

Université Paris Descartes

Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

Bruno COMMARE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Spécialité Chimie Organique/Médicinale

CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE NOUVEAUX AGONISTES DE RÉCEPTEURS MÉTABOTROPIQUES DU GLUTAMATE

Soutenue le 28 novembre 2014 devant la commission d'examen composée de :

Dr. Bruno Figadère	Université Paris-Sud XI	Rapporteur
Dr. Stephan Schann	Domain Therapeutics, Illkirch	Rapporteur
Pr. Marc Lecouvey	Université Paris XIII	Examineur
Dr. Jean-Philippe Pin	Université de Montpellier	Examineur
Dr. Francine Acher	Université Paris Descartes	Directrice de Thèse
Pr. Françoise Colobert	Université de Strasbourg	Directrice de Thèse
Dr. Frédéric Leroux	Université de Strasbourg	Co-directeur

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Messieurs Bruno Figadère, Stephan Schann, Marc Lecouvey et Jean-Philippe Pin d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pris le temps de lire ce manuscrit.

Je souhaiterais également remercier très chaleureusement mes 3 directeurs de thèse, Mesdames Francine Acher et Françoise Colobert ainsi que Monsieur Frédéric Leroux de m'avoir accueilli dans vos laboratoires respectifs. Votre patience et vos conseils m'ont permis de devenir le jeune chercheur que je suis devenu. Sans vous, je n'aurais jamais pu vivre ces trois belles années et acquérir toutes ces compétences scientifiques et humaines.

Merci à l'école doctorale MTCI pour son financement et pour m'avoir permis de suivre en parallèle de ma thèse un diplôme universitaire en santé biomédicale (IFSBM, Villejuif). Ayant suivi un parcours universitaire purement basé sur la chimie, cette formation m'a permis d'acquérir de nouvelles connaissances à l'interface de la biologie, la pharmacologie et la neuroscience. Ces connaissances ont été très bénéfiques pour mon projet de thèse et le seront sans aucun doute à l'avenir.

Je voudrais remercier Madame Patricia Busca ainsi que tout le comité d'organisation des RCO 2014 pour cette belle expérience et cette belle réussite vécue ensemble.

Je tiens également à remercier tous les professeurs et tous mes superviseurs de stages. C'est aussi grâce à vous que j'en suis arrivé là et particulièrement Catherine André, Cyrille Sabot et Philippe Jubault.

Qui dit codirection, dit deux laboratoires, deux villes, deux fonctionnements différents... et donc beaucoup de personnes côtoyées !

Pour commencer, je tire un grand coup de chapeau à Delphine Rigault qui m'a permis d'appréhender plus facilement et plus rapidement mon projet de thèse et pour tout le travail qu'elle a accompli pendant ces trois années.

J'aimerais remercier tous les chercheurs confirmés que j'ai rencontrés pendant ces trois années de thèse : Nicolas Pietrancosta, Isabelle McCort, Gilles Hanquet, Sabine Choppin, Johanna Wencel-Delort et Armen Panossian. Un Merci particulier à Isabelle pour tout ce que tu as fait pour moi, principalement pour ton hospitalité et ta générosité ainsi que pour tes corrections dans ma partie expérimentale. Et bien sûr Armen... Une très belle rencontre. Nos discussions scientifiques ou non, autour d'un bon café ou devant la distillation de THF furent très constructives. Merci pour ton aide, ta simplicité et ta générosité.

Que serait une thèse sans d'inoubliables collègues de laboratoires... Tout d'abord, un très grand Merci à Nico pour cette excellente année passée en ta compagnie que ce soit au labo, autour d'une bonne bière, pendant notre trail dans les Vosges et surtout sur les terrains de squash. Ensuite, un petit tour sur Paris pour passer un peu de temps avec Franck et Lilian. Merci les gars pour ces bons moments partagés. Et bien sûr, mon acolyte : Boubacar. Merci Bouba pour tous ces moments passés ensemble. Ce fut un immense plaisir de venir au labo le matin pour travailler avec toi, chef du labo 1. Le fait d'entendre ton rire, même depuis la RMN, me redonnait le sourire même dans les instants difficiles. Je n'oublierai aucun des moments passés avec chacun de vous.

Merci à...

Thomas pour ces bons cafés matinaux partagés ensemble. Antonella de m'avoir aidé à contrôler notre cher Bouba pendant quelques mois. Mathieu pour ces bons matchs de squash et la SECO. Laëtitia et Sandy pour vos expériences partagées, j'espère que vous trouverez un poste rapidement. Etienne et Geoffrey pour ces 6 mois de partage et de gaieté au labo 1. Grégory pour ta bonne humeur à longueur de journée. Marie, Anaïs, Florence, Stéphanie, Joséphine, Farah, Mathieu, Younes, Thomas, Assiah, Aurélie, Mickael, Farouk, Laurent, Pierre-Antoine....

Je tiens aussi à remercier mes stagiaires Sylvie, Romain et Rémy pour tout le travail que vous avez accompli.

Merci bien évidemment à tous les autres jeunes chercheurs rencontrés pendant ces trois années de thèse et désolé pour les personnes non citées mais sachez que vous avez tous participé à ces trois années de plaisir.

J'aimerais également remercier tous mes proches qui ont contribué à leur manière à ces trois belles années. Tout d'abord, je voudrais remercier mon frère Fabien, sa compagne Elo et ma magnifique filleule Laly pour tous vos déplacements en Alsace et tous les bons moments passés autour d'un bon pinot gris au Renard Prêchant. Laly, je suis très fier que tu aies fait tes premiers pas le long de l'Ill et très heureux d'avoir pu te voir grandir malgré la distance. Ensuite, je remercie Glat, Amandine et Hugo pour vos nombreuses visites à Strasbourg remplies d'agréables moments qui resteront marqués. Merci aussi à Clémence et à mon neveu, je vous emmènerai visiter cette belle région qu'est l'Alsace. Et je n'oublie pas tous mes proches venus nous rendre visite à Strasbourg et qui, je pense, garderont de très bons souvenirs alsaciens : ma mère, Jacky, Fabienne, Alain, Floriane, Ghislain, Élise, Flavie, Babas, Karelle, Lulu, Jérôme, Sandy, Manon, Evan, Yann, Fabrice, Clémence, Arnaud, Élodie, Denis, Aurélie, Éloïse, Louane, Mic, Hélène, David, Frédéric, Laurence, Loïc, Hélène et Virginie.

Merci à ma mère et Jacky, mon père et Cathy ainsi que mon frère Rémi qui m'ont soutenu au cours de ces trois années.

Un très grand merci à Fabienne et Alain. Sans vous, je n'aurais pas pu être ce que je suis aujourd'hui et mener à bien ce doctorat. Merci pour tout ! Votre soutien, votre hospitalité, vos visites en Alsace,... et pour vos soirées de corrections !

Enfin, je souhaite bien évidemment remercier ma femme Noëllie. Merci de ton soutien tout au long de ces trois années et de m'avoir supporté dans les bons moments comme dans les périodes de doutes, notamment pendant la rédaction. Merci d'être présente à mes côtés et j'espère que nous arriverons à réaliser les projets qui nous tiennent à cœur.

Liste des abréviations et acronymes

ABD : Domaine de liaison de l'agoniste
Ac : Acétyle
AC : Adénylate cyclase
ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine I (Angiotensin I Converting Enzyme)
ACPD : Acide 1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylique
ACPT : Acide 1-aminocyclopentane-1,3,4-tricarboxylique
AIBN : α,α' -azoisobutyronitrile
ALB : aluminium lithium binol
Alk : groupement alkyle
AmiC : protéine liant l'acétamide
AMN082 : *N,N'*-Bis(diphénylméthyl)-1,2-ethanediamine dihydrochloride
AMPA : Acide α -Amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ANPR : Atrial Natriuretic Peptide Receptor
APCPr : Acide 1-amino-2-phosphonométhylcyclopropane carboxylique
aq : aqueux
Ar : Aromatique

BDNF : Brain-derived neurotropic factor
BHE : Barrière hémato-encéphalique
BINOL : 1,1'-Bis(2-naphtol)
Bn : Benzyle
Boc : Tert-butoxycarbonyle
BSA : *N,O*-bis(triméthylsilyl)acétamide
BTSP : Bis(triméthylsilyl)phosphonite
Bu : Butyle

Cbz : *N*-benzyloxycarbonyle
CCI : Chronic Constriction Injury
CCM : Chromatographie sur couche cince
conc : concentré
CPPG : (*R,S*)- α -cyclopropyl-4-phosphonophénylglycine
CRD : Domaine riche en cystéine
CTD : Domaine C-Terminal

DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DCM : Dichlorométhane
DCPG : (*S*)-3,4-dicarboxyphénylglycine
DEAD : Diéthylazodicarboxylate
dia : diastéréomère
DIAD : Diisopropylazodicarboxylate
DIBAL-H : Hydrure de diisobutylaluminium
DIEA : Diisopropylethylamine
DMAP : Diméthylaminopyridine
DMF : Diméthylformamide
DMPT : Desméthylphosphinothricine
DMSO : Diméthylsulfoxyde

EAAT : Excitatory Amino Acid Transporters
EC₅₀ : concentration efficace permettant 50 % de l'activation maximale
ed : excès diastéréoisomérique
EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EPM : Elevated Plus Maze
équiv : équivalent
Et : Éthyle
ESI : Electro-Spray Ionization

GABA : Acide γ -aminobutyrique
GAP : Protéine activant la GTPase
GDP : Guanosine diphosphate
GEA : Groupement électroattracteur
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GP : Globus Pallidus
GTP : Guanosine triphosphate

h : heure
HEK : Human Embryonic Kidney
HMDS : Hexaméthylsilylazane
HMTA : Hexaméthylènetétramine
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography (CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performance)
HPLC-MS : High Pressure Liquid Chromatography coupled to Mass Spectroscopy (Spectrométrie de masse)
HTS : High Throughput Screening

Ibo : Iboténate
IC₅₀ : Concentration permettant 50 % de l'inhibition maximale
ICV : Intra-cérébro-ventriculaire
Récepteur iGlu : Récepteur ionotropique du glutamate
IP : Inositol phosphate
i.p : intrapéritonéale
iPr : isopropyle
IPSC : Inhibitory Post-Synaptic Courant
i.t. : intrathécale
IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

KA : kaïnate
kg : killogramme
KO : Knock-Out

L : ligand
L-APB : Acide L-2-amino-4-phosphorobutyrique
L-AP4 : Acide L-2-amino-4-phosphonobutyrique
LDA : Lithium diisopropyl amidure
LID : L-Dopa Induced Dyskinesia
LIVBP : Leucine Isoleucine Valine Binding Protein
LBP : Leucine Binding Protein
LSP : Laboratoire des Saints-Pères

M : Molaire en mol.L⁻¹
MAP4 : Acide 2-amino-2-méthyl-4-phosphonobutyrique
Me : Méthyle
Men : Mentyle
MeOH : Méthanol
Récepteur mGlu : Récepteur métabotrope du glutamate
min : minute
m.p. : melting point (point de fusion)
MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MS : Mass Spectroscopy

