est démontrée très délicate à réaliser sur phase solide, particulièrement à cause du manque de descriptions dans la littérature d'exemples de réactions d'oxydation et de réduction en SPPS.

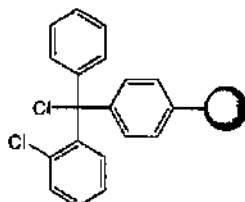
D'autre part, l'idée de remplacer ALA par son analogue non-carbonylé AVA s'est révélée être un échec, puisque ce dernier, en présence d'une base (par. ex. la pipéridine ou la diéthylamine), semble être en mesure de cycliser instantanément pour former le valérolactame (voir hypothèse page No.106 et figure No.45), rendant ainsi impossible le couplage d'un autre acide aminé.

Il est ici important de noter que les deux phénomènes (dimérisation et cyclisation) caractérisant les acides  $\delta$ -aminés étaient déjà connus en solution, mais qu'aucune référence dans la littérature ne faisait part des problèmes rencontrés sur phase solide.

Etant donné que l'insertion d'un acide  $\alpha$ -aminé intermédiaire entre le support polymérique et l'acide  $\delta$ -aminé à coupler ne modifie en rien la sensibilité de ces derniers, une solution à nos problèmes pourrait être la considération d'un autre type de linker. En effet, la résine du type Wang [223] semble être trop "dure", raison pour laquelle elle influence considérablement la répartition électronique dans les liaisons voisines. La conséquence principale de ce phénomène est une modification de la nature de la liaison ester permettant le couplage du premier acide aminé sur le support polymérique.

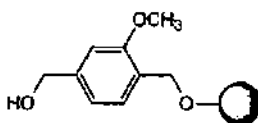
Récemment, des résines, considérées comme plus "douces" de ce point de vue et basées sur un principe de gêne stérique, ont été développées et commercialisées :

- les résines du type "2-chlorotrityle" [227]



D'autres résines, mettant en jeu l'influence électronique des substituants fixés sur le linker, ont également été mises sur le marché :

- les résines du type SASRIN™ [83]



D'autre part, afin d'éviter les problèmes rencontrés avec ALA (ou AVA) après la déprotection de son *N*-terminal, il est possible d'imaginer l'application d'un groupe *N*-protecteur acido-labile et UV actif, tel que le groupe biphenylylisopropylloxycarbonyl ou Bpoc [228] (Figure No.46).

Une autre alternative élégante à l'emploi de groupes *N*-protecteurs clivables par l'action d'un réactif chimique est la considération de groupes protecteurs enzymo-labiles. Dans ce contexte, un exemple de synthèse sur phase solide a été publié récemment par Waldmann [229].

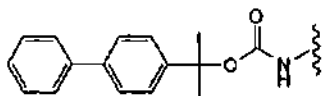


Figure No.46 : Utilisation du groupe Bpoc dans la protection du *N*-terminal

Une autre stratégie à envisager pour une synthèse peptidique basée sur ALA (ou AVA) efficace sur phase solide pourrait être représentée par un chargement "volontairement

incomplet" de ce dernier sur le support polymérique. En effet, les charges commerciales se situant aux alentours de 0.500 mmol/g, il serait envisageable de charger la résine de départ à env. 0.050 - 0.100 mmol/g grâce à l'utilisation de solutions très diluées d'acide  $\delta$ -aminé. A noter toutefois que l'étape de coiffage (ou de blocage des fonctions hydroxyles non-réagies) représente, dans ce cas, une étape cruciale en vue d'une synthèse univoque à la surface du support solide.

Une autre possibilité pour éviter la dimérisation de ALA en présence d'une base est représentée par le chargement direct d'un dipeptide basé sur ALA sur le support polymérique. De cette manière, la fonction amine positionnée en  $\delta$  dans la structure de ALA ne peut participer à la dimérisation, vu qu'elle est masquée sous la forme d'une amide.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la chimie peptidique basée sur le dipeptide naturel et commercial H-(Gly-Gly)-OH 64, afin de comprendre si le chargement direct d'une telle molécule sur une phase solide est envisageable (opération peu connue jusqu'à aujourd'hui).

### 5.5. Remplacement de ALA par H-(Gly-Gly)-OH en chimie peptidique

En vue de ramener la chimie peptidique sur phase solide à une séquence de couplages/*N*-déprotections d'acides  $\alpha$ -aminés naturels, l'idée consistant à remplacer ALA par le dipeptide H-(Gly-Gly)-OH 64 semble fondée, d'autant plus que les structures des deux composés sont semblables (Figure No.47). En fait, la seule différence existant entre ALA 1 et H-(Gly-Gly)-OH 64 est l'introduction d'une fonction amide à la place d'un groupe carbonyle (possible selon les conditions établies dans la partie 5.1.).

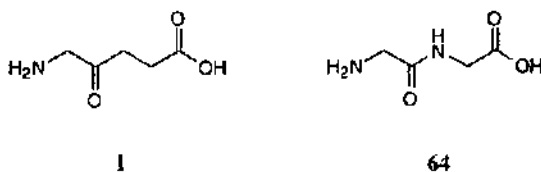


Figure No.47 : Comparaison des structures de ALA et de H-(Gly-Gly)-OH

D'autre part, des travaux précédents [15] sur l'inhibition de PBGS ont permis d'affirmer que Ac-(Gly)-OH 68 représente un inhibiteur de type compétitif très médiocre ( $K_i = 18'800 \mu\text{M}$ ).

Mais la substitution d'un groupe méthylène par un groupe amine secondaire peut nous indiquer si la stratégie mettant en jeu des dérivés peptidiques est à abandonner définitivement.

En fait, les deux avantages principaux de cette nouvelle approche sont :

- la chimie peptidique sur phase solide de dérivés constitués uniquement d'acides  $\alpha$ -aminés est bien connue et caractérisée
- ces connaissances nous permettent d'envisager la construction rapide sur phase solide de peptides potentiellement intéressants en tant qu'inhibiteurs de PBGS.

### 5.5.1. Synthèse peptidique en solution basé sur H-(Gly-Gly)-OH (64)

Comme dans le cas des acides  $\delta$ -aminés, il est important, dans un premier temps, de vérifier la réactivité de H-(Gly-Gly)-OH 64 en solution. Cette étude se déroule en trois phases successives :

- protection du *N*-terminal de 64
- estérification directe du *C*-terminal de 64
- couplage peptidique avec le dérivé *C*-protégé de 64.

#### 5.5.1.1. Protection du *N*-terminal de H-(Gly-Gly)-OH (64)

La première étape de notre stratégie de synthèse en solution de dérivés peptidiques basés sur 64 consiste donc en la protection du *N*-terminal de ce dernier à l'aide du groupe appliqué en SPPS : le groupe protecteur Fmoc.

La méthode de synthèse du dérivé *N*-protégé 65 est celle appliquée pour les acides  $\delta$ -aminés, exception faite du remplacement du DMF par le dioxane, vu la bonne solubilité de 64 dans les solvants organiques. Rendement : 89 %.

#### 5.5.1.2. Protection du *C*-terminal de H-(Gly-Gly)-OH (64)

En vue de développer une synthèse sur phase solide basée sur 64, il est important de vérifier sa réactivité au niveau de son *C*-terminal également.

Pour cela, nous avons procédé à la synthèse de l'ester benzylique 66, mais sans protection préalable du *C*-terminal du dipeptide de départ (Figure No.48).

En effet, la méthode développée par Crofts [230] permet la synthèse directe et stoechiométrique ( $\eta > 96\%$ ) du composé 66 sous la forme d'un sel, grâce à l'emploi d'un

large excès de  $\text{BnOH}$  (> 20 éq.) et d'une quantité équimolaire de  $p\text{-TsOH}$  dans un grand volume de  $\text{C}_6\text{H}_6$ .

En fait, pendant la réaction, l'eau formée durant la condensation est éliminée par distillation azeotropique du mélange réactionnel.

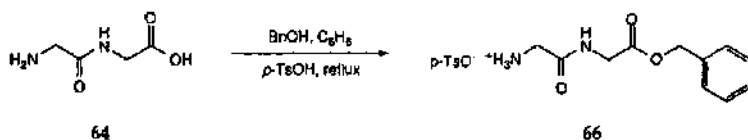


Figure No.48 : Synthèse de 66 selon la méthode de Crofts [230]

### 5.5.1.3. Synthèse de tripeptides basés sur H-(Gly-Gly)-OBn (66)

La dernière étape de notre stratégie de synthèse en solution de dérivés peptidiques basés sur 64 consiste donc à coupler le dérivé 66 sur son  $N$ -terminal avec des acides  $\alpha$ -aminés naturels (Figure No.49).

Ce couplage peptidique est réalisé selon le mode opératoire-type développée dans notre approche (voir partie 5.2.3. pour détails).

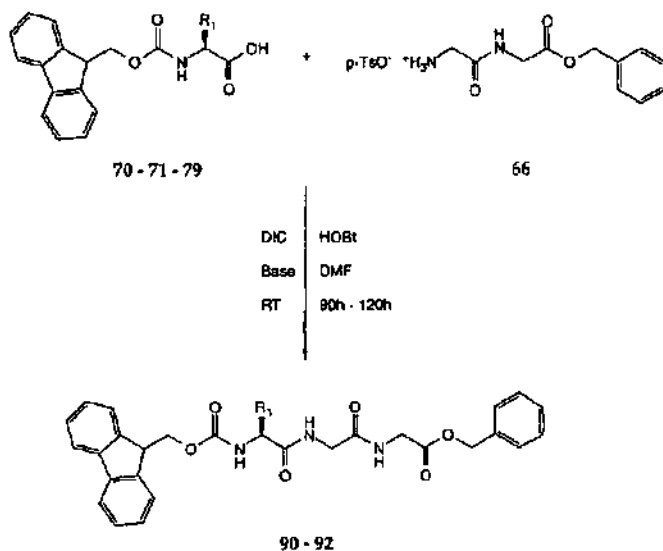


Figure No.49 : Schéma général de synthèse en solution des dérivés peptidiques 90 - 92

Tableau No.6 Rendements des synthèses des dérivés peptidiques 90 - 92

Composé	R	Durée	Rendement
90	CH <sub>3</sub>	120 heures	28 %
91	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	120 heures	55 %
92	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	90 heures	74 %

**Remarque :** La synthèse du tetrapeptide Fmoc-(Gly-Gly-Gly-Gly)-OBu se distingue par une étape de purification du produit brut de réaction particulièrement difficile, d'où un rendement très faible ( $\eta < 20\%$ ) pour le couplage de 65 avec 66.

Etant donné que les couplages peptidiques en solution d'acides  $\alpha$ -aminés avec 66 sont caractérisés par des rendements plutôt faibles, il serait judicieux, avant d'envisager une application de ce type de molécules sur la phase solide (qui s'est avérée souvent plus sensible que la synthèse en solution), de nous intéresser au pouvoir d'inhibition de ces derniers et de déduire ainsi s'il est vraiment utile de concentrer nos efforts dans cette nouvelle approche.

### 5.6. Résultats d'inhibition avec les composés du type H-(Gly-Gly)-OH (64)

Cette partie essentielle du travail a été réalisée dans nos laboratoires par Mmes C. Jarret et J. Bobalova, que je remercie cordialement.

Notre idée consiste, dans un premier temps, à tester l'efficacité du dipeptide commercial en tant qu'inhibiteur de PBGS. Toutefois, le résultat obtenu pour 64 ( $K_i = 100'000 \mu\text{M}$ ,  $K_M = 65 \mu\text{M}$ ) démontre que ce dernier ne peut être inclus dans la classe des inhibiteurs de PBGS.

D'autre part, le réactif de couplage DIC, utilisé dans la synthèse en solution des dérivés peptidiques, se distingue par la particularité de générer, en fin de réaction, une urée soluble dans la plupart des solvants organiques usuels : la *N,N'*-diisopropylurée DIU. Or, cette transformation, qui est un avantage certain sur phase solide, représente un obstacle en solution, puisque DIU contamine les dérivés peptidiques synthétisés. En effet, cette urée est difficilement éliminée lors des étapes de purification (répétition de plusieurs chromatographies-éclaircies sur gel de silice). Ainsi, nous nous sommes intéressés à déterminer le pouvoir d'inhibition de DIU, afin de savoir s'il est envisageable de procéder aux tests sur PBGS avec des dérivés peptidiques contaminés. Malheureusement, des tests préliminaires [15] ont démontré que DIU est un inhibiteur environ 10x plus puissant ( $K_i \approx 10'000 \mu\text{M}$ ,  $K_M$

= 65  $\mu\text{M}$ ) que 64, ce qui signifie qu'elle est certainement également meilleur inhibiteur de PBGS que la plupart des dérivés peptidiques synthétisés dans ce travail.

Ce résultat peut être considéré comme négatif, puisqu'il serait nécessaire de travailler avec des concentrations supérieures à 80'000  $\mu\text{M}$  pour entrevoir un effet inhibiteur.

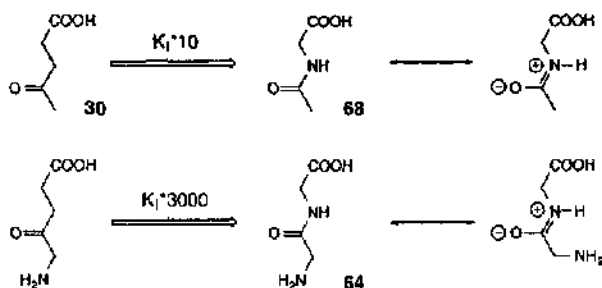


Figure No.30 : Comparaison entre Ac-(Gly)-OH 68 et H-(Gly-Gly)-OH 64

Deux points sont en mesure d'expliquer cette différence importante dans l'inhibition de l'enzyme PBGS :

- d'une part, le passage d'une fonction cétone à une fonction amide explique le facteur de dix caractérisant le passage de l'acide lévulinique 30 à l'acétyl-glycine 68. En fait, le changement de fonction modifie les propriétés du groupe carbonyle, ce qui est suffisant pour diminuer sensiblement la reconnaissance du substrat en question dans le site actif (les analogues du substrat ALA sont essentiellement reconnus dans le site A)
- d'autre part, la liaison amide, comme nous l'avons déjà précisé, possède un certain caractère insaturé, (double liaison entre N(3) et C(O)), ce qui confère une certaine planéité à la molécule.

Ces résultats préliminaires nous ont définitivement incités à chercher une autre application aux dérivés peptidiques de ALA synthétisés en solution. Les résultats obtenus dans cette nouvelle étude sont réunis dans le chapitre suivant.

---

## 6. Applications des dérivés peptidiques de ALA dans la PDT

Comme nous l'avons vu plus haut, les résultats controversés obtenus dans les différentes synthèses de dérivés peptidiques de ALA et dans le remplacement de ALA sur phase solide ont fait que nos recherches dans ce domaine ont été momentanément suspendues. D'autre part, les résultats récents [15] rassemblés au sein de notre groupe dans l'inhibition de PBGS ont montré que les dérivés peptidiques basés sur ALA ne représentaient pas une famille d'inhibiteurs très puissants et que la priorité serait donnée à d'autres types de structures potentiellement plus intéressantes.

Depuis environ cinq ans, un groupe de recherche, appartenant au Département de Génie Rural de l'EPFL et dirigé par le Professeur H. Van den Bergh, s'intéresse à l'application des dérivés de ALA en tant que précurseurs efficaces de la PpIX, photosensibilisateur puissant en PDT. En effet, dans la plupart des études cliniques et précliniques considérées [231,232], une application topique ou systémique d'un dérivé de ALA a induit une augmentation de l'accumulation de PpIX au sein des tissus ciblés.

D'autre part, la modification chimique de ALA a permis de traiter des couches cellulaires plus profondes et d'améliorer ainsi la pénétration médiocre de ALA à travers les membranes cellulaires et dans l'espace interstitiel des tissus [188,190,231]. Les essais les plus récents font appel à l'utilisation d'alkylesters de ALA en lieu et place de ALA lui-même [188,233]. Mais l'emploi de ces esters est limité par leur toxicité en fortes concentrations du fait de leur manque de sélectivité.

Notre idée a donc été de synthétiser de nouveaux dérivés en mesure de libérer ALA de manière plus sélective. Cette nouvelle collaboration a tout d'abord débouché sur deux travaux de diplôme [234-236], qui ont permis de définir les futures directions de nos recherches, puis, finalement, sur l'application des dérivés peptidiques de ALA, préparés dans un premier temps pour leur application en chimie combinatoire.

Il est important de noter que cette collaboration n'aurait jamais été possible sans le soutien de l'Institut de Pathologie du CHUV, en particulier du groupe de recherche dirigé par Mme le Dr. L. Juillerat, qui nous a mis à disposition ses infrastructures et ses connaissances au niveau des études de fluorescence sur les lignées cellulaires en culture.

Avant de nous concentrer sur les résultats obtenus dans le cadre de ce travail, il est judicieux de présenter brièvement les résultats et conclusions rassemblés dans les travaux précédents.

## 6.1. Résumés des travaux précédents dans le domaine ALA-PDT

Le premier travail, de nature purement synthétique [234], a consisté en la synthèse d'une série d'esters de ALA et en leur étude d'hydrolyse par l' $\alpha$ -chymotrypsine et par la *Hog liver esterase* (HLE).

### 6.1.1. Etudes de synthèse et d'hydrolyse d'esters de ALA

Le but principal de cette étude est de déterminer, après mise au point et optimisation de leurs synthèses respectives, la vitesse relative d'hydrolyse d'esters synthétisés de ALA par deux enzymes reconnus pour leur efficacité en tant qu'estérases.

#### 6.1.1.1. Synthèses des chlorhydrates d'esters de ALA

Les différentes synthèses effectuées dans cette étude se basent sur le Mode opératoire décrit dans le travail de diplôme de Y. Berger [234], que je remercie cordialement.

La méthode de synthèse considérée est celle via le chlorure d'acide, grâce à l'emploi de  $\text{SOCl}_2$  et de l'alcool correspondant en large excès (Figure No.51).

L'alcool, refroidi à 0 - 5°C, est mélangé sous atmosphère inerte avec  $\text{SOCl}_2$ , puis 1.0 éq. de ALA est ajouté en plusieurs portions. Le mélange hétérogène est alors agité pendant une durée variant de 1 heure à 30 heures et à une température de 50°C à 70°C selon l'alcool considéré. Le produit brut de réaction est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice.

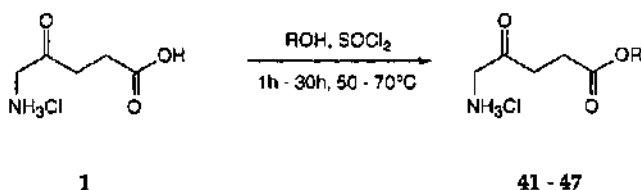


Figure No.51 : Schéma général de synthèse des chlorhydrates d'esters de ALA

Les rendements sont réunis dans le Tableau No.7<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Les esters du type polyéthylèneglycol (45, 46, 47) sont difficilement purifiés à cause de leur nature peu cristalline, d'où des rendements moins intéressants

Tableau No.7 Rendements des synthèses des chlorhydrates d'esters 41 - 47

Composé	R	Durée	Température	Rendement
41	CH <sub>3</sub>	17 heures	70°C	90 %
42	<i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	5 heures	70°C	85 %
43	<i>c</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	30 heures	70°C	77 %
44	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4 heures	70°C	84 %
45	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub>	1 heure	50°C	60 %
46	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1 heure	50°C	51 %
47	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O- CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1 heure	50°C	76 %

Ces résultats nous permettent d'affirmer que la méthode synthétique mise au point représente une alternative intéressante à la méthode traditionnelle d'estérification, mettant en jeu un acide minéral (par ex. HCl) en présence d'un large excès d'alcool. En outre, la méthode de purification développée dans ce travail (voir partie 8.2.1.1.) permet d'isoler le chlorhydrate de l'ester avec une pureté satisfaisante pour les tests d'hydrolyse enzymatique subséquents.

A noter que le potentiel des esters du type PEG est très intéressant, puisqu'ils présentent l'avantage de libérer, lors de leur hydrolyse, un alcool tout à fait inoffensif pour l'environnement biologique, ce qui n'est pas forcément le cas des autres types d'esters.

#### 6.1.1.2. Etude d'hydrolyse enzymatique des esters synthétisés de ALA

Les détails expérimentaux relatifs aux études d'hydrolyse enzymatique sont réunis dans le travail de diplôme de Y. Berger [234]. Cette partie du travail a consisté principalement en la mesure de la vitesse d'hydrolyse des esters synthétisés ci-dessus par deux enzymes différents : l'*α*-chymotrypsine et la *Hog liver esterase* (HLE).

Le choix des enzymes utilisés dans nos mesures est basé sur plusieurs facteurs :

- les enzymes, connus pour leur efficacité en tant qu'estérases, sont-ils en mesure d'hydrolyser les esters 42 à 47 ?

- les enzymes sont présents dans le corps des vertébrés
- les enzymes sont commerciaux, relativement bon marché et leurs manipulations sont documentées.

Le but de cette étude est, à court terme, de pouvoir déterminer quel est l'ester hydrolysé le plus rapidement et, à plus long terme, d'être en mesure de tester la possibilité, pour l'ester de ALA considéré, d'être un substrat pour une estérase. Les mesures des vitesses d'hydrolyse relatives se déroulent en deux étapes principales :

- détermination de l'activité des enzymes considérés à l'aide d'un substrat de référence (voir les tableaux respectifs)
- mesures proprement dites de la vitesse d'hydrolyse relative des esters 42 à 47 par comparaison avec le substrat de référence (le mode opératoire des différentes mesures est détaillé dans [234]).

Les résultats peuvent être récapitulés dans deux tableaux :

Tableau No.8 Vitesses d'hydrolyse des esters par l' $\alpha$ -chymotrypsine [234]

Composé	Vitesse d'hydrolyse [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ]	Rapport en % avec le substrat de référence
<i>N</i> -acétyl- <i>L</i> -tyrosine éthylester <sup>1</sup>	17.10	100.0
42	0.21	1.2
43	0.14	0.8
45	0.27	1.6
46	0.23	1.4
47	0.20	1.2

<sup>1</sup>La comparaison des résultats obtenus pour les esters 42 à 47 avec la vitesse d'hydrolyse mesurée pour le substrat de référence est délicate, puisque ce dernier est caractérisé par un *N*-terminus bloqué, au contraire des esters de ALA, synthétisés en solution sous la forme de chlorures

Les résultats obtenus avec l' $\alpha$ -chymotrypsine ne permettent pas de tirer des conclusions décisives sur la nature idéale de l'ester hydrolysé. A priori, toutefois, l'ester 45 semble être hydrolysé deux fois plus rapidement que le cyclohexylester de ALA 43.

Tableau No.9 Vitesses d'hydrolyse des esters par la *Hog liver esterase* (HLE) [234]

Composé	N-acétyl-L-tyrosine éthylester	42	43	45	46	47
Vitesse d'hydrolyse [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ]	1.010	0.036	0.009	0.063	0.053	0.014

Dans le cas de HLE, les différences dans les vitesses d'hydrolyse des esters sont plus importantes, notamment pour l'ester 45, qui semble être hydrolysé 7x plus vite que le cyclohexylester 43. Les résultats obtenus avec les deux enzymes vont donc dans le même sens et préconisent l'emploi d'esters du type PEG pour une application clinique en PDT. Mais, avant de s'intéresser à une éventuelle application, il est nécessaire d'optimiser les rendements dans la synthèse des composés 45 à 47.

D'autre part, comme nous allons le voir dans la partie suivante, les études précliniques et cliniques en PDT se concentrent de préférence sur l'emploi d'esters du type hexylester 42 et/ou cyclohexylester 43.

### 6.1.2. Etudes de paramètres pour l'optimisation de la production de PpIX à partir d'esters de ALA

Cette recherche a été effectuée dans les laboratoires du Département de Génie rural de l'EPFL par P. Uehlinger, que je tiens à remercier cordialement. Le but de ce travail [235,236] a été d'étudier plusieurs paramètres afin d'optimiser la production de PpIX par des cellules tumorales et non-tumorales à partir d'esters de ALA. Les paramètres étudiés sont la concentration optimale d'ester permettant la production maximale de PpIX et le pH optimal du milieu. Le type de transport utilisé pour entrer dans la cellule, qui dépend des propriétés physico-chimiques de la molécule transportée, a également été étudié.

Dans le cadre de cette expérience, les esters de ALA considérés ont été : le méthyl- 41, l'éthyl- 48<sup>1</sup>, le butyl- 49, l'hexyl- 42, le cyclohexyl- 43 et l'octylester 50 de ALA.

<sup>1</sup> Les esters de ALA 48, 49 et 50 ont été spécialement synthétisés pour cette expérience [235]

Ces études ont été faites sur quatre lignées de cellules humaines : trois lignées proviennent de tissus tumoraux de l'épithélium des bronches et de la vessie, et une lignée est constituée d'un épithélium bronchique immortalisé.

A noter que l'expérimentation avec les cellules se fait selon le protocole décrit dans la partie expérimentale (voir partie 7.14.).

#### 6.1.2.1. Détermination de la concentration optimale

Dans cette partie, il s'agit de déterminer, pour chaque ester et pour chaque lignée de cellules, la concentration optimale permettant la plus grande accumulation de PpIX, sans toutefois être cytotoxique. Les résultats sont réunis dans la Tableau No.10 ci-dessous [235].

La concentration optimale varie d'un produit à l'autre en fonction de la longueur de la chaîne de l'ester. Une chaîne contenant plus d'atomes de carbone est plus lipophile et devrait par conséquent permettre à la molécule d'entrer plus facilement dans la cellule, nécessitant ainsi des quantités plus faibles de produit pour une fluorescence équivalente.

En revanche, une augmentation de la longueur de la chaîne carbonée diminue la solubilité de la molécule dans le milieu aqueux, ce qui a pour conséquence une précipitation des produits en solution au-delà d'une certaine concentration et une diminution sensible de la quantité de produit traversant la membrane plasmique des cellules.

**Tableau No.10** Récapitulation des concentrations optimales pour chaque composé [235]

Composé	ALA 1	41	48	49	42	43	50
Conc. optimale [mM]	10-12	15-25	15-30	2-5	0.2-1.5	4-6	0.2-0.4

Les concentrations optimales relevées pour le méthylester et l'éthylester sont plus élevées que pour ALA, ce qui signifie qu'il faut plus de substrat pour produire la même quantité de PpIX. Ce résultat s'explique probablement par le fait que ces deux molécules, de petite taille comparable à ALA et chargées positivement au pH physiologique, sont peu lipophiles et diffusent donc mal à travers la membrane cellulaire.

En revanche, les esters caractérisés par une chaîne supérieure à quatre atomes de carbone induisent une production maximale de PpIX à une concentration optimale inférieure à celle de ALA. Ce résultat s'explique par une plus grande lipophilicité de l'hexylester et de l'octylester,

ce qui permet un passage beaucoup plus important par diffusion passive à travers la membrane. Mais le choix de la concentration optimale s'avère être plus délicat pour garantir une production maximale de PpIX, sans atteindre des doses toxiques (voir page No.53).

Enfin, il est important de noter qu'un même produit, à des concentrations identiques, génère une production de PpIX différente d'une lignée de cellules à l'autre. Ce phénomène est explicable par le fait que le métabolisme cellulaire d'une cellule tumorale est plus important que celui d'une cellule non-tumorale, et en particulier la cascade intracellulaire de production de la PpIX peut être plus active [159].

D'autre part, la production de PpIX induite par l'administration d'esters d'ALA est dépendante de l'activité des estérases cytoplasmiques cellulaires, qui scindent les esters en alcool et ALA. Cette hydrolyse est parfois plus rapide au sein des cellules tumorales que dans les cellules saines [233]. Il faut aussi signaler que l'estérase qui coupe les esters de ALA en alcool correspondant et ALA est plus spécifique pour les dérivés de ALA à longue chaîne carbonée [190]. C'est pour cette même raison que les esters à courte chaîne carbonée doivent être administrés à des concentrations optimales plus élevées.

#### 6.1.2.2. Détermination du pH optimal

Le pH du milieu contenant la solution d'ester de ALA est un autre paramètre important, qui est en mesure de modifier la quantité de PpIX formée (sans variation de la concentration du produit administré).

La molécule peut entrer dans la cellule par diffusion passive<sup>1</sup> à travers la membrane plasmique et/ou par transport actif<sup>2</sup> à travers des pores membranaires (ou médié par des protéines "transporteurs membranaires"). Le transport à travers la membrane cellulaire dépend en outre de certains paramètres physico-chimiques, tels que l'hydrophobicité et la charge électrique des molécules, qui peuvent être modifiés par l'équilibre acido-basique du milieu et, par conséquent, par la valeur du pH.

En faisant varier le pH d'une solution, à une concentration donnée de produit, plus petite ou égale à la concentration optimale, on a constaté que la production maximale de PpIX a lieu à des valeurs proches du pH physiologique. A pH acide, la fluorescence est réduite, mais le

---

<sup>1</sup>La diffusion passive est un phénomène en relation directe avec le gradient de concentration (et avec la lipophilicité du substrat transporté)

<sup>2</sup>Le transport actif nécessite de l'énergie, mais ne découle pas nécessairement d'un gradient de concentration (en général, il est médié par une protéine membranaire)

pourcentage de cellules mortes est assez faible. Cela est probablement dû au fait que les cellules, bien qu'elle supportent sans trop de mal les pH acides, tentent malgré tout de s'isoler du milieu externe en rendant leur membrane externe imperméable, et c'est ce phénomène qui diminue l'entrée des produits administrés, entraînant finalement une baisse de la production de PpIX. Par contre, les pH basiques provoquent une perte de fluorescence plus faible, mais un pourcentage de cellules mortes plus important. Dans ce cas, on peut supposer que les pH supérieurs à 8.4 (valeur du  $pK_1$  de la fonction basique de ALA<sup>1</sup>) font que les esters de ALA, qui n'ont pas de fonction acide, se trouvent en plus grandes quantités sous forme non-chargée que sous forme cationique, permettant ainsi une meilleure pénétration des produits à travers la double couche lipidique des cellules. Cet environnement basique est toutefois mal supporté par les cellules et nuit très fortement à leur viabilité.

### 6.1.2.3. Transport des produits à travers les membranes cellulaires

Pour le transport des produits administrés, l'entrée dans la cellule se fait différemment d'un composé à l'autre. En effet, les esters à longue chaîne carbonée, donc très lipophiles, sont principalement transportés par diffusion passive à travers la membrane plasmique, sans emprunter les pompes du transport actif [235]. L'utilisation clinique de ces esters à longue chaîne permettrait, par conséquent, d'éviter une interaction avec un inhibiteur des pompes  $Na^+/K^+$  ATPases administré pour soigner une autre pathologie (par exemple cardio-vasculaire).

Par contre, ALA et ses esters à courte chaîne carbonée, plus hydrophiles et plus petits, entraînent une production de PpIX qui diminue à partir d'une certaine concentration d'inhibiteur des pompes  $Na^+/K^+$  ATPases, en raison, probablement, d'une pénétration limitée du composé par transport actif dans les cellules [235].

La cinétique d'entrée des produits administrés est également difficile à comprendre. En effet, afin d'estimer la quantité d'ester de ALA qui entre dans la cellule par unité de temps, il est nécessaire de connaître le lien existant entre la PpIX formée (déterminée par l'intensité de sa fluorescence) et le nombre de molécules d'ALA nécessaires à sa production. Or, selon le cycle biosynthétique menant à l'hème, huit molécules de ALA conduisent à une molécule de PpIX. Ainsi, en déterminant la quantité approximative de PpIX fabriquée par la cellule, le nombre de molécules de ALA utilisées pourrait être calculé. En bref, la variabilité caractérisant l'entrée des différentes molécules (en fonction de leur lipophilicité) et la différence d'activité des estérases (selon la molécule considérée) peuvent entraîner une variation des concentrations optimales de chaque ester de ALA.

---

<sup>1</sup> le  $pK_1$  des différents esters de ALA se situe entre 8.3 et 8.4 [235]

#### 6.1.2.4. Conclusions

Les esters à longue chaîne semblent être les produits les plus performants, puisqu'ils induisent la plus forte production de PpIX à des concentrations très faibles (0.2 - 0.3 mM), et cela indépendamment de la lignée cellulaire considérée.

Il est toutefois difficile d'établir une corrélation entre l'expérimentation *in vitro* et l'expérimentation *in vivo*, car les observations expérimentales ne sont pas toujours reproductibles, notamment pour le contraste marqué entre l'accumulation de PpIX par les cellules tumorales et l'accumulation par les cellules saines immortalisées. De plus, les concentrations administrées *in vivo* sont de l'ordre de 8 mM pour l'hexylester 42 par exemple, alors que les concentrations optimales observées *in vitro* varient entre 0.2 mM et 2.0 mM (selon la lignée cellulaire).

Enfin, il est important de noter un inconvénient majeur de l'expérimentation sur culture de cellules : elle ne donne aucune indication sur la profondeur de pénétration des molécules testées. En effet, le travail *in vitro* s'effectue sur une monocouche cellulaire, alors qu'une tumeur au sein d'un organisme vivant se développe souvent dans l'espace et se trouve en constante interaction avec d'autres tissus.

## 6.2. Application des dérivés peptidiques de ALA dans la PDT

Forts des observations et des résultats récoltés ci-dessus avec les esters de ALA, nous nous sommes posés la question de savoir si les dérivés peptidiques de ALA synthétisés dans la partie 5.2.3. pourraient représenter des précurseurs intéressants de la PpIX. En effet, grâce à la présence d'amino- et de carboxypeptidases, il est sensé de penser que des dérivés peptidiques, susceptibles d'être des substrats pour ces protéases, pourraient conduire à une production exploitable de PpIX. Malheureusement, le problème principal des dérivés peptidiques du type 80 - 83 réside dans l'étape de la déprotection sur leur *N*-terminal, rendue impossible en solution par la dimérisation de ALA catalysée par la pipéridine.

D'autre part, le dérivé peptidique complètement protégé ne conduit à aucune formation de PpIX, puisque le groupe Fmoc ne peut être clivé par les enzymes. Cette difficulté de nature synthétique nous a incité à nous concentrer sur la synthèse des mêmes dérivés peptidiques, mais protégés sur leur *N*-terminal par le groupe acido-labile Boc.

### 6.2.1. Synthèse des dérivés peptidiques de ALA *N*( $\delta$ )-Boc protégés

Comme nous l'avons souligné ci-dessus, le désavantage principal avec l'emploi du groupe Fmoc dans la chimie des dérivés peptidiques de ALA est représenté par la dimérisation

instantanée de ce dernier après la déprotection du *N*-terminal du dérivé peptidique par un nucléophile (pipéridine en général).

Dans le cas du groupe Boc (Figure No.52) en revanche, ce problème n'intervient pas puisque ce dernier est éliminé au moyen de TFA dilué. L'avantage principal de cette *N*-déprotection est qu'elle génère des molécules facilement éliminées du milieu réactionnel (en revanche, elle ne génère aucune entité UV active, ce qui représente un désavantage en vue d'une application sur phase solide). Les quatre dérivés peptidiques **85 - 88** ont été synthétisés selon le mode opératoire-type décrit dans la partie 5.2.1.

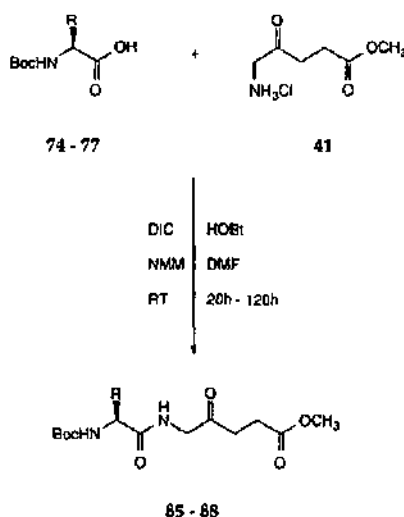


Figure No.52 : Schéma général de synthèse en solution des dérivés peptidiques **85 - 88**

Tableau No.11 Rendements des synthèses des dérivés peptidiques **85 - 88**

Composé	R	Rendement
<b>85</b>	Me	53 %
<b>86</b>	Bn	42 %
<b>87</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHBoc	30 %
<b>88</b>	CH <sub>2</sub> COO <sup>t</sup> Bu	60 %

Les rendements plutôt médiocres illustrent le fait que la stratégie Fmoc/carbodiimide est la plus adéquate pour ce type de couplage. Les composés **85** - **88**, non-cristallins, sont en revanche exempts de l'impureté DIU, produit-parasite dans la synthèse des dipeptides analogues **80** - **83**. Les dipeptides totalement protégés ne pouvant être testés sur les lignées de cellules, il est nécessaire de procéder aux étapes de déprotection successives du *N*-terminal et du *C*-terminal des dipeptides **85** - **88**.

### 6.2.2. Réactions de déprotection sur les dérivés peptidiques de ALA *N*( $\delta$ )-Boc protégés

Le dérivé **85** a été, dans un premier temps, mono-déprotégé sur son *C*-terminal, donnant **100**. Ensuite, une mono-déprotection au niveau de son *N*-terminal a été effectuée, pour conduire à l'aminoester **101** puis, finalement, le dérivé **100** a été *N*-déprotégé, afin d'isoler le dipeptide totalement déprotégé **102**.