NAM : Modulateur allostérique négatif
NBS : *N*-bromosuccinimide
NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NMDA : *N*-methyl-D-aspartate
NMR : Nuclear Magnetic Resonance
NTD : Domaine N-Terminal

OBD : Domaine de liaison orthostérique
6-OHDA : 6-hydroxydopamine
PAM : Positive Allosteric Modulator
PCEP : Acide 3-amino-3-carboxypropyl-2'-carboxyethyl phosphinique
PDB : Protein Data Bank
pH : potentiel Hydrogène
Ph : Phényle
PivCl : Chlorure de pivaloyle
pKa : Constante d'acidité
PLC : Phospholipase C
PPB : Protéine Périplasmique Bactérienne
PPG : 4-phosphonophénylglycine
ppm : partie par million
p-TSA (ou APTS) : acide *para*-toluènesulfonique

Quis : quisqualate

rac : racémique
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
Rdt : Rendement
Rf : Rapport frontal
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROC : Receiver Operating Characteristic
Rt: Retention time

s : seconde
SAM : Modulateur allostérique silencieux
SAR : Relation structure-activité
sc : subcutané
SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SNc : Substance Noire pars compacta

SNr : Substance Noire pars reticulata
St : Striatum

TBAF : Fluorure de tétra-*n*-butylammonium
TBDPS : *tert*-butyldiphénylsilyle
TFA : Acide trifluoroacétique
TFAA : Anhydride trifluoroacétique
THF : Tétrahydrofurane
TMD : Domaine Transemembranaire
TMS : Triméthylsilyl
 t_R : temps de rétention

UV : Ultra Violet

Veh : véhicule
VFT : Venus FlyTrap
VGLUT : Vesicular GLUtamate Transporters
vHTS : Virtual High Throughput Screening
VP : Pallidum Ventral

WT : Wild Type

Sommaire

Remerciements

Liste des abréviations et acronymes

Sommaire

Introduction générale : Le glutamate au cœur du système nerveux central.....	1
1. Le glutamate.....	2
1.1. De son goût savoureux.....	2
1.2. ... à son rôle de neurotransmetteur.....	2
2. La synapse glutamatergique.....	5
2.1. La transmission de l'information.....	5
2.2. Le cycle du glutamate.....	5
2.3. Les récepteurs du glutamate.....	6
2.3.1. Les récepteurs ionotropiques du glutamate (récepteurs iGlu).....	6
2.3.1.1. Structure des récepteurs iGlu.....	8
2.3.1.2. Fonctionnement des récepteurs iGlu.....	10
2.3.1.3. Localisation des récepteurs iGlu.....	11
2.3.2. Les récepteurs métabotropiques du glutamate (récepteurs mGlu).....	11
3. Caractéristiques structurales et propriétés fonctionnelles des récepteurs métabotropiques du glutamate.....	12
3.1. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	12
3.2. Classe C des RCPG.....	14
3.3. Structure des récepteurs mGlu.....	16
3.4. Activation des récepteurs mGlu.....	17
3.5. Classification des récepteurs mGlu.....	19
3.6. Localisation des récepteurs mGlu.....	20
4. Intérêt thérapeutique des récepteurs métabotropiques du glutamate.....	22
4.1. Des récepteurs ionotropiques aux récepteurs métabotropiques.....	22

4.2. Pharmacologie des récepteurs métabotropiques du glutamate.....	23
4.2.1. Données pharmacologiques du glutamate.....	23
4.2.2. Deux types de ligand.....	25
4.2.3. Ligand orthostérique Vs ligand allostérique.....	28
4.2.4. Pharmacologie des récepteurs mGlu du groupe III.....	29
4.2.5. Bilan et perspectives.....	34
5. Potentiel thérapeutique des récepteurs métabotropiques du glutamate.....	35
5.1. La maladie de Parkinson.....	35
5.2. La douleur.....	38
5.3. L'anxiété et le stress.....	40
5.4. La dépression.....	41
5.5. L'épilepsie.....	42
5.6. L'addiction.....	43
5.7. Autres applications.....	43
5.8. Bilan.....	45
6. Objectifs et présentation de notre approche.....	45
7. Références bibliographiques.....	47
Chapitre I : État de l'art du projet.....	57
I.1. Découverte du (S)-PCEP.....	58
1.1. L-AP4 : un outil très utilisé.....	58
1.2. Utilisation de la chimie informatique.....	59
1.3. Une nouvelle poche d'interaction.....	62
1.4. Sélectivité au sein des récepteurs mGlu du groupe III.....	64
I.2. Du (S)-PCEP au LSP4-2022.....	65
2.1. Objectifs.....	65
2.2. Utilisation des acides phosphiniques et des phosphinates dissymétriques.....	66
2.3. Données bibliographiques : synthèse d'acides phosphiniques et de phosphinates dissymétriques.....	68

2.3.1. Synthèse d'acides H-phosphiniques et de H-phosphinates.....	68
2.3.2. Seconde alkylation de l'atome de phosphore.....	71
2.4. Données bibliographiques : synthèse du (S)-PCEP.....	73
2.5. Développement d'une voie de synthèse.....	75
2.5.1. Synthèse de l'acide H-phosphinique intermédiaire "P-H _{int} ".....	75
2.5.2. Synthèse du (S)-PCEP.....	76
2.5.3. Optimisation de la partie proximale.....	77
2.6. Diversification de la partie distale.....	79
2.6.1. Voie de synthèse générale.....	79
2.6.2. Dérivés linéaires.....	82
2.6.3. Dérivés aromatiques.....	83
2.6.4. Dérivés hétérocycliques.....	86
2.7. Valorisation du LSP1-2111.....	87
2.8. Synthèse du LSP4-2022.....	89
2.9. Valorisation du LSP4-2022.....	91
2.10. Bilan et ouverture vers mes travaux de recherches.....	93
I.3. Références bibliographiques.....	94
Chapitre II : Relation structure-activité autour du LSP4-2022.....	99
II.1. Point de départ de mon doctorat.....	100
II.2. Premières optimisations par Isabelle Lemasson.....	103
II.3. Poursuite de l'optimisation chimique.....	105
II.4. Synthèses de dérivés fluorés du LSP4-2022.....	107
4.1. Pourquoi le fluor ?.....	107
4.2. Synthèse des analogues fluorés du LSP4-2022.....	113
4.3. Synthèse du LSP3-9166.....	114
4.4. Optimisation de la petite poche.....	116
4.5. Synthèse du LSP14-1086.....	123
4.6. Conclusions et perspectives.....	125

II.5. Étude sur la sélectivité mGlu4 vs mGlu7	125
5.1. Importance du groupement nitro.....	126
5.2. Substitution du cycle aromatique par des hétérocycles.....	129
5.2.1. Synthèse de composés triazoles.....	129
5.2.2. Sélectivité pour le récepteur mGlu7 - Synthèse d'imidazoles.....	135
5.2.3. Sélectivité pour le récepteur mGlu4 – Synthèse de pyridines.....	137
5.2.4. Vérification de ces hypothèses par mutagénèse.....	137
II.6. Autres voies d'optimisation	139
6.1. Ligands bitopiques.....	139
6.2. Synthèse du “LSP4-2022 cyclopentène”.....	146
6.2.1. Objectif.....	146
6.2.2. Travaux de synthèse.....	147
6.2.2.1. Synthèse du composé intermédiaire II-55a	148
6.2.2.2. Introduction de la partie phosphorée.....	150
6.2.2.3. Synthèse du “LSP4-2022 cyclopentanone”.....	155
6.2.2.4. Bilan et perspectives.....	158
II.7. Références bibliographiques	160
 Chapitre III : Détermination de la configuration du carbinol stéréogène	165
III.1. Introduction	166
1.1. Contexte de la problématique.....	166
1.2. Importance de la stéréochimie des biomolécules.....	167
1.2.1. La chiralité : un outil essentiel.....	167
1.2.2. Activités biologiques différentes.....	168
III.2. Résultats préliminaires	169
2.1. Introduction d'un troisième centre asymétrique.....	169
2.2. Méthode analytique : HPLC Crownpak.....	170
2.2.1. Chiral Technologies.....	170
2.2.2. Séparation des diastéréomères du LSP1-2093 au laboratoire.....	174

2.2.3. Applications à d'autres composés.....	176
2.2.4. Activités biologiques.....	177
2.2.5. Bilan de cette méthode.....	178
2.3. Autres stratégies.....	179
2.4. Bilan des résultats préliminaires.....	182
III.3. Attribution de la configuration absolue du carbinol benzylique.....	183
3.1. Données bibliographiques.....	183
3.2. Attribution de la configuration absolue du carbinol benzylique de l'acide α -hydroxyle -H-phosphinique III-4a par cristallographie aux rayons X.....	186
3.3. Détermination de la pureté énantiomérique de III-4a et III-4b	188
3.4. Corrélation des configurations absolues trouvées avec la littérature.....	191
III.4. Introduction du synthon « acide aminé ».....	193
4.1. Seconde alkylation du phosphore par voie radicalaire.....	193
4.2. Substitution nucléophile de l'iodure de l'homosérine par l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique III-4	195
4.2.1. Synthèse de l'électrophile dérivé de l'homosérine.....	195
4.2.2. Substitution nucléophile de III-14	196
4.3. Utilisation de la copule de Schöllkopf.....	199
4.4. Addition de l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique III-4 sur un acrylate et réduction en aldéhyde.....	200
4.5. Addition de l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique III-4 sur l'acrylonitrile et réduction en aldéhyde.....	202
4.6. Addition de l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique III-4 sur l'acrylamide de Weinreb et réduction en aldéhyde.....	204
4.7. Bilan et choix d'une nouvelle stratégie.....	206
4.8. Protection des fonctions acide phosphinique et hydroxyle.....	206
III.5. Synthèse du LSP1-2093 à partir du III-4 protégé.....	210
5.1. Seconde alkylation de l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique protégé sur l'iodure de l'homosérine.....	210

5.2. Couplage avec l'acrylamide de Weinreb puis réduction en aldéhyde.....	213
5.3. Réaction de Strecker.....	216
5.3.1. Données bibliographiques.....	216
5.3.2. Réaction de Strecker asymétrique sur l'aldéhyde III-38	223
5.4. Déprotection et hydrolyse de l'adduit de Strecker III-41	226
5.5. Analyse par HPLC chirale Crownpak CR(+) du composé III-44	229
III.6. Application de la voie de synthèse développée aux deux énantiomères III-4a et III-4b	
6.1. Protection des deux énantiomères III-4a et III-4b	231
6.2. Obtention de l'aldéhyde, précurseur d'acide aminé.....	232
6.3. Réaction de Strecker.....	232
6.4. Obtention des deux composés finaux III-44a et III-44b	233
6.5. Analyse de III-44a et b par HPLC Crownpak CR(+).....	234
III.7. Conclusion et perspectives	237
III.8. Références bibliographiques	239
Conclusion générale	245
Experimental part	249
<u>General remarks</u>	250
<u>General procedures</u>	253
Chapter II : Structure-activity relationship of LSP4-2022	255
Chapter III : Determination of stereogenic carbinol configuration	297
Résumé/Summary	335

Introduction générale : Le glutamate au cœur du système nerveux central

Introduction générale : Le glutamate au cœur du système nerveux central

1. Le glutamate

1.1. De son goût savoureux...

L'acide glutamique, ou glutamate, est l'un des vingt acides aminés qui constituent les protéines (Figure 1). Il fut découvert en 1866 par le chimiste allemand Karl Heinrich Leopold Ritthausen. Ce n'est qu'au début du XX^e siècle que l'acide glutamique prend de l'ampleur suite aux expériences menées par le Professeur japonais nommé Kikunae Ikeda à l'Université Impériale de Tokyo. Il prénomme le glutamate « umami » et le présente comme exhausteur de goût s'additionnant aux goûts salé, sucré, amer et acide.^{1,2}

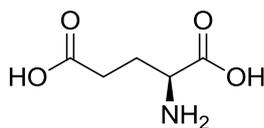


Figure 1 L'acide glutamique

1.2. ... à son rôle de neurotransmetteur

Bien qu'il était connu depuis les années 1930 que le glutamate était présent dans le cerveau à forte concentration,³ il a fallu plus de temps pour découvrir que le glutamate possédait des propriétés de neurotransmetteur. Effectivement, au début, le glutamate était considéré seulement comme acteur majeur dans la métabolisation.⁴ Il est vrai que le glutamate, constituant de certaines protéines, est un produit issu de la transamination de l' α -cétoglutarate lors du cycle de Krebs.⁵

Jusqu'au début du XX^e siècle, la transmission de l'influx nerveux était encore supposée comme exclusivement électrique. Ce n'est qu'en 1921, que la première neurotransmission chimique fut mise en évidence par Otto Loewi (Prix Nobel 1936 de physiologie ou médecine, conjointement à Henry Hallett Dale). Il découvre, au niveau des terminaisons nerveuses, que la transmission de l'information se faisait par voie chimique (Figure 2). L'expérience célèbre des deux cœurs de grenouille isolés, placés sur un même circuit de perfusion lui a permis de démontrer l'existence d'un médiateur chimique issu du premier cœur (stimulé électriquement) et agissant sur le second

cœur pour en ralentir le rythme (la légende raconte qu'il a eu l'idée de l'expérience dans un rêve et qu'il a couru au laboratoire dès qu'il était éveillé).

Figure 2 Otto Loewi et l'expérience des deux cœurs de grenouille

Malgré ces résultats préliminaires, beaucoup de scientifiques hésitaient encore sur l'existence ou non d'une transmission chimique au niveau des extrémités nerveuses. Cette idée sera vérifiée à partir des années 1950 par Sir Carex Eccles en étudiant la jonction neuromusculaire, la synapse entre les neurones moteurs spécialisés et les muscles avec des électrodes intracellulaires (Figure 3). Il a découvert que les petites fluctuations dans le potentiel de membrane de base, enregistrées à la jonction neuromusculaire, étaient dues à la libération aléatoire des vésicules synaptiques contenant de l'acétylcholine. Ce dernier était identifié comme le premier neurotransmetteur.⁶

Figure 3 Sir John Carew Eccles

Sa découverte fut confirmée en 1954 en découvrant que l'acétylcholine était libérée lors de l'inhibition de synapses cholinergiques sur des motoneurones.⁷ Cependant, les tests pharmacologiques ont montré que l'acétylcholine ne pouvait pas être l'agent majoritaire

responsable de l'inhibition ou de l'excitation des synapses neuronales situées dans la moelle épinière. Après avoir prouvé que le GABA était le principal intervenant lors des actions inhibitrices synaptiques,⁸ Curtis, Watkins et Phillis, trois étudiants du groupe de recherche australien d'Eccles ont découvert que le glutamate, ainsi que d'autres acides aminés, étaient quand à lui responsable de l'activité excitatrice synaptique.^{9,10} Ces travaux ont alors constitué une base de travail primordiale sur lesquelles plusieurs groupes de recherche ont travaillé et c'est à partir des années 1970 que le glutamate fut reconnu comme le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux chez les vertébrés.

Le glutamate est extrêmement présent au niveau du cerveau avec une concentration de 5 à 15 mmol/kg dont la majorité se situe dans les neurones. Effectivement, sa concentration cytoplasmique neuronale est de 5 à 10 mM. Elle est sept fois plus forte que n'importe quel acide aminé et deux à trois fois plus élevée au niveau des axones par rapport au corps cellulaire du neurone.¹¹ Le glutamate est formé dans les mitochondries des neurones de deux façons : soit il est obtenu sous l'action de la glutamate synthétase sur la glutamine, soit par transamination à partir de l' α -cétoglutarate lors du cycle de Krebs (Schéma 1).

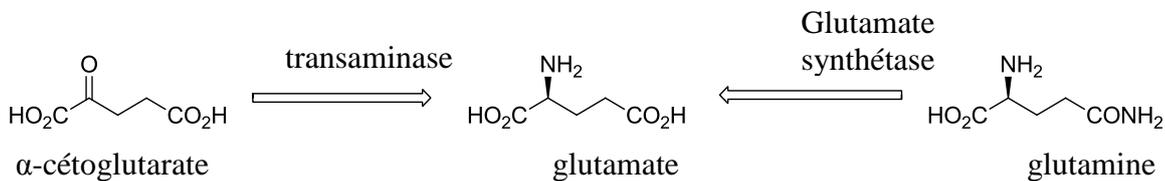


Schéma 1 Biosynthèses du glutamate

Cet acide aminé joue un rôle physiologique indispensable car il est responsable de la majorité des transmissions synaptiques excitatrices et donc du transfert rapide de l'information nerveuse. Il est impliqué dans différentes fonctions neurologiques telles que la mémoire, l'apprentissage, le comportement, le mouvement ou encore la sensation.¹² A l'inverse, il est aussi à l'origine de plusieurs pathologies du système nerveux central, principalement liées à des concentrations excessives de glutamate au niveau des synapses nerveuses qui entraînent une excitotoxicité.¹³ C'est le cas lors d'un accident vasculaire cérébral de type ischémie. Lors de l'occlusion d'une artère cérébrale, le cerveau est partiellement privé d'oxygène et de glucose. Ce manque va induire une dépolarisation massive des neurones qui vont libérer une dose de glutamate extrêmement élevée qui va alors suractiver les récepteurs du glutamate. Cela engendre par la suite une augmentation du taux de calcium intracellulaire et donc la mort des neurones.¹⁴ Il est

donc très important que les neurotransmetteurs et notamment le glutamate soient toujours en équilibre.

2. La synapse glutamatergique

2.1. La transmission de l'information

La diffusion de l'information entre deux neurones peut s'effectuer de deux façons ; soit par transmission électrique ou soit par transmission chimique. La première consiste en un signal électrique qui se propage d'un neurone à l'autre via une jonction communicante (synapse électrique) entre les 2 neurones mis en jeu. Cette jonction est formée de molécules transmembranaires, les connexines. Six molécules de connexines assemblées en cylindre forment un hémi-canal nommé connexon. L'aboutement de deux connexons conduit à la formation d'un canal tubulaire qui traverse l'espace intercellulaire. Les neurones peuvent également communiquer à d'autres neurones ou effecteurs (cellules musculaires) à travers une synapse chimique. Cette dernière correspond à l'espace inter contacte entre deux neurones ; un neurone présynaptique et un neurone postsynaptique. L'information est transmise grâce aux neurotransmetteurs tels que le glutamate.

2.2. Le cycle du glutamate

Au niveau du neurone présynaptique, les molécules de glutamate sont stockées dans des vésicules (avec une concentration moyenne de 100 mM).¹² Ces vésicules vont migrer jusqu'à l'extrémité du neurone sous l'action du signal électrique. Les membranes vésiculaires peuvent alors fusionner avec la membrane neuronale pour libérer le glutamate dans l'espace synaptique qui va pouvoir activer deux types de récepteurs : les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGlu) et les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGlu). Les propriétés de ces deux types de récepteurs seront relatées dans le paragraphe suivant. Le glutamate est également capté dans les cellules gliales par l'intermédiaire des transporteurs d'acides aminés excitateurs EAAT (Excitatory Amino Acids Transporters). Au niveau de ces cellules, le glutamate est recyclé en glutamine subissant l'action de la glutamine synthétase. Cette glutamine est réintroduite dans le neurone présynaptique à l'aide de transporteurs de glutamine puis convertie en glutamate par l'action de la glutamate synthétase. Le neurotransmetteur est alors réintroduit dans les vésicules de stockage via les transporteurs de glutamate VGLUT (Vesicular GLUtamate Transporters).

Glu : glutamate, Gln : glutamine ; VGLUT : Vesicular GLutamate Transporters ;
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor ;
AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid ; NMDA : N-methyl-
(D)-aspartate; mGluR : metabotropic glutamate receptor ; BDNF : Brain-derived
neurotropic factor

Figure 4 Schéma simplifié d'une synapse glutamatergique¹⁵

2.3. Les récepteurs du glutamate

2.3.1. Les récepteurs ionotropiques du glutamate (récepteurs iGlu)

Les récepteurs ionotropiques ont été les premiers récepteurs du glutamate à avoir été identifiés et clonés¹⁶. Ces récepteurs ont été découverts dans les années 1980 et ont été nommés d'après leurs agonistes sélectifs¹⁷. Il s'agit des récepteurs NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate), AMPA (acide (*S*)- α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique) et kaïnate (Figure 5). Les récepteurs AMPA et kaïnate sont souvent regroupés sous l'appellation de récepteurs « non-NMDA ».