#### 6.2.2.1. Synthèse de l'acide *N*-protégé **100**

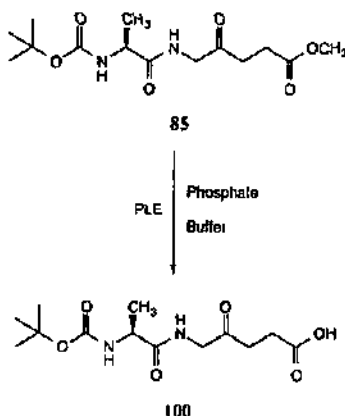
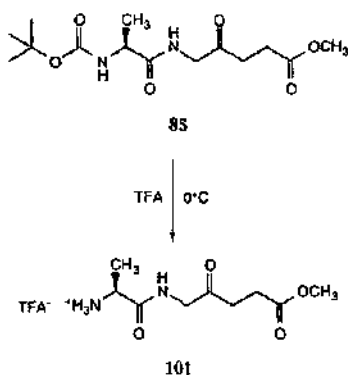


Figure No.53 : Synthèse de **100** par *C*-déprotection enzymatique

La déprotection enzymatique est effectuée à l'aide d'une solution de *Pig liver esterase* (PLE) et d'une solution tampon phosphate, dans laquelle 1.0 éq. de **85** est dissout. La libération de l'acide est suivie par titration au pH-stat à l'aide d'une solution 0.1N de NaOH (temps de réaction : 48 heures à RT). Le mélange réactionnel est alors acidifié à pH  $\approx$  1.5 et l'acide **100** est récupéré par extraction à l'aide d'AcOEt.

Une étape de purification par chromatographie-éclair sur gel de silice permet d'isoler **100** sous la forme d'un solide compact blanc (rendement : 88 %).

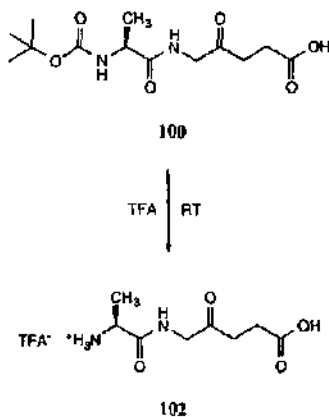
## 6.2.2.2. Synthèse de l'ainoester 101

Figure No.54 : Synthèse de 101 par *N*-déprotection de 85

La *N*-déprotection se fait à l'aide de TFA<sub>aq</sub> utilisé comme solvant de réaction. La température est maintenue à 0°C afin de ménager le composé (temps de réaction : 12 heures).

Le composé 101 est isolé à l'état brut (rendement : 91%) suite à l'élimination du TFA par évaporation et il est conservé à -18°C sous atmosphère inerte.

## 6.2.2.3. Synthèse du dipéptide totalement déprotégé 102

Figure No.55 : Synthèse de 102 par *N*-déprotection de 100

La *N*-déprotection finale se fait également à l'aide de TFA<sub>aq</sub>, sans solvant, mais à RT, car il n'y a aucune réaction à 0°C (temps de réaction : 6 heures). Dans ce cas également, isolement du composé brut (rendement : 82 %) et conservation de la pâte à -18°C sous atmosphère inerte.

Maintenant que nous sommes en possession des différents dérivés peptidiques de ALA totalement protégés **85 - 88** et des dérivés de **85** partiellement ou complètement déprotégés **100 - 102**, il est possible de passer aux mesures de fluorescence sur des lignées de cellules tumorales (ou immortalisées).

### 6.2.3. Mesures de fluorescence avec les dérivés peptidiques de ALA

Cette partie du travail a été effectuée dans les laboratoires de l'Institut de Pathologie du CHUV avec l'aide de Y. Berger et sous la direction de Mme le Dr. L. Juillerat, que je remercie cordialement. Le protocole suivi pour l'expérimentation sur les lignées de cellules considérées (A549, EC219 et HCEC) est décrit dans la partie expérimentale sous le point 7.14.

Cette série de mesures nous donnent une indication sur :

- l'efficacité des dérivés peptidiques de ALA en tant que précurseurs de la PpIX
- l'influence de la nature du C-terminal de ALA sur la fluorescence du peptide considéré
- l'influence de la nature de l'acide aminé couplé sur le *N*-terminal de ALA
- la concentration optimale du dérivé peptidique pour une production maximale de PpIX (la baisse de la quantité de PpIX formée suite à des concentrations trop élevées peut être mise en corrélation avec la réduction du nombre de cellules métaboliquement fonctionnelles déterminée par la réduction du MTT (voir point 7.15.)),

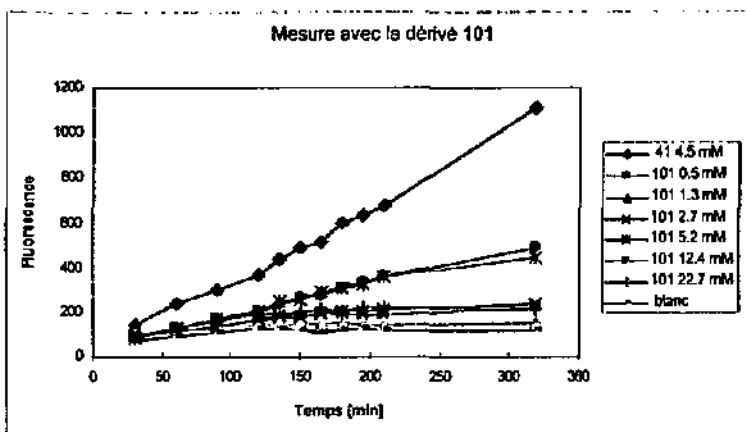
Notre stratégie, en vue de vérifier tous ces points, consiste à nous intéresser à un dérivé peptidique de ALA existant sous toutes les formes que nous avons synthétisées dans le cadre de ce travail. Pour cette raison, nous nous sommes concentrés sur le dérivé issu du couplage entre Ala et ALA et sur ses dérivés: Fmoc-(Ala-ALA)-OMe **80**, Boc-(Ala-ALA)-OMe **85**, Boc-(Ala-ALA)-OH **100**, <sup>+</sup>H<sub>3</sub>N-(Ala-ALA)-OMe **101** et <sup>+</sup>H<sub>3</sub>N-(Ala-ALA)-OH **102**.

Les mesures de fluorescence de cette série de dérivés ont donc été effectuées sur la lignée cellulaire A549, de manière à utiliser l'activité des aminopeptidases *N* exprimée par cette lignée cellulaire [237] (voir point 7.12.).

Le dérivé **80** n'a produit aucune fluorescence, vu que le groupe *N*-protecteur Fmoc ne peut être clivé enzymatiquement par les aminopeptidases *N*. Les composés **85** et **100**, n'ont d'ailleurs conduit à aucune production de PpIX détectable pour la même raison, le groupe Boc

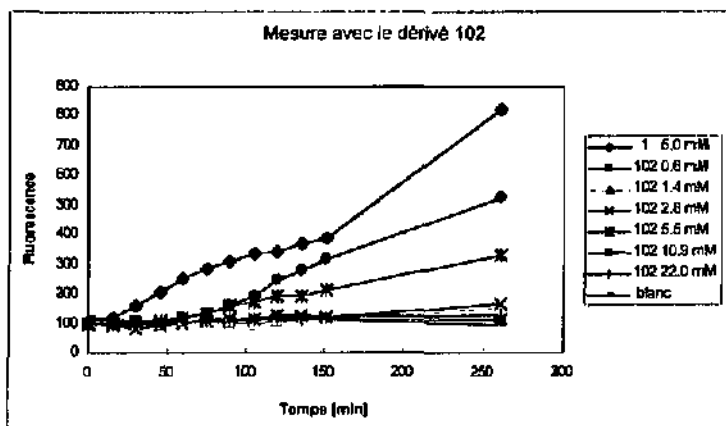
n'étant pas enzymo-labile. Ces résultats nous permettent d'affirmer qu'il est nécessaire de procéder à la déprotection du *N*-terminal du dérivé peptidique considéré pour observer la production de PplX et une fluorescence détectable.

Des résultats encourageants ont, en revanche, été obtenus pour les mesures de fluorescence effectuées avec les dérivés 101 et 102.



Graphique No.1 : Mesures de fluorescence sur A549 avec le dérivé peptidique 101

Le dérivé 102 permet d'obtenir les résultats suivants :



Graphique No.2 : Mesures de fluorescence sur A549 avec le dérivé peptidique 102

Ces deux séries de mesures de fluorescence nous permettent d'arriver à des conclusions importantes :

- les dérivés peptidiques de ALA sont effectivement en mesure d'être des précurseurs de la PpIX. En fait, les aminopeptidases N sont en mesure de cliver le dérivé peptidique considéré au niveau de la liaison amide et de libérer ainsi ALA pour la production de PpIX
- dans le graphique No.1, l'intensité de la fluorescence mesurée est généralement plus faible que pour la référence (H-(ALA)-OMe) 41 car il faut deux pas enzymatiques pour libérer ALA : le clivage enzymatique sur la surface cellulaire de la liaison peptidique par les aminopeptidases N, puis l'hydrolyse du groupe méthylester par les estérases au sein de la cellule (ou alternativement, l'entrée du dérivé non-hydrolysé dans la cellule, puis les hydrolyses intracellulaires successives)
- la nature du C-terminal de ALA n'altère que très sensiblement la production de PpIX par les cellules A549 (les fluorescences mesurées avec 101 sont légèrement plus intenses que celles mesurées avec 102). Pour l'explication de cette petite différence, se référer au point 6.1.2.3.
- la concentration optimale de dérivé peptidique pour une production maximale de PpIX se situe dans une fourchette variant entre 5 et 15 mM.

### 6.3. Perspectives

Les mesures de fluorescence enregistrées dans le cadre de ce travail nous permettent d'ouvrir la voie à de nouvelles directions dans ce domaine. En particulier, il serait intéressant d'étudier plus précisément l'influence qu'ont les propriétés du N- et du C-terminal respectivement sur la production de PpIX par le dérivé peptidique de ALA.

Les esters du type PEG représentent, dans le cadre de l'étude de la nature du C-terminal, une famille de composés potentiellement intéressants, puisqu'ils sont susceptibles, grâce à leur faible cytotoxicité, de pouvoir pénétrer plus profondément au sein des tissus tumoraux et d'être ainsi plus sélectifs. A ce sujet, des mesures de fluorescence avec le dérivé 47 sont actuellement en cours dans notre groupe.

D'autre part, dans le cadre de l'étude de la nature du N-terminal sur la production de PpIX, des travaux récents [238] ont permis de mettre en évidence l'existence de divers types d'aminopeptidases exprimées en fonction de la tumeur traitée. L'idée, dans ce contexte, serait par conséquent de construire un dérivé peptidique en fonction de l'aminopeptidase (A, B ou

N) que l'on désire activer. Dans ce contexte, des mesures de fluorescence sont actuellement en cours avec des dérivés peptidiques du type 88, les aminopeptidases A s'étant révélées très actives dans la production de PpIX.

De cette manière, il sera possible, à moyen terme, de développer une famille de composés basés sur ALA, en mesure de détecter (voire de traiter) une gamme de tumeurs et cancers. Ces travaux s'inscrivent dans une recherche multidisciplinaire, mettant en jeu les connaissances biologiques, physico-chimiques et purement chimiques acquises dans ce domaine. La recherche de nouvelles structures chimiques nous permettra ainsi de définir plus précisément le profil des agents photodynamiques (hydrolyse au sein ou hors de la cellule, transport actif ou passif à travers la membrane cellulaire, etc.) les plus efficaces.

Ce développement passe tout d'abord par une optimisation des synthèses peptidiques, par une évaluation des produits par des mesures de fluorescence sur les lignées cellulaires en culture, puis par une adaptation de la technique à une application clinique.

---

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **7. Méthodes analytiques et appareillage**

#### **7.1. Chromatographie**

Préparation des mélanges d'élution : dans un premier temps, mesure du solvant le plus polaire, puis ajustement au volume désiré avec le solvant le moins polaire.

##### **Chromatographie sur couche mince (CCM) :**

Couches minces sur aluminium ou sur verre, gel de silice 60 F254, (épaisseur de la couche 0.2 mm) avec indicateur de fluorescence (Merck, Darmstadt). Révélateurs (par atomisation): solutions basique aqueuse de  $\text{KMnO}_4$ , de vanilline, de ninhydrine ou d'acide molybdique.

##### **Chromatographie sur colonne - chromatographie-éclair :**

Gel de silice 60, grosseur de grains 0.040 - 0.063 mm (230 - 400 mesh ASTM) (Merck, Darmstadt). L'éluant et les proportions du mélange utilisé sont décrits dans la partie expérimentale. Les colonnes employées correspondent aux dimensions traditionnelles d'env. 10 : 1 (hauteur de la colonne / diamètre de la colonne). Toutes les chromatographies sur colonne s'effectuent sous pression ( $p = 0.5 - 0.9 \text{ atm}$ ), sinon, une note est indiquée dans le mode opératoire.

#### **7.2. Chromatographie en phase gazeuse (GC)**

Chromatographe Perkin-Elmer Sigma 3B Dual FID. Colonne : 25 m MN OV-1701, température d'injection : 250°C, température du détecteur : 280°C. Programme de température No.1 : injection à 70°C, temps d'initiation = 2 min, 8°C/min jusqu'à 250°C. 15 min à 250°C.

#### **7.3. Chromatographie en phase liquide (HPLC)**

Injecteur RHEODYNE 7125, pompes Spectra-Physics équipées d'un mélangeur SP 8500, détecteur UV Perkin-Elmer LC-55 et intégrateur Spectra-Physics SP 4200. Colonne Nucleosil® RP18 5  $\mu\text{m}$ , longueur de 25 cm. Flux : 1.0 ml/min. Gradient d'élution : ACN /  $\text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{ TFA}$  1:9 - 9:1 en 30 min. Volume d'injection : 10  $\mu\text{l}$  d'une solution 0.1 % dans MeOH. Longueur d'onde pour la mesure :  $\lambda = 215 \text{ nm}$ .

#### 7.4. Spectroscopie infrarouge (IR)

Un spectromètre du type Perkin Elmer FT-IR 1720 X est utilisé pour l'obtention des spectres IR, avec une résolution de  $10\text{ cm}^{-1}$  entre 4000 et  $2000\text{ cm}^{-1}$ , et de  $4\text{ cm}^{-1}$  entre 2000 et  $400\text{ cm}^{-1}$ . Des pastilles de KBr sont préparées pour les substances cristallines, la technique du film liquide (sandwich) entre 2 plaques de KBr est utilisée pour les liquides purs ou en solution. Les bandes d'absorption sont décrites par des abréviations *vs* (très intense), *s* (intense), *m* (moyenne), *w* (faible), *vw* (très faible) ou *br* (large) et données en longueur d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ ).

#### 7.5. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les mesures RMN sont effectuées avec un spectromètre Gemini XL-200 de Varian [spectres  $^1\text{H}$  à 200 MHz et  $^{13}\text{C}$  à 50 MHz] ou Bruker AMX-400 [spectres  $^1\text{H}$  à 400 MHz et  $^{13}\text{C}$  à 100 MHz]. La fréquence de mesure, ainsi que le solvant [la plupart du temps  $\text{CDCl}_3$  99.8% (degré de deutériation) provenant de l'entreprise CIL USA-Andover] sont précisés entre parenthèses dans chaque cas. Standard interne pour les spectres du proton ( $^1\text{H}$ ) : TMS ( $d_{\text{H}} = 0\text{ ppm}$ ) ou  $\text{CHCl}_3$  ( $d_{\text{H}} = 7.26\text{ ppm}$ ); pour les spectres du carbone ( $^{13}\text{C}$ ) :  $\text{CDCl}_3$  ( $d_{\text{C}} = 77.0\text{ ppm}$ ).

Tous les déplacements chimiques sont donnés en ppm et les constantes de couplage *J* en Hz. Les spectres  $^{13}\text{C}$  sont mesurés avec découplage large en proton. Les multiplicités des signaux sont abrégées par: *s* = singulet, *d* = doublet, *t* = triplet, *q* = quartet, *quint* = quintet, *sx* = sextet, *m* = multiplet et *br* = large.

Pour permettre une interprétation correcte, des spectres HETCOR (low range ou short range), COSY, DEPT' ou APT ont été mesurés lorsque cela s'avérait nécessaire.

#### 7.6. Spectrométrie de masse (MS)

Un spectromètre Nermag RC 30-10 (EI : 70 eV; DCI :  $\text{NH}_4^+$ ) a été utilisé. Les spectres ESI sont enregistrés avec un appareil Finnigan, LCQ. Les pics sont donnés en *m/e* et en pour-cent du pic de base (100%). Les intensités individuelles sont données entre parenthèses; le pic moléculaire protoné est en outre caractérisé à l'aide d'un signal  $[M + 1]^+$  ou  $[M + 18]^+$  respectivement. Les spectres FAB (fast atom bombardment) sont mesurés à l'aide d'un spectromètre Vacuum Generators Micromass 7070 E à l'Université de Fribourg (6 kV de tension d'accélération, bombardement d'argon (8 kv, 1 mA), matrice : alcool o-nitro benzylique (NBA)).

#### 7.7. Spectrométrie de masse haute résolution (HRMS)

Les mesures ont été effectuées par le service analytique de l'Université de Fribourg, à l'aide d'un spectromètre Bruker FTMS 4.7T BioAPEX II. La méthode utilisée (ESI) permet la

caractérisation, soit du pic moléculaire protoné  $[M + H]^+$ , soit du pic moléculaire additionné d'un atome de sodium  $[M + Na]^+$ .

### 7.8. Analyse élémentaire (EA)

Les analyses CHN sont effectuées par Ciba-Specialties SA (Département Kunststoffe und Additive) à CH-1723 Marly.

### 7.9. Point de fusion (F)

Les diverses mesures de point de fusion ont été effectuées sur un appareil du type Gallenkamp MFB-595.

### 7.10. Appareillage pour le pH-stat

Les réactions d'hydrolyse enzymatique ont été contrôlées à l'aide d'un appareil Präzisions-pH-meter E510 couplé à un Dosimat E535 et à un Impulsomat E473 (Metrohm, Herisau).

### 7.11. Spectrophotométrie UV-visible

Les mesures d'absorbance ont été effectuées sur un appareillage du type Cary 1E UV-visible (Varian).

### 7.12. Lignées de cellules

Dans le cadre de l'étude de la production de PpIX par les cellules en culture, trois lignées issues de divers laboratoires ont été étudiées :

- une lignée cellulaire humaine provenant d'un carcinome des poumons : les cellules A549 ("American Type Culture Collection" ATCC CCL-185, Rockville, MA, USA) sont de type épithélial. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium", Life Technologies AG, Basel) 1 g/l de glucose et 10 % de FCS (sérum foetal de veau, Lot # 96207, Chemie Brunschwig AG, Basel). Ces cellules expriment l'activité de l'aminopeptidase N/CD13 (EC 3.4.12.2), mais pas celle de l'aminopeptidase A (EC 3.4.11.7) [237]
- une lignée cellulaire cérébrale de rat : les cellules EC219 (Département de Pathologie, CHUV) sont de type endothélial. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM 1 g/l de glucose et 10 % de FCS, développées à Lausanne et immortalisées par transfection du SV40 middle T-oncogène. Ces cellules expriment une activité modérée d'aminopeptidase N, mais une activité élevée d'aminopeptidase A [238]

- une lignée cérébrale humaine : les cellules HCEC (Institute of Biological Sciences, National Research Council of Canada, Ottawa) sont de type endothélial. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM 4.5 g/l de glucose et 10 % de FCS, puis immortalisées par transfection du SV40 large T-oncogène. Ces cellules expriment une activité modérée d'aminopeptidase N, mais pas d'activité d'aminopeptidase A.

Les cultures et les boîtes d'expérimentation sont placées dans un incubateur contenant 6 % de CO<sub>2</sub> à une température de 37°C. Les réactifs utilisés pour les cultures cellulaires proviennent généralement de Gibco BRL. Life Technologies, Basel.

Les inhibiteurs des aminopeptidases considérés dans ce travail sont :

- pour l'aminopeptidase A : l'amastatin (Novabiochem, Suisse; stock 1.0 mg/ml PBS "Phosphate Buffer saline" : 0.15 M NaCl dans du tampon phosphate 0.01 M pH 7.2), MW 474.6)
- pour l'aminopeptidase N : l'actinonin (Novabiochem, Suisse; stock 0.6 mg/ml PBS, MW 385.5)

### 7.13. Détection de la fluorescence

Le système de détection thermostatisé CytoFluor® Series 4000, Multi-well Plate Reader (Perspective Biosystems, Framingham, MA, USA) permet la mesure de la fluorescence des produits solubles ou associés à la cellule. La fluorescence est en fait mesurée à l'aide d'un tube photomultiplicateur dans une chambre de détection à l'abri de la lumière. Le scanner du système CytoFluor® possède six filtres d'excitation et six filtres d'émission de manière à détecter les produits fluorescents (ou fluorophores) les plus communs. Le spectre d'excitation de la lampe (de type tungstène-halogène d'une puissance de 50W) balaye les longueurs d'onde entre 320 nm et 700 nm. La détection de la PplX produite se fait par des tubes à électrons (Inc. # 9781 Photomultiplier Tube). Filtres utilisés : 409 ± 20 nm pour l'excitation et 645 ± 40 nm pour l'émission.

### 7.14. Protocole pour l'expérimentation sur culture de cellules

Les supports considérés pour l'expérience sont des plaques multi-puits (Costar® 3548, Integra Biosciences, Wallisellen) de 48 puits spécialement conçues pour la culture cellulaire. Les cellules sont maintenues dans du milieu de culture pour leur prolifération jusqu'à confluence. Le jour de l'expérimentation, les milieux de culture sont aspirés et du milieu DMEM, ne contenant ni rouge phénol, ni FCS est ajouté (200 µl/puits), les cultures sont stabilisées à 37°C et à 6 % de CO<sub>2</sub> pendant 10 min. A noter que l'absence de sérum pendant un temps limité (l'expérience dure 3-4 heures) n'est pas préjudiciable à la survie des cellules.

Dans chaque puits sont alors administrés des volumes respectifs de 1, 2,5, 5, 10, 25 et 50  $\mu\text{l}$  de solution 100 mM à tester constituée d'un dérivé peptidique de ALA dilué généralement dans de l'eau bidistillée. Pour chaque volume de dérivé peptidique considéré, six puits sont remplis. A l'extrémité gauche de la plaque, une ligne de six puits est remplie avec 200  $\mu\text{l}$  de milieu et 10  $\mu\text{l}$  de la solution de référence (ALA 1 pour les dérivés peptidiques acides et le méthylester de ALA 41 pour les dérivés peptidiques estérifiés), alors qu'à l'extrémité droite de la plaque, une ligne de six puits n'est remplie que de 200  $\mu\text{l}$  de milieu. D'autre part, à trois des six puits de mesure sont ajoutés 10  $\mu\text{l}$  d'un inhibiteur des aminopeptidases intervenant dans la libération du dérivé de ALA considéré.

Les mesures sont effectuées sur l'appareillage CytoFluor® toutes les 15 minutes pour une durée variant entre 90 et 150 minutes selon le dérivé peptidique considéré. Une mesure finale après plus de 200 minutes est effectuée pour certains dérivés présentant des résultats intéressants. Les données récoltées sont ensuite reportées sur un graphique représentant la fluorescence en fonction de la quantité de dérivé peptidique administré.

### 7.15. Test de viabilité des cellules

La viabilité des cellules après les diverses expérimentations est contrôlée grâce au test du MTT, méthode permettant de vérifier la respiration mitochondriale des cellules. La réduction du sel jaune de MTT, le bromure de [(4, 5-diméthylthiazo-2-yl)-2, 5-diphényl] tetrazolium en formazan violet (composé insoluble) est catalysée par une enzyme déshydrogénase mitochondriale, qui exerce son action uniquement au sein des cellules vivantes et métaboliquement actives.

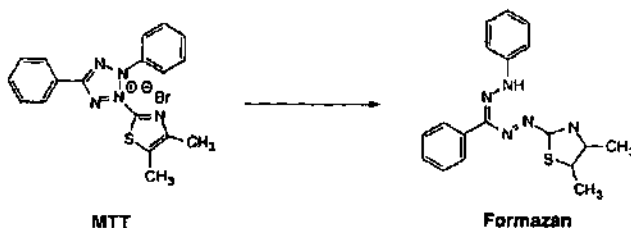


Figure No.56 : Réduction du MTT en formazan

Pratiquement, le sel de MTT est dissout dans du PBS à une concentration de 5 mg/ml (solution de stockage). 20  $\mu\text{l}$  de cette solution sont alors ajoutés dans chaque puits contenant la solution à tester et le tout est placé pendant 120 min dans un incubateur à une température de 37°C. Après ce laps de temps, les boîtes sont vidées et rincées avec du PBS. 250  $\mu\text{l}$  d' $\text{PrOH}$  contenant 1% de HCl 4N sont alors ajoutés dans chaque puits, opération permettant de

dissoudre les cellules et de mettre en solution le formazan qu'elles ont accumulé. L'absorbance de la solution est enfin mesurée à l'aide d'un lecteur multipuits (Labsystems, iEMS Reader EMF) à une longueur d'onde de 540 nm. L'activité mitochondriale est déterminée en fonction de l'absorbance mesurée : plus il y a de formazan accumulé, plus l'absorbance est élevée, donc plus l'activité mitochondriale est forte.

## 7.16. Verreries, système de chauffage et de refroidissement

La verrerie pour les réactions sous  $N_2$ , sous argon ou à l'abri de humidité est chauffée à  $120^\circ C$  minimum dans une étuve durant la nuit, elle est montée chaude et refroidie à température ambiante sous un flux d'azote.

Les réactions à basses températures (en dessous de  $-40^\circ C$ ) se font dans un bain froid acétone/ $CO_2$  sol. ou acétone/ $N_2$  liquide. Pour les réactions de  $-40^\circ C$  à  $0^\circ C$ , un cryostat HAAKE F3 ( $-40^\circ C$  à  $+80^\circ C$ ) est utilisé.

Les réactions à  $180^\circ C$  se font dans un bain de polyéthylène glycol, et celles au-dessus de  $180^\circ C$  dans un mélange composé de 40%  $NaNO_2$ , 7%  $NaNO_3$  et 53%  $KNO_3$  (liquide dès  $150^\circ C$ , utilisable jusqu'à  $500^\circ C$ ).

## 7.17. Solvants

### 7.17.1. Solvants standards

Les solvants standards sont utilisés pour les traitements finaux, les extractions, ainsi que pour la purification par chromatographie (CCM, colonnes ou CP).

Solvant	dans le texte	distillé sur
Chloroforme	$CHCl_3$	$CaCl_2$
Chlorure de méthylène	$CH_2Cl_2$	$CaCl_2$
Diéthyléther	éther	$CaCl_2$
Acétate d'éthyle	AcOEt	$K_2CO_3$
Heptane	heptane	$CaCl_2$
Hexane	hexane	$CaCl_2$
Méthanol	MeOH	CaO

## 7.17.2. Solvants séchés

Pour toutes les réactions sous atmosphère inerte, des solvants secs sont utilisés. Les solvants standards sont distillés sur un agent dessiccant. Les solvants secs distillés une deuxième fois (qualité absolue) sont caractérisés par une astérisque (\*).

Solvants	dans le texte	Agent dessiccant
Acétonitrile	$\text{CH}_3\text{CN}$	$\text{CaH}_2$
Chloroforme	$\text{CHCl}_3$	$\text{P}_2\text{O}_5$ ou $\text{CaH}_2$
Chlorure de méthylène	$\text{CH}_2\text{Cl}_2^*$	$\text{CaH}_2$
Diéthyléther	éther*	$\text{LiAlH}_4$
Diméthylformamide	DMF	Anhydride phtalique
Heptane	heptane*	Sodium ou potassium
Hexane	hexane*	Sodium ou potassium
Méthanol	MeOH	Magnésium
<i>N</i> -méthyl-pyrrolidone	NMP	$\text{CaH}_2$
Pentane	pentane	$\text{LiAlH}_4$
Tetrahydrofurane	THF*	Potassium (benzophénone)
Toluène	toluène*	Potassium

## 7.18. Réactifs chimiques et gaz

Réactif chimique	Abréviation	Qualité
Phtalimide de potassium		Fluka purum (> 99 %)
Acide lévulinique		Fluka purum (> 97 %)
Brome	Br <sub>2</sub>	Fluka purum p.a. (> 99 %)
Azoture de sodium	NaN <sub>3</sub>	Fluka purum
Palladium sur charbon actif	10 % Pd/C	Fluka puriss (H <sub>2</sub> O > 50 %)
Hydrogène	H <sub>2</sub>	Carbagas techn.
Alcool benzylique	BnOH	Fluka puriss p.a.
Chlorure de thionyle	SOCl <sub>2</sub>	Fluka purum
Hexanol		Fluka purum
Cyclohexanol	DMAP	Fluka purum
2-méthoxy éthanol		Fluka purum
2-éthoxy éthanol		Fluka purum
Diéthylène glycol monoéthyl éther		Fluka purum
<i>N, N</i> -diméthylacétamide	DMA	Merck p.a.
Pipéridine		Fluka purum
<i>N, N</i> -diméthylformamide	DMF	Fluka puriss p.a.
[ <i>(9H</i> -fluorèn- <i>9</i> - <i>y</i> )méthoxycarbonyl]succinimide	Fmoc-OSu	Novabiochem purum
Triéthylamine	NEt <sub>3</sub>	Fluka purum dist. sur NaH
Chloroformate de méthyle	ClCOOMe	Fluka purum dist.
Diméthylaminopyridine	DMAP	Fluka purum
Acide 5-aminopentanoïque	AVA	Fluka purum
Carbonate de sodium	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Fluka puriss
Dibenzylacétate du <i>N, N'</i> -diméthylformamide		Fluka pract.

Réactif chimique	Abréviation	Qualité
Benzène	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	Fluka puriss p.a.
Acide (9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl)-5-aminovalérique		Bachem
Acide (9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl)-4-aminobutyrique		Bachem
Chlorhydrate du chlorure de 2-[diisopropyl(amino)éthyle]	EDC	Fluka pract.
Acide <i>p</i> -toluènesulfonique	<i>p</i> -T <sub>3</sub> OH	Fluka purum
<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide	DIC	Fluka purum
1-hydroxybenzotriazole	HOBt	Fluka purum suspendu dans ACN puis évaporé
<i>N</i> -méthyl morpholine	NMM	Fluka purum dist. sur CaH <sub>2</sub>
Phosphate Buffer		Fluka microselect
Pig Liver Esterase	PLE	Sigma
Acide trifluoroacétique	TFA	Fluka purum
<i>N</i> -(diisopropylamino)éthylamine	DIPEA	Fluka purum dist. sur CaH <sub>2</sub>
Fmoc-Ala-OH		Novabiochem
Fmoc-Phe-OH		Novabiochem
Fmoc-Lys(Boc)-OH		Alexis
Fmoc-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-OH		Novabiochem
Fmoc-Val-OH		Novabiochem
Boc-Ala-OH		Novabiochem
Boc-Phe-OH		Novabiochem
Boc-Lys(Boc)-OH		Novabiochem
Boc-Asp(O <sup>t</sup> Bu)-OH		Novabiochem
Acide chlorhydrique	HCl	Fluka purum
Ethanol	EtOH	Fluka puriss p.a.

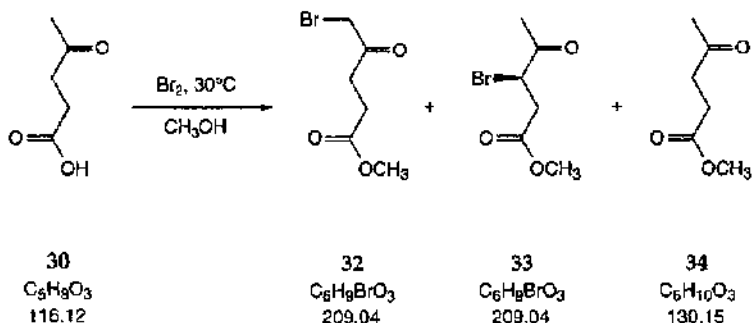
## 8. Synthèses

### 8.1. Synthèses de dérivés de l'acide lévulinique

Les modes opératoires décrits dans la partie 8.1. sont tous dérivés de travaux avancés effectués par des étudiants dans nos laboratoires. Une remarque détaillant les modifications apportées est notée si nécessaire.

#### 8.1.1. Synthèse du 3- et du 5-bromolévulinate de méthyle (33 et 32)

Synthèse effectuée selon le Mode opératoire décrit dans le rapport de Y. Berger (semestre hiver 1996-97).



Dans un ballon quadricol de 1500 ml est placée une solution de 92.8 g (799 mmol, 1.0 éq.) d'acide lévulinique 30 dans 800 ml de méthanol. 127.8 g (805 mmol, 1.0 éq.) de brome lui sont alors ajoutés, goutte à goutte et sous forte agitation, de manière à ce que la température ne dépasse pas  $30^\circ\text{C}$ . Le départ de la réaction, reconnaissable à la soudaine décoloration du mélange réactionnel et à une montée de la température, n'est consommé qu'après un temps d'induction d'environ 30 minutes.

Après ce délai, la solution est agitée durant 60 minutes à RT puis durant 90 minutes à reflux; elle est ensuite laissée reposer 180 minutes à RT puis 800 ml de chlorure de méthylène sont alors ajoutés afin de permettre le lavage de la phase organique avec quatre portions successives de 200 ml d'eau désionisée. La phase organique lavée et neutralisée est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre puis le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif ( $T_{\text{bain}} = 30^\circ\text{C}$ ).

Une première distillation fractionnée sur colonne Widmer NS14 de 20 cm conduit à l'obtention de sept fractions principales d'une masse totale de 143.4 g.

Rendement de l'opération : 87 %.

**Tableau No.12 : Première distillation du produit de réaction**

Fraction	Masse (g)	T (°C)	p (Torr)	$n_D^{20}$
1	8.2	35-37	0.01	1.4390
2	14.0	38-45	0.01	1.4348
3	27.5	51-58	0.03	1.4672
4	20.1	52-54	0.03	1.4704
5	9.2	51-55	0.02	1.4766
6	39.8	50-75	0.01	1.4824
7	24.6	72-75	0.01	1.4847

Le contenu de chaque fraction est alors analysé par chromatographie en phase gazeuse.

**Tableau No.13 : Contenu des fractions issues de la première distillation**

Fraction	32		33		34	
	(mol %)	(g)	(mol %)	(g)	(mol %)	(g)
1	1.8	0.1	9.1	0.8	79.4	6.5
2	2.3	0.3	7.2	1.0	87.1	12.2
3	2.3	0.6	57.4	15.8	38.1	10.5
4	13.2	2.6	61.2	12.3	22.1	4.5
5	23.1	2.1	18.2	1.7	10.4	1.0
6	87.6	35.0	0.8	0.3	2.4	1.0
7	96.1	23.6	1.2	0.3	1.8	0.4

Notice : Les pourcentages donnés par la GC sont exempts de la correction due au facteur de réponse.

Afin d'obtenir des produits de bonne pureté, les fractions caractérisées par un contenu similaire (3-4 et 6-7) sont réunies pour être distillées une seconde fois sur colonne *Widmer NS14* de 20 cm. La distillation des fractions 3 et 4 réunies permet d'isoler deux fractions principales de masse totale de 39.4 g.

Rendement de l'opération : 85 %.

**Tableau No.14 :** Deuxième distillation pour l'enrichissement du composé **33**

Fraction	Masse (g)	T (°C)	p (Torr)	$n_D^{20}$	<b>32</b>		<b>33</b>		<b>34</b>	
					(mol %)	(g)	(mol %)	(g)	(mol %)	(g)
1	25.4	32-40	0.001	1.4684	3.1	0.8	65.2	16.6	29.1	7.4
2	2.5	32-35	0.001	1.4719	3.2	0.1	56.2	1.4	30.2	0.8

Les puretés des fractions sont obtenues par analyse GC (toujours exemptes de la correction).

La distillation des fractions 6 et 7 réunies, elle, permet d'isoler deux fractions principales de masse totale de 53.7 g.

Rendement de l'opération : 89 %.

**Tableau No.15 :** Troisième distillation pour l'enrichissement du composé **32**

Fraction	Masse (g)	T (°C)	p (Torr)	$n_D^{20}$	<b>32</b>		<b>33</b>		<b>34</b>	
					(mol %)	(g)	(mol %)	(g)	(mol %)	(g)
1	25.4	65-105	0.001	1.4815	87.5	22.2	9.1	2.3	0.6	0.1
2	28.3	105-210	0.001	1.4820	96.1	27.2	1.4	0.4	1.7	0.5

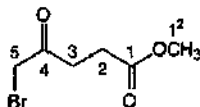
La somme des masses obtenues respectivement dans les sept fractions issues de la première distillation (voir **Tableau No.13**) permet le calcul des rendements totaux pour chacun des trois composés isolés.

**Tableau No.16 :** Rendements totaux des produits de réaction

<b>32</b>	:	64.3 g (310 mmol)	=	38.5 %
<b>33</b>	:	32.2 g (150 mmol)	=	19.3 %

34 : 36.1 g (280 mmol) = 34.7 % selon la théorie.

Données analytiques de 32 :



**R<sub>f</sub>** : (Hexane/AcOEt 1:1) : 0.50 (coloration brunâtre par traitement avec la 2,4-diphénylhydrazine).

**E<sub>b</sub>** : 65.0 °C à p = 0.001 Torr.

**n<sub>D</sub><sup>20</sup>** : 1.4820.

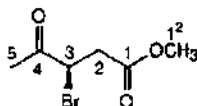
**GC** (programme standard) : 11.1 min.

**IR** (film) : 3000m, 2953m, 2849w, 1734s, 1722s, 1439s, 1411s, 1359s, 1322m, 1207s, 1177s, 1080m, 988m, 863w.

**<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 3.95 (s, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 3.67 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 2.95 (t, <sup>3</sup>J(2, 3) = 6.4, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.65 (t, <sup>3</sup>J(2, 3) = 6.6, 2H, H<sub>2</sub>C(2)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 201.3 (C(4)); 173.4 (C(1)); 52.6 (C(1<sup>2</sup>)); 35.1 (C(3)); 34.7 (C(2)); 28.8 (C(5)).