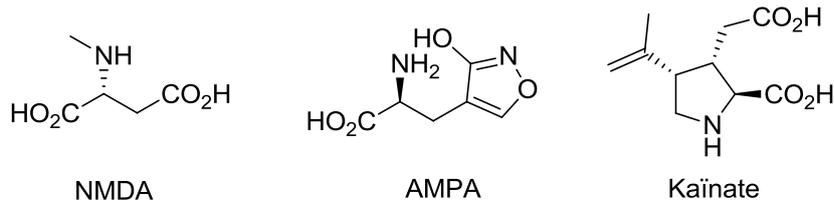


Figure 5 Agonistes éponymes des récepteurs iGlu

Les récepteurs ionotropiques du glutamate sont responsables de la transmission synaptique excitatrice rapide. Ce sont des récepteurs canaux transmembranaires perméables aux cations, principalement au Na^+ , au K^+ et pour certains au Ca^{2+} .^{18,19} L'activation des récepteurs iGlu est donc à l'origine d'un flux ionique à travers la membrane plasmique du neurone postsynaptique qui provoque sa dépolarisation et peut ainsi permettre l'initiation de potentiels d'action. Leurs cinétiques d'activation sont assez élevées pour répondre à une libération brève de glutamate dans la synapse, par exemple lors d'une fusion vésiculaire unique. Dans ce cas, les 5000 molécules de glutamate contenues dans une vésicule donnent lieu, en à peine 1 μs , à un pic de concentration d'environ 1 mM sous le site de libération. Toutefois, cette concentration n'est atteinte que très transitoirement. En effet, le glutamate diffuse rapidement hors de la fente synaptique, avec un temps caractéristique d'environ 1 ms.^{20,21}

Les récepteurs iGlu peuvent être activés par deux cinétiques distinctes. Les récepteurs non-NMDA s'activent et s'inactivent avec des temps caractéristiques inférieurs à la milliseconde. Ces propriétés leur permettent d'effectuer un codage rapide de l'information, c'est à dire de suivre des trains de potentiels d'action qui donnent lieu à des libérations de glutamate séparées par des temps de l'ordre de 10 ms. A l'opposé, les récepteurs NMDA présentent des cinétiques bien plus lentes. Cette lenteur reflète un temps de résidence élevé du glutamate sur les récepteurs NMDA et leur permet de jouer le rôle de détecteur de coïncidence entre excitation des éléments pré et post-synaptiques. Les récepteurs NMDA sont très affins pour le glutamate ($\text{EC}_{50} \sim 1 \mu\text{M}$), près de cent fois plus que les récepteurs AMPA ($\text{EC}_{50} \sim 100 \mu\text{M}$).^{20,22} Nous pouvons noter que ces affinités sont faibles par rapport à d'autres neurotransmetteurs ($\text{EC}_{50} \sim \text{nM}$).

2.3.1.1. Structure des récepteurs iGlu

Les études de clonage, initié par Hollmann *et al.*¹⁶, ont permis d'améliorer les connaissances sur ces récepteurs. Il existe quatre grandes familles de récepteurs ionotropiques du glutamate (Figure 6) ; les récepteurs NMDA, AMPA, kaïnate et delta. Ces derniers sont un peu moins connus à ce jour.

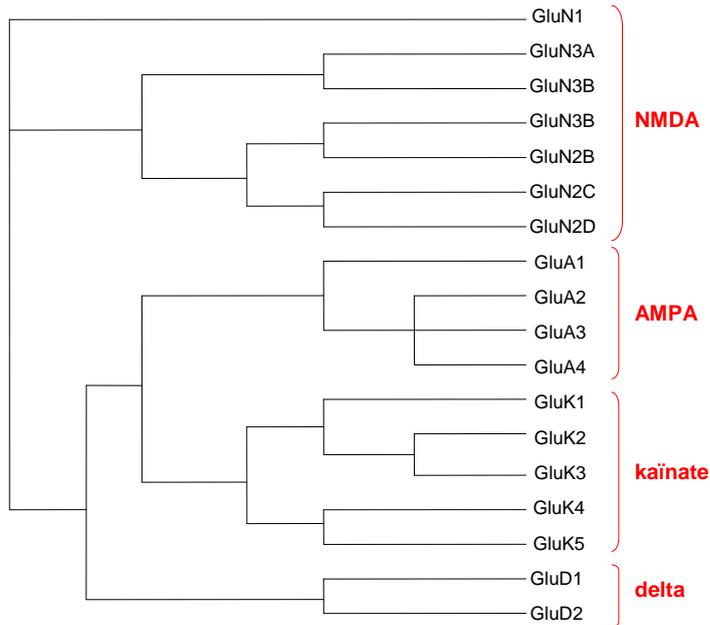


Figure 6 Arbre phylogénétique des récepteurs iGlu²³

Ces récepteurs canaux sont des complexes tétramériques²⁴ composés de plusieurs sous-unités. Malgré leur diversité phylogénétique toutes les sous-unités des récepteurs iGlu partagent une même architecture moléculaire. Effectivement, ils sont composés de quatre grands domaines (Figure 7):

- Un domaine N-terminal extracellulaire large (NTD ou ATD)
- Le site de liaison des agonistes (domaine extracellulaire très large ABD ou LBD)
- La partie transmembranaire (TMD) qui forme le canal ionique
- Un domaine C-terminal intracellulaire (CTD) qui est impliqué dans le trafic et l'ancrage des récepteurs à la synapse

NTD : Domaine N-Terminal ; ABD : Domaine de liaison de l'agoniste ; TMD : Domaine Transmembranaire ; CTD : Domaine C-Terminal

Figure 7 Structure monomérique des récepteurs iGlu

Des études cristallographiques récentes ont montré que les récepteurs iGlu fonctionneraient plutôt en dimères de dimères (Figure 8).^{25,26}

Figure 8 Assemblage de plusieurs iGluR²⁶

2.3.1.2. Fonctionnement des récepteurs iGlu

La liaison des agonistes dans la crevasse interlobe de chaque ABD provoque la fermeture de ces derniers et donc l'écartement des deux lobes adjacents inférieurs. Cette séparation a de fortes conséquences sur le domaine transmembranaire car il est directement relié à ces deux lobes inférieurs. Cela se traduit par l'ouverture du canal ionique (Figure 9).

ATD : Domaine N-Terminal ; LBD : Domaine de liaison du ligand ; TMD : Domaine TransMembranaire ; CTD : Domaine C-Terminal

Figure 9 Activation des récepteurs iGlu²⁷

Cependant, en cas d'interaction chronique avec le glutamate (ou d'autres agonistes), les récepteurs iGlu peuvent subir une dépolarisation totale, c'est-à-dire que le canal ionique se ferme et que l'activité du glutamate est totalement inhibée.^{28,29} Cette désensibilisation peut-être bénéfique dans certaines pathologies telle que l'ischémie cérébrale, durant laquelle la concentration de glutamate au niveau de la synapse augmente très rapidement (Figure 10).^{30,31}

Figure 10 Désensibilisation du récepteur³²

Hansen *et al.*,³³ ont montré cette activation et cette désensibilisation par cristallographie (Figure 11). Nous pouvons facilement observer les différentes distances entre les lobes inférieurs des deux ABD selon l'état d'activation du récepteur.

Figure 11 Structure cristallographique des trois états des récepteurs iGlu^{33,34}

2.3.1.3. Localisation des récepteurs iGlu

Les récepteurs ionotropiques du glutamate sont omniprésents dans tout le système nerveux, central et périphérique. Au niveau de la synapse, ils sont essentiellement situés sur les neurones postsynaptiques. Cependant, il existe des récepteurs iGlu présynaptiques qui régulent la quantité de glutamate au niveau de la synapse, s'ajoutant à l'activité des récepteurs mGlu.³⁵

2.3.2. Les récepteurs métabotropiques du glutamate (récepteurs mGlu)

Ces récepteurs ont été découverts et étudiés plus tardivement par le fait qu'ils jouent un rôle de modulateur de la transmission synaptique en parallèle de l'action des récepteurs iGlu. Ces récepteurs ont été initiés par Sladeczek *et al.* qui ont montré que le glutamate était capable d'activer la phospholipase C (PLC) via un autre récepteur que les récepteurs iGlu.³⁶ Peu après, ces résultats ont également été observés dans d'autres régions du cerveau.³⁷⁻⁴⁰ De plus, en 1984, un analogue phosphonate, le L-AP4 fut découvert en tant que ligand d'un nouveau récepteur de glutamate.⁴¹ Ces expériences signifient bien que le glutamate est capable d'activer d'autres récepteurs que les récepteurs iGlu.⁴² Ces nouveaux récepteurs sont intitulés récepteurs métabotropiques du glutamate. Les propriétés de ces récepteurs sont expliquées dans le paragraphe suivant.

3. Caractéristiques structurales et propriétés fonctionnelles des récepteurs métabotropiques du glutamate

3.1. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Propriétés générales des RCPG

Figure 12 Structure générale des RCPG⁴³

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de protéines membranaires dans le génome humain avec près de 800 gènes codant pour ce type de récepteur.⁴⁴ Ces récepteurs permettent la transmission de l'information intracellulaire et peuvent être stimulés par de nombreux ligands différents tels que des protéines, des petites molécules (acides aminés, ligands exogènes), des hormones, des ions, des odeurs ou même des rayons lumineux. Cette activation par différents agents est due à la forte diversité de ces récepteurs au cours de l'évolution et les RCPG représentent aujourd'hui la majorité des cibles thérapeutiques avec 30 à 50 % de médicaments visant directement ces récepteurs (ou bien le mécanisme d'action serait associé à un RCPG).⁴⁵⁻⁴⁸ En 2000, environ 150 médicaments agissant sur les

RCPG représentaient 26% des meilleures ventes, soit une somme de 23,5 milliards de dollars. De plus, seuls 20 des ~750 RCPG sont ciblés par ces 150 médicaments.^{49,50} A partir de 2008, 5 des 15 médicaments génériques⁵¹ et 7 des 15 médicaments prescrits⁵² les plus vendus au monde ciblent les RCPG. Tous ces chiffres sont très explicites et prouvent que l'étude de ces récepteurs a des enjeux considérables. Malgré la grande diversité des RCPG, leur structure de base reste commune. Effectivement, ces récepteurs se caractérisent par trois grandes parties : un domaine N-terminal extracellulaire, un domaine transmembranaire comprenant 7 hélices hélicoïdales et un domaine C-terminal intracellulaire. L'activation de ces récepteurs par un ligand extracellulaire engendre un changement de conformation du récepteur. Cette modification permet l'activation des protéines G reliées au récepteur qui vont interagir avec différents effecteurs secondaires intracellulaires.⁵³

Les protéines G

Les protéines G constituent un élément essentiel entre les RCPG et les effecteurs secondaires. Elles sont composées de trois sous-unités α , β et γ . Au repos, les 3 sous-unités sont associées entre-elles et l'unité α est liée à une molécule de GDP. L'activation du récepteur induit le remplacement de la molécule de GDP par une molécule de GTP. Cette dernière active alors la protéine $G\alpha$ ce qui va engendrer la séparation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. Ces deux complexes $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$ peuvent alors réguler différents effecteurs. Enfin, l'activité GTPase de la sous-unité α hydrolyse le GTP ce qui entraîne la réassociation des sous-unités de la protéine G.⁵⁴ Tant que le récepteur est activé par son ligand, et tant que le système ne subit pas une désensibilisation, le cycle d'échange du GDP par du GTP continue (Figure 13). Il existe une grande diversité de protéines $G\alpha$ classées en 4 grandes catégories. Ces familles ont été constituées en fonction des effecteurs régulés par ces protéines $G\alpha$. Les $G_q\alpha$ activent la phospholipase C (PLC) ce qui induit par la suite une production d'inositol triphosphate (IP_3) puis la libération de calcium intracellulaire. Les $G_s\alpha$ activent l'adénylate cyclase (AC) qui catalyse la réaction de formation de l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) qui elle-même est responsable de l'activation de la protéine kinase A (PKA) capable de phosphoryler différents substrats protéiques. A l'inverse, les $G_{i/o}\alpha$ inhibent l'adénylate cyclase (AC) et toute la voie de signalisation qui en découle. Enfin, les $G_{12/13}\alpha$ activent la GMPc (Guanosine MonoPhosphate cyclique)phosphodostérase qui est l'enzyme spécifique qui catalyse la formation de GMPc à partir du GTP.⁵⁵

Figure 13 Activation des protéines G⁵⁶

3.2. Classe C des RCPG

Après avoir découvert l'existence de nouveaux récepteurs de glutamate dans les années 1980, il était important d'identifier leur type de récepteur. Le premier récepteur mGlu fut cloné en 1991 par deux groupes de recherche.^{57,58} Il fut nommé mGlu1 étant le premier récepteur mGlu découvert. Entre 1992 et 1994, les caractéristiques du récepteur mGlu1 ont été utilisées pour cloner les sept autres récepteurs mGlu qui sont numérotés de 1 à 8 en fonction de leur ordre de découverte.⁵⁹⁻⁶⁴ Nous verrons un peu plus tard dans ce manuscrit que les 8 récepteurs mGlu sont classés en trois groupes élaborés non pas sur leur numérotation mais plutôt sur identité de séquence primaire et leurs caractéristiques pharmacologiques qui ont été effectuées après le clonage. Il a été montré que l'activation du récepteur mGlu1 induisait toute une cascade biochimique engendrée par l'activation de protéines G et la formation d'IP₃. Ces résultats étant également observés chez les autres récepteurs mGlu, il était donc évident que les récepteurs mGlu étaient des récepteurs couplés aux protéines G. Cependant, la séquence primaire de ces 8 nouveaux récepteurs est plus longue avec notamment un domaine N-terminal extracellulaire conséquent (500 à 600 acides aminés) et ne possède presque aucune analogie avec les séquences des autres RCPG connus. Cela signifie que les récepteurs métabotropiques du glutamate constituent une nouvelle famille de RCPG, la famille C, à laquelle seront ajoutés par la suite les récepteurs GABA_B, des récepteurs du goût, des récepteurs de phéromones et le senseur calcique (Figure 14).⁶⁵

Figure 14 Arbre phylogénétique des RCPG de la classe C⁶⁶

Il existe donc trois familles de RCPG. Les classes A et B sont structurées de la même manière. On retrouve un domaine N-terminal extracellulaire assez petit et le site de liaison du ligand se situe au niveau du domaine transmembranaire. En un coup d'œil, on voit très vite la différence de la classe C par rapport aux deux autres. Le domaine N-terminal extracellulaire est beaucoup plus conséquent.

Figure 15 Les trois classes des RCPG⁶⁷

3.3. Structure des récepteurs mGlu

Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe précédent, la différence majeure entre la classe C et les classes A et B des RCPG se situe au niveau du domaine extracellulaire. C'est au niveau de ce domaine, composé d'environ 500 résidus, que le glutamate se lie. O'Hara *et al.*⁶⁸ ont identifié une faible homologie de séquence entre le domaine extracellulaire de cinq récepteurs mGlu (mGlu1 à mGlu5) et les Protéines Périplasmiques Bactériennes (PPB) dont la structure tridimensionnelle avait déjà été décrite⁶⁹ et plus particulièrement les protéines LBP (Leu Binding Protein) et LIVBP (Leu-Ile-Val Binding Protein). Nous détaillerons les caractéristiques du site de liaison dans le paragraphe **I.1.2**. Ces PPB sont constituées de deux lobes qui se replient l'un vers l'autre reliés par une charnière. Ce mécanisme de repliement fut assimilé au mécanisme d'action de la plante carnivore Venus de Dionée pour capturer ses proies. Le domaine de liaison du glutamate fut alors baptisé Venus FlyTrap domain (VFT). Ce domaine extracellulaire est relié au domaine transmembranaire par l'intermédiaire d'un domaine riche en cystéine (CRD) de 70 résidus environ.⁷⁰ Les sept hélices heptahélicoïdales transmembranaires possèdent très peu de similarités avec les RCPG de la classe A (Rhodopsine)⁷¹ et sont reliées au domaine C-terminal intracellulaire. Il a été prouvé que ce sont les deux boucles intracellulaires i2 et i3 ainsi que la partie C-terminale intracellulaire qui permettent de réguler les protéines G.^{72,73}

De plus, deux sites de liaison sont possibles sur ce type de récepteur ; un site de liaison orthostérique ou site du glutamate qui se situe au niveau de ce domaine extracellulaire et un site allostérique localisé au niveau du domaine transmembranaire.⁴⁸

OBD : Domaine de liaison orthostérique ; PAM : Modulateur allostérique positif ;
NAM : Modulateur allostérique négatif ; SAM : Modulateur allostérique silencieux

Figure 16 Structure des récepteurs mGlu sous forme de monomère⁴⁸

3.4. Activation des récepteurs mGlu

L'activation des récepteurs mGlu se produit, comme pour tous les RCPG de la classe C, lorsque le glutamate (ou autres ligands) vient interagir avec le site de liaison VFT. Cependant, des premières études ont prouvé que les récepteurs métabotropiques du glutamate étaient non pas sous forme de monomère mais plutôt de dimère. Effectivement, Romano *et al.* ont montré, par électrophorèse, que les récepteurs mGlu étaient observés avec une masse deux fois supérieure à leur masse théorique.⁷⁴ Le dimère serait lié par un pont disulfure⁷⁵ ou alors par simple interaction hydrophobe entre les domaines extracellulaires.⁷⁶ Tous ces résultats ont été prouvés par cristallographie du domaine extracellulaire de différents récepteurs mGlu (Kunishima *et al.*,⁷⁷ Tsuchiya *et al.*,⁷⁸ Muto *et al.*⁷⁰).

Figure 17 Structure et activation des récepteurs mGlu sous forme de dimère²⁷

Les récepteurs mGlu se présentent donc sous forme de dimère. Nous pouvons alors se demander combien d'agonistes faut-il pour activer le récepteur? Un ou deux?

Figure 18 Trois états d'activation des récepteurs mGlu⁷¹

Pour répondre à cette question, des études menées⁷⁹ sur des récepteurs hétérodimériques (mGlu5) ont prouvé que la présence d'un seul agoniste et par conséquent que la fermeture d'un seul VFT sur deux était suffisant pour activer le récepteur, mais pas complètement. Pour être totalement activé, les deux VFT doivent-êtré fermés (Figure 18). Cependant, pour stabiliser l'état (fermé-fermé), la présence d'un cation Gd^{3+} est nécessaire. En effet, en absence de cet ion, il se produit une interaction électrostatique entre les deux lobes inférieurs de chaque monomère qui déstabilise totalement la forme activée.^{78,66} De plus, l'introduction d'un pont disulfure entre les deux CRD des deux monomères permet de stabiliser la forme fermé-fermé.⁸⁰

3.5. Classification des récepteurs mGlu

La classification des récepteurs mGlu est établie selon leur identité de séquence primaire.⁴² Les huit récepteurs métabotropiques du glutamate partagent environ 40% de leur identité pour former trois groupes partageant eux 70% de similitude. Le groupe I comprend les récepteurs mGlu1 et mGlu5, le groupe II est composé des récepteurs mGlu2 et mGlu3 et le groupe III est formé par les quatre derniers, c'est-à-dire les récepteurs mGlu4, mGlu6, mGlu7 et mGlu8 (Figure 19).

Figure 19 Classification des récepteurs mGlu selon leur identité de séquence^{81,82}

Cette classification prend aussi en compte un deuxième facteur : le mode de transduction. En effet, les récepteurs du groupe I sont couplés à la protéine G_q et vont activer la phospholipase C (Figure 20) alors que les récepteurs des groupes II et III sont couplés à la protéine G_i et inhibent l'adénylate cyclase (Figure 21).⁸³

Figure 20 Voie de transduction des récepteurs mGlu du groupe I⁸³

Figure 21 Voie de transduction des récepteurs mGlu des groupes II et III⁸³

3.6. Localisation des récepteurs mGlu

Les récepteurs métabotropiques du glutamate sont très largement distribués dans le système nerveux central. De plus, les récepteurs mGlu jouent un rôle de régulateur de la quantité de glutamate libérée dans la synapse ; ils vont donc pouvoir moduler la transmission synaptique. Par conséquent, ces récepteurs vont être répartis de part et d'autre de la synapse, c'est-à-dire que nous allons retrouver des récepteurs mGlu présynaptiques et d'autres postsynaptiques (Tableau 1). Récemment, Atwood *et al.* ont décrit plus précisément le mécanisme d'inhibition de la transmission synaptique en activant les récepteurs mGlu présynaptiques. En effet, l'activation de ces derniers permet de diminuer la quantité de glutamate libérée dans la synapse et ainsi de rétablir l'équilibre en cas de surconcentration en glutamate (par exemple en cas d'ischémie).⁸⁴

Tableau 1 Localisation des récepteurs mGlu⁸⁵

Récepteur	Localisation
mGlu1	Majoritairement post synaptique ; Synapses Glu et GABA Omniprésence dans le cerveau
mGlu5	Majoritairement post synaptique ; Synapses Glu et GABA et cellules gliales Omniprésence dans le cerveau
mGlu2	Pré et post synaptique ; Synapses Glu et GABA Présence minime dans le cerveau
mGlu3	Majoritairement post synaptique ; Synapses Glu et GABA et cellules gliales Omniprésence dans le cerveau
mGlu4	Majoritairement pré synaptique ; Synapses Glu et GABA Présence importante dans Globus Pallidus (GP) et le Pallidum Ventral (VP) ⁸⁶
mGlu6	Majoritairement dans la rétine ; Absence quasiment totale du cerveau
mGlu7	Majoritairement pré synaptique ; Synapses Glu et GABA mGluR le plus présent dans le cerveau
mGlu8	Pré et post synaptique ; Synapses Glu et GABA Présence importante dans certaines régions (noyau olfactif antérieur, noyaux réticulaires latéraux,...)