Données analytiques de 33 :



**R<sub>f</sub>** : (Hexane/AcOEt 1:1) : 0.56 (coloration brunâtre par traitement avec la 2,4-diphénylhydrazine).

**E<sub>b</sub>** : 35.0 °C à p = 0.001 Torr.

$n_D^{20}$  : 1.4684.

GC (programme standard) : 8.3 min.

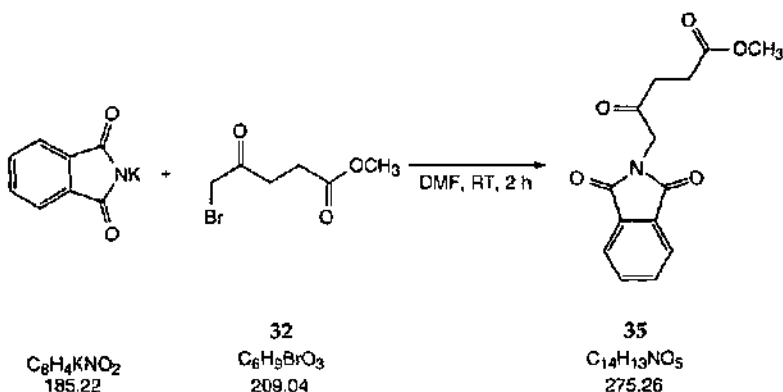
IR (film) : 2970w, 2956w, 2840w, 1724s, 1438m, 1409m, 1359s, 1332m, 1293m, 1211s, 1162s, 997w, 896w, 650w.

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 4.65 (dxd,  $^3J(2^a, 3) = 8.5$ ,  $^3J(2^b, 3) = 5.9$ , 1H, HC(3)); 3.70 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(1^2)$ ); 3.27 (dxd,  $^2J(2^a, 2^b) = 17.1$ ,  $^3J(2^a, 3) = 8.7$ , 1H,  $\text{H}^a\text{-C}(2)$ ); 2.90 (t,  $^2J(2^a, 2^b) = 17.3$ ,  $^3J(2^b, 3) = 5.9$ , 1H,  $\text{H}^b\text{-C}(2)$ ); 2.42 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(5)$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 201.0 (C(4)); 171.3 (C(1)); 52.8 (C(1<sup>2</sup>)); 45.6 (C(3)); 35.1 (C(2)); 27.7 (C(5)).

### 8.1.2. Synthèse du 5-(N-Phthalimido)-lévulinate de méthyle (35)

Synthèse effectuée selon le Mode opératoire décrit dans le rapport de D. Reymond (semestre hiver 1995-96).



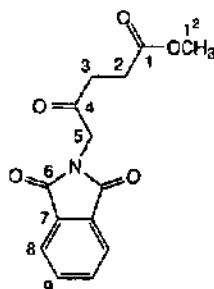
41 g (196 mmol, pureté 88 %, 1.0 éq.) de S-bromolévulinate de méthyle (32) sont dissous dans 180 ml de DMF à 0°C sous agitation. De petites portions de phthalimide de potassium (40 g, 216 mmol, 1.1 éq.) sont ensuite ajoutées sous forte agitation. La suspension granuleuse obtenue est agitée durant 120 min à RT. Le mélange réactionnel prend progressivement une coloration brunâtre.

Le précipité formé (KBr) est centrifugé et le surnageant mélangé avec de l'eau (100-200 ml) jusqu'à l'apparition d'un précipité jaunâtre. Ce dernier est filtré et l'opération répétée encore trois fois. Les quatre solides ainsi récoltés sont réunis puis dissous dans 100 ml de  $\text{CHCl}_3$ . La phase organique est ensuite lavée avec 50 ml d'une solution 0.1 M de NaOH jusqu'à disparition de la coloration jaune, puis avec 50 ml d'eau pour éliminer les traces de NaOH. La phase organique est alors séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre, filtrée et concentrée. Après séchage à la pompe à huile, isolement de 50.4 g d'une huile de couleur brune.

Après dilution de cette dernière dans un peu de  $\text{CHCl}_3$ , suivie de l'adjonction de quelques gouttes d'hexane pour troubler la solution, le produit brut de réaction cristallise sous la forme d'aiguilles beiges. Après séchage à la pompe à huile, 30.4 g (56 %) de produit sont isolés. Après concentration des eaux-mères, une nouvelle cristallisation donne 2.5 g (5 %) de 35 beige-brun. Les deux fractions sont réunies, dissoutes dans  $\text{CHCl}_3$ , filtrées sur une fritte de type P4 et une nouvelle fois cristallisées avec un mélange  $\text{CHCl}_3$ /hexane (après filtration de la solution, observation de traces d'un solide beige, qui, d'après la spectroscopie  $^1\text{H-RMN}$ , s'avère être le phthalimide non-réagi). 31.8 g (115 mmol, 59 %) de 35 sous forme cristalline et de couleur jaune pâle sont isolés.

**Remarque :** Cette variante dans l'isolement du 5-(*N*-Phthalimido)-lévulinate de méthyle 35 a été développée, parce qu'une extraction directe du mélange réactionnel avec du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  conduit à la formation d'une émulsion difficile à séparer. A noter toutefois que le rendement final n'est pas meilleur que ceux enregistrés habituellement (50 - 80 %).

Données analytiques de 35 :



$R_f$  : (Hexane/AcOEt 1:1) : 0.51 (UV<sub>254</sub>-visible, coloration brunâtre par traitement avec  $\text{KMnO}_4$ ).

F : 96.0 - 97.0°C.

IR (KBr) : 3473vw, 3049vw, 3029vw, 2957w, 1776m, 1741s, 1730vs, 1718vs, 1615w, 1468m, 1447m, 1417s, 1388m, 1354m, 1314s, 1269m, 1200s, 1179m, 1103s, 1056w, 1017m, 993m, 972w, 925w, 906m, 796vw, 746m, 713s, 689vw, 605w.

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.90 - 7.86 (m, 2H, HC(8, 8')); 7.76 - 7.71 (m, 2H, HC(9, 9')); 4.56 (s, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 3.69 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 2.86 (t, <sup>3</sup>J(2, 3) = 6.6, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.67 (t, <sup>3</sup>J(2, 3) = 6.6, 2H, H<sub>2</sub>C(2)).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 200.6 (C(4)); 172.4 (C(1)); 167.4 (C(6, 6')); 134.0 (C(9, 9')); 131.8 (C(7, 7')); 123.3 (C(8, 8')); 51.8 (C(1<sup>2</sup>)); 46.3 (C(5)); 34.3 (C(3)); 27.4 (C(2)).

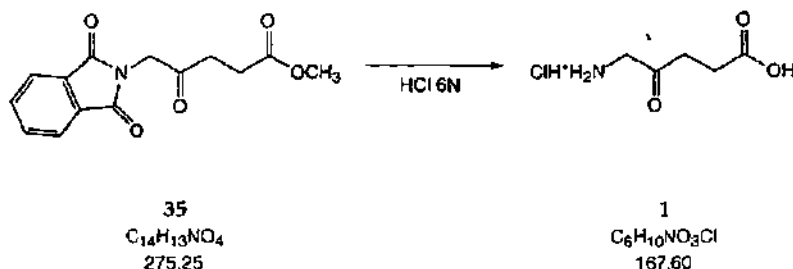
MS (EI, 70 eV) : 275 (4, [M]<sup>+</sup>), 244 (8, [M - OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 216 (15), 161 (14), 160 (59), 133 (11), 115 (100, [M - Phth=CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>), 104 (17), 87 (17), 77 (35), 76 (32), 59 (14), 55 (28).

C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub> (275.26) : calc. : C 61.09, H 4.76, N 5.09;

obs. : C 60.88, H 4.72, N 5.06.

### 8.1.3. Synthèse de l'acide 5-aminolévulinique (1)

Synthèse effectuée selon le Mode opératoire décrit dans le rapport de Y. Berger (semestre hiver 1996-97).

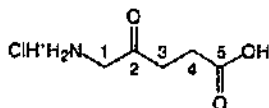


Dans un ballon de 250 ml sont placés 3.50 g (13 mmol, 1.0 éq.) de 5-(N'-Phthalimido)-lévulinat de méthyle 35 et 80 ml de HCl 6N. Après dissolution du solide, le mélange est chauffé à reflux durant 12 heures. L'avancement de la réaction est confirmée par CCM en phase inverse (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 13:1). Le mélange réactionnel est alors filtré afin d'éliminer l'acide phthalique formé lors de l'hydrolyse et le filtrat est agité durant trois heures à RT en présence

de 2 g de charbon actif. Après filtration sur Celite<sup>®</sup>, l'eau est éliminée par évaporation rotative. Le solide pâteux obtenu est dissout dans un minimum d'éthanol puis recristallisé par adjonctions successives d'éther.

Rendement de la réaction après une recristallisation : 1.23 g (7.3 mmol, 56 %) de solide cristallin blanchâtre.

Données analytiques de **1** :



**R<sub>f</sub>** : (RP-18 F<sub>245S</sub>, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 1:1) : 0.35 (coloration jaunâtre par traitement avec la ninhydrine).

**F** : 146.0 - 147.0°C.

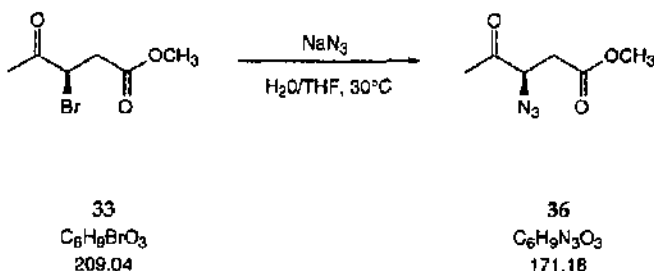
**IR** (KBr) : 3009s, 2928s, 2622m, 1723vs, 1591m, 1478m, 1407m, 1368s, 1356m, 1310m, 1238m, 1225m, 1184m, 1152m, 1100m, 1048m, 997m, 981m, 947m, 862m, 777m, 662w, 633w, 542w.

**<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, D<sub>2</sub>O) : 4.10 (*s*, 2H, H<sub>2</sub>C(1)); 2.87 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.67 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(4)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz, D<sub>2</sub>O) : 206.7 (C(2)); 179.4 (C(5)); 49.7 (C(1)); 36.9 (C(3)); 30.0 (C(4)).

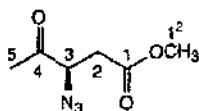
## 8.1.4. Synthèse du 3-azoture lévullnate de méthyle (36)

Synthèse effectuée selon le Mode opératoire décrit dans le rapport de D. Reymond (semestre hiver 1995-96).



Dans un ballon tricol de 500 ml est placée une solution contenant 17.4 g (268 mmol, 2.0 éq.) de  $\text{NaN}_3$  dans 100 ml d'eau désionisée. 28.0 g (134 mmol, 1.0 éq.) de 33 sont alors ajoutés progressivement, sous forte agitation, de manière à ne pas dépasser  $30^\circ\text{C}$ . Le mélange trouble et jaunâtre est alors agité durant 60 min. à RT, puis phase organique et phase aqueuse sont séparées. Cette dernière est ensuite extraite avec trois portions de 150 ml d'AcOEt; les phases organiques réunies sont alors lavées avec deux portions successives de 200 ml d'eau désionisée puis séchées sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, filtrées et concentrées. Après séchage à la pompe à huile, isolement de 21.3 g (124 mmol, 93 %) d'une huile de couleur jaune. Le produit 36 ainsi isolé est de pureté suffisante pour les données analytiques.

Données analytiques de 36 :



$R_f$ : (hexane/AcOEt 2:1) : 0.33.

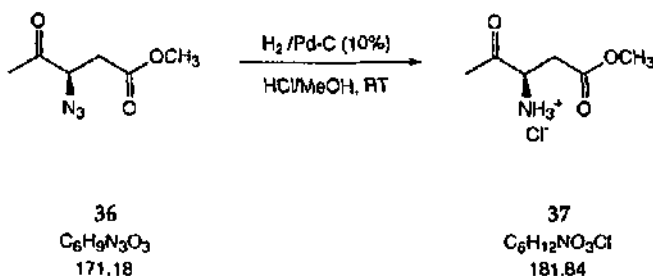
IR (film) : 3009s, 2928s, 2622m, 1723vs, 1591m, 1478m, 1407m, 1368s, 1356m, 1310m, 1238m, 1225m, 1184m, 1152m, 1100m, 1048m, 997m, 981m, 947m, 862m, 777m, 662w, 633w, 542w.

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) : 4.10 (s, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(5)$ ); 2.87 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(3)$ ); 2.67 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(2)$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) : 206.7 (C(4)); 179.4 (C(1)); 49.7 (C(5)); 36.9 (C(3)); 30.0 (C(2)).

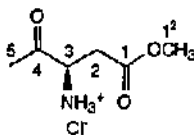
### 8.1.5. Synthèse du 3-chlorure d'ammonium du lévulinate de méthyle (37)

Synthèse effectuée selon le Mode opératoire décrit dans le rapport de D. Reymond (semestre hiver 1995-96).



Dans un ballon bicol de 100 ml sont placés 0.12 g de Pd-C (10 %). Le récipient est purgé à l'aide d'azote, puis une solution contenant 1.20 g (7 mmol, 1.0 éq.) de 36 dans 50 ml de MeOH est versée. 2.5 ml d'HCl conc. sont alors ajoutés goutte à goutte et le mélange est agité magnétiquement sous atmosphère d'hydrogène. Le mélange hétérogène et jaunâtre est alors agité durant 150 min. à RT, puis il est filtré sur Celite®. Le filtrat jaunâtre est finalement concentré. Après séchage à la pompe à huile, récupération de 0.51 g (2.8 mmol, 40 %) d'une mousse de couleur jaune. Le produit 37 est recristallisé à l'aide d'un mélange MeOH/ $\text{CHCl}_3$ . 0.24 g (1.3 mmol, 19 %) de cristaux blancs compacts sont ainsi isolés.

Données analytiques de 37 :



**R<sub>f</sub>** : (RP-18 F<sub>245</sub>S, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 10:1) : 0.56 (coloration brunâtre par traitement avec KMnO<sub>4</sub>).

**F** : 134.0 - 135.0°C.

**IR** (KBr) : 3438m, 2986s, 2917s, 2726w, 1731vs, 1603w, 1489m, 1377m, 1245m, 1181m, 1129w, 1086w, 892w.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : 8.51 (*sbr*, 3H, H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>); 4.28 (*sbr*, 1H, HC(3)); 3.64 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 3.18 - 3.05 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 2.25 (*s*, 3H, H<sub>2</sub>C(5)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : 202.5 (C(4)); 169.9 (C(1)); 54.9 (C(3)); 52.2 (C(1<sup>2</sup>)); 33.5 (C(2)); 26.5 (C(5)).

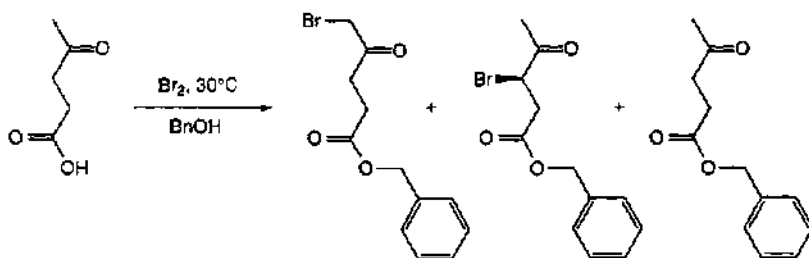
**MS** (DCI, NH<sub>3</sub>) : 181 (13, [M]<sup>+</sup>), 146 (77, [M - Cl]<sup>+</sup>), 114 (23), 102 (100), 70 (44), 60 (21), 44 (20).

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>Cl (181.64) : calc. : C 39.68, H 6.66, N 7.71;

obs. : C 38.56, H 6.16, N 7.61.

### 8.1.6. Synthèse du 3- et 5-bromolévulinate de benzyle (39 et 38)

Synthèse effectuée selon le Mode opératoire décrit dans le rapport de D. Reymond (semestre hiver 1995-96).



**30**  
C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>  
116.12

**38**  
C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>3</sub>  
285.14

**39**  
C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>3</sub>  
285.14

**40**  
C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>  
206.24

Dans un ballon tricol de 500 ml est placée une solution de 23.3 g (200 mmol, 1.00 éq.) d'acide lévulinique 30 dans 200 ml d'alcool benzylique (BnOH). 33.6 g (210 mmol, 1.05 éq.) de brome lui sont alors ajoutés, goutte à goutte et sous forte agitation, de manière à ce que la température ne dépasse pas 40°C. Le départ de la réaction, reconnaissable à la soudaine décoloration du mélange réactionnel et à une montée de la température, n'est consommé qu'après un temps d'induction de 40 minutes.

Après ce délai, la solution est agitée durant 60 minutes, puis laissée au repos durant 16 heures à RT. 400 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont alors ajoutés au mélange réactionnel jaunâtre, provoquant la formation d'une émulsion blanchâtre. La phase organique est ensuite lavée avec quatre portions successives de 100 ml d'eau désionisée, neutralisée avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, puis les solvants sont éliminés à l'aide de l'évaporateur rotatif (T<sub>bain</sub> = 40°C)<sup>1</sup>.

Rendement de l'opération : 75 %.

Tableau No.17 : Distillation du mélange réactionnel brut

Fraction	Masse (g)	T (°C)	p (Torr)
1	5.7	20-53	0.001
2	2.2	45-78	0.001
3	3.7	78-90	0.001
4	8.4	91-120	0.001
5	2.2	20-105	0.01
6	14.1	100-110	0.01
7	17.0	110-115	0.01
8	2.6	110-130	0.01

Le contenu de chaque fraction est alors analysé par CCM et par spectroscopie <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Les composés 38 et 39 désirés sont contenus dans les fractions 4 à 8 qui sont par conséquent réunies.

<sup>1</sup> Avec cette dernière opération, il n'est pas possible d'éliminer la totalité de l'alcool benzylique engagé, malgré le fait d'avoir relié la pompe à huile à l'évaporateur rotatif. Il est par conséquent nécessaire de procéder à une distillation sur colonne Vigreux de 25 cm des 74.2 g de mélange isolé. Récolte de huit fractions principales d'une masse totale de 55.9 g

**Remarque :** Du fait des températures élevées nécessaires à une séparation satisfaisante de **38** et **39** par distillation et de la sensibilité de ces derniers, l'étape finale de purification est effectuée par chromatographie-éclair sur colonne.

3.00 g du mélange issu des fractions 4 à 8 sont purifiés par chromatographie-éclair sur 150 g de silice (acétate d'éthyle/heptane 7:2). Isolement de 1.28 g de 5-bromolévulinate de benzyle **38** (pureté 90 %) et 0.57 g de 3-bromolévulinate de benzyle **39** (pureté 90 %).

Rendement de l'opération : 62 %.

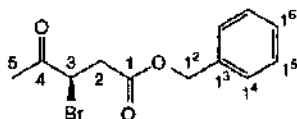
Pour les analyses, les composés isolés ci-dessus sont déposés respectivement sur deux plaques de silice CP de Imm d'épaisseur et éluées à l'aide d'un mélange AcOEt/heptane 1:2. Après grattage de la silice, extraction de cette dernière avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , filtration et évaporation du solvant, les composés sont caractérisés.

La somme des masses obtenues dans les fractions 4 à 8 issues de la distillation (voir **Tableau No.17**) et les masses isolées issues de l'étape de purification par chromatographie-éclair permettent le calcul des rendements totaux pour chacun des trois composés isolés.

**Tableau No.18 :** Rendements totaux des produits de réaction

<b>38</b>	:	18.9 g (66 mmol)	=	33.1 %
<b>39</b>	:	8.4 g (29 mmol)	=	14.7 %
<b>40</b>	:	11.0 g (53 mmol)	=	26.7 % selon la théorie.

Données analytiques de **39** :



**R<sub>f</sub>** : (heptane/AcOEt 2:1) : 0.50 (UV<sub>254</sub>-visible).

**E<sub>b</sub>** : > 130°C à p = 0.01 Torr.

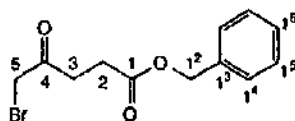
**IR** (film) : 3090w, 3034m, 2958w, 1724vs, 1498m, 1456w, 1385m, 1357m, 1327m, 1290m, 1242m, 1201m, 1160m, 1082m, 991m, 892w, 752m, 699m.

**<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.39 - 7.36 (m, 5H, HC(1<sup>4</sup>; 1<sup>4'</sup>); HC(1<sup>5</sup>; 1<sup>5'</sup>); HC(1<sup>6</sup>)); 5.14 (s, 2H, H<sub>2</sub>C(1<sup>2</sup>)); 4.67 (dxd, <sup>3</sup>J(2<sup>a</sup>, 3) = 8.4, <sup>3</sup>J(2<sup>b</sup>, 3) = 5.9, 1H, HC(3)); 3.33 (dxd, <sup>2</sup>J(2<sup>a</sup>, 2<sup>b</sup>) = 17.2, <sup>3</sup>J(2<sup>a</sup>, 3) = 8.8, 1H, H<sup>a</sup>C(2)); 2.95 (dxd, <sup>2</sup>J(2<sup>a</sup>, 2<sup>b</sup>) = 17.3, <sup>3</sup>J(2<sup>b</sup>, 3) = 5.9, 1H, H<sup>b</sup>C(2)); 2.40 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(5)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 200.4 (C(4)); 170.0 (C(1)); 135.3 (C(1<sup>3</sup>)); 128.7 - 128.3 (C(1<sup>4</sup>; 1<sup>4'</sup>); C(1<sup>5</sup>; 1<sup>5'</sup>); C(1<sup>6</sup>)); 67.0 (C(1<sup>2</sup>)); 45.0 (C(3)); 38.3 (C(2)); 27.1 (C(5)).

**MS** (EI, 70 eV) : 287 (3, [M + 2]<sup>+</sup>), 285 (2, [M]<sup>+</sup>), 205 (4, [M - HBr]<sup>+</sup>), 117 (10), 107 (72), 99 (25), 91 (100, [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>), 77 (100, [C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>), 71 (8), 65 (7), 51 (2), 43 (12), 39 (2).

Données analytiques de **38** :



**R<sub>f</sub>** : (heptane/AcOEt 2:1) : 0.39 (UV<sub>254</sub>-visible).

**E<sub>b</sub>** : > 130°C à p = 0.01 Torr.

**IR** (film) : 3066w, 3034w, 2943w, 1734vs, 1498w, 1456m, 1407m, 1388m, 1353m, 1315m, 1245s, 1214m, 1173s, 1080m, 989m, 753m, 699m.

**<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.39 - 7.36 (m, 5H, HC(1<sup>4</sup>; 1<sup>4'</sup>); HC(1<sup>5</sup>; 1<sup>5'</sup>); HC(1<sup>6</sup>)); 5.13 (s, 2H, H<sub>2</sub>C(1<sup>2</sup>)); 3.95 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(5)); 2.97 (t, <sup>3</sup>J(2, 3) = 6.4, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.71 (t, <sup>3</sup>J(2, 3) = 6.3, 2H, H<sub>2</sub>C(2)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 200.6 (C(4)); 172.2 (C(1)); 135.7 (C(1<sup>3</sup>)); 128.7 - 128.3 (C(1<sup>4</sup>; 1<sup>4'</sup>); C(1<sup>5</sup>; 1<sup>5'</sup>); C(1<sup>6</sup>)); 66.8 (C(1<sup>2</sup>)); 34.4 - 34.2 (2xs, C(2); C(3)); 28.4 (C(5)).

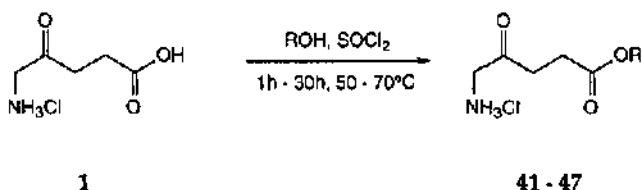
**MS** (EI, 70 eV) : 287 (1, [M + 2]<sup>+</sup>), 285 (1, [M]<sup>+</sup>), 205 (2, [M - HBr]<sup>+</sup>), 121 (6), 107 (77), 99 (60), 91 (100, [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>), 79 (100, [C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>), 71 (4), 65 (8), 51 (2), 39 (3).

## 8.2. Synthèses de dérivés de l'acide 5-aminolévulinique

### 8.2.1. Synthèses de chlorhydrates d'esters de l'acide 5-aminolévulinique

Les modes opératoires décrits dans la partie 8.2.1. sont tous dérivés du travail de diplôme de Y. Berger [234]. Une remarque détaillant les modifications apportées est notée si nécessaire.

#### 8.2.1.1. Mode opératoire - Type I



Composé	R	Durée	Température	PM [g/mol]
41	CH <sub>3</sub>	17 heures	70°C	181.64
42	<i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	5 heures	70°C	251.78
43	<i>c</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	30 heures	70°C	249.76
44	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4 heures	70°C	257.72
45	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub>	1 heure	50°C	225.67
46	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1 heure	50°C	239.70
47	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O- CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1 heure	50°C	283.75

Dans un ballon bicol de 25 ml préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, sont versés 3.0 ml de l'alcool ROH correspondant. Après refroidissement à l'aide d'un bain de glace et sous agitation magnétique, 0.5 ml (7 mmol, 2.3 éq.) de chlorure de thionyle SOCl<sub>2</sub> sont ajoutés goutte à goutte au liquide dense. Après 5 minutes d'agitation à 0°C, 500 mg (3 mmol, 1.0 éq.) d'acide 5-aminolévulinique (ALA) 1 sont versés par petites portions dans le récipient. Le mélange réactionnel est alors réchauffé à RT, puis est chauffé à une température allant de 50°C à 70°C pour une durée variant de 1 heure à 30 heures selon l'alcool utilisé.

Le contrôle de l'avancement de la réaction se fait par CCM ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  : 70:30:5). Une fois la totalité de **1** disparue sur CCM, le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif et le résidu pâteux séché à la pompe à huile.

Selon le cas, le composé brut isolé et séché est de pureté satisfaisante pour les analyses spectroscopiques. Sinon, le résidu pâteux contenant de l'alcool résiduel est purifié à l'aide d'une colonne de chromatographie, dont les caractéristiques sont les suivantes : hauteur de 30 cm et diamètre de 4 cm; 100g de gel de silice 60, grosseur de grains 0.063 - 0.200 mm (Merck, Darmstadt); 200 ml d'acétone, puis 200 ml de méthanol/acétone 1:1, enfin 300 ml de méthanol et récolte des fractions contenant l'ester pur.

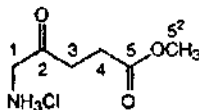
Après concentration des fractions récoltées, le résidu pâteux est dissout dans un volume minimum de méthanol, puis sa précipitation est provoquée par l'addition en petites portions de 10-15 ml d'éther\* et par la réfrigération du mélange trouble à  $-21^\circ\text{C}$ . Le solide amorphe récupéré est séché à la pompe à huile.

#### 8.2.1.2. Synthèse du chlorure de [(4-méthoxycarbonyl)-(2-oxo)-(1-butyl)]ammonium (**41**)

La synthèse de **41** est effectuée selon le Mode opératoire - Type 1. Addition de 0,5 ml (7 mmol, 2,3 éq.) de  $\text{SOCl}_2$  à 3,0 ml (74 mmol, 24,7 éq.) de MeOH, puis, après refroidissement à  $0^\circ\text{C}$ , adjonction de 500 mg (3 mmol, 1,0 éq.) d'acide 5-aminolévulinique en petites portions. Le mélange est chauffé à  $70^\circ\text{C}$  durant 17 heures. Le solide amorphe brut isolé après concentration du mélange réactionnel est de pureté satisfaisante pour les analyses spectroscopiques.

Rendement : 490 mg (90 %).

Données analytiques de **41** :



$R_f$  : ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  : 70:30:5) : 0,33 (coloration brunâtre par traitement avec la ninhydrine).

F :  $144,0 - 146,0^\circ\text{C}$ .

IR (KBr) : 2991sbr, 1723s, 1588m, 1474m, 1420m, 1326m, 1280m, 1201m, 1140m, 1057m, 978m, 739m.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) : 4.09 (s, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(1)$ ); 3.66 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(5^2)$ ); 2.90 - 2.85 (m, AA' d'un AA'BB', 2H,  $\text{H}_2\text{C}(3)$ ); 2.70 - 2.66 (m, BB' d'un AA'BB', 2H,  $\text{H}_2\text{C}(4)$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) : 206.7 (C(2)); 178.1 (C(5)); 55.1 (q, C(5<sup>2</sup>)); 49.7 (C(1)); 37.0 (t, C(3)); 30.0 (t, C(4)).

MS (EI, 70 eV) : 146 (47,  $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ ), 117 (42), 114 (90), 86 (100), 82 (37), 59 (63), 55 (98).

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_3\text{Cl}$  (181.64) : calc. : C 39.68, H 6.66, N 7.71;

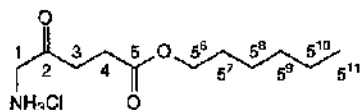
obs. : C 38.07, H 6.44, N 7.74.

### 8.2.1.3. Synthèse du chlorure de [(4-héxyloxycarbonyl)-(2-oxo-(1-butyl)]ammonium (42)

La synthèse de **42** est effectuée selon le Mode opératoire - Type I. Addition de 0.5 ml (7 mmol, 2.3 éq.) de  $\text{SOCl}_2$  à 3.0 ml (41 mmol, 13.7 éq.) d'hexanol, puis, après refroidissement à  $0^\circ\text{C}$ , adjonction de 500 mg (3 mmol, 1.0 éq.) d'ALEA en petites portions. Le mélange est chauffé à  $70^\circ\text{C}$  durant 5 heures. Le résidu pâteux brut, isolé après concentration du mélange réactionnel, est chromatographié comme indiqué plus haut puis recristallisé dans un mélange MeOH/éther\*. Isolement d'un solide cristallin légèrement jaune.

Rendement : 640 mg (85 %).

Données analytiques de **42** :



$R_f$  : ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  : 70:30:5) : 0.53 (coloration brunâtre par traitement avec la ninhydrine).

F :  $137.0 - 139.0^\circ\text{C}$ .

IR (KBr) : 2960m, 2860m, 1729vs, 1586w, 1470m, 1417w, 1366w, 1242w, 1214m, 1183m, 1067w, 984vw.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 4.16 (t,  $^3J(5^6, 5^7) = 6.7$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(5^6)$ ); 4.11 (s, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(1)$ ); 2.93 - 2.90 (m, AA' d'un AA'BB', 2H,  $\text{H}_2\text{C}(3)$ ); 2.77 - 2.74 (m, BB' d'un AA'BB', 2H,

$H_2C(4)$ ); 1.75 - 1.68 (*m*, 2H,  $H_2C(5^7)$ ); 1.50 - 1.36 (*m*, 6H,  $H_2C(5^8)$ ;  $H_2C(5^9)$ ;  $H_2C(5^{10})$ ); 1.01 (*t*,  $J(5^{10}, 5^{11}) = 7.0$ , 3H,  $H_3C(5^{11})$ ).

$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ ) : 203.4 (C(2)); 174.5 (C(5)); 66.3 (C(5<sup>6</sup>)); 48.4 (C(1)); 35.6 (C(3)); 32.9 (C(5<sup>9</sup>)); 30.0 (C(5<sup>7</sup>)); 28.8 (C(4)); 27.0 (C(5<sup>8</sup>)); 23.9 (C(5<sup>10</sup>)); 14.6 (C(5<sup>11</sup>)).

MS (EI, 70 eV) : 216 (19, [M - Cl]<sup>+</sup>), 158 (17), 145 (19), 131 (16), 114 (59), 101 (51), 86 (71), 74 (50), 55 (100), 44 (67).

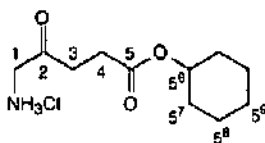
$C_{11}H_{22}NO_3Cl$ (251.78) :	calc.	: C 52.48,	H 8.81,	N 5.56;
	obs.	: C 51.69,	H 8.42,	N 5.48.

#### 8.2.1.4. Synthèse du chlorure de [(4-cyclohexyloxycarbonyl)-(2-oxo)-(1-butyl)ammonium] (43)

La synthèse de 43 est effectuée selon le Mode opératoire - Type I. Addition de 1.4 ml (18 mmol, 6.0 éq.) de  $SOCl_2$  à 3.0 ml (28 mmol, 9.3 éq.) de cyclohexanol, puis, après refroidissement à 0°C, adjonction de 500 mg (3 mmol, 1.0 éq.) d'ALA en petites portions. Le mélange est chauffé à 70°C durant 30 heures. Le résidu pâteux brut, isolé après concentration du mélange réactionnel, est chromatographié comme indiqué plus haut puis recristallisé dans un mélange MeOH/éther\*. Isolement d'un solide cristallin légèrement brunâtre.

Rendement : 577 mg (77 %).

Données analytiques de 43 :



$R_f$  : ( $CH_2Cl_2/CH_3OH/H_2O$  : 70:30:5) : 0.50 (coloration brunâtre par traitement avec la ninhydrine).

F : 140.0 - 142.0°C.

IR (KBr) : 3439m, 2940m, 2550s, 1731vs, 1579m, 1455s, 1416m, 1388m, 1359s, 1251m, 1239m, 1210s, 1174s, 1143s, 1095m, 1037m, 1013m, 999m, 972m, 933m, 908m, 871m.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 4.83 - 4.77 (*m*, 1H,  $\text{HC}(5^6)$ ); 4.12 (*s*, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(1)$ ); 2.94 - 2.90 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H,  $\text{H}_2\text{C}(3)$ ); 2.76 - 2.72 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H,  $\text{H}_2\text{C}(4)$ ); 1.93 - 1.82 (*m*, 4H,  $\text{H}_2\text{C}(5^7)$ ;  $\text{H}_2\text{C}(5^7)$ ); 1.68 - 1.37 (*m*, 6H,  $\text{H}_2\text{C}(5^8)$ ;  $\text{H}_2\text{C}(5^8)$ ;  $\text{H}_2\text{C}(5^9)$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 203.4 (C(2)); 173.9 (C(5)); 74.7 (C(5<sup>6</sup>)); 48.5 (C(1)); 35.7 (C(3)); 32.8 (C(5<sup>7</sup>); 5<sup>7</sup>)); 29.2 (C(4)); 26.7 (C(5<sup>9</sup>)); 25.0 (C(5<sup>8</sup>); 5<sup>8</sup>)).

MS (EI, 70 eV) : 214 (8,  $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ ), 179 (7), 131 (14), 114 (23), 101 (18), 86 (64), 74 (31), 67 (21), 55 (100), 45 (44).

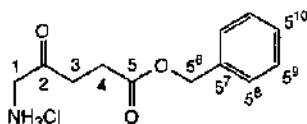
$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{Cl}$ (249.76) :	calc.	: C 52.90,	H 8.07,	N 5.61;
	obs.	: C 48.68,	H 7.04,	N 5.17.

#### 8.2.1.5. Synthèse du chlorure de [(4-benzyloxycarbonyl)-(2-oxo)-(1-butyl)]ammonium (44)

La synthèse de 44 s'effectue selon le Mode opératoire - Type 1. Addition de 0.5 ml (7 mmol, 2.3 éq.) de  $\text{SOCl}_2$  à 3.0 ml (29 mmol, 9.7 éq.) d'alcool benzylique (BnOH), puis, après refroidissement à 0°C, adjonction de 500 mg (3 mmol, 1.0 éq.) d'ALA en petites portions. Le mélange est chauffé à 70°C durant 4 heures. Le résidu pâteux brut, isolé après concentration du mélange réactionnel, est chromatographié comme indiqué plus haut puis recristallisé dans un mélange MeOH/éther\*. Isolement d'un solide cristallin jaune pâle.

**Rendement** : 649 mg (84 %).

Données analytiques de 44 :



**R<sub>f</sub>**: ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  : 70:30:5) : 0.55 (coloration brunâtre par traitement avec la ninhydrine).

**F**: 147.0 - 149.0°C.

**IR** (KBr) : 3031m, 2959m, 1728vs, 1585w, 1497w, 1456w, 1391w, 1358w, 1252w, 1213m, 1173w, 1145w, 984w, 957w.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) : 7.39 - 7.30 (*m*, 5H, HC(5<sup>8</sup>); HC(5<sup>8'</sup>); H<sub>2</sub>C(5<sup>9</sup>); HC(5<sup>9'</sup>); HC(5<sup>10</sup>)); 5.07 (*s*, 2H, H<sub>2</sub>C(5<sup>6</sup>)); 4.01 (*s*, 2H, H<sub>2</sub>C(1)); 2.85 - 2.82 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.68 - 2.64 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(4)).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) : 206.5 (C(2)); 177.2 (C(5)); 138.1 (C(5<sup>7</sup>)); 131.5 (C(5<sup>9</sup>; 5<sup>9'</sup>)); 131.3 (C(5<sup>10</sup>)); 130.9 (C(5<sup>8</sup>; 5<sup>8'</sup>)); 69.9 (C(5<sup>6</sup>)); 49.6 (C(1)); 36.9 (C(3)); 30.1 (C(4)).

**MS** (EI, 70 eV) : 207 (25), 161 (6), 135 (8), 108 (7), 107 (8, [M - C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>), 92 (6), 91 (100, [M - C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>), 79 (12), 77 (14), 65 (11).