Les récepteurs du groupe I (mGlu1 et mGlu5) sont très majoritairement postsynaptiques. On les retrouve notamment au niveau de l'hippocampe, du cervelet^{87,88} et dans les ganglions de la base.⁸⁹ Ces récepteurs améliorent la transmission synaptique. Les récepteurs des groupes II (mGlu2 et mGlu3) et III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 et mGlu8) sont surtout situés sur les neurones présynaptiques et ont pour rôle d'inhiber la quantité de glutamate libérée dans la synapse (modulation).^{82,90,91}

AOB : accessory olfactory bulb ; Acb : accumbens nucleus ; Cb : cerebellum ; Cx : neocortex ; GP : globus pallidus ; Hi : hippocampus ; Ic : inferior colliculus ; LS : lateral septum ; MOB : main olfactory bulb ; OT : olfactory tubercle ; Pir : piriform cortex ; SC : superior colliculus ; SN : substantia nigra ; SpV : spinal vestibular nucleus ; St : neostriatum ; Th : thalamus ; VP : ventral pallidum

Figure 22 Distribution des récepteurs mGlu dans un cerveau de rat⁸⁵

En ce qui concerne la répartition des récepteurs mGlu dans le système nerveux central SNC (Figure 22), nous pouvons observer trois grandes familles. Tout d'abord, il y a les récepteurs qui sont omniprésents dans le cerveau tels que mGlu1, mGlu5, mGlu3 et mGlu7. Ensuite, nous retrouvons les récepteurs qui sont situés dans des régions bien spécifiques du cerveau. Premièrement, le récepteur mGlu2 est surtout situé dans les cellules de Golgi au niveau du cortex cérébral,⁹² du bulbe olfactif et du striatum. Deuxièmement, nous pouvons trouver le

récepteur mGlu4 dans diverses régions du cerveau et notamment dans le cervelet,⁹³ dans le globus pallidus et la substance noire pars reticulata.⁸⁶ Troisièmement, le récepteur mGlu8 est surtout présent au niveau du bulbe olfactif et du cortex cérébral.^{88,94} Enfin, la répartition du récepteur mGlu6 se fait exclusivement au niveau de la rétine.⁶¹ Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, les récepteurs métabotropiques du glutamate jouent un rôle de modulateur de la quantité de glutamate au niveau de la fente synaptique. Par conséquent, ces récepteurs représentent une cible thérapeutique prometteuse.

Cette première partie nous a permis de rappeler les généralités de la transmission synaptique et de ses acteurs indispensables. Notre étude étant menée sur les récepteurs métabotropiques du glutamate, nous allons donc nous intéresser plus particulièrement, dans le prochain chapitre, à ces derniers et à leurs nombreuses applications thérapeutiques.

4. Intérêt thérapeutique des récepteurs métabotropiques du glutamate

4.1. Des récepteurs ionotropiques aux récepteurs métabotropiques

Les récepteurs ionotropiques du glutamate furent découverts bien avant les récepteurs métabotropiques et la recherche de ligand s'est évidemment concentrée dans un premier temps sur ces récepteurs iGlu. Ces récepteurs sont responsables de la transmission synaptique rapide et sont donc indispensables à l'homme. Cependant, comme nous l'avons déjà évoqué au début de ce manuscrit, une surconcentration de ces récepteurs peut être néfaste à l'organisme. C'est par exemple le cas lors d'une ischémie cérébrale ou chez les patients épileptiques. Les principales avancées sur ces récepteurs étaient basées sur le blocage de ces récepteurs en cas de surconcentration de glutamate au niveau des synapses. Il existe un seul antagoniste des canaux NMDA ; il s'agit de la mémantine, mise le marché à partir des années 1960 pour lutter contre l'épilepsie. Cette molécule fut aussi mise sur le marché pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. L'avantage de ce composé est sa dissociation rapide avec les récepteurs NMDA (contrairement au MK-81), ce qui diminue significativement les risques secondaires.⁹⁵

Il n'en reste pas moins que la modulation pharmacologique des récepteurs iGlu dans un but thérapeutique semble encore relever du numéro d'équilibriste. Les difficultés rencontrées lors du développement de principes actifs visant les récepteurs iGlu ont poussé les groupes de recherche à travailler sur d'autres types de récepteurs et en particulier, les récepteurs mGlu. Ces derniers, jouant un rôle de modulateur de la transmission synaptique, sont des cibles thérapeutiques très

prometteuses. Le très grand avantage de ces récepteurs contrairement aux récepteurs iGlu, c'est qu'ils n'interviennent pas directement dans la transmission synaptique rapide.

4.2. Pharmacologie des récepteurs métabotropiques du glutamate

4.2.1. Données pharmacologiques du glutamate

Avant de nous intéresser aux données pharmacologiques des récepteurs mGlu, il est important de connaître les valeurs de référence du glutamate lui-même sur les huit sous-types mGlu. Les valeurs moyennes d'EC₅₀ du glutamate sur les huit récepteurs mGlu sont regroupées dans le tableau 2. Ces ordres de grandeurs proviennent de nombreuses études qui ont été menées sur le sujet.^{42,53,85}

Tableau 2 EC₅₀ du glutamate sur les huit sous-types mGlu

Groupe	Sous-type mGlu	EC ₅₀ (µM) Glutamate
I	1	0.3 – 0.4
I	5	0.8
II	2	1.3 – 4
II	3	0.04
III	4	3 – 13
III	6	6.3
III	7	800
III	8	2-10

On remarque que le glutamate est un bon agoniste de tous les récepteurs mGlu sauf le sous-type 7. Les valeurs d'EC₅₀ sont comprises entre 0,4 à 13 µM lorsque une activité agoniste est visible et de 800 µM sur le sous-type 7. Cette faible activité est surtout due à la localisation de ce récepteur. Effectivement, ce récepteur est essentiellement présent au niveau des neurones présynaptiques et il est plus précisément situé très près de la zone active où le glutamate est libéré des vésicules (Figure 23).^{90,96} Le seuil d'activation de ce récepteur est plus élevé afin qu'il ne soit pas suractivé trop rapidement.

Figure 23 Schéma d'une synapse – disposition des différents récepteurs mGlu⁷¹

Le récepteur mGlu1 étant le premier découvert, il est donc évident que les premières études pharmacologiques ont été menées sur ce récepteur. Les premiers composés testés ont été des analogues du glutamate où le carboxylate fut substitué par une fonction isostère (Figure 24). Ces deux composés sont le quisqualate et l'iboténate. Cependant, ces deux composés ne sont pas sélectifs des récepteurs mGlu car ils activent aussi des récepteurs iGlu.⁹¹ Le premier ligand sélectif des récepteurs mGlu par rapport aux récepteurs iGlu synthétisé fut le *L-trans*-ACPD (isomère 1*S*,3*R*).⁹⁷

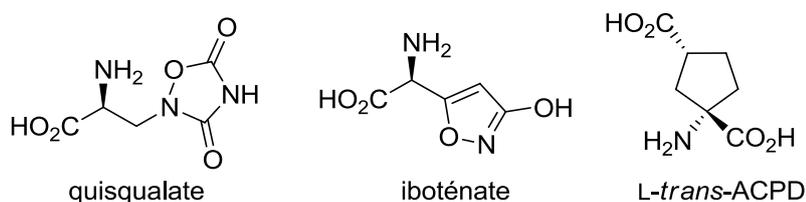


Figure 24 Structures des premiers agonistes des récepteurs mGlu

A partir de ces premiers résultats, une multitude de ligand fut développé au cours des ces 30 dernières années. Deux stratégies ont été développées : la synthèse de ligands orthostériques ou bien la synthèse de ligands allostériques.

4.2.2. Deux types de ligand

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, il existe deux sites de liaison sur les récepteurs métabotropiques du glutamate ; un site orthostérique au niveau du domaine extracellulaire (site du glutamate) et un site allostérique localisé au niveau du domaine transmembranaire (Figure 25).

Figure 25 Positions des deux sites de liaison⁹⁸

Les ligands orthostériques sont compétitifs avec le glutamate et permettent d'activer ou d'inhiber les récepteurs mGlu. En effet, les agonistes activent les récepteurs en stabilisant la forme fermée du VFT alors que les antagonistes inhibent les récepteurs en empêchant la fermeture des deux lobes (Figure 26). Généralement, l'antagoniste bloque la fermeture des deux lobes par encombrement stérique. Par exemple, le MAP4 qui est l'analogue du L-AP4 (Figure 27) avec un méthyle supplémentaire sur le carbone portant l'acide aminé. C'est ce groupement supplémentaire qui est responsable de la non-fermeture des deux lobes.

Figure 28 Conséquences induites par des ligands allostériques⁶⁷

Généralement, ces ligands allostériques sont classés en trois grands groupes :

- Les PAM (Positive Allosteric Modulators) qui permettent d'augmenter l'affinité ou l'efficacité (ou les deux) du ligand orthostérique
- Les NAM (Negative Allosteric Modulators) qui à l'inverse inhibent la réponse du ligand orthostérique
- Les SAM (Silent Allosteric Modulators) qui se lient au site de liaison allostérique mais ne provoquent aucune modification pharmacologique

Les composés SAM n'étant pas très nombreux, nous nous intéresserons essentiellement aux PAM ainsi qu'aux NAM (Figure 29).

Figure 29 Exemple de modulations de PAM et de NAM (courbes de dose réponse)⁷¹

4.2.3. Ligand orthostérique Vs ligand allostérique

Nous venons de voir qu'il existait deux sites de liaison sur les récepteurs mGlu. Un site compétitif du glutamate où se lient les ligands orthostériques et le site allostérique où peuvent se lier des modulateurs allostériques. Il est important de signaler que ces deux types de ligands possèdent des propriétés totalement différentes.¹⁰¹ Est-il préférable de synthétiser des ligands orthostériques ou allostériques ? Les ligands allostériques sont souvent des composés hydrophobes capables de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) mais à contrario très peu solubles en milieu physiologique. Les ligands orthostériques, à l'inverse, sont souvent très hydrophiles (dérivés d'acides aminés) ; ce qui est favorable en terme de solubilité mais défavorable pour le passage de la BHE. Malgré tout, nous verrons par la suite que nos composés atteignent le système nerveux central par l'intermédiaire de transport actif (Chapitre I). Le domaine N-terminal extracellulaire est très conservé entre les huit sous-types mGlu alors que le domaine transmembranaire présente de plus grandes disparités. Cela signifie que les composés allostériques sont souvent très sélectifs d'un seul sous-type alors qu'il est difficile de trouver de la sélectivité chez les ligands orthostériques. Cependant, la plupart des domaines extracellulaires des huit récepteurs mGlu ont déjà été cristallisés alors que les premières structures cristallisées du domaine transmembranaire viennent tout juste d'être publiées.^{102,103} Enfin, une activation prolongée du site du glutamate peut-être néfaste pour le récepteur (risque de désensibilisation) alors qu'aucun problème n'est observé en cas d'activation allostérique prolongée.