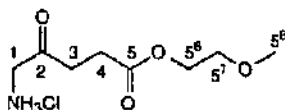
$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{Cl}$ (257.72) :	calc.	: C 55.93,	H 6.26,	N 5.43;
	obs.	: C 51.56,	H 7.87,	N 5.36.

### 8.2.1.6. Synthèse du chlorure de {[4-(2-méthoxyéthoxy)carbonyl]-(2-oxo)-(1-butyl)}ammonium (45)

La synthèse de 45 est effectuée selon le Mode opératoire - Type I. Addition de 0.6 ml (8 mmol, 2.7 éq.) de  $\text{SOCl}_2$  à 3.0 ml (38 mmol, 12.7 éq.) de 2-méthoxy éthanol, puis, après refroidissement à 0°C, adjonction de 500 mg (3 mmol, 1.0 éq.) d'ALA en petites portions. Le mélange est chauffé à 50°C durant 1 heure. Le résidu pâteux brut, isolé après concentration du mélange réactionnel, est chromatographié comme indiqué plus haut puis précipité dans un mélange MeOH/éther\*. Isolement d'un solide pâteux brunâtre.

Rendement : 406 mg (60 %).

Données analytiques de 45 :



$\text{H}_f$  : ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  : 70:30:5) : 0.36 (coloration brunâtre par traitement avec la ninhydrine).

$\text{F}$  : 25.0 - 30.0°C.

**IR** (KBr) : 3442w, 2949s, 1729vs, 1482w, 1412m, 1384m, 1352w, 1243w, 1185m, 1131m, 1098m, 1032w, 994w.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 4.30 - 4.28 (*m*, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(5^6)$ ); 4.13 (*s*, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(1)$ ); 3.70 - 3.67 (*m*, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(5^7)$ ); 3.45 (*s*, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(5^8)$ ); 2.95 - 2.92 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H,  $\text{H}_2\text{C}(3)$ ); 2.81 - 2.78 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H,  $\text{H}_2\text{C}(4)$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 203.4 ( $\text{C}(2)$ ); 174.2 ( $\text{C}(5)$ ); 71.7 ( $\text{C}(5^7)$ ); 65.1 ( $\text{C}(5^6)$ ); 59.4 ( $\text{C}(5^8)$ ); 48.5 ( $\text{C}(1)$ ); 35.6 ( $\text{C}(3)$ ); 28.8 ( $\text{C}(4)$ ).

MS (EI, 70 eV) : 190 (100,  $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ ), 86 (2), 59 (4), 46 (6).

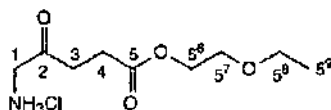
$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}_4\text{Cl}$ (225.67) :	calc.	: C 42.58,	H 7.15,	N 6.21;
	obs.	: C 38.97,	H 6.75,	N 5.71.

#### 8.2.1.7. Synthèse du chlorure de {[4-(2-éthoxyéthoxycarbonyl)-(2-oxo)-(1-butyl)]ammonium} (46)

La synthèse de 46 s'effectue selon le Mode opératoire - Type 1. Addition de 0.5 ml (7 mmol, 2.3 éq.) de  $\text{SOCl}_2$  à 3.0 ml (31 mmol, 10.3 éq.) de 2-éthoxy éthanol, puis, après refroidissement à  $0^\circ\text{C}$ , adjonction de 500 mg (3 mmol, 1.0 éq.) d'ALA en petites portions. Le mélange est chauffé à  $50^\circ\text{C}$  durant 1 heure. Le résidu pâteux brut, isolé après concentration du mélange réactionnel, est chromatographié comme indiqué plus haut puis précipité dans un mélange MeOH/éther\*. Isolement d'un solide pâteux légèrement jaune.

Rendement : 367 mg (51 %).

Données analytiques de 46 :



$R_f$  : ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  : 70:30:5) : 0.43 (coloration brunâtre par traitement avec la ninhydrine).

F :  $25.0 - 30.0^\circ\text{C}$ .

IR (KBr) : 3442w, 2976m, 2879m, 1730vs, 1590w, 1488w, 1417w, 1391m, 1350w, 1248m, 1210m, 1186s, 1126s, 1055w, 959w.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) : 4.19 - 4.17 (*m*, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(5^6)$ ); 4.05 (*s*, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(1)$ ); 3.67 - 3.64 (*m*, 2H,  $\text{H}_2\text{C}(5^7)$ ); 3.53 (*q*,  $^3J(5^8, 5^9) = 7.1$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(5^8)$ ); 2.87 - 2.84 (*m*, AA' d'un AA'BB'),

$^1\text{H}$ ,  $\text{H}_2\text{C}(3)$ ); 2.69 - 2.65 (m,  $\text{BB}'$  d'un  $\text{AA}'\text{BB}'$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(4)$ ); 1.11 (t,  $^3\text{K}(5^8, 5^9)$  = 7.1, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(5^9)$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) : 206.5 (C(2)); 177.3 (C(5)); 70.3 (C(5<sup>7</sup>)); 69.3 (C(5<sup>8</sup>)); 66.8 (C(5<sup>6</sup>)); 49.6 (C(1)); 36.8 (C(3)); 30.0 (C(4)); 16.6 (C(5<sup>9</sup>)).

MS (EI, 70 eV) : 204 (100,  $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ ), 189 (77), 146 (30), 131 (19), 114 (65), 108 (14), 99 (31), 88 (9), 72 (34).

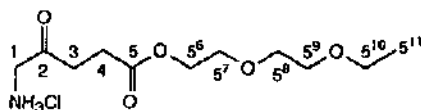
$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{Cl}$ (239.70) :	calc.	: C 45.10,	H 7.57,	N 5.84;
	obs.	: C 44.45,	H 7.29,	N 5.79.

#### 8.2.1.8. Synthèse du chlorure de ((4-(2-éthoxy)-(2-éthoxy)éthoxy)carbonyl)-(2-oxo)-(1-butyl)ammonium (47)

La synthèse de 47 est effectuée selon le Mode opératoire - Type I. Addition de 0.5 ml (7 mmol, 2.3 éq.) de  $\text{SOCl}_2$  à 3.0 ml (22 mmol, 7.3 éq.) de diéthylène glycol monoéthyléther, puis, après refroidissement à  $0^\circ\text{C}$ , adjonction de 500 mg (3 mmol, 1.0 éq.) d'ALA en petites portions. Le mélange est chauffé à  $50^\circ\text{C}$  durant 20 heures. Le résidu pâteux brut, isolé après concentration du mélange réactionnel, est chromatographié comme indiqué plus haut puis précipité dans un mélange MeOH/éther\*. Isolement d'un solide pâteux jaunâtre.

Rendement : 647 mg (76 %).

Données analytiques de 47 :



$R_f$  : ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  : 70:30:5) : 0.48 (coloration brunâtre par traitement avec la ninhydrine).

F :  $25.0 - 30.0^\circ\text{C}$ .

IR (MeOH) : 3446m, 2800m, 2330w, 1730vs, 1643w, 1557w, 1505w, 1489w, 1456w, 1391m, 1350w, 1314w, 1246m, 1211m, 1186m, 1125m, 1055w, 996w, 959w.

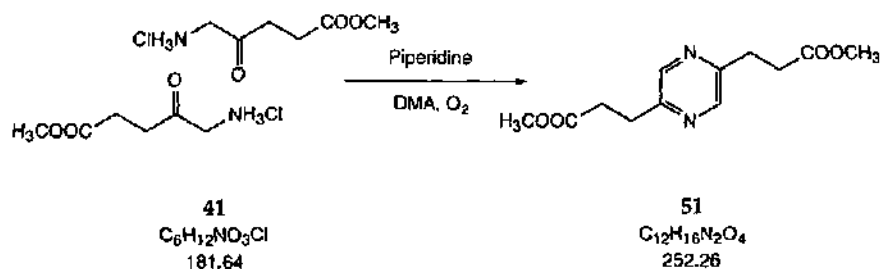
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) : 4.20 - 4.18 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(5<sup>6</sup>)); 4.05 (*s*, 2H, H<sub>2</sub>C(1)); 3.70 - 3.68 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(5<sup>7</sup>)); 3.63 - 3.61 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(5<sup>8</sup>)); 3.59 - 3.56 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(5<sup>9</sup>)); 3.51 (*q*,  $^3J(5^{10}, 5^{11}) = 7.1$ , 2H, H<sub>2</sub>C(5<sup>10</sup>)); 2.87 - 2.83 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.68 - 2.65 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 1.11 (*t*,  $^3J(5^{10}, 5^{11}) = 7.1$ , 3H, H<sub>3</sub>C(5<sup>11</sup>)).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O) : 206.6 (C(2)); 177.3 (C(5)); 72.2 (C(5<sup>8</sup>)); 71.5 (C(5<sup>9</sup>)); 71.0 (C(5<sup>7</sup>)); 69.2 (C(5<sup>11</sup>)); 66.7 (C(5<sup>6</sup>)); 49.7 (C(1)); 36.9 (C(3)); 30.0 (C(4)); 16.7 (C(5<sup>11</sup>)).

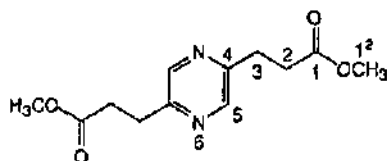
MS (EI, 70 eV) : 248 (46, [M · Cl]<sup>+</sup>), 190 (5), 174 (7), 146 (7), 117 (25), 99 (68), 86 (45), 72 (100), 59 (63), 55 (35).

C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>5</sub> Cl (283.75) :	calc.	: C 46.56,	H 7.81,	N 4.94;
	obs.	: C 44.93,	H 7.18,	N 4.93.

### 8.2.2. Synthèse de la 2, 5-[(β-carboxy)éthyle]pyrazine (51)

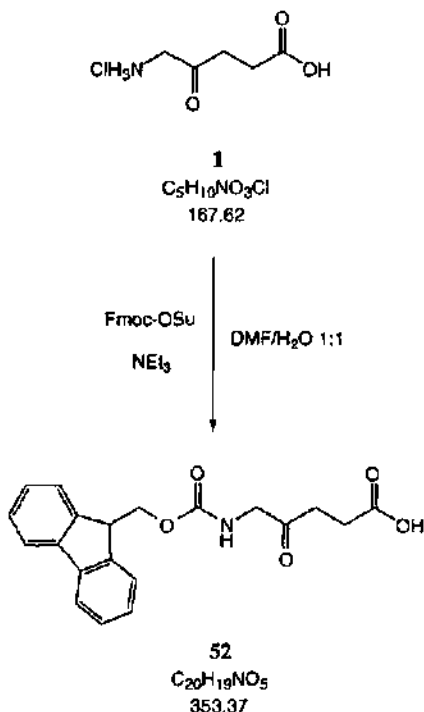


Dans un ballon de 10 ml sont placés 182 mg (1 mmol, 1.0 éq.) de chlorure de [(4-méthoxycarbonyl)-(2-oxo)-(1-butyl)]ammonium **41** et 4.0 ml de DMA. Après dissolution complète du solide, 0.1 ml (1 mmol, 1.0 éq.) de pipéridine sont ajoutés goutte à goutte et le mélange hétérogène est agité durant 24 heures à RT. L'avancement de la réaction est confirmée par CCM (AcOEt). Le mélange réactionnel jaune pâle et trouble est alors concentré à l'aide de l'évaporateur rotatif et le résidu huileux dissout dans 30 ml d'AcOEt. Cette phase organique jaune est ensuite lavée avec, successivement, 10 ml d'eau désionisée, d'une solution 2N de HCl, d'eau désionisée, d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, d'eau désionisée et d'une solution saturée de NaCl. La phase organique lavée et neutralisée est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, puis le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, isolement de 130 mg d'un solide cristallin orange-brun, qui est purifié par chromatographie-éclair sur gel de silice (hexane/AcOEt 5:1 - 1:10). Récupération de 100 mg (79 %) de **51** sous la forme d'un solide cristallin blanc.

Données analytiques de **51** :**R<sub>f</sub>** : (AcOEt) : 0.68 (UV<sub>254</sub>-visible).**F** : 60.0 - 61.0°C.**IR** (KBr) : 3085w, 2954m, 2931m, 1730vs, 1687m, 1494m, 1452m, 1436m, 1347s, 1284m, 1166m, 987m, 895w.**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 8.36 (s, 2H, HC(5); HC(5')); 3.64 (s, 6H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>); H<sub>3</sub>C(1<sup>2'</sup>)); 3.07 (t, <sup>3</sup>J(2, 3) resp. <sup>3</sup>J(2', 3') = 7.3, 4H, H<sub>2</sub>C(2); H<sub>2</sub>C(2')); 2.78 (t, <sup>3</sup>J(2, 3) resp. <sup>3</sup>J(2', 3') = 7.3, 4H, H<sub>2</sub>C(3); H<sub>2</sub>C(3')).**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 173.0 (C(1; 1')); 152.8 (C(4; 4')); 143.5 (C(5; 5')); 51.7 (C(1<sup>2</sup>; 1<sup>2'</sup>)); 32.4 (C(3; 3')); 29.4 (C(2; 2')).**MS** (EI, 70 eV) : 252 (9, [M]<sup>+</sup>), 221 (37, [M - OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 193 (100), 161 (19), 133 (38), 119 (6).

<b>C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b> (252.26) :	calc.	: C 57.13,	H 6.39,	N 11.10;
	obs.	: C 57.36,	H 6.38,	N 11.00.

### 8.2.3. Synthèse de l'acide [(9H-fluorén-9-yl)méthoxycarbonyl]-(5-amino)-(4-oxo)pentanoïque (52)

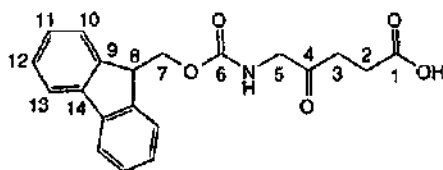


Dans un ballon de 250 ml sous atmosphère inerte d'azote sont versés 40 ml d'un mélange 1:1 de *N,N*-diméthylformamide (DMF) et d'eau désionisée. 0.84 g (5 mmol, 1.0 éq.) de **1** sont ensuite ajoutés en portions successives. Une fois le solide entièrement dissout, le pH de la solution incolore est ajusté à 9 (contrôle à l'aide du papier pH) avec env. 0.6 ml de triéthylamine (NEt<sub>3</sub>). Le mélange homogène devenu vert-jaune est agité durant 30 min. à RT sous N<sub>2</sub>, puis 3.34 g (10 mmol, 2.0 éq.) de [(9H-fluorén-9-yl)méthoxycarbonyl]succinimidate (Fmoc-OSu) sont ajoutés en portions successives. Cette opération se traduit par la formation d'une suspension blanche. Le mélange hétérogène est alors agité durant 24 heures à RT sous N<sub>2</sub> tout en ajustant régulièrement le pH à 9 (contrôle au papier pH) à l'aide de 0.3 ml supplémentaires de NEt<sub>3</sub>. L'avancement de la réaction est confirmée par CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 70:30:5). Le mélange réactionnel brut est ensuite versé, sous forte agitation magnétique, dans 200 ml d'HCl 2N, puis le tout est placé durant 20 heures au réfrigérateur. Après ce laps de temps, le précipité beige est filtré sur Büchner puis lavé avec

100 ml d'hexane. Après séchage à la pompe à huile, isolement de 1.50 g d'un solide beige très compact.

Après dilution partielle de ce dernier dans un peu de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  chaud, la partie insoluble (qui, d'après la spectroscopie  $^1\text{H}$ -RMN, s'avère être le Fmoc-OSu non-réagi) est filtrée. Après refroidissement à RT et addition de quelques gouttes d'hexane, le produit brut de réaction cristallise sous la forme d'un solide blanc compact. Après séchage à la pompe à huile, 1.24 g de solide blanc sont obtenus. Une seconde recristallisation permet une purification satisfaisante du produit : 1.06 g (3 mmol, 60 %) de **52** sont isolés.

Données analytiques de **52** :



$R_f$  : ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  : 70:30:5) : 0.79 ( $\text{UV}_{254}$ -visible).

F : 152.0 - 153.0°C.

IR (KBr) : 3344m, 3020m, 2914m, 1718s, 1685s, 1525m, 1452m, 1411m, 1386m, 1352m, 1242m, 1165m, 1078m, 1021m, 998m, 938m, 761m.

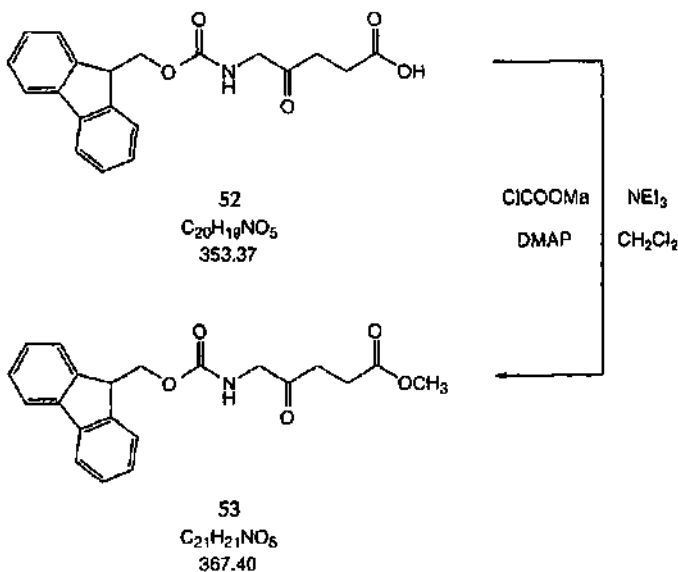
$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) : 7.88 (d,  $^3J(12, 13)$  resp.  $^3J(12', 13') = 7.5$ , 2H, HC(13); HC(13')); 7.71 (d,  $^3J(10, 11)$  resp.  $^3J(10', 11') = 7.4$ , 2H, HC(10); HC(10')); 7.58 (t,  $^3J(5, \text{NH}) \approx 5.9$ , 1H, NH); 7.41 (t,  $^3J(11, 12)$  resp.  $^3J(11', 12') \approx ^3J(12, 13)$  resp.  $^3J(12', 13') = 7.4$ , 2H, HC(12); HC(12')); 7.33 (t,  $^3J(10, 11)$  resp.  $^3J(10', 11') \approx ^3J(11, 12)$  resp.  $^3J(11', 12') = 7.4$ , 2H, HC(11); HC(11')); 4.31 (d,  $^3J(7, 8) = 6.6$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(7)$ ); 4.23 (t,  $^3J(7, 8) = 6.8$ , 1H, HC(8)); 3.86 (d,  $^3J(5, \text{NH}) = 5.9$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(5)$ ); 2.61 (t,  $^3J(2, 3) = 6.4$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(3)$ ); 2.41 (t,  $^3J(2, 3) = 6.4$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(2)$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) : 205.9 (C(4)); 172.7 (C(1)); 156.5 (C(6)); 143.9 (C(9); 9'); 140.8 (C(14); 14')); 127.7 (C(12); 12'); 127.1 (C(11); 11'); 125.3 (C(10); 10')); 120.2 (C(13); 13')); 65.7 (C(7)); 49.8 (C(5)); 46.7 (C(8)); 33.9 (C(3)); 27.5 (C(2)).

MS (FAB) : 376 (21,  $[M + Na]^+$ ), 354 (17,  $[M + H]^+$ ), 179 (100), 165 (31), 158 (22), 132 (21).

$C_{20}H_{19}NO_5$  (353.37) : calc. : C 67.98, H 5.42, N 3.96;  
obs. : C 67.27, H 5.24, N 3.67.

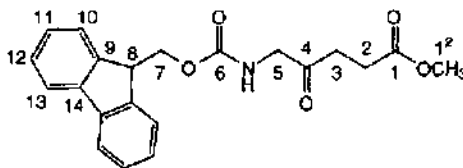
8.2.3.1. Synthèse du [(9H-fluorén-9-yl)méthoxycarbonyl]-(5-amino)-(4-oxo) pentanoate de méthyle (53)



Dans un ballon de 25 ml sous atmosphère inerte d'azote sont suspendus 354 mg (1.0 mmol, 1.0 éq.) de 52 dans 10 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le mélange hétérogène est refroidi à l'aide d'un bain de glace, puis 154 µl (1.1 mmol, 1.1 éq.) de NEt<sub>3</sub> sont ajoutés. Le mélange réactionnel, homogène et jaune, est agité durant 20 min. à 0°C sous N<sub>2</sub>, puis 156 µl (2.0 mmol, 2.0 éq.) de ClCDOME sont ajoutés en une portion. Après 20 min d'agitation à 0°C sous N<sub>2</sub>, addition de 12 mg (0.1 mmol, 0.1 éq.) de DMAP. L'avancement de la réaction est confirmée par CCM (hexane/AcOEt 1:1). Après 2 heures d'agitation à 0°C et 20 heures d'agitation à RT, le mélange réactionnel homogène et jaune foncé est concentré à l'aide de l'évaporateur rotatif. Le résidu pâteux orange est alors dissout dans 100 ml d'AcOEt et cette phase organique jaune est lavée avec, successivement, 50 ml d'eau désionisée, d'une solution 2N de HCl, d'eau désionisée, d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, d'eau désionisée et d'une solution saturée de NaCl. La

phase organique récupérée est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, puis le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, le produit brut de réaction est isolé sous la forme d'un solide compact orange. Purification par chromatographie-éclair sur gel de silice (hexane/AcOEt 5:1 - 1:1) et récupération de 260 mg (71 %) de **53** sous la forme d'un solide cristallin blanc.

Données analytiques de **53** :



$R_f$ : (hexane/AcOEt 1:1): 0.41 (UV<sub>254</sub>-visible).

F: 85.0 - 86.0°C.

IR (KBr): 3336s, 3045m, 2949m, 1734vs, 1694vs, 1542s, 1478m, 1449m, 1294m, 1268m, 1166m, 1004w, 740w.

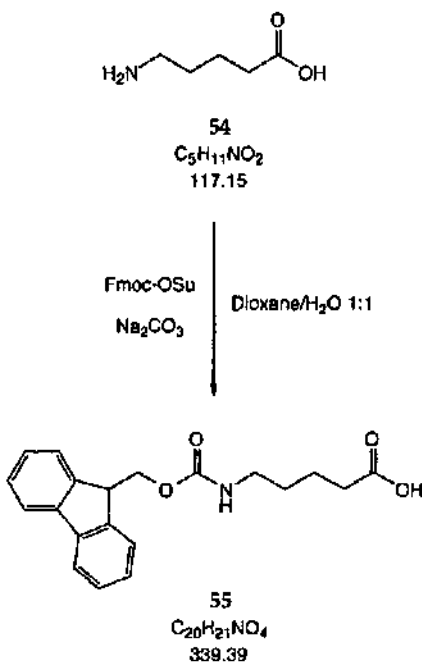
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.76 (*d*,  $^3J(12, 13)$  resp.  $^3J(12', 13') = 7.5$ , 2H, HC(13); HC(13')); 7.59 (*d*,  $^3J(10, 11)$  resp.  $^3J(10', 11') = 7.4$ , 2H, HC(10); HC(10')); 7.40 (*t*,  $^3J(11, 12)$  resp.  $^3J(11', 12') \approx ^3J(12, 13)$  resp.  $^3J(12', 13') = 7.3$ , 2H, HC(12); HC(12')); 7.31 (*t*,  $^3J(10, 11)$  resp.  $^3J(10', 11') \approx ^3J(11, 12)$  resp.  $^3J(11', 12') = 7.5$ , 2H, HC(11); HC(11')); 5.49 (*sbr*, 1H, NH); 4.39 (*d*,  $^3J(7, 8) = 7.1$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(7)$ ); 4.23 (*t*,  $^3J(7, 8) = 7.0$ , 1H, HC(8)); 4.17 (*d*,  $^3J(5, \text{NH}) = 4.9$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(5)$ ); 3.68 (*s*, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(1^2)$ ); 2.76 - 2.72 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H,  $\text{H}_2\text{C}(3)$ ); 2.69 - 2.66 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H,  $\text{H}_2\text{C}(2)$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 203.8 (C(4)); 172.8 (C(1)); 156.1 (C(6)); 143.8 (C(9); 9'); 141.3 (C(14); 14'); 127.7 (C(12); 12')); 127.1 (C(11); 11')); 125.1 (C(10); 10')); 120.0 (C(13); 13')); 67.1 (C(7)); 51.9 (C(1<sup>2</sup>)); 50.6 (C(5)); 47.1 (C(8)); 34.3 (C(3)); 27.6 (C(2)).

MS (FAB): 390 (32,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ), 368 (23,  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ), 191 (22), 179 (100), 165 (81), 158 (28), 146 (77), 115 (26).

$C_{21}H_{21}NO_5$ (367.40) :	calc.	: C 68.65,	H 5.76,	N 3.81;
	obs.	: C 68.31,	H 5.97,	N 3.81.

#### 8.2.4. Synthèse de l'acide [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(5-amino)pentanoïque (55)

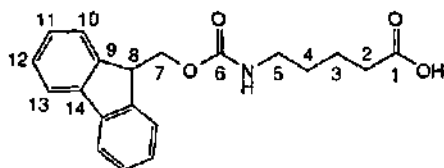


Dans un ballon de 250 ml sous atmosphère inerte d'azote sont dissous 1.17 g (10 mmol, 1.0 éq.) de 54 dans 30 ml d'eau bidistillée. 3.17 g (30 mmol, 3.0 éq.) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sont alors ajoutés en une portion à la solution jaune et le mélange moussant est refroidi à l'aide d'un bain de glace. 5.06 g (15 mmol, 1.5 éq.) de Fmoc-OSu, partiellement dissous dans 30 ml de dioxane, sont ajoutés en portions successives. Cette opération se traduit par la formation d'une suspension blanche. Le mélange hétérogène est alors agité durant 2 heures à 0°C, puis 24 heures à RT sous  $\text{N}_2$ . L'avancement de la réaction est confirmée par CCM ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  70:30:5). Le mélange réactionnel brut est ensuite versé, sous forte agitation magnétique, dans 300 ml d' $\text{H}_2\text{O}$ , puis le tout est extrait, successivement, avec 150 ml d'éther et 150 ml d'AcOEt. La phase aqueuse jaune refroidie est alors acidifiée à pH=2 (contrôle au papier pH) à l'aide d'HCl conc. et le mélange est placé durant 24 heures au réfrigérateur. Après ce laps de temps, le

précipité blanc est filtré sur Büchner puis dissout dans 200 ml d'AcOEt. Le filtrat est extrait avec trois portions successives d'AcOEt, puis les phases organiques réunies sont lavées avec 2x200 ml d'eau désionisée. Séchage sur MgSO<sub>4</sub> anhydre puis concentration à l'aide de l'évaporateur rotatif permettent la récupération d'un solide blanc compact.

Après dilution de ce dernier dans un peu d'AcOEt, suivie de l'adjonction de quelques gouttes de ligroïne (40 - 60 °C) pour troubler la solution, le produit brut de réaction cristallise sous la forme d'étoiles blanches. Après séchage à la pompe à huile, 2.00 g (59 %) de produit sont isolés. Après concentration des eaux-mères, une nouvelle cristallisation donne 0.98 g (29 %) de **55** blanc. Les deux fractions sont réunies, dissoutes dans de l'AcOEt, filtrées sur une fritte de type P4 et une nouvelle fois cristallisées avec un mélange AcOEt/ligroïne. 2.81 g (8.3 mmol, 83 %) de **55** sous forme cristalline et de couleur blanche sont isolés.

Données analytiques de **55** :



**R<sub>f</sub>** : (AcOEt/hexane/CH<sub>3</sub>COOH : 100:20:1) : 0.75 (UV<sub>254</sub>-visible).

**F** : 135.0 - 136.0°C.

**IR** (KBr) : 3347m, 3066w, 3018w, 2949m, 2885w, 1696vs, 1545s, 1451m, 1411m, 1279m, 1258s, 1139m, 1111m, 1021w, 733m.

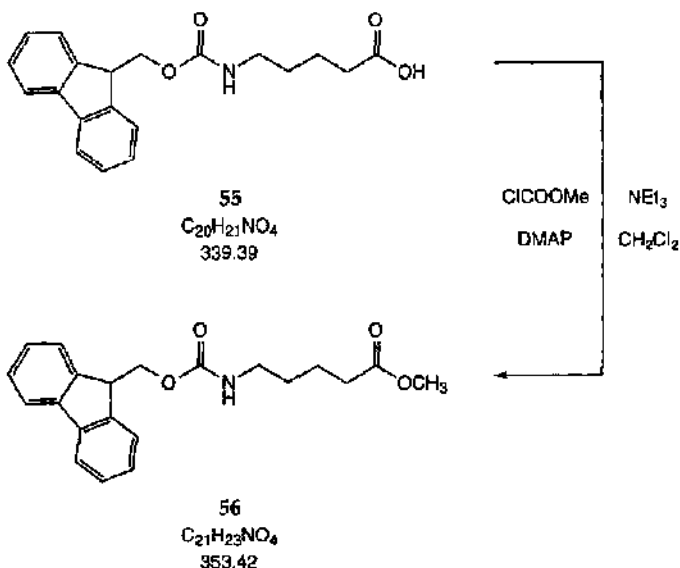
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 7.77 (*d*, <sup>3</sup>*J*(12, 13) resp. <sup>3</sup>*J*(12', 13') = 7.5, 2H, HC(13); HC(13')); 7.61 (*d*, <sup>3</sup>*J*(10, 11) resp. <sup>3</sup>*J*(10', 11') = 7.5, 2H, HC(10); HC(10')); 7.38 (*t*, <sup>3</sup>*J*(11, 12) resp. <sup>3</sup>*J*(11', 12') ≈ <sup>3</sup>*J*(12, 13) resp. <sup>3</sup>*J*(12', 13') = 7.3, 2H, HC(12); HC(12')); 7.30 (*t*, <sup>3</sup>*J*(10, 11) resp. <sup>3</sup>*J*(10', 11') ≈ <sup>3</sup>*J*(11, 12) resp. <sup>3</sup>*J*(11', 12') = 7.4, 2H, HC(11); HC(11')); 4.33 (*d*, <sup>3</sup>*J*(7, 8) = 6.7, 2H, H<sub>2</sub>C(7)); 4.16 (*t*, <sup>3</sup>*J*(7, 8) = 6.7, 1H, HC(8)); 3.08 (*t*, <sup>3</sup>*J*(4, 5) = 6.6, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 2.30 (*t*, <sup>3</sup>*J*(2, 3) = 7.2, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.61 - 1.44 (*m*, 4H, H<sub>2</sub>C(3); H<sub>2</sub>C(4)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 174.9 (C(1)); 156.2 (C(6)); 144.0 (C(9); 9'); 140.8 (C(14); 14')); 127.7 (C(12); 12'); 127.1 (C(11); 11')); 125.2 (C(10); 10')); 120.1 (C(13); 13')); 65.3 (C(7)); 46.9 (C(8)); 39.8 (C(5)); 33.9 (C(2)); 29.0 (C(4)); 22.1 (C(3)).

MS (DCI.  $\text{NH}_3$ ) : 357 (2,  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ ), 340 (3,  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ), 296 (2), 215 (3), 179 (100), 152 (8), 118 (12), 100 (10), 36 (13).

$\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$  (339.39) :      calc.      : C 70.78,    H 6.24,      N 4.13;  
    obs.      : C 70.49,    H 6.15,      N 4.01.

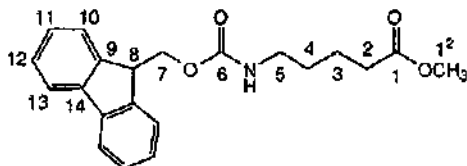
#### 8.2.4.1. Synthèse du (9H-fluorén-9-yl)méthoxycarbonyl-(5-amino) pentanoate de méthyle (56)



Dans un ballon de 50 ml sous atmosphère inerte d'azote sont suspendus 680 mg (2.0 mmol, 1.0 éq.) de **55** dans 20 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Le mélange hétérogène est refroidi à l'aide d'un bain de glace, puis 0.43 ml (3.4 mmol, 1.7 éq.) de  $\text{NEt}_3$  sont ajoutés. Le mélange réactionnel, devenu homogène et jaune, est agité durant 20 min. à  $0^\circ\text{C}$  sous  $\text{N}_2$ , puis 0.23 ml (3.0 mmol, 1.5 éq.) de ClCOOMe sont ajoutés en une portion. Après 20 min d'agitation à  $0^\circ\text{C}$  sous  $\text{N}_2$ , addition de 48 mg (0.4 mmol, 0.2 éq.) de DMAP. L'avancement de la réaction est confirmée par CCM (hexane/AcOEt 1:1). Après 2 heures d'agitation à  $0^\circ\text{C}$  et 22 heures d'agitation à RT, le mélange réactionnel homogène et jaune clair est concentré à l'aide de l'évaporateur rotatif. Le résidu pâteux jaune est alors dissout dans 100 ml d'AcOEt et cette phase organique jaune pâle est lavée avec, successivement, 50 ml d'eau désionisée, d'une solution 2N d'HCl, d'eau désionisée, d'une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , d'eau désionisée et d'une solution saturée de NaCl. La phase organique récupérée est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, puis le solvant est éliminé à l'aide

de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, le produit brut de réaction est isolé sous la forme d'un solide compact jaune pâle. Purification par chromatographie-éclair sur gel de silice (hexane/AcOEt 5:1 - 1:1) et récupération de 450 mg (64 %) de **56** sous la forme d'un solide cristallin blanc.

Données analytiques de **56** :



$R_f$  : (AcOEt/hexane/CH<sub>3</sub>COOH : 100:20:1) : 0.70 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 91.0 - 92.0°C.

IR (KBr) : 3328m, 3068w, 3019w, 2950m, 2924w, 2868w, 1738vs, 1690vs, 1549s, 1477m, 1466w, 1448m, 1360w, 1269s, 1172m, 1021w, 739m.

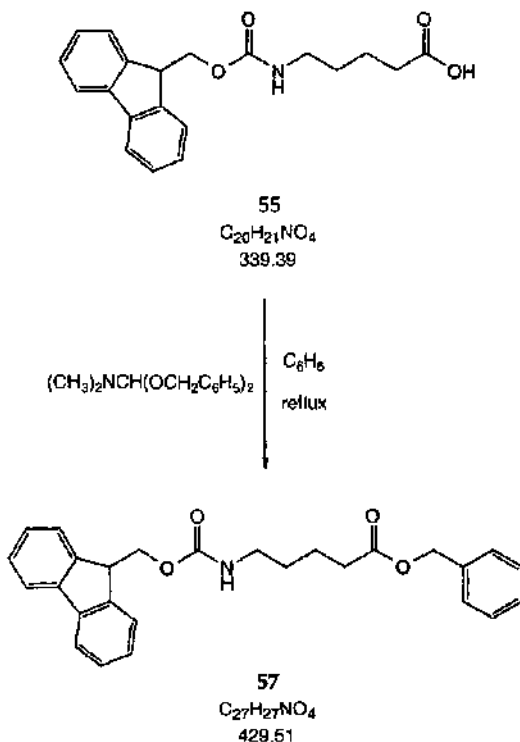
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.73 (*d*, <sup>3</sup>*J*(12, 13) resp. <sup>3</sup>*J*(12', 13') = 7.5, 2H, HC(13); HC(13')); 7.58 (*d*, <sup>3</sup>*J*(10, 11) resp. <sup>3</sup>*J*(10', 11') = 7.4, 2H, HC(10); HC(10')); 7.37 (*t*, <sup>3</sup>*J*(11, 12) resp. <sup>3</sup>*J*(11', 12') ≈ <sup>3</sup>*J*(12, 13) resp. <sup>3</sup>*J*(12', 13') = 7.4, 2H, HC(12); HC(12')); 7.28 (*t*, <sup>3</sup>*J*(10, 11) resp. <sup>3</sup>*J*(10', 11') ≈ <sup>3</sup>*J*(11, 12) resp. <sup>3</sup>*J*(11', 12') = 7.4, 2H, HC(11); HC(11')); 5.21 (*sbr*, 1H, NH); 4.38 (*d*, <sup>3</sup>*J*(7, 8) = 6.9, 2H, H<sub>2</sub>C(7)); 4.18 (*t*, <sup>3</sup>*J*(7, 8) = 6.8, 1H, HC(8)); 3.63 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 3.20 - 3.14 (*dxr*, <sup>3</sup>*J*(4, 5) = 6.5, <sup>3</sup>*J*(5, NH) = 6.4, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 2.30 (*t*, <sup>3</sup>*J*(2, 3) = 7.3, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.67 - 1.58 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 1.54 - 1.46 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(4)).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 173.6 (C(1)); 156.2 (C(6)); 143.7 (C(9'; 9'')); 141.0 (C(14); 14'')); 127.4 (C(12; 12')); 126.7 (C(11; 11')); 124.8 (C(10; 10')); 119.7 (C(13; 13')); 66.2 (C(7)); 51.2 (C(1<sup>2</sup>)); 47.0 (C(8)); 40.3 (C(5)); 33.2 (C(2)); 29.0 (C(4)); 21.7 (C(3)).

MS (DCI, NH<sub>3</sub>) : 371 (7, [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 354 (67, [M + H]<sup>+</sup>), 326 (6), 178 (100), 165 (8), 132 (30), 100 (8), 56 (6).

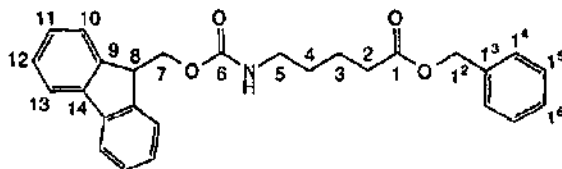
C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub> (353.42) :	calc.	: C 71.37,	H 6.56,	N 3.96;
	obs.	: C 70.82,	H 6.68,	N 4.04.

## 8.2.4.2. Synthèse du [(9H-fluorén-9-yl)méthoxycarbonyl]-(5-amino) pentanoate de benzyle (57)



Dans un ballon de 100 ml sous atmosphère inerte d'azote sont suspendus 340 mg (1.0 mmol, 1.0 éq.) de 55 dans 60 ml de C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>. Le mélange hétérogène est agité durant 10 min à RT, puis 0.39 ml (1.5 mmol, 1.5 éq.) de dibenzylacétal de *N,N*-diméthylformamide ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NCH(OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>) sont ajoutés en une portion. Le mélange réactionnel est alors chauffé à reflux durant 8 heures. Cette opération se traduit par la dissolution du solide. L'avancement de la réaction est confirmée par CCM (hexane/AcOEt 1:1). Le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif et le résidu pâteux dissout dans 200 ml d'AcOEt. La phase organique incolore est alors lavée avec, successivement, 80 ml d'eau désionisée, d'une solution 2N d'HCl, d'eau désionisée, d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, d'eau désionisée et d'une solution saturée de NaCl, puis elle est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre. Le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif et, après séchage à la pompe à huile, le produit brut de réaction est isolé sous la forme d'une pâte blanche. Cette dernière est purifiée par chromatographie-éclair sur gel de silice (hexane/AcOEt 10:1 - 1:1) qui permet d'isoler 285 mg (66 %) de 57 sous la forme d'un solide compact jaune.

Données analytiques de 57 :

R<sub>f</sub> : (hexane/AcOEt : 1:1) : 0.76 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 98.0 - 99.0°C.

IR (KBr) : 3333m, 3064w, 3037w, 2935m, 2859w, 1726vs, 1691vs, 1536m, 1450w, 1265m, 1144w, 742m.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.77 (*d*, <sup>3</sup>J(12, 13) resp. <sup>3</sup>J(12', 13') = 7.5, 2H, HC(13); HC(13')); 7.61 (*d*, <sup>3</sup>J(10, 11) resp. <sup>3</sup>J(10', 11') = 7.4, 2H, HC(10); HC(10')); 7.43 - 7.30 (*m*, 4H, HC(11); HC(11'); HC(12); HC(12')); 7.37 (*s*, 5H, HC(14); HC(14'); HC(15); HC(15'); HC(16)); 5.14 (*s*, 2H, H<sub>2</sub>C(1<sup>2</sup>)); 4.96 (*sbr*, 1H, NH); 4.43 (*d*, <sup>3</sup>J(7, 8) = 6.8, 2H, H<sub>2</sub>C(7)); 4.23 (*t*, <sup>3</sup>J(7, 8) = 6.9, 1H, HC(8)); 3.23 - 3.17 (*dxt*, <sup>3</sup>J(4, 5) = 6.5, <sup>2</sup>J(5, NH) = ?, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 2.40 (*t*, <sup>3</sup>J(2, 3) = 7.2, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.73 - 1.65 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 1.58 - 1.52 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(4)).

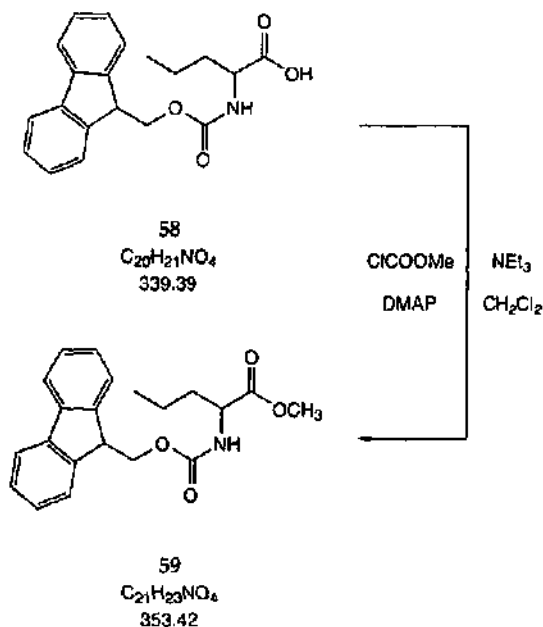
<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 173.1 (C(1)); 156.3 (C(6)); 143.9 (C(9); 9')); 141.2 (C(14); 14')); 135.9 (C(13)); 128.4 (C(1<sup>5</sup>; 1<sup>5'</sup>)); 128.1 (C(16)); 128.1 (C(14'; 14')); 127.5 (C(12; 12')); 126.9 (C(11; 11')); 124.9 (C(10; 10')); 119.8 (C(13; 13')); 66.3 (C(7)); 66.1 (C(1<sup>2</sup>)); 47.2 (C(8)); 40.4 (C(5)); 33.6 (C(2)); 29.2 (C(4)); 21.8 (C(3)).

MS (DCI, NH<sub>3</sub>) : 447 (9, [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 430 (12, [M + H]<sup>+</sup>), 322 (8), 251 (23), 234 (12), 208 (37), 178 (69), 166 (23), 100 (50), 91 (54), 36 (100).

C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub> (429.51) :	calc.	: C 75.50,	H 6.34,	N 3.26;
	obs.	: C 75.16,	H 6.29,	N 3.16.

## 8.2.5. Synthèse de dérivés de l'acide [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(2-amino) pentanoïque

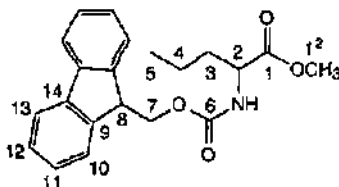
### 8.2.5.1. Synthèse du [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(2-amino) pentanoate de méthyle (59)



Dans un ballon de 50 ml sous atmosphère inerte d'azote sont dissous 680 mg (2.0 mmol, 1.0 éq.) de **58** dans 15 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La solution incolore est refroidie à l'aide d'un bain de glace, puis 475 µl (3.4 mmol, 1.7 éq.) de NEt<sub>3</sub> sont ajoutés. Le mélange réactionnel trouble est alors agité durant 20 min. à 0°C sous N<sub>2</sub>, puis 385 µl (5.0 mmol, 2.5 éq.) de ClCOOMe sont ajoutés en une portion. Après 20 min d'agitation à 0°C sous N<sub>2</sub>, addition de 48 mg (0.4 mmol, 0.2 éq.) de DMAP. L'avancement de la réaction est confirmée par CCM (hexane/AcOEt 1:1). Après 1 heure d'agitation à 0°C et 12 heures d'agitation à RT, le mélange réactionnel légèrement opaque est concentré à l'aide de l'évaporateur rotatif. Le résidu pâteux est alors dissout dans 100 ml d'AcOEt et cette phase organique jaune claire est lavée avec, successivement, 50 ml d'eau désionisée, d'une solution 2N d'HCl, d'eau désionisée, d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, d'eau désionisée et d'une solution saturée de NaCl. La phase organique récupérée est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, puis le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, le produit brut de réaction est isolé

sous la forme d'une masse compacte jaune. Purification par chromatographie-éclair sur gel de silice (hexane/AcOEt 5:1 - 2:1) et récupération de 430 mg (61 %) de **59** sous la forme d'un solide cristallin blanc.

Données analytiques de **59** :



$R_f$  : (hexane/AcOEt : 1:1) : 0.79 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 107.0 - 108.0°C.

IR (KBr) : 3313s, 3064m, 3021m, 1750vs, 1692vs, 1548s, 1478m, 1466m, 1448m, 1385w, 1350m, 1322w, 1234m, 1123w, 1082w, 1033w, 741m.

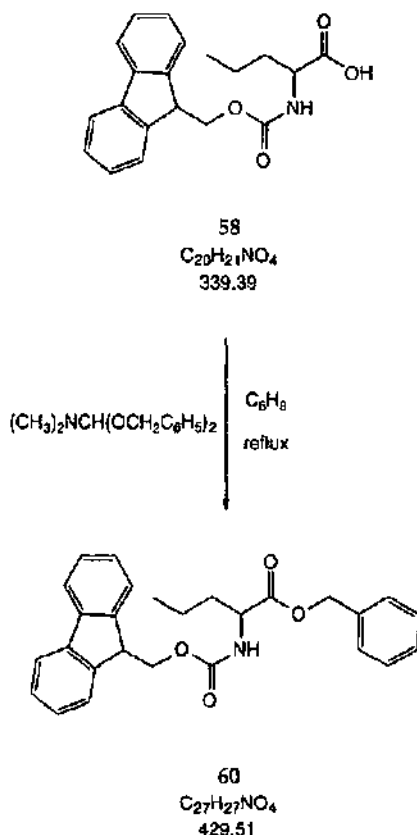
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.77 (*d*, <sup>3</sup>*J*(12, 13) resp. <sup>3</sup>*J*(12', 13') = 7.6, 2H, HC(13); HC(13')); 7.63 - 7.58 (*m*, 2H, HC(10); HC(10')); 7.41 (*t*, <sup>3</sup>*J*(11, 12) resp. <sup>3</sup>*J*(11', 12') = <sup>3</sup>*J*(12, 13) resp. <sup>3</sup>*J*(12', 13') = 7.5, 2H, HC(12); HC(12')); 7.32 (*t*, <sup>3</sup>*J*(10, 11) resp. <sup>3</sup>*J*(10', 11') = <sup>3</sup>*J*(11, 12) resp. <sup>3</sup>*J*(11', 12') = 7.5, 2H, HC(11); HC(11')); 5.35 (*d*, <sup>3</sup>*J*(2, NH) = 8.1, 1H, NH); 4.42 - 4.38 (*m*, 3H, HC(2); H<sub>2</sub>C(7)); 4.24 (*t*, <sup>3</sup>*J*(7, 8) = 7.0, 1H, HC(8)); 3.76 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 1.88 - 1.78 (*m*, 1H, H<sup>a</sup>C(3)); 1.71 - 1.62 (*m*, 1H, H<sup>b</sup>C(3)); 1.39 - 1.31 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 0.95 (*t*, <sup>3</sup>*J*(4, 5) = 7.3, 3H, H<sub>3</sub>C(5)).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 173.8 (C(1)); 156.5 (C(6)); 144.5 (*d*, *J* = 15.3, C(9; 9')); 142.0 (C(14; 14')); 128.3 (C(12; 12')); 127.7 (C(11; 11')); 125.7 (C(10; 10')); 120.6 (C(13; 13')); 67.6 (C(7)); 54.3 (C(2)); 52.9 (C(1<sup>2</sup>)); 47.8 (C(8)); 35.4 (C(3)); 19.2 (C(4)); 14.3 (C(5)).

MS (FAB) : 376 (20, [M + Na]<sup>+</sup>), 354 (21, [M + H]<sup>+</sup>), 191 (21), 179 (100), 165 (53), 132 (69), 116 (23), 89 (14), 72 (28).

C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub> (353.42) :	calc.	: C 71.37,	H 6.56,	N 3.96;
	obs.	: C 71.13,	H 6.81,	N 3.84.

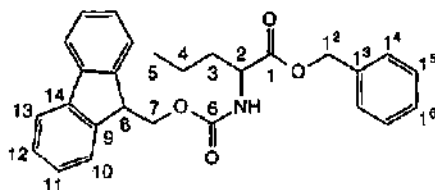
## 8.2.5.2. Synthèse du [(9H-fluorén-9-yl)méthylcarbamoyl]-(5-amino) pentanoate de benzyle (60)



Dans un ballon de 100 ml sous atmosphère inerte d'azote sont suspendus 340 mg (1.0 mmol, 1.0 éq.) de 58 dans 60 ml de C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>. Le mélange hétérogène est agité durant 10 min à RT, puis 0.39 ml (1.5 mmol, 1.5 éq.) de (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NCH(OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> sont ajoutés en une portion. Le mélange réactionnel est alors chauffé à reflux durant 3 heures. Cette opération se traduit par la dissolution du solide. L'avancement de la réaction est confirmée par CCM (hexane/AcOEt 1:1). Le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif et le résidu pâteux dissout dans 200 ml d'AcOEt. La phase organique jaune est alors lavée avec, successivement, 80 ml d'eau désionisée, d'une solution 2N d'HCl, d'eau désionisée, d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, d'eau désionisée et d'une solution saturée de NaCl, puis elle est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre. Le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif et, après séchage à la pompe à huile, le produit brut de réaction est isolé sous la forme d'une pâte jaune pâle. Cette dernière est

purifiée par chromatographie-éclair sur gel de silice (hexane/AcOEt 10:1 - 2:1), opération qui permet d'isoler 350 mg (81 %) de **60** sous la forme d'un solide cristallin de couleur blanche.

Données analytiques de **60** :



R<sub>f</sub> : (hexane/AcOEt : 2:1) : 0.78 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 104.0 - 106.0°C.

IR (KBr) : 3338s, 3038w, 2959w, 1732s, 1692vs, 1537s, 1470w, 1451w, 1323w, 1261w, 1195m, 1085w, 981w, 760w.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.79 (d, <sup>3</sup>J(12, 13) resp. <sup>3</sup>J(12', 13') = 7.5, 2H, HC(13); HC(13')); 7.63 (d, <sup>3</sup>J(10, 11) resp. <sup>3</sup>J(10', 11') = 7.3, 2H, HC(10); HC(10')); 7.44 - 7.31 (m, 4H, HC(11); HC(11')); HC(12); HC(12)); 7.37 (s, 5H, HC(14); HC(14'); HC(15); HC(15'); HC(16)); 5.42 (d, <sup>3</sup>J(2, NH) = 6.8, 1H, NH); 5.25 - 5.17 (système AB, <sup>2</sup>J(12a, 12b) = 20.5, 2H, H<sub>2</sub>C(12)); 4.51 - 4.42 (m, 3H, HC(2); H<sub>2</sub>C(7)); 4.25 (t, <sup>3</sup>J(7, 8) = 7.0, 1H, HC(8)); 1.92 - 1.82 (m, 1H, H<sup>α</sup>C(3)); 1.74 - 1.64 (m, 1H, H<sup>β</sup>C(3)); 1.46 - 1.31 (m, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 0.95 (t, <sup>3</sup>J(4, 5) = 7.3, 3H, H<sub>3</sub>C(5)).

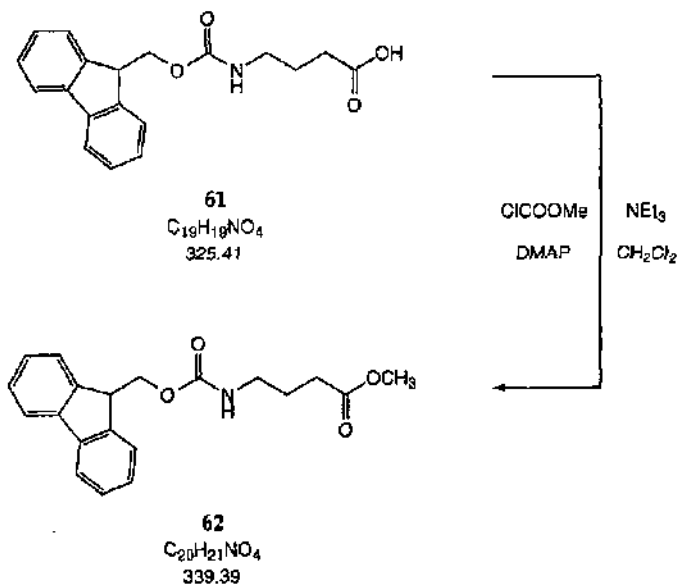
<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 172.5 (C(1)); 155.8 (C(6)); 143.7 (C(9); 9')); 141.2 (C(14); 14')); 135.3 (C(13)); 128.5 (C(15); 15')); 128.3 (C(16)); 128.1 (C(14'; 14')); 127.6 (C(12); 12')); 126.9 (C(11); 11')); 125.0 (C(10); 10')); 119.9 (C(13; 13')); 67.0 (C(12)); 66.9 (C(7)); 53.7 (C(2)); 47.1 (C(8)); 34.6 (C(3)); 18.4 (C(4)); 13.5 (C(5)).

MS (FAB) : 452 (20, [M + Na]<sup>+</sup>), 430 (21, [M + H]<sup>+</sup>), 269 (10), 208 (18), 191 (33), 179 (100), 165 (53), 154 (64), 136 (53), 107 (25), 91 (99), 77 (39).

<b>C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub></b> (429.51) :	calc.	: C 75.50,	H 6.34,	N 3.26;
	obs.	: C 74.71,	H 6.61,	N 3.26.

## 8.2.6. Synthèse de dérivés de l'acide [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(4-amino) butanoïque

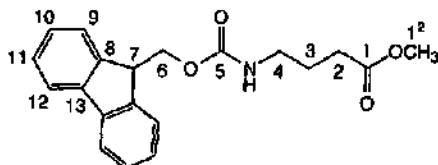
### 8.2.6.1. Synthèse du [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-(4-amino) butanoate de méthyle (62)



Dans un ballon de 50 ml sous atmosphère inerte d'azote sont suspendus 976 mg (3.0 mmol, 1.0 éq.) de **61** dans 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le mélange hétérogène est refroidi à l'aide d'un bain de glace, puis 0.84 ml (6.0 mmol, 2.0 éq.) de NEt<sub>3</sub> sont ajoutés. Le mélange réactionnel, devenu homogène, est agité durant 20 min. à 0°C sous N<sub>2</sub>, puis 0.46 ml (6.0 mmol, 2.0 éq.) de ClCOOMe sont ajoutés en une portion. Après 20 min d'agitation à 0°C sous N<sub>2</sub>, addition de 72 mg (0.6 mmol, 0.2 éq.) de DMAP. L'avancement de la réaction est confirmée par CCM (hexane/AcOEt 1:1). Après 2 heures d'agitation à 0°C et 10 heures d'agitation à RT, le mélange réactionnel homogène et jaune pâle est concentré à l'aide de l'évaporateur rotatif. Le résidu pâteux jaunâtre est alors dissout dans 100 ml d'AcOEt et cette phase organique jaune est lavée avec, successivement, 50 ml d'eau désionisée, d'une solution 2N d'HCl, d'eau désionisée, d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, d'eau désionisée et d'une solution saturée de NaCl. La phase organique récupérée est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, puis le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, le produit brut de réaction est isolé sous la forme d'un solide compact beige. Purification par chromatographie-éclair sur gel de

silice (hexane/AcOEt 5:1 - 1:1) et récupération de 620 mg (61 %) de 62 sous la forme d'un solide cristallin blanc.

Données analytiques de 62 :



$R_f$  : (hexane/AcOEt : 1:1) : 0.66 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 102.0 - 103.0°C.

IR (KBr) : 3335m, 3065w, 3019w, 2951w, 2885w, 1729s, 1688vs, 1544m, 1450m, 1324m, 1260m, 1172m, 1142m, 1023m, 759m, 741m.

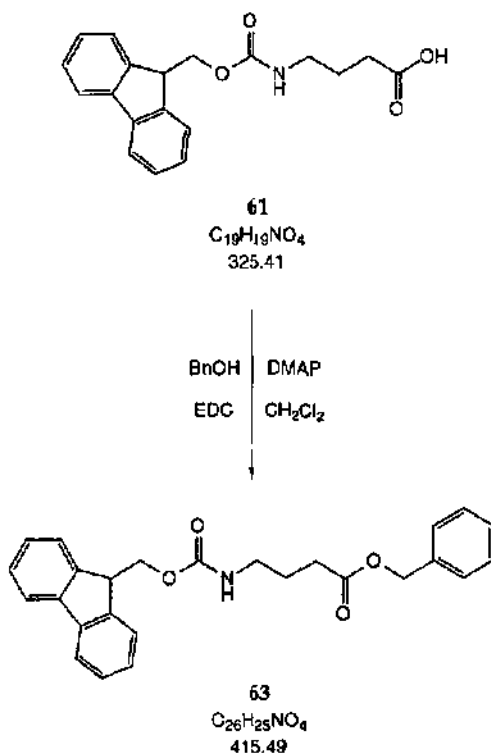
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.74 (d, <sup>3</sup>J(11, 12) resp. <sup>3</sup>J(11', 12') = 7.5, 2H, HC(12); HC(12')); 7.58 (d, <sup>3</sup>J(9, 10) resp. <sup>3</sup>J(9', 10') = 7.5, 2H, HC(9); HC(9')); 7.38 (t, <sup>3</sup>J(10, 11) resp. <sup>3</sup>J(10', 11') = <sup>3</sup>J(11, 12) resp. <sup>3</sup>J(11', 12') = 7.4, 2H, HC(11); HC(11')); 7.30 (t, <sup>3</sup>J(9, 10) resp. <sup>3</sup>J(9', 10') = <sup>3</sup>J(10, 11) resp. <sup>3</sup>J(10', 11') = 7.4, 2H, HC(10); HC(10')); 5.21 (sbr, 1H, NH); 4.40 (d, <sup>3</sup>J(6, 7) = 6.9, 2H, H<sub>2</sub>C(6)); 4.19 (t, <sup>3</sup>J(6, 7) = 6.8, 1H, HC(7)); 3.64 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 3.20 - 3.22 (dxt, <sup>3</sup>J(3, 4) = 6.5, <sup>3</sup>J(4, NH) = 6.4, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 2.34 (t, <sup>3</sup>J(2, 3) = 7.2, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.87 - 1.79 (ttxxt, <sup>3</sup>J(2, 3) = 7.0, 2H, H<sub>2</sub>C(3)).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 173.5 (C(1)); 156.3 (C(5)); 143.8 (C(8; 8')); 141.1 (C(13; 13')); 127.4 (C(11; 11')); 126.8 (C(10; 10')); 124.8 (C(9; 9')); 119.7 (C(12; 12')); 66.3 (C(6)); 51.4 (C(1<sup>2</sup>)); 47.0 (C(7)); 40.1 (C(4)); 31.0 (C(2)); 24.9 (C(3)).

MS (DCI, NH<sub>3</sub>) : 357 (5, [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 340 (65, [M + H]<sup>+</sup>), 214 (19), 179 (48), 165 (8), 103 (20), 86 (100), 50 (23).

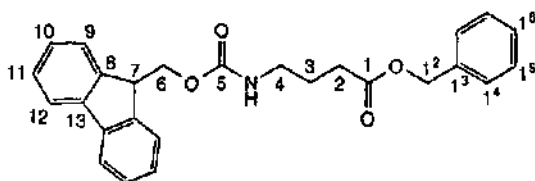
C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> (339.39) :  
 calc. : C 70.78, H 6.24, N 4.13;  
 obs. : C 70.48, H 6.31, N 3.88.

## 8.2.6.2. Synthèse du [(9H-fluorén-9-yl)méthoxycarbonyl]-(4-amino) butanoate de benzyle (63)



Dans un ballon de 50 ml sous atmosphère inerte d'azote sont suspendus 325 mg (1.0 mmol, 1.0 éq.) de **61** dans 10 ml de  $CH_2Cl_2$ . Le mélange hétérogène est agité durant 10 min. à RT sous  $N_2$ , puis, successivement, 125  $\mu$ l (1.2 mmol, 1.2 éq.) de BnOH, 288 mg (1.5 mmol, 1.5 éq.) d'EDC et 12 mg (0.1 mmol, 0.1 éq.) de DMAP sont ajoutés en petites portions. La suspension initiale se dissout progressivement dans le mélange réactionnel. L'avancement de la réaction est confirmée par CCM (hexane/AcOEt 1:1). Après 6 heures d'agitation à RT, le mélange réactionnel homogène et jaune pâle est concentré à l'aide de l'évaporateur rotatif. Le résidu pâteux jaunâtre est alors dissout dans 100 ml d'AcOEt et cette phase organique jaune est lavée avec, successivement, 50 ml d'eau désionisée, d'une solution 2N d'HCl, d'eau désionisée, d'une solution saturée de  $NaHCO_3$ , d'eau désionisée et d'une solution saturée de NaCl. La phase organique récupérée est séchée sur  $MgSO_4$  anhydre, puis le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, isolement d'une pâte blanche. Purification par chromatographie-éclair sur gel de silice (hexane/AcOEt 5:1 - 1:1) et récupération de 140 mg (34 %) de **63** sous la forme d'un solide compact de couleur blanche.

Données analytiques de 63 :



$R_f$  : (hexane/AcOEt : 1:1) : 0.79 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 147.0 - 148.0°C.

IR (KBr) : 3339m, 3067w, 3027w, 1725vs, 1696vs, 1548m, 1446m, 1319m, 1297w, 1267m, 1178m, 1168m, 1138m, 1026m, 765m, 747w.

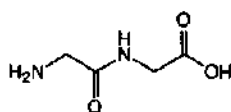
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.76 (*d*, <sup>3</sup>*J*(11, 12) resp. <sup>3</sup>*J*(11', 12') = 7.5, 2H, HC(12); HC(12')); 7.58 (*d*, <sup>3</sup>*J*(9, 10) resp. <sup>3</sup>*J*(9', 10') = 7.5, 2H, HC(9); HC(9')); 7.41 - 7.26 (*m*, 4H, HC(10); HC(10')); HC(11); HC(11')); 7.35 (*s*, 5H, HC(14'); HC(14')); HC(15); HC(15'); HC(16)); 5.12 (*s*, 2H, H<sub>2</sub>C(12)); 4.89 (*sbr*, 1H, NH); 4.40 (*d*, <sup>3</sup>*J*(6, 7) = 6.8, 2H, H<sub>2</sub>C(6)); 4.20 (*t*, <sup>3</sup>*J*(6, 7) = 6.7, 1H, HC(7)); 3.24 (*dxl*, <sup>3</sup>*J*(3, 4) = 6.5, <sup>3</sup>*J*(4, NH) = 6.4, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 2.41 (*t*, <sup>3</sup>*J*(2, 3) = 7.1, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.90 - 1.83 (*ovxt*, <sup>3</sup>*J*(2, 3) = 6.9, 2H, H<sub>2</sub>C(3)).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 173.0 (C(1)); 156.4 (C(5)); 143.9 (C(8; 8')); 141.3 (C(13; 13')); 135.8 (C(13)); 128.6 (C(15; 15')); 128.3 (C(16)); 128.2 (C(14; 14')); 127.6 (C(11; 11')); 127.0 (C(10; 10')); 125.0 (C(9; 9')); 119.9 (C(12; 12')); 66.5 (C(6)); 66.4 (C(12)); 47.2 (C(7)); 40.3 (C(4)); 31.4 (C(2)); 25.1 (C(3)).

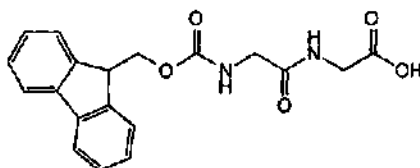
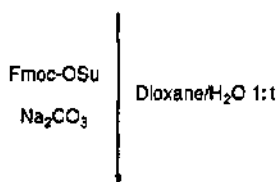
MS (DCI, NH<sub>3</sub>) : 416 (3, [M + H]<sup>+</sup>), 308 (3), 237 (9), 214 (20), 178 (72), 165 (22), 108 (14), 91 (26), 86 (100), 43 (22).

C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub> (415.49) :	calc.	: C 75.16,	H 6.06,	N 3.37;
	obs.	: C 74.80,	H 6.11,	N 3.44.

### 8.2.7. Synthèse de l'acide [(9H-fluorèn-9-yl)méthoxycarbonyl]-amino-acétylamino-acétique (65)



64  
C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
132.12

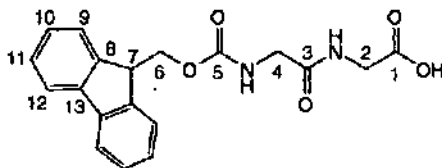


65  
C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
354.36

Dans un ballon de 250 ml sous atmosphère inerte d'azote sont dissous 2.64 g (20 mmol, 1.0 éq.) de 64 dans 60 ml d'eau bidistillée. 6.34 g (60 mmol, 3.0 éq.) de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sont alors ajoutés en une portion à la solution jaune et le mélange moussant est refroidi à l'aide d'un bain de glace. 10.13 g (30 mmol, 1.5 éq.) de Fmoc-OSu, partiellement dissous dans 60 ml de dioxane, sont ajoutés en portions successives. Cette opération se traduit par la formation d'une suspension blanche. Le mélange hétérogène est alors agité durant 1 heure à 0°C, puis durant 6 heures à RT sous N<sub>2</sub>. L'avancement de la réaction est confirmée par CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 70:30:5). Le mélange réactionnel brut est ensuite versé, sous forte agitation magnétique, dans 300 ml d'H<sub>2</sub>O, puis cette phase aqueuse jaune refroidie est acidifiée à pH=2 (contrôle au papier pH) à l'aide d'HCl conc. et le tout est placé durant 12 heures au réfrigérateur. Après ce laps de temps, le précipité blanc laiteux est filtré sur Büchner puis dissout dans 200 ml d'AcOEt. Le filtrat est extrait avec quatre portions successives d'AcOEt, puis les phases organiques réunies sont lavées avec 3x200 ml d'eau désionisée. Séchage sur MgSO<sub>4</sub> anhydre puis concentration à l'aide de l'évaporateur rotatif permettent la récupération d'un solide blanc compact.

Après dilution de ce dernier dans un peu de MeOH, suivie de l'adjonction de quelques gouttes d'AcOEt pour troubler la solution, le produit brut de réaction cristallise sous la forme d'étoiles blanches. L'opération est répétée trois fois dans un mélange 9:1 MeOH/AcOEt et permet d'isoler 6.32 g (89 %) de 65 sous forme cristalline et de couleur blanche.

Données analytiques de 65 :



$R_f$  : (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O : 70:30:5) : 0.38 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 173.0 - 174.0°C.

IR (KBr) : 3332m, 3065w, 2945m, 1733m, 1697vs, 1669vs, 1658s, 1543s, 1449m, 1428m, 1278m, 1230m, 1164w, 1049w, 998w, 752w.

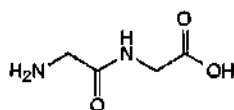
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : 8.14 (*t*, <sup>3</sup>*J*(2, NH) = 5.7, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(2)); 7.88 (*d*, <sup>3</sup>*J*(11, 12) resp. <sup>3</sup>*J*(11', 12') = 7.5, 2H, HC(12); HC(12')); 7.72 (*d*, <sup>3</sup>*J*(9, 10) resp. <sup>3</sup>*J*(9', 10') = 7.4, 2H, HC(9); HC(9')); 7.58 (*t*, <sup>3</sup>*J*(4, NH) = 6.1, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(4)); 7.41 (*t*, <sup>3</sup>*J*(10, 11) resp. <sup>3</sup>*J*(10', 11') = <sup>3</sup>*J*(11, 12) resp. <sup>3</sup>*J*(11', 12') = 7.2, 2H, HC(11); HC(11')); 7.33 (*t*, <sup>3</sup>*J*(9, 10) resp. <sup>3</sup>*J*(9', 10') = <sup>3</sup>*J*(10, 11) resp. <sup>3</sup>*J*(10', 11') = 7.1, 2H, HC(10); HC(10')); 4.30 (*d*, <sup>3</sup>*J*(6, 7) = 6.8, 2H, H<sub>2</sub>C(6)); 4.23 (*t*, <sup>3</sup>*J*(6, 7) = 6.8, 1H, HC(7)); 3.79 (*d*, <sup>3</sup>*J*(2, NH) = 5.8, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 3.68 (*d*, <sup>3</sup>*J*(4, NH) = 6.1, 2H, H<sub>2</sub>C(4)).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : 171.3 (C(1)); 169.6 (C(3)); 156.6 (C(5)); 144.0 (C(8; 8')); 140.8 (C(13; 13')); 127.8 (C(11; 11')); 127.2 (C(10; 10')); 125.4 (C(9; 9')); 120.2 (C(12; 12')); 65.9 (C(6)); 46.8 (C(7)); 43.4 (C(4)); 40.7 (C(2)).

MS (DCI, NH<sub>3</sub>) : 355 (12, [M + H]<sup>+</sup>), 214 (9), 196 (13), 178 (100), 165 (25), 152 (8), 133 (7).

C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (354.36) :	calc.	: C 64.40,	H 5.12,	N 7.91;
	obs.	: C 64.43,	H 5.17,	N 7.61.

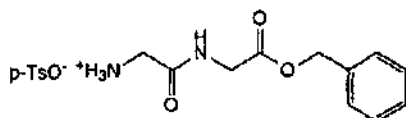
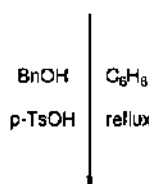
### 8.2.8. Synthèse du *p*-toluènesulfonate de [(benzyloxy)carbonyl]méthyl-carbamoyl d'ammonium (66)



64

 $C_8H_{16}N_2O_3$ 

132.12



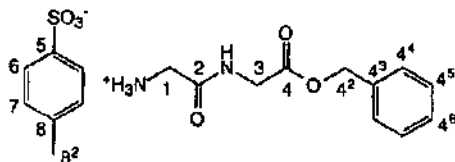
66

 $C_{16}H_{22}N_2O_6S$ 

394.44

Dans un ballon de 100 ml sous atmosphère inerte d'azote sont suspendus 0.66 g (5 mmol, 1 éq.) de 64 dans 40 ml de  $C_6H_6$ . Le mélange hétérogène est agité durant 10 min à RT, puis, successivement, 10 ml (95 mmol, 19 éq.) de BnOH et 0.95 g (5 mmol, 1 éq.) d'acide *p*-toluènesulfonique (*p*-TsOH) sont ajoutés en une portion. Le mélange réactionnel est alors chauffé à reflux durant 60 heures. L'eau formée durant la réaction est piégée par distillation azéotropique et le solide en suspension s'est totalement dissout. L'avancement de la réaction est confirmée par CCM ( $CH_2Cl_2/CH_3OH/H_2O$  70:30:5). Le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif et, après séchage à la pompe à huile, le résidu huileux jaune est suspendu dans 50 ml d'éther. Cette opération se traduit par la précipitation en aiguilles d'un solide cristallin blanc. Après trois précipitations successives, 1.89 g (96 %) de 66 sont isolés sous la forme d'aiguilles blanches.

Données analytiques de 66 :



**R<sub>f</sub>** : (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O : 70:30:5) : 0.72 (coloration jaunâtre par traitement avec la ninhydrine).

**F** : 155.0 - 157.0°C.

**IR** (KBr) : 3292m, 3162m, 3063m, 2972m, 1765s, 1698s, 1573m, 1518m, 1498m, 1391m, 1280m, 1218vs, 1199vs, 1166vs, 1125s, 1037m, 1010m, 969m, 810m, 732m.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : 8.81 (*t*, <sup>3</sup>*J*(3, NH) = 5.9, 1H, NH); 8.00 (*sbr*, 1H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 7.48 (*d*, <sup>3</sup>*J*(6, 7) resp. <sup>3</sup>*J*(6', 7') = 8.0, 2H, HC(6); HC(6')); 7.38 (*s*, 5H, HC(4<sup>4</sup>); HC(4<sup>5</sup>); HC(4<sup>5</sup>); HC(4<sup>6</sup>)); 7.12 (*d*, <sup>3</sup>*J*(6, 7) resp. <sup>3</sup>*J*(6', 7') = 7.9, 2H, HC(7); HC(7')); 5.15 (*s*, 2H, H<sub>2</sub>C(4<sup>2</sup>)); 4.03 (*d*, <sup>3</sup>*J*(3, NH) = 5.9, 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 3.63 (*s*, 2H, H<sub>2</sub>C(1)); 2.29 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(8<sup>2</sup>)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : 169.5 (C(4)); 166.8 (C(2)); 145.7 (C(5)); 137.8 (C(4<sup>3</sup>)); 135.9 (C(8)); 128.6 (C(4<sup>5</sup>; 4<sup>5</sup>)); 128.3 (C(4<sup>6</sup>)); 128.2 (C(4<sup>4</sup>; 4<sup>4</sup>)); 128.1 (C(7; 7')); 125.6 (C(6; 6')); 66.1 (C(4<sup>2</sup>)); 40.8 (C(3)); 40.2 (C(1)); 20.9 (C(8<sup>2</sup>)).

**MS** (DCI, NH<sub>3</sub>) : 240 (10, [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 223 (100, [M + H]<sup>+</sup>), 205 (6), 190 (5), 166 (8), 131 (7), 108 (10), 91 (27).

<b>C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S</b> (394.44) :	calc.	: C 54.81,	H 5.62,	N 7.10;
	obs.	: C 54.76,	H 5.58,	N 6.98.

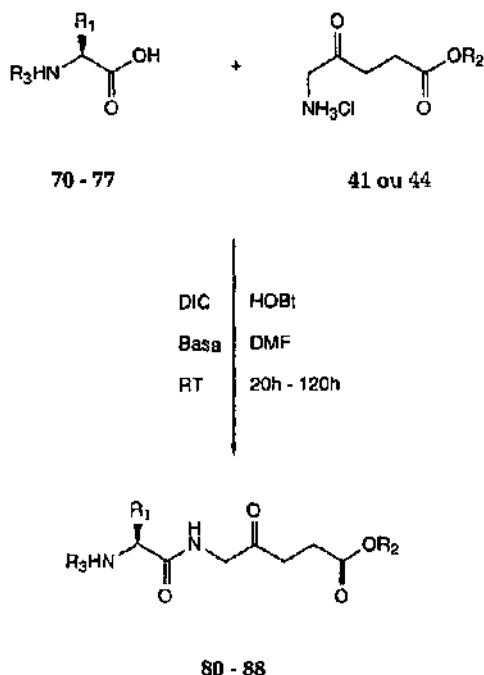
### 8.3. Synthèses de dérivés peptidiques

#### 8.3.1. Synthèses de dipeptides contenant l'acide 5-aminotévlulinique

Les conditions expérimentales appliquées dans le Mode opératoire - Type II ont été déduites d'une étude de réactivité résumée dans le Tableau No.3 (voir point 5.2.2.).