Nous pouvons conclure de ces observations qu'il est très difficile de dire quel type de ligand est préférentiel à l'autre. En effet, aucun des deux types ne dispose de toutes les propriétés optimales pour être un candidat médicament. Nous pouvons penser qu'il est judicieux de travailler en parallèle sur les deux types de ligands et de trouver la meilleure association finale. Nous allons maintenant présenter les principaux ligands orthostériques et allostériques des récepteurs mGlu du groupe III car notre laboratoire est essentiellement focalisé sur ces récepteurs. Cette liste est non exhaustive et repose essentiellement sur les revues suivantes : Schoepp *et al.*,⁹¹ Kew and Kemp,²³ Conn et Pin,¹⁰⁴ Niswender et Conn,⁷¹ Gasparini et Spooren,⁸³ Mercier et Lodge¹⁰⁵ et Yin et Niswender.⁹⁸

4.2.4. Pharmacologie des récepteurs mGlu du groupe III

Agonistes (Figure 30)

Découverts avant même que la classification des récepteurs mGlu soit élaborée, le L-AP4 ainsi que le L-SOP sont encore aujourd'hui des outils pharmacologiques très utilisés et sont très sélectifs du groupe III. Comme nous le verrons dans le chapitre I, la majorité des agonistes du groupe III possède une fonction acide supplémentaire contrairement à ceux des groupes I et II. Cela est dû au mode de liaison avec les résidus du domaine de liaison VFT du groupe III. C'est le cas pour le L-AP4 mais également pour les autres agonistes découverts par la suite. Effectivement, l'ajout de cette fonction acide sur l'ACPD permet d'obtenir les ACPT-I et III qui sont de bons agonistes.¹⁰⁶ L'ACPT-I a montré des résultats très encourageants sur des modèles animaux contre différentes pathologies : la douleur,¹⁰⁷ la maladie de Parkinson,¹⁰⁸ l'anxiété,¹⁰⁹ et l'épilepsie.¹¹⁰ Tous ces dérivés sélectifs du groupe III ne le sont pas au sein des sous-types de ce groupe. L'ajout d'une fonction acide sur l'APDC a également été réalisé par S.Schann *et al.* afin de former un nouvel agoniste des sous-types 4 et 8, le FP0429.^{111,112} En plus des dérivés de l'ACPT, notre laboratoire a également synthétisé des analogues cyclopropyles du L-AP4 et notamment le (1*S*,2*R*)-APCPr.¹¹³ D'autres dérivés cycliques ont été étudiés notamment des dérivés de la phénylglycine. Par rapport au (*S*)-CPG, une fonction acide est une nouvelle fois ajoutée pour former le (*S*)-3,4-DCPG¹¹⁴ et (*S*)-PPG.¹¹⁵ Le premier ligand cité montre une sélectivité vis-à-vis du sous-type 8 sur lequel il est 100 fois plus actif que sur les sous-types 4, 6 et 7. Cependant, il possède un pouvoir agoniste sur le récepteur mGlu2.¹¹⁶ Un autre agoniste cyclique fut synthétisé par Filosa *et al.* où le cyclopropyle a été remplacé par un carboxybicyclo[1.1.1]pentyl pour obtenir le (*S*)-PBPG.¹¹⁷ Il existe très peu d'agonistes sélectifs des récepteurs mGlu4 et mGlu8 à part les nouveaux dérivés découverts dans notre laboratoire, le **LSP1-2111** et le **LSP4-2022** qui sont respectivement préférentiels et sélectifs du récepteur mGlu4.¹¹⁸ Nous discuterons plus en détail de ces composés dans le chapitre II. Aucun agoniste sélectif du sous-type 7 n'est connu à ce jour alors que deux sont décrits comme l'étant sur le récepteur mGlu6. Il s'agit du HomoAMPA¹¹⁹ et du BnAPDC.¹²⁰ Ce dernier est également un dérivé de l'APDC sur lequel un groupement benzyle est introduit sur l'azote cyclique.

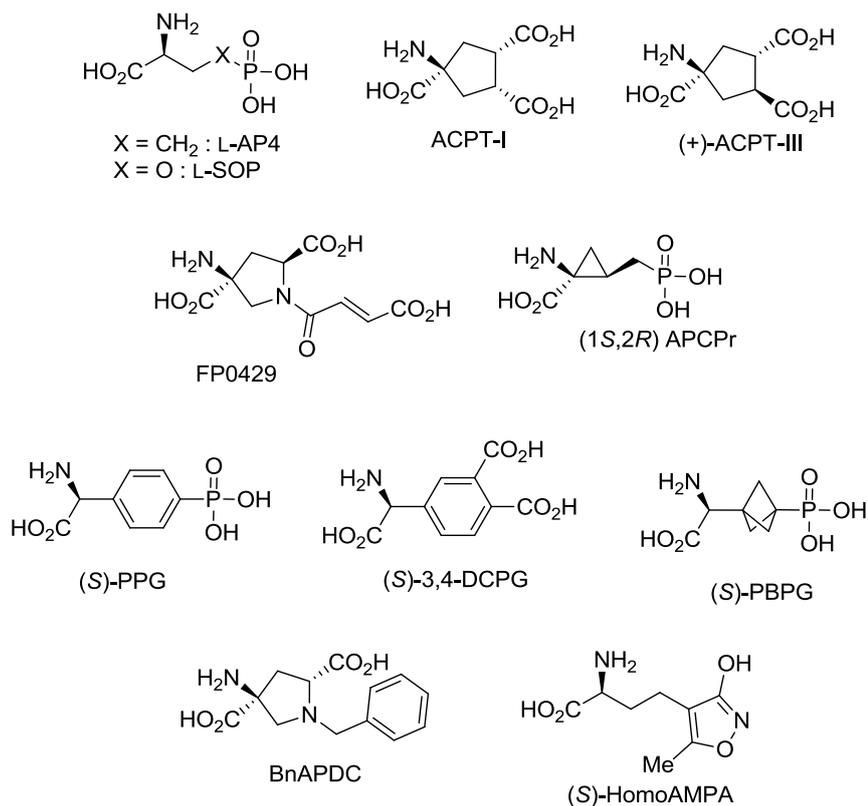


Figure 30 Agonistes orthostériques du groupe III

Antagonistes (Figure 31)

L'ajout d'une gêne stérique sur le carbone de l'acide aminé fut encore une fois un élément majeur dans l'obtention d'antagonistes orthostériques du groupe III. Le MAP4 et le MSOP ont été les premiers composés montrant une activité antagoniste. L'ACPT-II, l'isomère *cis* de l'ACPT-I, agoniste des récepteurs du groupe III possède également des propriétés antagonistes.¹⁰⁶ Un composé, le DCG-IV possède les deux effets ; c'est un agoniste des récepteurs du groupe II et un antagoniste de ceux du groupe III.¹²¹ L'antagoniste du groupe II LY341495 montre les mêmes effets sur le groupe III.¹²² Tous ces composés ne sont pas sélectifs du groupe III. Les premières molécules sélectives sont des dérivés de la phénylglycine et plus particulièrement des analogues du (S)-PPG sur lequel a été introduit un méthyle (MPPG)¹²³ ou bien un cyclopropyle (CPPG)¹²⁴ sur le carbone de l'acide aminé. D'autres dérivés phénylglycine, l'APICA et l'UBP1112,¹²⁵ montrent également des effets antagonistes contre le L-AP4 et le (1S,3S)-ACPD.

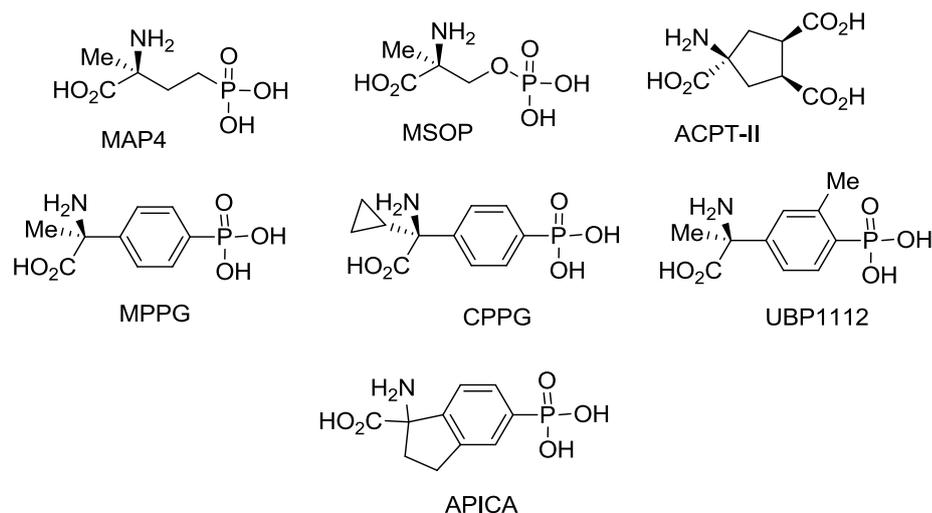


Figure 31 Antagonistes orthostériques du groupe III

Modulateurs allostériques négatifs et positifs

Beaucoup d'études ont été menées autour des ligands allostériques du groupe III et notamment du récepteur mGlu4 car le potentiel thérapeutique¹²⁶ de ces modulateurs est extrêmement important et particulièrement sur le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson (voir paragraphe suivant).¹²⁷ Le domaine transmembranaire des récepteurs du groupe III n'est pas conservé entre les quatre sous-types ; la découverte de modulateur allostérique sélectif est donc privilégiée dans l'objectif de trouver de nouveaux candidat-médicaments.¹⁰¹

Récepteur mGlu4

Le premier PAM découvert pour le récepteur mGlu4 fut le PHCCC qui présente l'inconvénient d'être également un NAM du récepteur mGlu1 et non sélectif par rapport aux sous-types 7 et 8. De plus, il est un peu trop hydrophobe pour passer la BHE.^{128,129} A partir de ce composé, une multitude de nouveaux PAM fut découverte sous l'impulsion du groupe de recherche de J. Conn. Grâce à un énorme travail de screening à haut débit, de nouveaux PAM ont été identifiés et ont montré de bons résultats *in vitro* et *in vivo*. Parmi eux, nous pouvons notamment citer le VU0155041¹³⁰ issu de PHCCC et le VU0080241.¹³¹ Ces deux molécules sont plus puissantes que la touche initiale, le PHCCC, avec des EC_{50} respectives de 5 et 0,75 μM sur le récepteur mGlu4. Ces deux composés ont été étudiés également *in vivo* sur des modèles animaux de la maladie de Parkinson.^{130,131}