**Remarque :** La substitution de NMM par NEt<sub>3</sub> en tant que base s'explique uniquement par un problème de livraison chez le fournisseur.

##### 8.3.1.1. Mode opératoire - Type II



Composé	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Base	Durée	PM [g/mol]
80	Me	Me	Fmoc	NMM	50 h	438.48
81	Bn	Me	Fmoc	NMM	50 h	514.58
82	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHBoc	Me	Fmoc	NMM	50 h	595.69
83	CH <sub>2</sub> COO <sup>t</sup> Bu	Me	Fmoc	NMM	50 h	538.60
84	CH <sub>2</sub> COO <sup>t</sup> Bu	Bn	Fmoc	NMM	100 h	614.69
85	Me	Me	Boc	NEt <sub>3</sub>	120 h	316.35
86	Bn	Me	Boc	NEt <sub>3</sub>	40 h	392.45
87	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHBoc	Me	Boc	NEt <sub>3</sub>	30 h	473.56
88	CH <sub>2</sub> COO <sup>t</sup> Bu	Me	Boc	NEt <sub>3</sub>	20 h	416.47

Dans un ballon de 25 ml préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, sont déposés 2.0 équivalents de l'acide aminé *N*-protégé 70 - 77. Le solide est séché sous vide, puis dissout dans 10 ml de OMF distillé sous atmosphère inerte d'azote. Après 10 minutes d'agitation à RT, 1.1 équivalents d'HOBt (1-hydroxybenzotriazole) et 1.1 équivalents de DIC (*N,N*-diisopropylcarbodiimide) sont successivement ajoutés en une portion à la solution. Le mélange réactionnel, qui se trouble progressivement, est alors agité à RT durant 45 à 50 minutes. Parallèlement, 1.0 équivalent de 41 (44) est placé dans un ballon de 10 ml préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, où il est tout d'abord séché sous vide, puis dissout dans 5 ml de DMF distillé.

Après ce délai, le mélange hétérogène préactivé<sup>1</sup> est ajouté, en plusieurs portions, à la solution de 41 (44) dans le DMF. La solution trouble résultante est alors agitée à RT durant 10 minutes, puis 1.0 équivalent de base est ajouté en une portion. Cette action se traduit par la coloration en jaune-orange du mélange réactionnel, qui est ensuite agité à RT pour une durée de 20 heures à 120 heures selon l'acide aminé *N*-protégé 70 - 77 engagé.

Le contrôle de l'avancement de la réaction se fait par CCM (AcOEt). Une fois la totalité du réactif 41 (44) disparu sur CCM, le solvant est éliminé à l'aide du four à boules et le résidu pâteux dissout dans 200 ml d'un mélange 1:1 H<sub>2</sub>O/AcOEt. Phase organique et phase aqueuse sont séparées et cette dernière est extraite avec trois portions successives de 50 ml d'AcOEt.

<sup>1</sup>Les conditions réactionnelles, ainsi que la stoechiométrie considérée sont en fait adaptées de la synthèse sur phase solide à la synthèse en solution

Les phases organiques réunies sont alors lavées avec, successivement, 100 ml d'eau désionisée, d'une solution 1N d'acide citrique, d'eau désionisée, d'une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , d'eau désionisée et d'une solution saturée de  $\text{NaCl}$ . La phase organique lavée et neutralisée est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, puis le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, le produit brut de réaction est isolé sous la forme d'un solide amorphe de couleur jaune-orange.

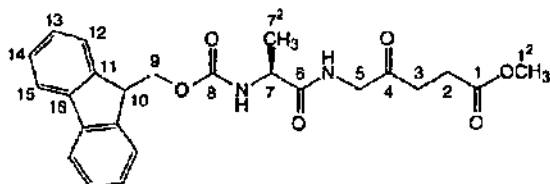
Une ou deux étapes de purification par chromatographie-éclair sur gel de silice (mélanges hexane/AcOEt de polarité croissante) sont, selon le cas, nécessaires pour la récupération du dérivé peptidique **80** - **88** correspondant sous sa forme cristalline.

### 8.3.1.2. Synthèse de Fmoc-[Ala-(ALA)]-OMe (**80**)

La synthèse de **80** est effectuée selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 1868 mg (2.0 éq.) de **70**, de 446 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 511  $\mu\text{l}$  (1.1 éq.) de DIC dans 10 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 545 mg (3 mmol, 1.0 éq.) de **41** dans 5 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 330  $\mu\text{l}$  (1.0 éq.) de NMM en une portion. Agitation à RT sous  $\text{N}_2$  durant 50 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après deux étapes de purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 3:1 - 1:10), récupération d'un solide blanc compact.

Rendement : 855 mg (52 %).

Données analytiques de **80** :



$R_f$  : (AcOEt) : 0.49 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 148.0 - 149.0°C.

$[\alpha]_D^{23}$  : - 7.1° ( $\lambda$  = 589 nm, c = 0.022,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); - 30.7° ( $\lambda$  = 365 nm, c = 0.022,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

RP-HPLC (10 - 90 % ACN en 30 min.; C<sub>8</sub>) :  $t_R$  = 22.2 min., pureté > 91 %.

IR (KBr) : 3301s, 3065m, 2975m, 1738s, 1723m, 1683m, 1645vs, 1537s, 1451m, 1356m, 1260m, 1222m, 1176m, 1113m, 1046m, 742m.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.75 (d, <sup>3</sup>J(14, 15) resp. <sup>3</sup>J(14', 15') = 7.5, 2H, HC(15); HC(15')); 7.58 (d, <sup>3</sup>J(12, 13) resp. <sup>3</sup>J(12', 13') = 6.9, 2H, HC(12); HC(12')); 7.39 (t, <sup>3</sup>J(13, 14) resp. <sup>3</sup>J(13', 14') = <sup>3</sup>J(14, 15) resp. <sup>3</sup>J(14', 15') = 7.3, 2H, HC(14); HC(14')); 7.30 (t, <sup>3</sup>J(12, 13) resp. <sup>3</sup>J(12', 13') ≈ <sup>3</sup>J(13, 14) resp. <sup>3</sup>J(13', 14') = 7.4, 2H, HC(13); HC(13')); 6.74 (sbr, 1H, NH-HC(7)); 5.41 (sbr, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(5)); 4.41 (d, <sup>2</sup>J(9, 10) = 6.2, 2H, H<sub>2</sub>C(9)); 4.31 (t, <sup>2</sup>J(7, 7<sup>2</sup>) ≈ 6.8, 1H, HC(7)); 4.23 - 4.19 (m, 3H, H<sub>2</sub>C(5); HC(10)); 3.66 (s, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 2.74 - 2.71 (m, AA' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.66 - 2.62 (m, BB' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.40 (d, <sup>3</sup>J(7, 7<sup>2</sup>) = 6.6, 3H, H<sub>3</sub>C(7<sup>2</sup>)).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 203.4 (C(4)); 172.8 (C(1)); 172.3 (C(6)); 155.9 (C(8)); 143.8 - 143.7 (2xs, C(11; 11'))<sup>1</sup>; 141.3 - 141.2 (2xs, C(16; 16'))<sup>1</sup>; 127.7 (C(14; 14')); 127.0 (C(13; 13')); 125.0 (C(12; 12')); 119.9 (C(15; 15')); 67.0 (C(9)); 51.9 (C(1<sup>2</sup>)); 50.4 (C(7)); 49.1 (C(5)); 47.1 (C(10)); 34.5 (C(3)); 27.5 (C(2)); 18.7 (C(7<sup>2</sup>)).

MS (DCI, NH<sub>3</sub>) : 439 (8, [M + H]<sup>+</sup>), 217 (10), 199 (6), 180 (7), 179 (36), 178 (100), 165 (8), 45 (16).

C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> (438.48) :	calc.	: C 65.74,	H 5.98,	N 6.39;
	obs. <sup>2</sup>	: C 65.43,	H 5.95,	N 6.27.

### 8.3.1.3. Synthèse de Fmoc-[Phe-(ALA)]-OMe (81)

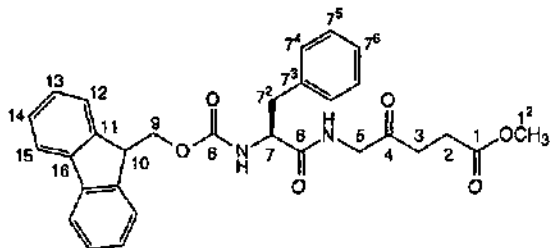
La synthèse de 81 s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 2324 mg (2.0 éq.) de 71, de 446 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 511 µl (1.1 éq.) de DIC dans 10 ml de DMF durant 50 minutes. Parallèlement, dissolution de 545 mg (3 mmol, 1.0 éq.) de 41 dans 5 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 330 µl (1.0 éq.) de NMM en une portion. Agitation à RT sous N<sub>2</sub> durant 50 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après une étape de purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 3:1 - 1:8), récupération d'un solide blanc compact.

<sup>1</sup>Le dédoublement du signal <sup>13</sup>C-RMN pour les atomes de carbone quaternaires s'explique par la proximité du centre chiral en C(10). Ce phénomène est rencontré dans la plupart des dérivés comportant le groupe Fmoc.

<sup>2</sup>Les analyses CHN des différents dérivés peptidiques sont généralement faussées par la présence de traces importantes d'eau difficiles à éliminer lors du séchage à l'aide de la pompe à huile

**Rendement** : 1308 mg (85 %).

**Données analytiques de 81** :



$R_f$  : (AcOEt) : 0.54 (UV<sub>254</sub>-visible).

$F$  : 136.0 - 138.0°C.

$[\alpha]_D^{25}$  : - 6.6° ( $\lambda$  = 589 nm,  $c$  = 0.026, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); - 29.9° ( $\lambda$  = 365 nm,  $c$  = 0.026, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**RP-HPLC** (10 - 90 % ACN en 30 min.; C<sub>18</sub>) :  $t_R$  = 25.5 min., pureté > 96 %.

**IR** (KBr) : 3322s, 3062w, 3039w, 2970w, 2934w, 2906w, 1725vs, 1692vs, 1653vs, 1619m, 1537s, 1464m, 1451m, 1266m, 1220m, 1169m, 1037m, 737m.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.74 (*d*,  $^3J(14, 15)$  resp.  $^3J(14', 15')$  = 7.5, 2H, HC(15); HC(15')); 7.50 (*t*,  $^3J(12, 13)$  resp.  $^3J(12', 13')$  = 8.1, 2H, HC(12); HC(12')); 7.38 (*t*,  $^3J(13, 14)$  resp.  $^3J(13', 14')$  ≈  $^3J(14, 15)$  resp.  $^3J(14', 15')$  = 7.5, 2H, HC(14); HC(14')); 7.28 (*t*,  $^3J(12, 13)$  resp.  $^3J(12', 13')$  ≈  $^3J(13, 14)$  resp.  $^3J(13', 14')$  = 7.3, 2H, HC(13); HC(13')); 7.25 - 7.17 (*m*, 5H, HC(7<sup>d</sup>); HC(7<sup>d'</sup>); HC(7<sup>e</sup>); HC(7<sup>e'</sup>); HC(7<sup>f</sup>)); 6.81 (*sbr*, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(5)); 5.60 (*sbr*, 1H, NH-HC(7)); 4.55 - 4.53 (*q*,  $^3J(7, \text{NH})$  ≈ 5.8, 1H, HC(7)); 4.38 (*t*,  $^2J(9^a, 9^b)$  ≈ 9.8,  $^3J(9, 10)$  ≈ 7.4, 2H, H<sub>2</sub>C(9)); 4.28 (*t*,  $^2J(5^a, 5^b)$  ≈ 9.9,  $^3J(5, \text{NH})$  ≈ 6.4, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 4.17 - 4.12 (*m*, 1H, HC(10)); 3.63 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 3.09 (*q*,  $^2J(7^{2a}, 7^{2b})$  ≈ 9.8,  $^3J(7, 7^2)$  ≈ 6.2, 2H, H<sub>2</sub>C(7<sup>2</sup>)); 2.66 - 2.63 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.61 - 2.57 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(2)).

**Signaux supplémentaires caractéristiques du solvant AcOEt** (raisons de la mauvaise qualité de l'analyse élémentaire ci-dessous) : 4.12 (*q*,  $^3J(3, 4)$  = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2.05 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 1.26 (*t*,  $^3J(3, 4)$  = 7.0, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 203.3 (C(4)); 172.7 (C(1)); 171.1 (C(6)); 155.9 (C(8)); 143.7 - 143.6 (2xs, C(11; 11')); 141.2 (C(16; 16')); 136.3 (C(7<sup>3</sup>)); 129.2 (C(7<sup>5</sup>; 7<sup>5'</sup>)); 128.6 (C(7<sup>4</sup>; 7<sup>4'</sup>)); 127.6 (C(14; 14')); 127.0 (C(7<sup>6</sup>)); 127.0 (C(13; 13')); 125.0 (C(12; 12')); 119.9 (C(15; 15')); 67.0 (C(9)); 55.9 (C(7)); 51.8 (C(1<sup>2</sup>)); 49.0 (C(5)); 47.0 (C(10)); 38.4 (C(7<sup>2</sup>)); 34.3 (C(3)); 27.4 (C(2)).

MS (DCI,  $\text{NH}_3$ ) : 515 (7,  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ), 180 (7), 179 (50), 178 (100), 176 (9), 165 (6), 152 (5), 63 (4), 45 (11), 40 (5).

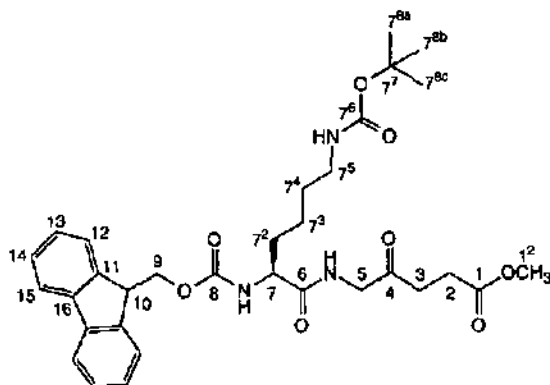
$\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$ (514.58) :	calc.	: C 70.02,	H 5.88,	N 5.44;
	obs.	: C 68.66,	H 6.16,	N 5.70.

#### 8.3.1.4. Synthèse de Fmoc-[Lys(Boc)-(ALA)]-OMe (82)

La synthèse de **82** est effectuée selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 2811 mg (2.0 éq.) de **72**, de 446 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 511  $\mu\text{l}$  (1.1 éq.) de DIC dans 10 ml de DMF durant 50 minutes. Parallèlement, dissolution de 545 mg (3 mmol, 1.0 éq.) de **41** dans 5 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 330  $\mu\text{l}$  (1.0 éq.) de NMM en une portion. Agitation à RT sous  $\text{N}_2$  durant 50 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après une étape de purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 3:1 - 1:9), récupération d'un solide blanc compact.

Rendement : 1552 mg (87 %).

Données analytiques de **82** :



$R_f$  : (AcOEt) : 0.44 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 97.0 - 98.0°C.

$[\alpha]_D^{25}$  : - 6.8° ( $\lambda = 589$  nm,  $c = 0.030$ , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); - 27.8° ( $\lambda = 365$  nm,  $c = 0.030$ , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

RP-HPLC (10 - 90 % ACN en 30 min.; C<sub>8</sub>) :  $t_R = 25.5$  min., pureté > 91 %.

IR (KBr) : 3329s, 3065w, 2936m, 2864w, 1726vs, 1687vs, 1646vs, 1530vs, 1450m, 1393m, 1366m, 1251s, 1209m, 1171s, 1088m, 758m, 740m.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.74 (*d*, <sup>3</sup>J(14, 15) resp. <sup>3</sup>J(14', 15') = 7.5, 2H, HC(15); HC(15')); 7.58 (*d*, <sup>3</sup>J(12, 13) resp. <sup>3</sup>J(12', 13') = 6.9, 2H, HC(12); HC(12')); 7.38 (*t*, <sup>3</sup>J(13, 14) resp. <sup>3</sup>J(13', 14') ≈ <sup>3</sup>J(14, 15) resp. <sup>3</sup>J(14', 15') = 7.4, 2H, HC(14); HC(14')); 7.29 (*t*, <sup>3</sup>J(12, 13) resp. <sup>3</sup>J(12', 13') ≈ <sup>3</sup>J(13, 14) resp. <sup>3</sup>J(13', 14') = 7.4, 2H, HC(13); HC(13')); 6.84 (*sbr*, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(5)); 5.61 (*sbr*, 1H, NH-HC(7)); 4.67 (*sbr*, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(7<sup>s</sup>)); 4.38 (*sbr*, 2H, H<sub>2</sub>C(9)); 4.22 - 4.16 (*m*, 4H, H<sub>2</sub>C(5); HC(7); HC(10)); 3.64 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 3.09 (*sbr*, 2H, H<sub>2</sub>C(7<sup>s</sup>)); 2.73 - 2.70 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.65 - 2.61 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.88 - 1.85 (*m*, 1H, HC(7<sup>2a</sup>)); 1.68 - 1.66 (*m*, 1H, HC(7<sup>2b</sup>)); 1.42 (*s*, 9H, H<sub>3</sub>C(7<sup>8a</sup>); H<sub>3</sub>C(7<sup>8b</sup>); H<sub>3</sub>C(7<sup>8c</sup>)); 1.47 - 1.36 (*m*, 4H, H<sub>2</sub>C(7<sup>3</sup>); H<sub>2</sub>C(7<sup>4</sup>)).

Signaux supplémentaires caractéristiques du solvant AcOEt : 4.12 (*q*, <sup>3</sup>J(3, 4) = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2.05 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 1.26 (*t*, <sup>3</sup>J(3, 4) = 7.0, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 203.5 (C(4)); 172.8 (C(1)); 171.9 (C(6)); 156.2 (C(7<sup>6</sup>) ou C(8)); 156.2 (C(8) ou C(7<sup>6</sup>)); 143.8 - 143.7 (2xs, C(11); 11')); 141.2 (C(16; 16')); 127.7 (C(14; 14')); 127.1 (C(13; 13')); 125.1 (C(12; 12')); 119.9 (C(15; 15')); 79.1 (C(7<sup>7</sup>)); 67.0 (C(9)); 54.7 (C(7)); 51.2 (C(1<sup>2</sup>)); 49.0 (C(5)); 47.1 (C(10)); 39.8 (C(7<sup>5</sup>)); 34.5 (C(3)); 32.0 (C(7<sup>2</sup>)); 29.6 (C(7<sup>4</sup>)); 28.4 (C(7<sup>8a</sup>); C(7<sup>8b</sup>); C(7<sup>8c</sup>)); 27.5 (C(2)); 22.4 (C(7<sup>3</sup>)).

MS (EI, 70 eV) : 596 (1, [M + H]<sup>+</sup>), 533 (2), 356 (4), 318 (3), 300 (3), 256 (3), 255 (6), 197 (4), 196 (21), 181 (4), 179 (42), 178 (100), 177 (14), 176 (22), 166 (10), 165 (18), 163 (3), 152 (16), 151 (7), 150 (7), 139 (4).

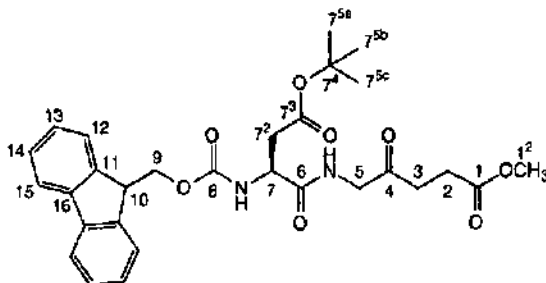
C <sub>32</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> (595.69) :	calc.	: C 64.52,	H 6.94,	N 7.05;
	obs.	: C 64.00,	H 7.08,	N 6.83.

8.3.1.5. Synthèse de Fmoc-[Asp(O<sup>t</sup>Bu)-(ALA)]-OMe (83)

La synthèse de **83** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 2469 mg (2.0 éq.) de **73**, de 446 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 511  $\mu$ l (1.1 éq.) de DIC dans 10 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 545 mg (3 mmol, 1.0 éq.) de **4f** dans 5 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 330  $\mu$ l (1.0 éq.) de NMM en une portion. Agitation à RT sous N<sub>2</sub> durant 50 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après une étape de purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 5:1 - 1:4), récupération d'un solide blanc compact.

Rendement : 1473 mg (91 %).

Données analytiques de **83** :



R<sub>f</sub> : (AcOEt) : 0.58 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 65.0 - 67.0°C.

$[\alpha]_D^{25}$  : 10.9° ( $\lambda$  = 589 nm,  $c$  = 0.026, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); 28.1° ( $\lambda$  = 365 nm,  $c$  = 0.026, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

RP-HPLC (10 - 90 % ACN en 30 min.; C<sub>8</sub>) : t<sub>R</sub> = 25.8 min., pureté > 94 %.

IR (KBr) : 3341m, 3067w, 3041w, 2969m, 2937w, 1733vs, 1670s, 1618m, 1573m, 1524s, 1451m, 1367m, 1249s, 1166s, 1047m, 741m.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.75 (*d*, <sup>3</sup>J(14, 15) resp. <sup>3</sup>J(14', 15') = 7.5, 2H, HC(15); HC(15')); 7.58 (*d*, <sup>3</sup>J(12, 13) resp. <sup>3</sup>J(12', 13') = 7.4, 2H, HC(12); HC(12')); 7.38 (*t*, <sup>3</sup>J(13, 14) resp. <sup>3</sup>J(13', 14') ≈ <sup>3</sup>J(14, 15) resp. <sup>3</sup>J(14', 15') = 7.4, 2H, HC(14); HC(14')); 7.30 (*t*, <sup>3</sup>J(12, 13) resp. <sup>3</sup>J(12', 13') ≈ <sup>3</sup>J(13, 14) resp. <sup>3</sup>J(13', 14') = 7.5, 2H, HC(13); HC(13')); 7.17 (*sbr*, 1H, *NH*-H<sub>2</sub>C(5)); 6.04 (*d*, <sup>3</sup>J(7, NH) = 8.5, 1H, *NH*-HC(7)); 4.60 - 4.58 (*m*, 1H, HC(7)); 4.46

- 4.36 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(9)); 4.22 (*t*, <sup>3</sup>J(9, 10) = 7.0, 1H, HC(10)); 4.16 (*d*, <sup>3</sup>J(5, NH) = 4.7, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 3.64 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 2.93 - 2.86 (*dx**d*, <sup>3</sup>J(7, 7<sup>2</sup>) = 4.5, 1H, HC(7<sup>2a</sup>)); 2.73 - 2.69 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.69 - 2.66 (*dx**d*, <sup>3</sup>J(7, 7<sup>2</sup>) = ?, 1H, HC(7<sup>2b</sup>)); 2.64 - 2.60 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.43 (*s*, 9H, H<sub>3</sub>C(7<sup>5a</sup>); H<sub>3</sub>C(7<sup>5b</sup>); H<sub>3</sub>C(7<sup>5c</sup>)).

Signaux supplémentaires caractéristiques du solvant AcOEt : 4.12 (*q*, <sup>3</sup>J(3, 4) = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2.05 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 1.26 (*t*, <sup>3</sup>J(3, 4) = 7.0, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 203.2 (C(4)); 172.8 (C(1)); 171.1 (C(6)); 170.9 - 170.7 (2xs, C(7<sup>3</sup>)); 156.1 (C(8)); 143.7 - 143.6 (2xs, C(11; 11')); 141.3 (C(16; 16')); 127.7 (C(14; 14')); 127.1 - 127.0 (2xs, C(13; 13')); 125.1 - 125.0 (2xs, C(12; 12')); 120.0 (C(15; 15')); 81.8 (C(7<sup>4</sup>)); 67.2 (C(9)); 51.9 (C(1<sup>2</sup>)); 51.1 (C(7)); 49.2 (C(5)); 47.0 (C(10)); 37.3 (C(7<sup>2</sup>)); 34.4 (C(3)); 28.0 (C(7<sup>5a</sup>); C(7<sup>5b</sup>); C(7<sup>5c</sup>)); 27.5 (C(2)).

MS (DCI, NH<sub>3</sub>) : 540 (7), 539 (1), [M + H]<sup>+</sup>, 484 (7), 483 (23), 181 (15), 180 (15), 179 (36), 178 (100), 176 (7), 145 (11), 58 (14), 57 (10), 45 (82), 44 (10), 43 (9), 42 (13), 40 (13).

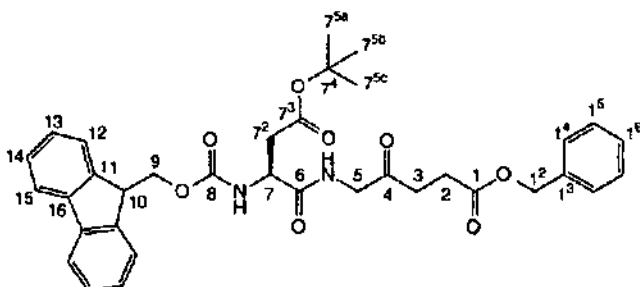
C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (538.60) :	calc.	: C 64.67,	H 6.36,	N 5.20;
	obs.	: C 62.27,	H 6.93,	N 6.45.

### 8.3.1.6. Synthèse de Fmoc-[Asp(O<sup>t</sup>Bu)]-(ALA)]-OBn (84)

La synthèse de **84** s'effectue selon le Mode opératoire - Type 11. Préactivation de 1646 mg (2.0 éq.) de **73**, de 297 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 341 µl (1.1 éq.) de DIC dans 10 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 515 mg (2 mmol, 1.0 éq.) de **44** dans 5 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 220 µl (1.0 éq.) de NMM en une portion. Agitation à RT sous N<sub>2</sub> durant 100 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après deux étapes de purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 4:1 - 1:10), récupération d'un solide blanc mousseux.

Rendement : 653 mg (53 %).

## Données analytiques de 84 :



$R_f$  : (AcOEt) : 0.62 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 138.0 - 140.0°C.

IR (KBr) : 3328m, 3291m, 3243m, 1752s, 1704s, 1685vs, 1651vs, 1555s, 1450m, 1415m, 1389m, 1355m, 1259m, 1187s, 1115m, 1080m, 1040m, 699m.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 7.76 (*d*,  $^3J(14, 15)$  resp.  $^3J(14', 15')$  = 7.5, 2H, HC(15); HC(15')); 7.60 (*d*,  $^3J(12, 13)$  resp.  $^3J(12', 13')$  = 7.6, 2H, HC(12); HC(12')); 7.40 - 7.29 (*m*, 9H, HC(13); HC(13')); HC(14); HC(14'); HC(14'); HC(14'); HC(15); HC(15'); HC(16)); 7.12 (*sbr*, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(5)); 5.97 (*d*,  $^3J(7, \text{NH})$  = 8.3, 1H, NH-HC(7)); 5.10 (*s*, 2H, H<sub>2</sub>C(1<sup>2</sup>)); 4.58 (*sbr*, 1H, HC(7)); 4.49 - 4.38 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(9)); 4.24 (*t*,  $^3J(9, 10)$  = 7.0, 1H, HC(10)); 4.16 (*d*,  $^3J(5, \text{NH})$  = 4.8, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 2.96 - 2.90 (*ddd*,  $^3J(7, 7^2)$  = 4.3, 1H, HC(7<sup>2a</sup>)); 2.74 - 2.67 (*m*, AA'BB', 4H, H<sub>2</sub>C(2); H<sub>2</sub>C(3)); 2.67 - 2.60 (*ddd*,  $^3J(7, 7^2)$  = 6.2, 1H, HC(7<sup>2b</sup>)); 1.45 (*s*, 9H, H<sub>3</sub>C(7<sup>5a</sup>); H<sub>3</sub>C(7<sup>5b</sup>); H<sub>3</sub>C(7<sup>5c</sup>)).

Signaux supplémentaires caractéristiques du solvant AcOEt : 4.12 (*q*,  $^3J(3, 4)$  = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2.05 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 1.26 (*t*,  $^3J(3, 4)$  = 7.0, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 203.0 (C(4)); 172.1 (C(1)); 171.0 (C(6)); 170.6 (C(7<sup>3</sup>)); 156.0 (C(8)); 143.7 - 143.6 (2xs, C(11); 11')); 141.3 (C(16); 16')); 135.6 (C(13)); 128.6 (C(1<sup>5</sup>); 1<sup>5</sup>)); 128.3 (C(1<sup>6</sup>)); 128.2 (C(1<sup>4</sup>); 1<sup>4</sup>)); 127.7 (C(14); 14)); 127.1 - 127.0 (2xs, C(13); 13')); 125.1 - 125.0 (2xs, C(12); 12')); 120.0 (C(15); 15')); 81.9 (C(7<sup>4</sup>)); 67.3 (C(9)); 66.6 (C(1<sup>2</sup>)); 51.1 (C(7)); 49.2 (C(5)); 47.1 (C(10)); 37.3 (C(7<sup>2</sup>)); 34.4 (C(3)); 28.0 (C(7<sup>5a</sup>); C(7<sup>5b</sup>); C(7<sup>5c</sup>)); 27.8 (C(2)).

**MS** (DCI, NH<sub>3</sub>) : 634 (20), 633 (53, [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), 632 (38), 617 (31), 616 (85, [M + H]<sup>+</sup>), 615 (70), 577 (47), 576 (36), 561 (30), 560 (100), 559 (87), 198 (33), 181 (65), 180 (37), 179 (32), 178 (77), 86 (22), 84 (21).

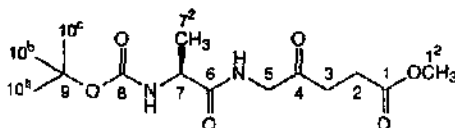
<b>C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub></b> (614.69) :	calc.	: C 68.39,	H 6.23,	N 4.56;
	obs.	: C 66.89,	H 6.64,	N 4.15.

### 8.3.1.7. Synthèse de Boc-[Ala-(ALA)]-OMe (85)

La synthèse de **85** est effectuée selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 1135 mg (2.0 éq.) de **74**, de 446 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 511 µl (1.1 éq.) de DIC dans 10 ml de DMF durant 50 minutes. Parallèlement, dissolution de 545 mg (3 mmol, 1.0 éq.) de **41** dans 5 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 418 µl (1.0 éq.) de NEt<sub>3</sub> en une portion. Agitation à RT sous N<sub>2</sub> durant 120 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après deux étapes de purification par chromatographie-éclair (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 1:3), récupération d'une pâte incolore.

**Rendement** : 502 mg (53 %).

Données analytiques de **85** :



**R<sub>f</sub>** : (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O : 70:30:5) : 0.71 (coloration brunâtre par traitement avec KMnO<sub>4</sub>).

$[\alpha]_D^{25}$  : - 15.6° (λ = 589 nm, c = 0.016, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); - 59.3° (λ = 365 nm, c = 0.016, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**IR** (KBr) : 3336w, 2979m, 2935w, 1723vs, 1664s, 1517m, 1457m, 1441m, 1394m, 1367s, 1250m, 1213m, 1169s, 1054w.

A noter la présence d'un signal supplémentaire non-expliqué : 2494w.

**(H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.07 (*sbr*, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(5)); 5.30 (*sbr*, 1H, NH-HC(7)); 4.19 - 4.16 (*m*, 1H, HC(7)); 4.11 (*d*,  $J(5, \text{NH}) = 5.0$ , 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 3.60 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 2.71 -

2.67 (m, AA' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.59 - 2.55 (m, BB' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.37 (s, 9H, H<sub>3</sub>C(10<sup>a</sup>); H<sub>3</sub>C(10<sup>b</sup>); H<sub>3</sub>C(10<sup>c</sup>)); 1.30 (d, <sup>3</sup>J(7, 7<sup>2</sup>) = 7.1, 3H, H<sub>3</sub>C(7<sup>2</sup>)).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 203.8 (C(4)); 173.0 (C(1)); 172.7 (C(6)); 155.3 (C(8)); 80 (C(9)); 51.7 (C(1<sup>2</sup>)); 49.9 (C(7)); 48.9 (C(5)); 34.3 (C(3)); 28.1 (C(10<sup>a</sup>); C(10<sup>b</sup>); C(10<sup>c</sup>)); 27.4 (C(2)); 18.4 (C(7<sup>2</sup>)).

MS (EI, 70 eV) : 317 (29, [M + H]<sup>+</sup>), 261 (53), 217 (16), 145 (31), 144 (100), 140 (26), 115 (68), 88 (80), 87 (20), 70 (20).

HR-MS (ESI) : calc. pour [C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> + Na]<sup>+</sup> : 339.1526; obs. 339.1525.

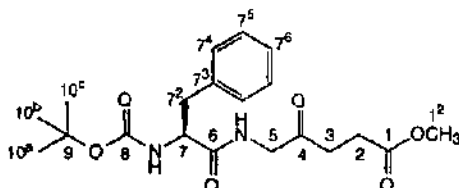
C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> (316.35) :	calc.	: C 53.15,	H 7.65,	N 8.86;
	obs.	: C 53.17,	H 7.91,	N 8.85.

### 8.3.1.8. Synthèse de Boc-Phe-(ALA)-OMe (86)

La synthèse de **86** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 2653 mg (2.0 éq.) de **75**, de 744 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 852 µl (1.1 éq.) de DIC dans 10 ml de DMF durant 50 minutes. Parallèlement, dissolution de 908 mg (5 mmol, 1.0 éq.) de **41** dans 5 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 697 µl (1.0 éq.) de NEt<sub>3</sub> en une portion. Agitation à RT sous N<sub>2</sub> durant 40 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après deux étapes de purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 2 : 1 - 1 : 5), récupération d'un solide cristallin sous la forme d'aiguilles blanches.

Rendement : 825 mg (42 %).

Données analytiques de **86** :



R<sub>f</sub> : (AcOEt) : 0.51 (coloration brunâtre par traitement avec KMnO<sub>4</sub>).

UV/VIS (MeOH) : λ<sub>max</sub> = 258 nm, log(ε) = 2.32.

$[\alpha]_D^{22}$  : - 2.0° ( $\lambda = 589 \text{ nm}$ ,  $c = 0.019$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); - 4.5° ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ,  $c = 0.019$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

F : 83.0 - 85.0°C.

IR (KBr) : 3336m, 2969w, 1741m, 1722m, 1694m, 1651vs, 1525m, 1444w, 1390w, 1366m, 1249w, 1206m, 1172m.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 7.30 - 7.17 (*m*, 5H, HC(7<sup>d</sup>); HC(7<sup>d</sup>); HC(7<sup>s</sup>); HC(7<sup>s</sup>); HC(7<sup>6</sup>)); 6.65 (*sbr*, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(5)); 5.00 (*sbr*, 1H, NH-HC(7)); 4.41 (*sbr*, 1H, HC(7)); 4.20 - 4.04 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 3.66 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 3.13 - 2.99 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(7<sup>2</sup>)); 2.70 - 2.66 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.64 - 2.59 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.38 (*s*, 9H, H<sub>3</sub>C(10<sup>a</sup>); H<sub>3</sub>C(10<sup>b</sup>); H<sub>3</sub>C(10<sup>c</sup>)).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 203.2 (C(4)); 172.7 (C(1)); 171.4 (C(6)); 155.3 (C(8)); 136.5 (C(7<sup>3</sup>)); 129.2 (C(7<sup>5</sup>; 7<sup>5</sup>)); 128.6 (C(7<sup>4</sup>; 7<sup>4</sup>)); 126.9 (C(7<sup>6</sup>)); 80.2 (C(9)); 55.6 (C(7)); 51.9 (C(1<sup>2</sup>)); 49.0 - 48.9 (2xs, C(5)); 38.4 (C(7<sup>2</sup>)); 34.4 (C(3)); 28.2 (C(10<sup>a</sup>); C(10<sup>b</sup>); C(10<sup>c</sup>)); 27.5 (C(2)).

MS (APCI) : 394 (23, [M + H]<sup>+</sup>), 393 (98, [M]<sup>+</sup>), 337 (14), 293 (13), 275, 261, 247, 243, 215.

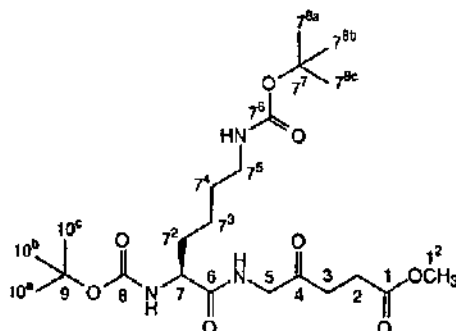
$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$ (392.45) :	calc.	: C 61.21,	H 7.19,	N 7.14;
	obs.	: C 61.39,	H 7.44,	N 7.28.

### 8.3.1.9. Synthèse de Boc-[Lys(Boc)-(ALA)]-OMe (87)

La synthèse de **87** est effectuée selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 2078 mg (2.0 éq.) de **76**, de 446 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 511  $\mu\text{l}$  (1.1 éq.) de DIC dans 10 ml de DMF durant 50 minutes. Parallèlement, dissolution de 545 mg (3 mmol, 1.0 éq.) de **41** dans 5 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 418  $\mu\text{l}$  (1.0 éq.) de  $\text{NEt}_3$  en une portion. Agitation à RT sous  $\text{N}_2$  durant 30 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après deux étapes de purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 2:1 - 1:10), récupération d'un solide compact légèrement jaune.

Rendement : 425 mg (30 %).

Données analytiques de 87 :

R<sub>f</sub> : (AcOEt) : 0.45 (coloration brunâtre par traitement avec KMnO<sub>4</sub>).

F : 99.0 - 100.0°C.

[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> : - 10.5° (λ = 589 nm, c = 0.024, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); - 37.3° (λ = 365 nm, c = 0.024, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

IR (KBr) : 3363m, 2979w, 2943w, 1741s, 1718m, 1687vs, 1652vs, 1520s, 1393m, 1367m, 1249m, 1207m, 1171s.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 4.23 - 4.09 (*m*, 3H, H<sub>2</sub>C(5); HC(7)); 3.74 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 3.15 - 3.11 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>C(7<sup>5</sup>)); 2.88 - 2.84 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.70 - 2.66 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.92 - 1.84 (*m*, 1H, HC(7<sup>2a</sup>)); 1.76 - 1.67 (*m*, 1H, HC(7<sup>2b</sup>)); 1.54 (*s*, 18H, H<sub>3</sub>C(7<sup>8a</sup>); H<sub>3</sub>C(7<sup>8b</sup>); H<sub>3</sub>C(7<sup>8c</sup>); H<sub>3</sub>C(10<sup>a</sup>); H<sub>3</sub>C(10<sup>b</sup>); H<sub>3</sub>C(10<sup>c</sup>)); 1.64 - 1.40 (*m*, 4H, H<sub>2</sub>C(7<sup>3</sup>); H<sub>2</sub>C(7<sup>4</sup>)).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 206.4 (C(4)); 175.9 (C(1)); 175.1 (C(6)); 158.8 (C(7<sup>6</sup>) ou C(8)); 158.2 (C(8) ou C(7<sup>6</sup>)); 80.9 (C(7<sup>7</sup>) ou C(9)); 80.1 (C(9) ou C(7<sup>7</sup>)); 56.3 (C(7)); 52.5 (C(1<sup>2</sup>)); 49.9 (C(5)); 41.3 (C(7<sup>5</sup>)); 35.5 (C(3)); 33.2 (C(7<sup>2</sup>)); 30.9 (*s*, C(7<sup>4</sup>)); 29.1 (C(7<sup>8a</sup>); C(7<sup>8b</sup>); C(7<sup>8c</sup>) ou C(10<sup>a</sup>); C(10<sup>b</sup>); C(10<sup>c</sup>)); 29.0 (C(10<sup>a</sup>); C(10<sup>b</sup>); C(10<sup>c</sup>) ou C(7<sup>8a</sup>); C(7<sup>8b</sup>); C(7<sup>8c</sup>)); 28.7 (C(2)); 24.4 (C(7<sup>3</sup>)).

MS (ESI) : 744 (3), 589 (11), 533 (6), 519 (15), 475 (23, [M + H]<sup>+</sup>), 474 (100), 418 (8), 374 (11), 318 (3), 300, 184, 145, 115, 84.

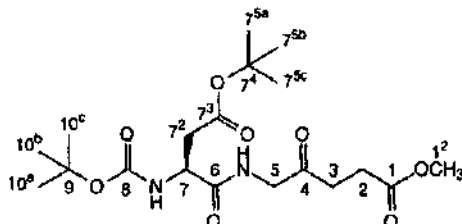
C <sub>22</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> (473.56) :	calc.	: C 55.80,	H 8.30,	N 8.87;
	obs.	: C 55.27,	H 8.40,	N 8.56.

8.3.1.10. Synthèse de Boc-[Asp(O<sup>t</sup>Bu)-(ALA)]-OMe (88)

La synthèse de **88** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 1736 mg (2.0 éq.) de **77**, de 446 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 511 µl (1.1 éq.) de DiC dans 10 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 545 mg (3 mmol, 1.0 éq.) de **41** dans 5 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 418 µl (1.0 éq.) de NEt<sub>3</sub> en une portion. Agitation à RT sous N<sub>2</sub> durant 20 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après une étape de purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 2:1 - 1:3), récupération d'une pâte transparente.

Rendement : 750 mg (60 %).

Données analytiques de **88** :



R<sub>f</sub> : (AcOEt) : 0.55 (coloration brunâtre par traitement avec KMnO<sub>4</sub>).

IR (KBr) : 3349mbr, 2979m, 2933m, 1729vs, 1675s, 1520s, 1394m, 1368s, 1298m, 1251s, 1166s.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.16 (*t*, <sup>3</sup>J(5, NH) = 4.8, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(5)); 5.68 (*d*, <sup>3</sup>J(7, NH) = 8.2, 1H, NH-HC(7)); 4.46 - 4.43 (*m*, 1H, HC(7)); 4.10 - 4.08 (*dxt*, <sup>3</sup>J(5, NH) = 4.6, <sup>4</sup>J(3, 5) = 2.2, 2H, H<sub>2</sub>C(5)); 3.59 (*s*, 3H, H<sub>3</sub>C(1<sup>2</sup>)); 2.79 - 2.73 (*m*, 1H, HC(7<sup>2a</sup>)); 2.69 - 2.65 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.61 - 2.54 (*m*, 3H, H<sub>2</sub>C(2); HC(7<sup>2b</sup>)); 1.38 (*s*, 9H, H<sub>3</sub>C(7<sup>5a</sup>); H<sub>3</sub>C(7<sup>5b</sup>); H<sub>3</sub>C(7<sup>5c</sup>)); 1.36 (*s*, 9H, H<sub>3</sub>C(10<sup>a</sup>); H<sub>3</sub>C(10<sup>b</sup>); H<sub>3</sub>C(10<sup>c</sup>)).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 203.2 (C(4)); 172.6 (C(1)); 171.0 - 170.9 (2xs, C(6)); 170.7 (C(7<sup>3</sup>)); 155.3 (C(8)); 81.4 (C(7<sup>4</sup>)); 80.1 (C(9)); 51.7 (C(1<sup>2</sup>)); 50.6 (C(7)); 49.0 (C(5)); 37.2 (C(7<sup>2</sup>)); 34.2 (C(3)); 28.1 (C(7<sup>5a</sup>); C(7<sup>5b</sup>); C(7<sup>5c</sup>)); 27.8 (C(10<sup>a</sup>); C(10<sup>b</sup>); C(10<sup>c</sup>)); 27.4 (C(2)).

MS (ESI) : 561 (7), 478 (6), 440 (7), 439 (21, [M + Na]<sup>+</sup>), 418 (20, [M + H]<sup>+</sup>), 417 (100, [M]<sup>+</sup>), 416 (11), 361 (16), 305 (7), 261 (4).

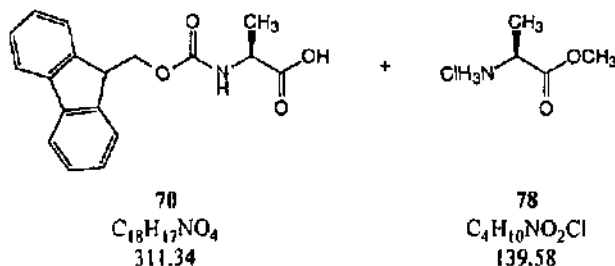
HR-MS (ESI) : calc. pour  $[C_{19}H_{32}N_2O_3 + Na]^+$  : 439.2051; obs. 439.2053.

### 8.3.2. Synthèses de dipeptides naturels

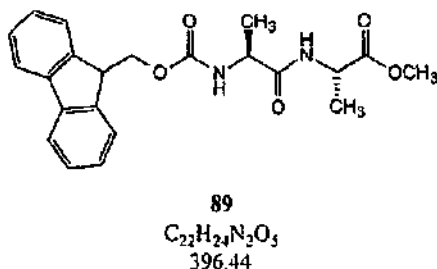
Afin de vérifier leur efficacité, les conditions expérimentales considérées dans le Mode opératoire - Type II sont appliqués à la synthèse de dérivés peptidiques composés d'acides α-aminés naturels. Un seul dipeptide naturel a été synthétisé.

**Remarque :** La substitution de NMM par  $NEt_3$  en tant que base s'explique uniquement par un problème de livraison chez le fournisseur.

#### 8.3.2.1. Synthèse de Fmoc-[Ala-Ala]-OMe (89)



DIC    HOBT  
 Base    DMF  
 RT    70h



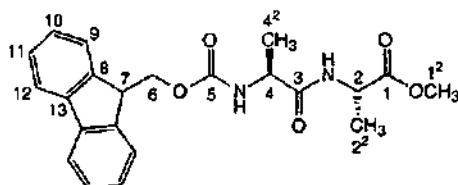
Dans un ballon de 25 ml préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, sont déposés 1868 mg (2.0 éq.) de **70**. Le solide est séché sous vide, puis dissout dans 10 ml de DMF distillé sous atmosphère inerte d'azote. Après 10 minutes d'agitation à RT, 446 mg (1.1 éq.) d'HOBt et 511  $\mu$ l (1.1 éq.) de DIC sont successivement ajoutés en une portion à la solution. Le mélange réactionnel, qui se trouble progressivement, est alors préactivé sous agitation à RT durant 50 minutes. Parallèlement, 419 mg (3 mmol, 1.0 éq.) de **78** sont placés dans un ballon de 10 ml préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, où ils sont tout d'abord séchés sous vide, puis dissous dans 5 ml de DMF distillé.

Après ce délai, le mélange hétérogène préactivé est ajouté, en plusieurs portions, à la solution incolore de **78** dans le DMF. La solution trouble résultante est alors agitée à RT durant 10 minutes, puis 418  $\mu$ l (1.0 éq.) de  $\text{NEt}_3$  sont ajoutés en une portion. Cette action se traduit par la coloration en jaune du mélange réactionnel. Le contrôle de l'avancement de la réaction se fait par CCM (AcOEt). Après 70 heures d'agitation à RT, le solvant est éliminé à l'aide du four à boules et le résidu pâteux jaunâtre dissout dans 200 ml d'un mélange 1:1  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOEt}$ . Phase organique et phase aqueuse sont séparées et cette dernière est extraite avec trois portions successives de 50 ml d'AcOEt. Les phases organiques jaunes réunies sont alors lavées avec, successivement, 100 ml d'eau désionisée, d'une solution 1N d'acide citrique, d'eau désionisée, d'une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , d'eau désionisée et d'une solution saturée de NaCl. La phase organique lavée et neutralisée est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre, puis le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, le produit brut de réaction est isolé sous la forme d'un solide compact de couleur jaune.

Après deux étapes de purification par chromatographie-éclair sur gel de silice (hexane/AcOEt 2:1 - 1:10), récupération d'un solide blanc compact.

Rendement : 1082 mg (91 %).

Données analytiques de **89** :



$R_f$  : (AcOEt) : 0.55 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 213.0 - 214.0°C.

$[\alpha]_D^{25}$  : - 9.5° ( $\lambda = 589$  nm,  $c = 0.020$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); - 35.7° ( $\lambda = 365$  nm,  $c = 0.020$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

IR (KBr) : 3296m, 3259w, 1742m, 1688m, 1650vs, 1532m, 1453m, 1260m, 1230m, 1052m.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 7.76 (*d*,  $^3J(11, 12)$ ) resp.  $^3J(11', 12') = 7.5$ , 2H, HC(12); HC(12')); 7.58 (*d*,  $^3J(9, 10)$ ) resp.  $^3J(9', 10') = 7.1$ , 2H, HC(9); HC(9')); 7.40 (*t*,  $^3J(10, 11)$ ) resp.  $^3J(10', 11') \approx ^3J(11, 12)$  resp.  $^3J(11', 12') = 7.5$ , 2H, HC(11); HC(11')); 7.30 (*t*,  $^3J(9, 10)$ ) resp.  $^3J(9', 10') \approx ^3J(10, 11)$  resp.  $^3J(10', 11') = 7.5$ , 2H, HC(10); HC(10')); 6.66 (*d*,  $^3J(4, \text{NH}) = 6.3$ , 1H, *NH*-HC(4)); 4.57 (*q*,  $^3J(4, 4^2) = 7.2$ , 1H, HC(4)); 4.39 (*d*,  $^3J(6, 7) = 6.8$ , 2H,  $\text{H}_2\text{C}(6)$ ); 4.33 - 4.29 (*m*, 1H, HC(2)); 4.21 (*t*,  $^3J(6, 7) = 7.1$ , 1H, HC(7)); 3.73 (*s*, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(1^2)$ ); 1.43 - 1.38 (*m*, 6H,  $\text{H}_3\text{C}(2^2)$ ;  $\text{H}_3\text{C}(4^2)$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 173.1 (C(1)); 171.8 (C(3)); 155.9 (C(5)); 143.8 - 143.7 (2xs, C(8; 8')); 141.3 (C(13; 13')); 127.7 (C(11; 11')); 127.0 (C(10; 10')); 125.0 (C(9; 9')); 119.9 (C(12; 12')); 67.1 (C(6)); 52.4 (C(1^2)); 50.4 (C(2)); 48.1 (C(4)); 47.1 (C(7)); 18.8 (C(4^2)); 18.2 (C(2^2)).

MS (APCI) : 479 (12), 409 (11), 398 (38,  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ), 397 (99,  $[\text{M}]^+$ ), 365, 359 (11), 337, 336, 303 (16), 294, 293, 292, 219, 187, 183(12), 179, 175.

$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$ (396.44) :	calc.	: C 66.65,	H 6.10,	N 7.07;
	obs.	: C 66.76,	H 6.26,	N 7.09.

### 8.3.3. Synthèses de tripeptides naturels

Les conditions expérimentales considérées dans le Mode opératoire - Type II sont appliqués à la synthèse de dérivés peptidiques composés d'acides  $\alpha$ -aminés naturels et contenant la séquence (Gly-Gly) sur la C-terminaison.



successivement ajoutés en une portion à la solution. Le mélange réactionnel, qui se trouble progressivement, est alors agité à RT durant 50 minutes. Parallèlement, 1 équivalent de **66** est placé dans un ballon de 10 ml préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, où il est tout d'abord séché sous vide, puis dissout dans 5 ml de DMF distillé.

Après ce délai, le mélange hétérogène préactivé est ajouté, en plusieurs portions, à la solution de **66** dans le DMF. La solution trouble résultante est alors agitée à RT durant 10 minutes, puis 1.0 équivalent de base est ajouté en une portion. Cette action se traduit par la coloration en jaune-orange du mélange réactionnel, qui est ensuite agité à RT pour une durée de 90 heures à 120 heures selon l'acide aminé *N*-protégé **70** (**71** ou **79**) engagé.

Le contrôle de l'avancement de la réaction se fait par CCM (AcOEt). Une fois la totalité du réactif **66** disparu sur CCM, le solvant est éliminé à l'aide du four à boules et le résidu pâteux dissout dans 200 ml d'un mélange 1:1 H<sub>2</sub>O/AcOEt. Phase organique et phase aqueuse sont séparées et cette dernière est extraite avec trois portions successives de 50 ml d'AcOEt. Les phases organiques réunies sont alors lavées avec, successivement, 100 ml d'eau désionisée, d'une solution 1N d'acide citrique, d'eau désionisée, d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, d'eau désionisée et d'une solution saturée de NaCl. La phase organique lavée et neutralisée est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, puis le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, le produit brut de réaction est isolé sous la forme d'un solide amorphe de couleur jaune-orange.

Une ou deux étapes de purification par chromatographie-éclair sur gel de silice (mélanges hexane/AcOEt de polarité croissante) sont, selon le cas, nécessaires pour la récupération du dérivé peptidique **90** - **92** correspondant sous sa forme cristalline.

### 8.3.3.2. Synthèse de Fmoc-[Ala-Gly-Gly]-OBn (**90**)

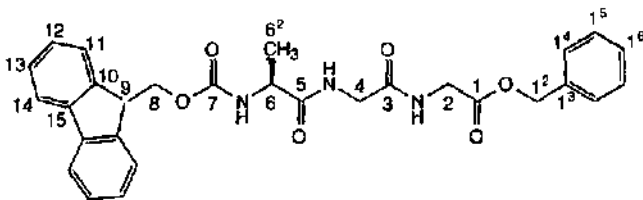
La synthèse de **90** est effectuée selon le Mode opératoire - Type III. Préactivation de 623 mg (2.0 éq.) de **70**, de 149 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 170 µl (1.1 éq.) de DIC dans 5 ml de DMF durant 50 minutes. Parallèlement, dissolution de 395 mg (1 mmol, 1.0 éq.) de **66** dans 5 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 110 µl (1.0 éq.) de NMM en une portion. Agitation à RT sous N<sub>2</sub> durant 120 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après deux étapes de purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 4:1 - 1:10), récupération d'un solide compact de couleur jaune pâle.

Rendement : 145 mg (28 %).

---

<sup>1</sup>La chute sensible du rendement dans cette synthèse s'explique par les difficultés rencontrées dans les étapes de purification du produit brut de réaction : le composé solide, peu soluble dans l'éluant, a en fait été adsorbé sur le gel de silice

Données analytiques de 90 :



$R_f$  : (AcOEt) : 0.21 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 157.0 - 158.0°C.

IR (KBr) : 3460sbr, 3412s, 2957m, 2924vs, 2853m, 1735s, 1718s, 1662m, 1541m, 1452m, 1413m, 1370m, 1250m, 1165m.

A noter la présence de signaux supplémentaires non-expliqués : 2361w, 2337w, 2323w.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.75 (*d*, <sup>3</sup>*J*(13, 14) resp. <sup>3</sup>*J*(13', 14') = 7.5, 2H, HC(14); HC(14')); 7.57 (*d*, <sup>3</sup>*J*(11, 12) resp. <sup>3</sup>*J*(11', 12') = 6.4, 2H, HC(11); HC(11')); 7.38 (*r*, <sup>3</sup>*J*(12, 13) resp. <sup>3</sup>*J*(12', 13') ≈ <sup>3</sup>*J*(13, 14) resp. <sup>3</sup>*J*(13', 14') = 7.5, 2H, HC(13); HC(13')); 7.34 - 7.27 (*m*, 7H, HC(14); HC(14'); HC(15); HC(15'); HC(16); HC(16'); HC(12); HC(12')); 7.00 - 6.96 (*m*, 2H, 2xNH); 5.45 (*sbr.* 1H, NH-HC(6)); 5.10 (*s*, 2H, H<sub>2</sub>C(1<sup>2</sup>)); 4.40 (*d*, <sup>3</sup>*J*(8, 9) = 6.8, 2H, H<sub>2</sub>C(8)); 4.22 - 4.16 (*m*, 2H, HC(6); HC(9)); 4.04 - 3.93 (*m*, 4H, H<sub>2</sub>C(2); H<sub>2</sub>C(4)); 1.38 (*d*, <sup>3</sup>*J*(6, 6<sup>2</sup>) = 6.9, 3H, H<sub>3</sub>C(6<sup>2</sup>)).

Signaux supplémentaires caractéristiques du solvant AcOEt : 4.12 (*g*, <sup>3</sup>*J*(3, 4) = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2.05 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 1.26 (*t*, <sup>3</sup>*J*(3, 4) = 7.0, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 173.0 (C(1)); 171.2 (C(5)); 169.1 (C(3)); 156.3 (C(7)); 143.7 (C(10); 10'); 141.3 (C(15); 15'); 135.0 (C(13)); 128.6 (C(15); 15'); 128.5 (C(16)); 128.3 (C(14); 14'); 127.8 (C(13); 13'); 127.1 - 127.0 (2xs, C(12); 12')); 125.0 - 124.9 (2xs, C(11); 11')); 120.0 (C(14); 14')); 67.2 (C(8)); 67.1 (C(1<sup>2</sup>)); 50.9 (C(6)); 47.1 (C(9)); 42.9 (C(2)); 41.2 (C(4)); 18.1 (C(6<sup>2</sup>)).

MS (APCI) : 681 (5), 544 (7), 517 (50, [M + H]<sup>+</sup>), 516, 441 (100), 413, 369, 352.

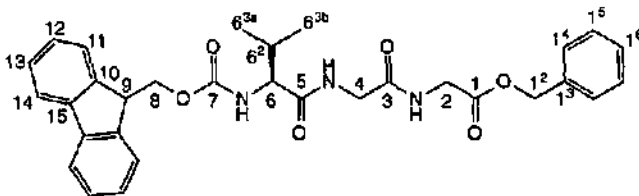
<b>C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub></b> (515.56) :	calc.	: C 67.56,	H 5.67,	N 8.15;
	obs.	: C 66.79,	H 5.59,	N 7.83.

## 8.3.3.3. Synthèse de Fmoc-[Val-Gly-Gly]-OBn (91)

La synthèse de **91** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Préactivation de 1358 mg (2.0 éq.) de **79**, de 297 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 341  $\mu$ l (1.1 éq.) de DIC dans 5 ml de DMF durant 50 minutes. Parallèlement, dissolution de 790 mg (2 mmol, 1.0 éq.) de **66** dans 5 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 220  $\mu$ l (1.0 éq.) de NMM en une portion. Agitation à RT sous N<sub>2</sub> durant 120 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après deux étapes de purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 1:1 - AcOEt), récupération d'un solide compact de couleur blanche.

Rendement : 598 mg (55 %).

Données analytiques de **91** :



R<sub>F</sub> (AcOEt) : 0.75 (UV<sub>254</sub>-visible).

F : 169.0 - 170.0°C.

IR (KBr) : 3341m, 3290m, 2968m, 2936w, 1743m, 1692m, 1638vs, 1618s, 1572s, 1250m, 1171m, 741m.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : 8.29 (t, <sup>3</sup>J(4, NH) = 5.8, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(4)); 8.24 (t, <sup>3</sup>J(2, NH) = 5.7, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(2)); 7.88 (d, <sup>3</sup>J(13, 14) resp. <sup>3</sup>J(13', 14') = 7.5, 2H, HC(14); HC(14')); 7.74 (t, <sup>3</sup>J(11, 12) resp. <sup>3</sup>J(11', 12') = 6.9, 2H, HC(11); HC(11')); 7.48 (d, <sup>3</sup>J(6, NH) = 8.7, 1H, NH-HC(6)); 7.43 - 7.29 (m, 9H, HC(14'); HC(14''); HC(15); HC(15''); HC(16); HC(12); HC(12''); HC(13); HC(13'')); 5.10 (s, 2H, H<sub>2</sub>C(12)); 4.30 - 4.19 (m, 3H, H<sub>2</sub>C(8); HC(9)); 3.93 - 3.85 (m, 3H, H<sub>2</sub>C(2); HC(6)); 3.78 (d, <sup>3</sup>J(4, NH) = 5.7, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 2.03 - 1.95 (m, 1H, HC(6<sup>2</sup>)); 0.89 - 0.86 (m, 6H, H<sub>3</sub>C(6<sup>3a</sup>); H<sub>3</sub>C(6<sup>3b</sup>)).

A noter les signaux supplémentaires caractéristiques de l'impureté N, N'-diisopropylurée (DIU) : 5.51 (d, <sup>3</sup>J(2, NH) resp. <sup>3</sup>J(2', NH) = 7.6, 2H, 2xNH); 3.63 (sept, <sup>3</sup>J(2, 3) = <sup>3</sup>J(2, 3')

resp.  $^3J(2', 3') = ^3J(2', 3^{1'}) = 6.5$ , 2H, HC(2'); HC(2'')); 1.00 (d,  $^4J(3, 3^{1'})$  resp.  $^4J(3', 3^{1'}) = 6.5$ , 12H, H<sub>3</sub>C(3); H<sub>3</sub>C(3<sup>1'</sup>)); H<sub>3</sub>C(3'); H<sub>3</sub>C(3<sup>1'</sup>)).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : 171.8 (C(1)); 170.9 (C(5)); 169.8 - 169.4 (2xs, C(3)); 157.0 - 156.4 (2xs, C(7)); 144.0 - 143.9 (2xs, C(10; 10')); 140.8 (C(15; 15')); 136.0 (C(1<sup>3</sup>)); 128.6 (C(1<sup>5</sup>; 1<sup>5'</sup>)); 128.2 (C(1<sup>6</sup>)); 128.0 (C(1<sup>4</sup>; 1<sup>4'</sup>)); 127.8 (C(13; 13')); 127.2 (C(12; 12')); 125.5 (C(11; 11')); 120.2 (C(14; 14')); 66.0 (C(1<sup>2</sup>)); 65.9 (C(8)); 60.5 (C(6)); 46.8 (C(9)); 41.8 (C(2) ou C(4)); 40.8 (C(4) ou C(2)); 30.2 (C(6<sup>2a</sup>)); 19.4 (C(6<sup>3a</sup>)); 18.4 (C(6<sup>3b</sup>)).

A noter les signaux supplémentaires caractéristiques de l'impureté DIU : 156.9 (C(1; 1')); 40.7 (C(2; 2')); 23.4 (C(3; 3'); C(3<sup>1</sup>; 3<sup>1'</sup>)).

MS (ESI) : 561 (27), 545 (25, [M + H]<sup>+</sup>), 544 (100, [M]<sup>+</sup>), 543 (23), 539 (21), 534 (24).

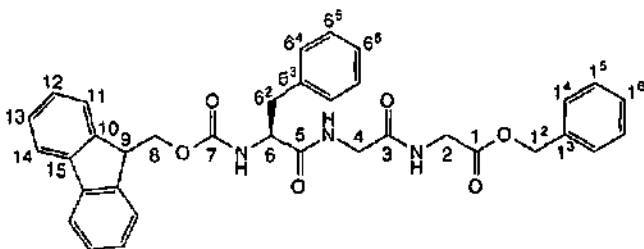
HR-MS (ESI) : calc. pour [C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> + Na]<sup>+</sup> : 566.2261; obs. 566.2264.

#### 8.3.3.4. Synthèse de Fmoc-[Phe-Gly-Gly]-OBn (92)

La synthèse de **92** est effectuée selon le Mode opératoire - Type III. Préactivation de 1550 mg (2.0 éq.) de **71**, de 297 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 341 µl (1.1 éq.) de DIC dans 5 ml de DMF durant 50 minutes. Parallèlement, dissolution de 790 mg (2 mmol, 1.0 éq.) de **66** dans 5 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 220 µl (1.0 éq.) de NMM en une portion. Agitation à RT sous N<sub>2</sub> durant 90 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après une étape de purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 2:1 - 1:10), récupération d'un solide blanc compact.

Rendement : 876 mg (74 %).

Données analytiques de **92** :



**R<sub>f</sub>** : (AcOEt) : 0.54 (UV<sub>254</sub>-visible).

**F** : 142.0 - 144.0°C.

**IR** (KBr) : 3302m, 1749m, 1689m, 1643vs, 1545m, 1451m, 1258m, 1215m, 1194m, 741m.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 8.37 (*t*, <sup>3</sup>*J*(4, NH) = 5.7, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(4)); 8.28 (*t*, <sup>3</sup>*J*(2, NH) = 5.8, 1H, NH-H<sub>2</sub>C(2)); 7.87 (*d*, <sup>3</sup>*J*(13, 14) resp. <sup>3</sup>*J*(13', 14') = 7.5, 2H, HC(14); HC(14')); 7.69 - 7.63 (*m*, 3H, HC(11); HC(11')); NH-HC(6)); 7.43 - 7.16 (*m*, 15H, HC(14); HC(14'); HC(15); HC(15'); HC(16); HC(6<sup>4</sup>); HC(6<sup>4</sup>); HC(6<sup>5</sup>); HC(6<sup>5</sup>); HC(6<sup>6</sup>); HC(12); HC(12'); HC(13); HC(13')); 5.14 (*s*, 2H, H<sub>2</sub>C(1<sup>2</sup>)); 4.40 - 4.33 (*m*, 1H, HC(6)); 4.25 - 4.12 (*m*, 3H, H<sub>2</sub>C(8); HC(9)); 3.97 (*d*, <sup>3</sup>*J*(2, NH) = 5.8, 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 3.85 (*d*, <sup>3</sup>*J*(4, NH) = 5.7, 2H, H<sub>2</sub>C(4)); 3.14 - 3.09 (*dx**d*, 1H, HC(6<sup>2a</sup>)); 2.89 - 2.82 (*dx**d*, 1H, HC(6<sup>2b</sup>)).

Signaux supplémentaires caractéristiques du solvant AcOEt : 4.03 (*q*, <sup>3</sup>*J*(3, 4) = 7.0, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1.99 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>CO); 1.17 (*t*, <sup>3</sup>*J*(3, 4) = 7.0, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 172.0 (C(1)); 170.9 - 170.5 (2xs, C(5)); 169.8 - 169.5 (2xs, C(3)); 156.1 (C(7)); 143.9 (*s*, C(10; 10')); 143.8 (C(6<sup>3</sup>)); 140.8 (C(15; 15')); 136.0 (C(13)); 129.4 (C(6<sup>5</sup>; 6<sup>5</sup>)); 128.5 (C(15; 15'); C(6<sup>4</sup>; 6<sup>4</sup>)); 128.2 (C(16)); 128.0 (C(14; 14')); 127.7 (C(13; 13')); 127.2 (C(12; 12')); 126.3 (C(6<sup>6</sup>)); 125.5 - 125.4 (2xs, C(11; 11')); 120.2 (C(14; 14')); 66.0 (C(1<sup>2</sup>)); 65.8 (C(8)); 56.3 (C(6)); 46.7 (C(9)); 42.0 (C(4)); 40.8 (C(2)); 37.5 (C(6<sup>2</sup>)).

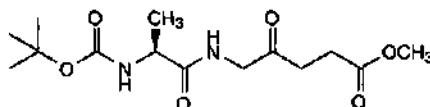
**MS** (ESI) : 646 (21), 615 (42), 614 (100, [M + Na]<sup>+</sup>), 593 (43), 592 (84, [M + H]<sup>+</sup>), 516 (16).

**HR-MS** (ESI) : calc. pour [C<sub>35</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> + Na]<sup>+</sup> : 614.2261; obs. 614.2263.

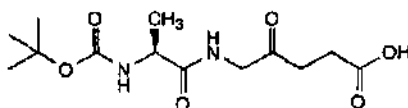
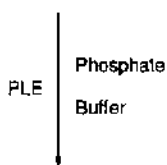
## 8.4. Réactions de déprotection sur les dérivés peptidiques

Le dérivé **85** a été, dans un premier temps, mono-déprotégé sur son C-terminal. Ensuite, une mono-déprotection au niveau de son N-terminal a été effectuée et, finalement, le dérivé **100** a été N-déprotégé.

### 8.4.1. Synthèse de Boc-[Ala-(ALA)]-OH (**100**)



**85**  
 $C_{14}H_{24}N_2O_6$   
 316.35

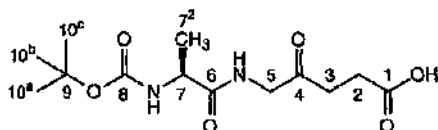


**100**  
 $C_{13}H_{22}N_2O_6$   
 302.33

Dans un erlenmeyer de 100 ml sont dissous 200 mg (0.6 mmol) de **85** dans 40 ml de solution-tampon phosphate (Phosphate Buffer). 200  $\mu$ l (750 units) de la solution enzymatique de PLE (Pig Liver Esterase; 15 mg de protéine/ml, 250 units/mg protéine) sont alors ajoutés en une portion à la solution incolore. La libération de l'acide est suivie par titration au pH-stat (pH = 8.0) à l'aide d'une solution 0.1N de NaOH. Le mélange réactionnel est agité à RT durant 48 heures. L'avancement de la réaction d'hydrolyse est confirmé par CCM ( $CH_2Cl_2/CH_3OH/H_2O$  70:30:5 et AcOEt). Le pH est alors baissé à 1.5 à l'aide d'HCl conc., la solution est saturée à l'aide de NaCl et elle est extraite avec trois portions successives de 75 ml d'AcOEt. Les phases organiques réunies sont ensuite séchées sur  $MgSO_4$  anhydre puis

concentrées à l'aide de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, isolement de 170 mg d'une pâte incolore, qui est purifiée par chromatographie-éclair sur gel de silice (AcOEt puis MeOH). Récupération de 150 mg (88 %) de 100 sous la forme d'un solide blanc compact.

Données analytiques de 100 :



**R<sub>f</sub>** : (AcOEt/hexane/CH<sub>3</sub>COOH : 100:20:1) : 0.67 (coloration jaunâtre par traitement avec KMnO<sub>4</sub>).

**F** : 97.0 - 98.0°C.

**IR** (KBr) : 3357mbr, 2981m, 2934w, 1718vs, 1665vs, 1561s, 1413m, 1394m, 1368s, 1251m, 1168s.

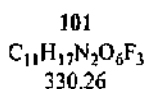
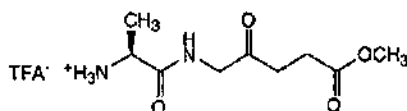
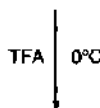
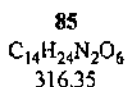
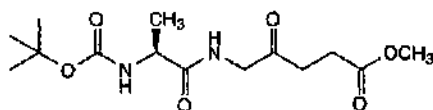
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 4.26 - 4.13 (*m*, 3H, H<sub>2</sub>C(5); HC(7)); 2.80 - 2.75 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(3)); 2.64 - 2.60 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H<sub>2</sub>C(2)); 1.53 (*s*, 9H, H<sub>3</sub>C(10<sup>a</sup>); H<sub>3</sub>C(10<sup>b</sup>); H<sub>3</sub>C(10<sup>c</sup>)); 1.43 (*d*, *J*(7, 7<sup>2</sup>) = 7.2, 3H, H<sub>3</sub>C(7<sup>2</sup>)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 179.7 (C(1)); 176.6 (C(6)); 157.9 (C(8)); 81.0 (C(9)); 51.9 (C(7)); 50.2 (C(5)); 36.2 (C(3)); 31.0 (C(2)); 29.0 (C(10<sup>a</sup>); C(10<sup>b</sup>); C(10<sup>c</sup>)); 18.8 (C(7<sup>2</sup>)).

**MS** (APCI) : 331 (7), 304 (17, [M + H]<sup>+</sup>), 303 (81, [M]<sup>+</sup>), 248 (9), 247 (100), 229 (12), 203 (10), 185, 132.

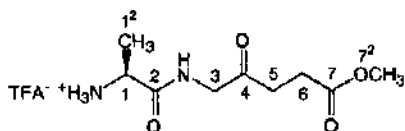
<b>C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub></b> (302.33) :	calc.	: C 51.65,	H 7.33,	N 9.27;
	obs.	: C 51.55,	H 7.61,	N 9.30.

## 8.4.2. Synthèse de H-[Ala-(ALA)]-OMe (101)



Dans un ballon de 10 ml sous atmosphère inerte d'azote sont dissous 95 mg (0.3 mmol) de **85** dans 2 ml d'acide trifluoroacétique (TFA). Après dissolution complète du solide, le mélange devenu jaune est refroidi à l'aide d'un bain de glace et agité à 0°C durant 12 heures. L'avancement de la réaction est confirmé par CCM (AcOEt). Après réchauffement à RT, le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif et le résidu pâteux jaune-orange séché à la pompe à huile. Isolement de 90 mg (91 %) de **101** à l'état brut, mais qui a tendance à se décomposer à RT (coloration toujours plus foncée). Le composé est par conséquent utilisé tel quel dans la suite des opérations.

Données analytiques de **101** :



$R_f$  : .

F : .

IR (KBr) : .

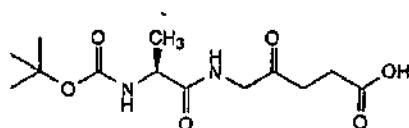
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) : 8.81 (*t*,  $^3J(3, \text{NH}) = 5.6$ , 1H,  $\text{NH-H}_2\text{C}(3)$ ); 8.26 (*sbr*, 3H,  $\text{H}_3\text{N}^+$ ); 4.27 - 4.20 (*dxdd*,  $^3J(3, \text{NH}) = 5.7$ ,  $^2J(3^a, 3^b) = 12.7$ , 1H,  $\text{HC}(3^a)$ ); 4.19 - 4.12 (*dxdd*,  $^3J(3, \text{NH}) = 5.5$ ,  $^2J(3^a, 3^b) = 12.9$ , 1H,  $\text{HC}(3^b)$ ); 4.07 - 4.00 (*m*, 1H,  $\text{HC}(1)$ ); 3.68 (*s*, 3H,  $\text{H}_3\text{C}(7^2)$ ); 2.86 - 2.82 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H,  $\text{H}_2\text{C}(5)$ ); 2.64 - 2.60 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H,  $\text{H}_2\text{C}(6)$ ); 1.49 (*d*,  $^3J(1, 1^2) = 7.0$ , 3H,  $\text{H}_3\text{C}(1^2)$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) : 204.9 (C(4)); 172.9 (C(7)); 170.2 (C(2)); 51.6 - 51.5 (2xs, C(7<sup>2</sup>)); 48.5 (C(1)); 48.4 (C(3)); 34.2 (C(5)); 27.4 (C(6)); 17.5 (C(1<sup>2</sup>)).

MS (ESI) : 456 (16), 455 (74), 434 (15), 433 (46), 361 (27), 239 (4,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ), 217 (100,  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ), 199 (38), 171, 167, 146 (18).

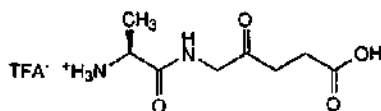
HM-MS (ESI) : calc. pour  $[\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4]^+$  : 217.1183; obs. 217.1191.

#### 8.4.3. Synthèse de H-[Ala-(ALA)]-OH (102)



100  
 $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$   
 302.33

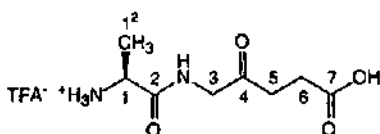
TFA RT



102  
 $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_6\text{F}_3$   
 316.23

Dans un ballon de 10 ml sous atmosphère inerte d'azote sont dissous 181 mg (0.6 mmol) de **100** dans 3 ml de TFA. Après dissolution complète du solide, le mélange devenu jaune est agité à RT durant 6 heures. L'avancement de la réaction est confirmé par CCM ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  70:30:5). Le solvant est alors éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif et le résidu pâteux jaune-orange séché à la pompe à huile. Isolement de 155 mg (82 %) de **102** à l'état brut, mais qui a tendance à se décomposer à RT (coloration toujours plus foncée). Le composé est par conséquent utilisé tel quel dans la suite des opérations.

Données analytiques de **102** :



**R<sub>f</sub>** :

**F** :

**IR** (KBr) :

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) :

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) :

**MS** (ESI) : 689 (13), 585 (10), 471 (12), 449 (20), 427 (58), 405 (14), 225 (53,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ), 203 (100,  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ), 185 (63), 145 (17), 132 (22).

**HR-MS** (ESI) : calc. pour  $[\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4]^+$  : 203.1026; obs. 203.1031.

---

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] P.M. Jordan, J.S. Seehra, *J.Chem.Soc.,Chem.Commun.* **1980**, 240.
- [2] L.R. Milgrom, 'The Colours of Life : An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and related Compounds', Oxford University Press, New York, 1997.
- [3] D. Shemin, *BioEssays* **1989**, *10*, 30.
- [4] A.R. Battersby, C.J.R. Fookes, G.W.J. Matcham, E. McDonald, *Nature* **1980**, *285*, 17.
- [5] D. Shemin, *Methods in Enzymology* **1970**, *XVII Part A*, 205.
- [6] H.A. Jackson, in 'Comprehensive Organic Chemistry', Ed. D. Barton, D. Ollis, Pergamon Press, Oxford, 1997, p. 275.
- [7] A. Eschenmoser, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **1988**, *27*, 5.
- [8] D. Shemin, *Vitam.Horm.* **1968**, *26*, 357.
- [9] D.L. Nandi, D. Shemin, *J.Biol.Chem.* **1968**, *243*, 1236.
- [10] A.R. Chaperon, T.M. Engeloch, R. Neier, *Angew.Chem.* **1998**, *110*, 369.
- [11] R. Neier, in 'Advances in Nitrogen Heterocycles', Ed. JAI Press Inc., Greenwich, 1996, p. 35.
- [12] R. Neier, R. Lüönd, J. Walker, *J.Org.Chem.* **1992**, *57*, 5005.
- [13] M. Henz, in 'Inhibitionsstudien zum Mechanismus der Porphobilinogen Synthase isoliert aus *Escherichia coli* CR 261', Thèse de l'Université de Neuchâtel, 1997.
- [14] T.M. Engeloch, in 'Biomimetische und biosynthetische Studien zum Mechanismus der Porphobilinogen Synthase', Thèse de l'Université de Neuchâtel, 1998.
- [15] C. Jarret, in 'Etude de la Porphobilinogène Synthase de *Escherichia coli*. Inhibitions sélectives des deux sites actifs', Thèse de l'Université de Neuchâtel, 1999.
- [16] K. Itakura, J.J. Rossi, R.B. Wallace, *Annu.Rev.Biochem.* **1984**, *53*, 323.
- [17] A. Furka, in 'Written and notarized document', Ed. Dr. J. Bókai, State Notary Public, Budapest, 1982, p. 1-11.
- [18] A. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibo, *14th Int.Congr.Biochem.* **1988**, *P-168*, 288.
- [19] R.A. Houghten, C. Pinilla, S.E. Blondelle, J.R. Appel, C.T. Dooley, J.H. Cuervo, *Nature* **1991**, *354*, 84.

- [20] K.S. Lam, S.E. Salmon, E.M. Hersh, V.J. Hruby, W.M. Kazmierski, R.J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82.
- [21] B.A. Bunin, J.A. Ellman, *J.Am.Chem.Soc.* **1992**, *114*, 10997.
- [22] H.M. Geysen, R.H. Meloen, S.J. Barteling, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1984**, *81*, 3998.
- [23] N.J. Maeji, R.M. Valerio, A.M. Bray, R.A. Campbell, H.M. Geysen, *React.Polym.* **1994**, *22*, 203.
- [24] R.A. Foughten, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1985**, *82*, 5131.
- [25] G. Jung, A.G. Beck-Sickinger, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **1992**, *31*, 367.
- [26] R.B. Merrifield, *J.Am.Chem.Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [27] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217.
- [28] S.P.A. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767.
- [29] F. Sebestyén, G. Dibo, A. Kovacs, A. Furka, *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1993**, *3*, 413.
- [30] A. Furka, *Drug.Develop.Res.* **1995**, *36*, 1.
- [31] M.A. Gallop, R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P.A. Fodor, E.M. Gordon, *J.Med.Chem.* **1994**, *37*, 1233.
- [32] E.M. Gordon, R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P.A. Fodor, M.A. Gallop, *J.Med.Chem.* **1994**, *37*, 1385.
- [33] E.M. Gordon, M.A. Gallop, D.V. Patel, *Acc.Chem.Res.* **1996**, *29*, 144.
- [34] J.A. Ellman, *Acc.Chem.Res.* **1996**, *29*, 132.
- [35] N.K. Terrett, M. Gardner, D.W. Gordon, R.J. Kobylecki, J. Steele, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8135.
- [36] E.R. Felder, *Chimia* **1994**, *48*, 531.
- [37] D. Weininger, in 'Pitfalls in creating a chemically diverse compound screening library', *unpublished results* **1995**.
- [38] E.J. Martin, J.M. Blaney, M.A. Siani, D.C. Spellmeyer, A.K. Wong, W.H. Moos, *J.Med.Chem.* **1995**, *38*, 1431.
- [39] M.M. Murphy, J.R. Schutlek, E.M. Gordon, M.A. Gallop, *J.Am.Chem.Soc.* **1995**, *117*, 7029.
- [40] M.J. Kurth, L.A.A. Randall, C.X. Chen, C. Melander, R.B. Miller, K. McAlister, G. Reitz, R. Kang, T. Nakatsu, C. Green, *J.Org.Chem.* **1994**, *59*, 5862.
- [41] M.C. Pirrung, J. Chen, *J.Am.Chem.Soc.* **1995**, *117*, 1240.

- [42] J.M. Fréchet, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 663.
- [43] C.C. Leznoff, *Acc.Chem.Res.* **1978**, *11*, 327.
- [44] T.A. Keating, R.W. Armstrong, *J.Am.Chem.Soc.* **1996**, *118*, 2574.
- [45] J.M. Ostresh, J.H. Winkle, V.T. Hamashin, R.A. Houghten, *Biopolymers* **1994**, *34*, 1681.
- [46] H.M. Geysen, S.J. Rodda, T.J. Mason, *Mol.Immun.* **1986**, *23*, 709.
- [47] D.J. Ecker, T.A. Vickers, R. Hanecak, V. Driver, K. Anderson, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 1853.
- [48] J.R. Wyatt, T.A. Vickers, J.L. Roberson, D.J. Ecker, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1994**, *91*, 1356.
- [49] W.D.F. Meutermans, P.F. Alewood, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7709.
- [50] P. Willett, *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 516.
- [51] B. Yan, G. Kumaravel, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 843.
- [52] R.C. Anderson, J.P. Stokes, M.J. Shapiro, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5311.
- [53] P.A. Keifer, *J.Org.Chem.* **1996**, *61*, 1558.
- [54] R.S. Garipati, B. Adams, J.L. Adams, S.K. Karkar, *J.Org.Chem.* **1996**, *61*, 2911.
- [55] B.B. Brown, D.S. Wagner, H.M. Geysen, *Mol.Diversity* **1995**, *1*, 4.
- [56] M.C. Fitzgerald, K. Harris, C.G. Sherlin, G. Siuzdak, *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1996**, *6*, 979.
- [57] J.W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, V. Gnau, J. Brtnjcs, G. Jung, *Angew.Chem.* **1993**, *105*, 901.
- [58] J.A. Boutin, P. Hennig, P.-H. Lambert, S. Bertin, L. Pctit, J.-L. Fauchère, *Anal.Biochem.* **1996**, *234*, 126.
- [59] L.C. Maillard, *Compt.Rend.Acad.Sci.* **1912**, *154*, 66.
- [60] H. Chen, R.J. Radmer, *unpublished results* **1995**.
- [61] P.W. Smith, J.Y.Q. Lui, B. Cox, J.G. Houston, P.R. Tiller, *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1994**, *4*, 2821.
- [62] M.C. Pirrung, J.H.-L. Chau, J. Chen, *Chem.Biol.* **1995**, *2*, 621.
- [63] T. Carell, E.A. Wintner, J. Rebek Jr., *Angew.Chem.* **1994**, *106*, 2162.
- [64] T. Carell, E.A. Wintner, E.J. Sutherland, J. Rebek Jr., Y.M. Dunayevskiy, P. Vouros, *Chem & Biol.* **1995**, *2*, 171.

- [65] R.W. Armstrong, A.P. Combs, P.A. Tempest, S.D. Brown, T.A. Keating, *Acc.Chem.Res.* 1996, 29, 123.
- [66] I. Ugi, A. Dömling, W. Hörl, *Endeavour* 1994, 18, 115.
- [67] I. Ugi, C. Steinbrückner, *Chem.Ber.* 1961, 94, 734.
- [68] R.W. Armstrong, *unpublished results* 1995.
- [69] C.P. Holmes, J.P. Chinn, G.C. Look, E.M. Gordon, M.A. Gallop, *J.Org.Chem.* 1995, 60, 7328.
- [70] T.A. Keating, R.W. Armstrong, *J.Am.Chem.Soc.* 1995, 117, 7842.
- [71] H. Han, M. Wolfe, S. Brenner, K.D. Janda, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1995, 92, 6419.
- [72] E. Atherton, R.C. Sheppard, 'Solid phase peptide synthesis. A practical approach', IRL Press, Oxford, 1989.
- [73] G. Grubler, S. Stoeva, H. Echnier, in 'Peptides : Chemistry, Structure and Biology', Leiden University, Leiden, 1994, p. 51.
- [74] D.R. Englebretsen, D.R.K. Harding, *Int.J.Peptide Prot.Res.* 1994, 43, 546.
- [75] G.B. Fields, R.L. Noble, *Int.J.Peptide Prot.Res.* 1990, 35, 161.
- [76] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* 1987, 28, 3787.
- [77] R.P. Hammer, F. Albericio, L. Gera, G. Barany, *Int.J.Peptide Prot.Res.* 1990, 36, 31.
- [78] B. Blankemeyer-Menge, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 5871.
- [79] H.G. Chao, M.S. Bernatowicz, P.D. Reiss, C.E. Klimas, G.R. Matsueda, *J.Am.Chem.Soc.* 1994, 116, 1746.
- [80] L.A. Thompson, J.A. Ellman, *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 9333.
- [81] B.J. Backes, J.A. Ellman, *J.Am.Chem.Soc.* 1994, 116, 11171.
- [82] G.W. Kenner, J.R. McDonnott, R.C. Sheppard, *J.Chem.Soc.,Chem.Commun.* 1971, 636.
- [83] M. Mergler, J. Gosteli, P. Grogg, R. Tanner, *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 4005.
- [84] C.T. Dooley, R.A. Houghlen, *Life Sci.* 1993, 52, 1509.
- [85] V. Nikolaiev, A. Stierandová, V. Krchnak, B. Seligmann, K.S. Lam, S.E. Salmon, M. Lebl, *Pept.Res.* 1993, 6, 161.
- [86] S. Brenner, R.A. Lerner, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1992, 89, 5381.
- [87] M.H.I. Ohlmeyer, R.N. Swanson, L.W. Dillard, J.C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W.C. Still, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1993, 90, 10922.

- [88] H.P. Nestler, P.A. Bartlett, W.C. Still, *J.Org.Chem.* 1994, 59, 4723.
- [89] S.H. DeWitt, J.S. Kiely, C.J. Stankovic, M.C. Schroeder, D.M.R. Cody, M.R. Pavia, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1993, 90, 6909.
- [90] J.H. Krieger, *Chem.Eng.News* 1996, 67.
- [91] E. Felder, D. Poppinger, *Adv Drug Res.* 1997, 30, 111.
- [92] G. Jori, *EPA Newsletter* 1997, 60, 12.
- [93] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J.Natl.Cancer I.* 1998, 90, 889.
- [94] T.J. Dougherty, *J.Clin.Laser Med.* 1996, 14, 219.
- [95] J.D. Spikes, *unpublished results* 1985.
- [96] M.F. Edelson, *Sci.Am.* 1988, 68, 259.
- [97] F.F. Rubaltelli, 'Photodiagnostic and Phototherapeutic Techniques in Medicine', 101st ed., Milano, 1995.
- [98] P.M. Farr, B.L. Diffey, E.M. Higgins, J.S.N. Matthews, *Brit.J.Dermatol.* 1991, 124, 443.
- [99] O. Raab, *Infusoria Z.Biol.* 1900, 39, 524.
- [100] H.F. Blum, 'Photodynamic action and diseases caused by light', Ed. H. Hafner, New York, 1964.
- [101] J. Moan, K. Berg, *Photochem.Photobiol.* 1991, 53, 549.
- [102] S. Schwartz, *Minnesota University's Medical Bulletin* 1955, 7, 27.
- [103] J. Moan, *Photochem.Photobiol.* 1986, 43, 681.
- [104] S. Schwartz, J.W. Winkelman, R.L. Lipson, in 'Photodynamic Therapy', Marcel Dekker Inc., New York, 1992, p. 1.
- [105] C.S. Foote, in 'Oxygen and Oxy-radicals in Chemistry and Biology', Academic Press, London, 1981, p. 425.
- [106] G. Jori, L. Schindl, A. Schindl, L. Polo, *J.Photoch.Photobio.A* 1996, 102, 101.
- [107] J.L. Goldsten, M.S. Brown, R.G. Anderson, D.W. Russell, W.J. Schneider, *Rev.Cell.Biol.* 1985, 1, 1.
- [108] E. Reddi, G. Jori, *Rev.Chem.Intern.* 1988, 10, 241.
- [109] G. Bock, S. Harnett, 'Photosensitizing Compounds : Their Chemistry, Biology and Clinical Use', John Wiley and Sons, Chichester, 1989.

- [110] M. Soncin, L. Polo, E. Reddi, G. Jori, M.E. Kenney, M.A.J. Rodgers, *Brit.J.Cancer* **1995**, *71*, 727.
- [111] C. Zhou, *J.Photoch.Photobio.B* **1989**, *3*, 299.
- [112] R. Biolo, G. Jori, R. Pratesi, B. Rihter, M.E. Kenney, M.A.J. Rodgers, *Photochem.Photobiol.* **1994**, *59*, 362.
- [113] L.R. Milgrom, F. O'Neill, in 'The Chemistry of Natural Products', Blackie, 2nd ed., New York, 1993, p. 363.
- [114] B.E. Hueger, J.R. Lawter, V.H. Waringrekar, M.C. Cucolo, *U.S. Patent No. 5059619* **1991**.
- [115] T.J. Dougherty, *J.Clin.Laser Med.* **1996**, *14*, 219.
- [116] B.W. Henderson, T.J. Dougherty, *Photochem.Photobiol.* **1995**, *30*, 145.
- [117] E.D. Stenberg, D. Dolphin, C. Brückner, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4151.
- [118] H.I. Pass, *J.Natl.Cancer I.* **1993**, *85*, 443.
- [119] R. Ebermann, G. Alth, M. Kreitner, A. Kubin, *J.Photoch.Photobio.B* **1996**, *36*, 95.
- [120] Q. Peng, J. Moan, J.M. Nesland, *Ultrastruct.Pathol.* **1996**, *20*, 109.
- [121] C. Salet, *Biochimie* **1986**, *68*, 865.
- [122] R.S. Murant, S.L. Gibson, R. Hilt, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 4323.
- [123] S.M. Sharkey, B.C. Wilson, R. Moorehead, G. Singh, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 4994.
- [124] B.W. Henderson, D.A. Bellnier, W.R. Greco, A. Sharma, R.K. Pandey, L.A. Vaughan, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4000.
- [125] T. Tsushida, G. Zheng, R.K. Pandey, W.R. Potter, D.A. Bellnier, B.W. Henderson, *Photochem.Photobiol.* **1997**, *66*, 224.
- [126] D. Kessel, K. Woodburn, B.W. Henderson, C.K. Chang, *Photochem.Photobiol.* **1995**, *62*, 875.
- [127] D. Kessel, Y. Luo, *J.Photoch.Photobio.B* **1998**, *42*, 89.
- [128] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, *Brit.J.Cancer* **1972**, *26*, 239.
- [129] K. Berg, J. Moan, *Photochem.Photobiol.* **1997**, *65*, 403.
- [130] K. Berg, H.B. Steen, J.C. Winkelman, J. Moan, *J.Photoch.Photobio.B* **1992**, *13*, 59.
- [131] J. Moan, E.O. Pettersen, T. Christensen, *Brit.J.Cancer* **1979**, *39*, 398.
- [132] J. Moan, J. McGhie, P.B. Jacobsen, *Photochem.Photobiol.* **1983**, *37*, 599.
- [133] K.G. Specht, M.A.J. Rodgers, *Photochem.Photobiol.* **1990**, *51*, 319.

- [134] J. Moan, T. Christensen, *Photobiochem. Photobiophys.* 1981, 2, 291.
- [135] S.L. Gibson, R.S. Murant, R. Hilt, *Cancer Res.* 1988, 48, 3360.
- [136] J.P. Thomas, A.W. Girotti, *Cancer Res.* 1989, 49, 1682.
- [137] J.P. Reysfman, R. Santus, P. Morliere, E. Kohan, *Photobiochem. Photobiophys.* 1986, 11, 197.
- [138] N. Turro, 'Molecular Photochemistry', Tudor Press, New York, 1965.
- [139] C. Perria, in 'Photodiagnostic and Phototherapeutic Techniques in Medicine', Milano, 1995, p. 45.
- [140] E. Reddi, A. Segalla, G. Jori, A. Cross, *Int. J. Cancer* 1998, 12, 43.
- [141] N. Nagamoto, Y. Saito, S. Ohta, M. Sato, K. Kanma, M. Sagawa, *Am. J. Surg. Pathol.* 1989, 13, 1009.
- [142] E.S. Edell, D.A. Cortese, *Chest* 1992, 102, 1319.
- [143] K. Furuse, M. Fukuoka, H. Kato, T. Horai, K. Kubota, N. Kodama, *J. Clin. Oncol.* 1993, 11, 1852.
- [144] H. Kato, T. Okunaka, H. Shimatani, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 1996, 14, 235.
- [145] G. Jori, *J. Photoch. Photobio. A* 1992, 62, 371.
- [146] A.M. Richter, A.K. Jain, M. Obochi, H. Meadows, A.J. Canaan, J.G. Levy, *Photochem. Photobiol.* 1994, 59, 350.
- [147] C.G. Kannangara, S.P. Gough, P. Bruyant, J.K. Hooker, A. Kalin, D. von Wettstein, *Trends Biochem. Sci.* 1988, 18, 139.
- [148] L. Knorr, H. Lange, *Chem. Ber.* 1902, 35, 2998.
- [149] L.J. Siepker, M. Ford, R. de Hock, S. Kramer, *Biochem. Biophys. Acta* 1987, 913, 349.
- [150] S. Enosawa, A. Ohashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986, 141, 1145.
- [151] F.J. Leeper, *Nat. Prod. Rep.* 1989, 6, 171.
- [152] G. Ksander, G. Bold, R. Lattman, C. Lehmann, T. Fraeh, Y.-B. Xiang, K. Inomata, H.-P. Buser, J. Schreiber, E. Zass, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* 1987, 70, 1115.
- [153] S.S. Bottomley, U. Muller-Eberhard, *Semin. Hematol.* 1988, 25, 282.
- [154] E. Rossi, P.V. Attwood, P. Garcia-Webb, K.A. Costin, *Biochem. Biophys. Acta* 1990, 145, 375.
- [155] K. Rick, S. Srocka, H. Stepp, M. Kriegmair, R.M. Huber, K. Jacob, R. Baumgartner, *J. Photoch. Photobio. B* 1997, 40, 313.

- [156] S. Gronlundpakkanen, K. Makinen, M. Talja, A. Kuusisto, E. Alhava, *J.Photoch.Photobio.B* 1997, 38, 269.
- [157] R. Rotomskis, G. Streckyte, S. Bagdonas, *J.Photoch.Photobio.B* 1997, 39, 167.
- [158] R. Rotomskis, G. Streckyte, S. Bagdonas, *J.Photoch.Photobio.B* 1997, 39, 172.
- [159] I. Georgakoudi, M.G. Nichols, T.H. Foster, *Photochem.Photobiol.* 1997, 65, 135.
- [160] K. König, H. Schnckenburger, A. Rück, R. Striner, *J.Photoch.Photobio.B* 1993, 18, 287.
- [161] R.B. Beenhurzen, F.A. Stewart, *Radiother.Oncol.* 1995, 37, 131.
- [162] E.F. Gudgin Dickson, R.H. Pottier, *J.Photoch.Photobio.B* 1993, 29, 91.
- [163] S.G. Brown, *unpublished results* 1997.
- [164] S.L. Gibson, J.J. Havens, T.H. Foster, R. Hilt, *Photochem.Photobiol.* 1997, 65, 416.
- [165] J.C. Kennedy, R.H. Pottier, D.C. Pross, *J.Photoch.Photobio.B* 1990, 6, 143.
- [166] J.C. Kennedy, S.L. Marcus, R.H. Pottier, *J.Clin.Laser Med.Surg.* 1996, 14, 289.
- [167] Q. Peng, T. Warloe, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, K.E. Giercksky, *Cancer* 1997, 79, 2282.
- [168] B.N. Roy, D.A. Van Vugt, R.L. Leid, *J.Soc.Obstet.Gynaec.Canc.* 1997, 19, 709.
- [169] F.M. Rossi, D.L. Campbell, R.H. Pottier, J.C. Kennedy, E.F. Gudgin Dickson, *Brit.J.Cancer* 1996, 74, 881.
- [170] C.S. Loh, A.J. MacRobert, J. Bedwell, J. Regula, N. Krasner, S.G. Brown, *Brit.J.Cancer* 1993, 68, 41.
- [171] J. Regula, A.J. MacRobert, A. Grochein, G.A. Buonaccorsi, S.M. Thorpe, G.M. Spencer, A.R. Hatfield, S.G. Brown, *Gut* 1995, 36, 67.
- [172] H. Barr, *Int.Photodynam.* 1995, 1, 6.
- [173] D.L. Campbell, E.F. Gudgin Dickson, P.G. Forkert, R.H. Pottier, J.C. Kennedy, *Photochem.Photobiol.* 1997, 62, 676.
- [174] P. Wolf, E. Rieger, H. Derl, *J.Am.Acad.Dermatol.* 1993, 28, 17.
- [175] Z. Malik, H. Lugaci, *Brit.J.Cancer* 1987, 56, 589.
- [176] J. Webber, D. Kessel, D. Fromm, *J.Surg.Res.* 1997, 68, 31.
- [177] K.F. Fan, C. Hopper, P.M. Speight, G.A. Buonaccorsi, A.J. MacRobert, S.G. Brown, *Cancer* 1996, 78, 1374.
- [178] H. Barr, N.A. Shepherd, A. Dix, D.J. Roberts, W.C. Tan, N. Krasner, *Lancet* 1996, 348, 584.

- [179] S.G. Brown, C.E. Millson, *Gut* **1997**, *41*, 5.
- [180] M. Novo, G. Hüttmann, H. Diddens, *J.Photoch.Photobio.B* **1996**, *34*, 143.
- [181] S. Granick, D. Mauzerall, *J.Biol.Chem.* **1958**, *232*, 1119.
- [182] A.R. Butler, S. George, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 7879.
- [183] D.M. Fiedler, P.M. Eckl, B. Krammer, *J.Photoch.Photobio.B* **1996**, *33*, 39.
- [184] M.A. Herman, J. Webber, Y. Luo, V. Patacsil, D. Kessel, D. Fromm, *J.Photoch.Photobio.B* **1997**, *40*, 107.
- [185] R.M. Szeimies, P. Calzavarapinton, S. Karrer, B. Ortel, M. Landthaler, *J.Photoch.Photobio.B* **1996**, *36*, 213.
- [186] J. Webber, D. Kessel, D. Fromm, *J.Photoch.Photobio.B* **1997**, *37*, 151.
- [187] J. Leveckis, J.L. Burn, N.J. Brown, M.W.R. Reed, *J.Urol.* **1990**, *152*, 550.
- [188] J. Kloek, G.M.J.B. Vanhenegouwen, *Photochem.Photobiol.* **1996**, *64*, 994.
- [189] N.M. Nielsen, H. Bundgaard, *J.Pharm.Sci.* **1988**, *77*, 285.
- [190] J. Kloek, W. Akkermans, G.M.J.B. Vanhenegouwen, *Photochem.Photobiol.* **1998**, *67*, 150.
- [191] C.A. Rebeiz, A. Montazer-Zouhoor, H.J. Hopen, S.M. Wu, *Enzyme Microb.Tech.* **1984**, *6*, 390.
- [192] F.R Hopf, D.G. Whitten, in 'The Porphyrins', Ed. D. Dolphin, Academic Press, New York, 1978, p. 161.
- [193] C.S. Foote, in 'Porphyrin Localization and Treatment of Tumors', Ed. A.R. Liss, Academic Press, New York, 1984, p. 3.
- [194] J.R. Mattheis, C.A. Rebeiz, *J.Biol.Chem.* **1977**, *252*, 4022.
- [195] J.R. Mattheis, C.A. Rebeiz, *J.Biol.Chem.* **1977**, *252*, 8347.
- [196] J.R. Mattheis, C.A. Rebeiz, *Photochem.Photobiol.* **1978**, *28*, 55.
- [197] C.A. Rebeiz, J.R. Mattheis, B.B. Smith, C.C. Rebeiz, D.F. Dayton, *Arch.Biochem.Biophys.* **1975**, *171*, 549.
- [198] E.C. Sisler, W. Klein, *Plant Physiol.* **1963**, *16*, 315.
- [199] C.A. Rebeiz, M. Abou Haidar, M. Yaghi, P.A. Castelfranco, *Plant Physiol.* **1970**, *46*, 543.
- [200] C.A. Rebeiz, J.R. Mattheis, B.B. Smith, C.C. Rebeiz, D.F. Dayton, *Arch.Biochem.Biophys.* **1975**, *166*, 446.

- [201] S. Granick, D. Mauzerall, in 'Metabolic Pathways', Ed. D.M. Greenberg, Academic Press, New York, 1961, p. 525.
- [202] C.A. Rebeiz, P.A. Castelfranco, *Annu.Rev.Plant Physiol.* 1973, 24, 129.
- [203] J. Lascelles, in 'Porphyrins and related compounds', Ed. T.W. Goodwin, Academic Press, New York, 1968, p. 49.
- [204] C.A. Rebeiz, J. Lascelles, in 'Photosynthesis : Energy conversion by plants and bacteria', Ed. H. Govindjee, Academic Press, Orlando, 1982, p. 699.
- [205] C.A. Rebeiz, M. Yaghi, M. Abou Haidar, P.A. Castelfranco, *Plant Physiol.* 1970, 46, 57.
- [206] H. Daniell, C.A. Rebeiz, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1982, 104, 837.
- [207] H. Daniell, C.A. Rebeiz, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1982, 106, 466.
- [208] H. Daniell, C.A. Rebeiz, *Biotechnol.Bioeng.* 1984, 26, 481.
- [209] C.A. Rebeiz, J.A. Juvik, C.C. Rebeiz, *Pestic.Biochem.Phys.* 1988, 30, 11.
- [210] C.A. Rebeiz, L.J. Gut, K. Lee, J.A. Juvik, C.C. Rebeiz, C.E. Bouton, *Crit.Rev.Plant Sci.* 1995, 14, 329.
- [211] C.A. Rebeiz, *J.Photoch.Photobio.B* 1993, 18, 97.
- [212] C.A. Rebeiz, J.A. Juvik, C.C. Rebeiz, C.E. Bouton, L.J. Gut, *Pestic.Biochem.Phys.* 1990, 36, 201.
- [213] L.J. Gut, K. Lee, J.A. Juvik, C.C. Rebeiz, C.E. Bouton, C.A. Rebeiz, *Pestic.Sci.* 1993, 39, 19.
- [214] L.J. Gut, K. Lee, J.A. Juvik, C.C. Rebeiz, C.E. Bouton, C.A. Rebeiz, *Pestic.Biochem.Phys.* 1994, 50, 1.
- [215] L.J. Gut, J.A. Juvik, C.A. Rebeiz, in 'Porphyrin Pesticides : Chemistry, Toxicology and Pharmaceutical Applications', Ed. S.O. Duke, C.A. Rebeiz, ACS Symposium Series, Washington, 1994, p. 206.
- [216] K. Lee, C.A. Rebeiz, in 'Light Activated Pesticides', Ed. J.R. Heitz, K.R. Downum, ACS Symposium Series, New York, 1995, p. 152.
- [217] T. Tanaka, K. Takahashi, Y. Hotta, Y. Takeuchi, M. Konnai, *Eur.Pat.Appl.EP 514776* 1992.
- [218] O. Siri, L. Jaquinod, K.M. Smith, *in press* 1999
- [219] R. Lüönd, in 'Untersuchungen zum Enzymmechanismus der  $\delta$ -Aminolävulinsäure Dehydratase aus *Rhodospseudomonas spheroides*', Thèse de l'Université de Fribourg, 1991.

- [220] L.A. Carpino, G.Y. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5478.
- [221] L. Lapsanis, *Synthesis* **1983**, 671.
- [222] S. Kim, Y.C. Kim, J.I. Lee, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 560.
- [223] S.S. Wang, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1235.
- [224] I. Fish, S.A. Schwartz, S. Samuels, *Eur. Pat. Appl. EP 42626* **1981**.
- [225] H. Brechbühler, H. Büchi, E. Hatz, J. Schreiber, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1965**, *48*, 1746.
- [226] P. Wipf, *Synthesis* **1996**, 241.
- [227] K. Barlos, D. Gatos, G. Papaphotiu, W. Schäfer, *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1991**, *38*, 555.
- [228] P. Sieber, B. Iselin, *Helv. Chim. Acta* **1968**, *51*, 622.
- [229] H. Waldmann, S. Gabold, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1997**, 1861.
- [230] P.C. Crofts, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1959**, 3610.
- [231] A. Marti, N. Lange, H. Van den Bergh, D. Sedmera, P. Kucera, *J. Urol.* **1998**, 312.
- [232] G. Wagnières, C. Hadjir, P. Grosjean, D. Braichotte, J.-F. Savary, P. Monnicr, H. Van den Bergh, *in press* **1999**.
- [233] J.M. Gaullier, K. Berg, Q. Peng, H. Anholt, P.K. Selbo, L.W. Ma, J. Moan, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1481.
- [234] Y. Berger, in 'Synthèse et hydrolyse enzymatique d'esters de l'acide  $\delta$ -aminolévulinique en vue de leur utilisation en thérapie photodynamique'. Travail de diplôme de l'Université de Neuchâtel, **1998**.
- [235] P. Uehlinger, in 'Optimalisation de la production de pPIX par des cellules tumorales humaines en culture à partir de l'acide 5-aminolévulinique et de ses esters'. Travail de diplôme de l'Université de Genève, **1999**.
- [236] P. Uehlinger, M. Zellweger, G. Wagnières, L. Juillerat, H. Van den Bergh, N. Lange, *in press* **1999**.
- [237] L. Juillerat-Jeanneret, J.-D. Aubert, P. Leuenberger, *J. Lab. Clin. Med.* **1997**, *130*, 603.
- [238] L. Juillerat-Jeanneret, F. Pinet, M.-F. Hamou, M.-G. Zurich, F. Monnet-Tschudi, *in press* **1999**.
- [239] A. Kienle, M.S. Patterson, *J. Opt. Soc. Am. A* **1997**, *14*, 246.

- 
- [240] T. Glanzmann, C. Hadjur, M. Zellweger, P. Grosjean, M. Forrer, J.-P. Ballini, P. Monnier, H. Van den Bergh, C.K. Lim, G. Wagnières, *Photochem.Photobiol.* **1998**, *67*, 596.
- [241] M. Zellweger, A. Radu, P. Monnier, H. Van den Bergh, G. Wagnières, *in press* **1999**.

---

## ANNEXES

### Historique de la thérapie photodynamique

**1900** Première observation (Raab).

Paranécies + lumière du soleil ==> vie

Paranécies + colorant acridine + nuit ==> vie

Paranécies + colorant acridine + lumière du soleil ==> mort.

**1904** Description (Tappeiner et Jodlbauer)

Invention du terme réaction "photodynamique" pour un système biologique qui requiert de l'oxygène, un photosensibilisateur et de la lumière.

**1910** Hématoporphyrine chez les animaux (Hausmann)

Des souris blanches traitées avec de l'hématoporphyrine (Hp) et exposées à la lumière développent des réactions qui dépendent directement de la quantité de sensibilisateur ou de la quantité de lumière.

**1913** Hématoporphyrine chez l'Homme (Meyer-Betz)

Il s'injecte une certaine quantité d'Hp et démontre ainsi que le produit provoque une hypersensibilité au soleil qui dure environ deux mois et qui entraîne une hyperpigmentation.

**1924** Fluorescence des tumeurs (Policard)

Il observe que certaines tumeurs produisent de la fluorescence lorsqu'elles sont exposées à une lumière proche des UV. Il suppose que cela est dû à la présence de porphyrine endogène.

**1948** Fluorescence de Hp chez les animaux (Figg)

Une injection d'Hp provoque une augmentation de la fluorescence des tumeurs, des noeuds lymphatiques, de tissus préalablement incisés et de placentas de souris enceintes.

**1955** Fluorescence de Hp chez l'Homme (Rasmussen-Taxdal)

Description de la fluorescence des tumeurs de patients traités avec Hp pour des cancers du pénis et du sein entre autres.

**1960** HpD (Lipson et Bilder)

Utilisation d'un dérivé d'hématoporphyrine (HpD) préparé par Schwantz. Ils démontrent également que la réaction d'une souris exposée à la lumière varie en fonction de la quantité d'hématoporphyrine, de la quantité de lumière et du temps écoulé entre l'injection et le moment de l'exposition.

**1961** Etude de la fluorescence endobronchique en présence de HpD (Lipson)

Il étudie la fluorescence des tumeurs endobronchiques sur 15 patients par endoscopie, en se servant de HpD en tant que sensibilisateur.

**1966** Traitement de patients grâce à HpD (Lipson)

Il décrit l'utilisation de dérivés d'hématoporphyrine pour la détection des cancers et traite le premier patient atteint d'un cancer du sein.

**1972** Traitement de tumeurs animales grâce à HpD (Diamond)

Il détruit des tumeurs expérimentales de rats, en leur injectant de l'hématoporphyrine, puis en les exposant à la lumière blanche.

**1976** Traitement d'une tumeur de la vessie grâce à HpD (Kelly et Snell)

Ils utilisent HpD pour traiter un patient atteint d'un cancer de la vessie. 48 heures après le traitement, la surface de la vessie semble intacte, mais plusieurs papillomes sont nécrosés.

**1976 Oxygène singulet (Weisaupt)**

Il démontre que de l'oxygène singulet est produit suite à l'absorption d'énergie lumineuse par HpD et que cela initialise la destruction de la tumeur.

**1978 Traitement de cancer de la peau grâce à HpD (Dougherty)**

Il décrit l'efficacité de la destruction partielle ou totale dans 111 cas sur 113 de lésions cutanées ou sous-cutanées, en traitant les patients par PDT et en utilisant HpD en tant que sensibilisateur.

**1980 Laser réglable (Dougherty)**

Il décrit l'emploi d'un système laser réglable basé sur l'argon et de systèmes en fibre optique pour le traitement de tumeurs malignes à l'aide de la lumière à 630 nm et de HpD.

**1982 LMRF**

Création de la "Laser Medical Research Foundation" pour l'avancement et la recherche dans l'emploi de laser en médecine. Début de la considération de la PDT pour le traitement des cancers.

**1984 DHE (Dougherty)**

Il fractionne HpD et sépare un produit qu'il nomme "dihématoporphyrine éther" (DHE). Ce produit s'est révélé être un bon sensibilisateur, qui est de nos jours couramment utilisé en clinique.

**1986 Analyse du cas de plus de 3000 patients (Dougherty)**

Un compte-rendu des traitements par PDT est établi par Dougherty. Il établit qu'en 1986, plus de 3000 patients ont été traités par cette méthode dans le monde.

**1988 Phase III des tests cliniques**

Quadriologic Technologies™ et Lederle Inc.™ entament la phase III des essais cliniques en utilisant DHE pour traiter des cancers de la vessie, de l'oesophage et des poumons.

# Curriculum vitae

GREPPI Alain

Né le 08.10.1970 à Neuchâtel

Fils de Tamara et Gianfranco Greppi

## Formation

### Avril 1995 - Août 1999

Travail de thèse au sein du groupe du Professeur R. Neier à l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel

Poste d'assistant à l'Université de Neuchâtel

### Octobre 1995 - Avril 1996

Stage pratique chez CIBA-GEIGY A.G. au sein de Département de diversité moléculaire dirigé par M. H. Rink

### Janvier 1994 - Mars 1995

Stage pratique au sein du groupe du Professeur D. Seebach à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Zuerich

### Octobre 1993

Obtention du Diplôme de chimiste à l'Université de Neuchâtel (*mention bien*)

### Juillet 1988

Obtention du baccalauréat et de la Maturité fédérale type C au Gymnase cantonal de Neuchâtel

- 1996** Traitement du cancer de l'oesophage approuvé aux USA par la "Food and Drug Administration" (FDA).
- 1997** Traitement de tumeurs avancées des poumons et de l'oesophage approuvé en France et aux Pays-Bas.
- 1998** Traitement de tumeurs bénignes de nature endobronchique approuvé aux USA par la FDA.