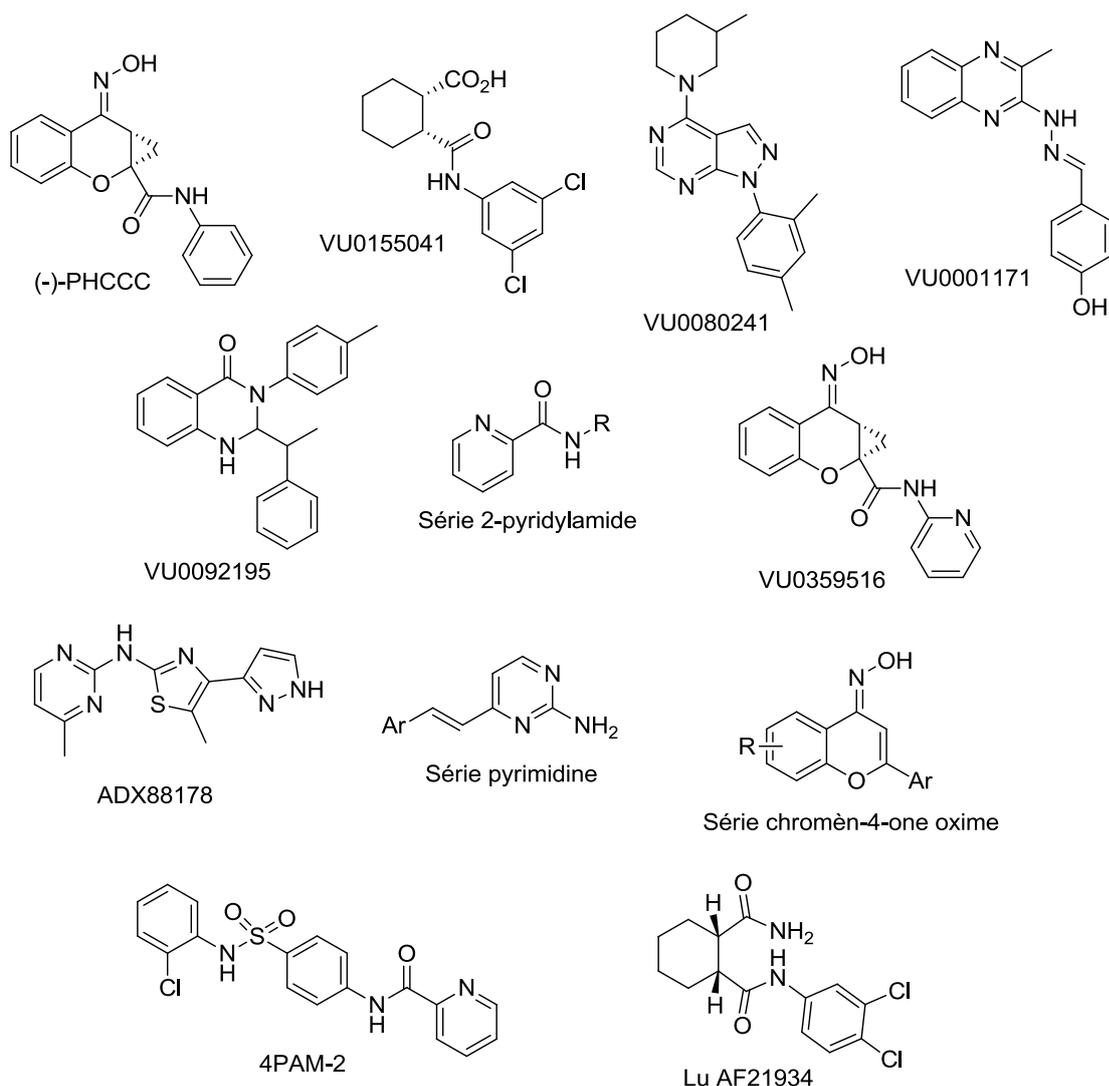


Figure 32 PAM du récepteur mGlu4

D'autres composés ont été découverts comme le VU000171 ou encore le VU0092145.¹³² Ce criblage a permis à l'équipe de J. Conn de développer une nouvelle série de PAM du récepteur mGlu4 basée sur un motif 2-pyridylamide dont certains composés possèdent de très bonnes propriétés pour être testés *in vivo*.^{133,134} En 2010, un analogue du PHCCC a été synthétisé, le VU0359516, montrant une meilleure activité sur le récepteur mGlu4 (EC_{50} 0,38 μ M contre 1,4 μ M pour le PHCCC) et surtout une totale sélectivité sur ce récepteur.¹³⁵ Plus récemment, Addex (ADX88178)¹³⁶ et Boehringer (Série pyrimidine)¹³⁷ ont également développé un PAM de ce récepteur. Le dérivé, Lu AF21934, analogue du VU0155041, a montré des effets très positifs dans le traitement de la dyskinésie comme le PHCCC mais ce composé possède des propriétés physicochimiques plus intéressantes.¹³⁸ Le composé 4PAM-2, développé par Niswender *et al.* est également capable de moduler positivement l'action du L-AP4 sur des récepteurs

hétérodimères mGlu2/4.¹³⁹ Enfin, en 2011, deux sociétés alsaciennes, Domain Therapeutics et Prestwick Chemical, ont breveté une impressionnante série chimique autour du même motif chromèn-4-one oxime. Les activités *in vitro* de ces composés sont très bonnes avec des EC₅₀ de l'ordre du nanomolaire sur le récepteur mGlu4. Certains composés ont même montré des effets anti-cataleptiques sur des modèles animaux de catalepsie induite par injection d'halopéridol.¹⁴⁰

Récepteur mGlu7

Le premier ligand modulateur du récepteur mGlu7 est un PAM présentant des propriétés agonistes. Il s'agit du composé AMN082 développé par une équipe de Novartis en 2005.¹⁴¹ Le mécanisme d'action de ce composé est encore un peu flou et il est probable que ce composé active le récepteur mGlu7 au niveau du domaine transmembranaire avec ou sans activation orthostérique. Le premier NAM a été découvert plus récemment par une société japonaise, Banyu Pharmaceutical, en synthétisant le MMPIP issu d'une optimisation d'une touche identifiée par screening.¹⁴² Le mécanisme d'action de ce composé n'est pas encore très bien connu. Enfin, Addex travaille également sur le sujet et a décrit en 2012 une molécule, l'ADX71743, qui montre des effets NAM remarquables *in vitro* et sur des modèles *in vivo* d'anxiété.¹⁴³ Récemment, un nouveau composé se liant dans la domaine VFT fut découvert en tant qu'antagoniste sélectif du récepteur mGlu7, le XAP044, même si son site de liaison n'est pas encore bien identifié.¹⁴⁴

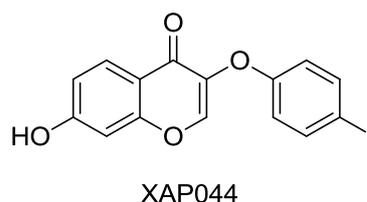
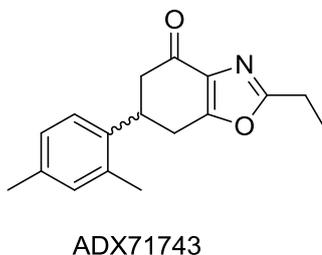
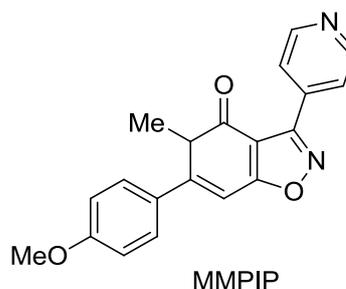
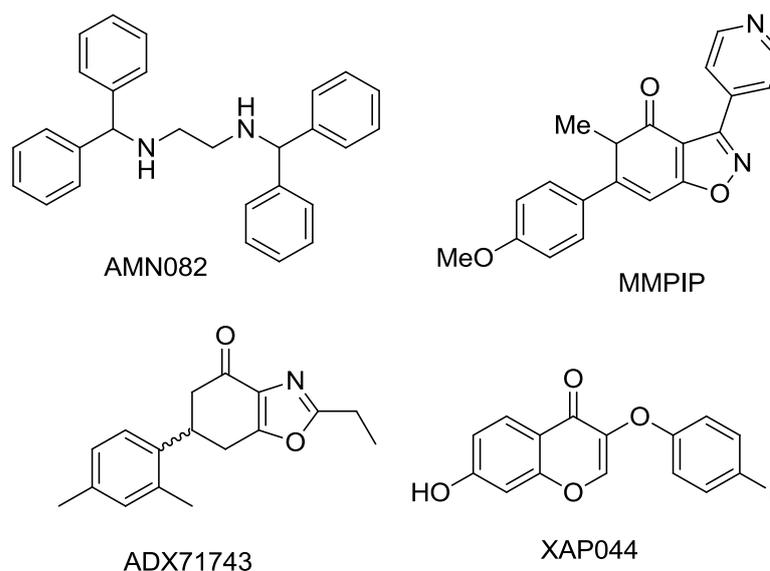


Figure 33 Quatre modulateurs allostériques du récepteur mGlu7

Récepteur mGlu8

Un seul PAM de ce récepteur mGlu8 est référencé à ce jour. Il s'agit du composé AZ12216052 synthétisé par AstraZeneca.¹⁴⁵

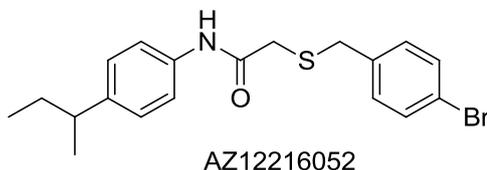


Figure 34 Structure du AZ12216052, seul PAM du récepteur mGlu8

4.2.5. Bilan et perspectives

Plusieurs conclusions ressortent de cette revue à propos de la pharmacologie des récepteurs métabotropiques du glutamate. Tout d'abord, on peut s'apercevoir que les recherches se sont plus focalisées sur les modulateurs allostériques que sur les ligands orthostériques. Deux raisons interviennent dans cette différence. Premièrement, le domaine de liaison du glutamate avec des ligands orthostériques est très conservé entre les huit sous-types alors que les domaines transmembranaires sont beaucoup plus hétérogènes. Il est donc plus simple de trouver de la sélectivité au niveau des modulateurs allostériques. Deuxièmement, les potentialités thérapeutiques sont les locomotives de ces projets et la majorité des applications ciblent les domaines transmembranaires des récepteurs mGlu. En ce qui concerne le groupe III, de plus en plus de ligands ont été développés et particulièrement des modulateurs allostériques positifs de du récepteur mGlu4 qui montrent des effets intéressants dans le traitement de la maladie de Parkinson. Même si le nombre de ligands orthostériques (agoniste ou antagoniste) est encore faible, il semble que la conjoncture actuelle pousse les chercheurs à approfondir leurs recherches dans ce domaine.

5. Potentiel thérapeutique des récepteurs métabotropiques du glutamate

L'omniprésence du glutamate au sein du système nerveux central est physiologiquement indispensable. Cependant, il est important que l'équilibre parmi les neurotransmetteurs reste stable afin de ne pas désorganiser le système. En raison de leur large distribution et leur capacité à exercer un rôle de neuromodulateur dans le contrôle à la fois de la transmission glutamatergique et GABAergique, les récepteurs métabotropiques du glutamate représentent donc un potentiel thérapeutique prometteur pour traiter une variété de troubles neurologiques et psychiatriques. L'étude de ces récepteurs à travers les différentes maladies du système nerveux central est en pleine évolution depuis les années 2000. Nous allons donc faire un rapide récapitulatif des différentes applications thérapeutiques des récepteurs mGlu. Étant donné que nous travaillons essentiellement sur les récepteurs mGlu du groupe III, nous nous focaliserons uniquement sur ces récepteurs mais il est évident que le potentiel thérapeutique des autres groupes, I et II, est autant voir plus prometteur. Pour cela, nous nous sommes basés sur différentes revues apparues récemment.^{105,146-151}

5.1. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson, découverte par le physicien anglais James Parkinson en 1817, constitue la seconde maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer. Elle touche 1% de la population de plus de 65 ans, soit environ 4 millions de patients dans le monde d'après l'ONU. En fonction du vieillissement de la population, on estime que ce chiffre devrait doubler d'ici 2040.¹⁵² Cette maladie est provoquée initialement par la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans les ganglions de la base (GB) et plus précisément au niveau de la substance noire pars compacta (SNc). Cette maladie est caractérisée par de nombreux symptômes et notamment l'akinésie, la bradykinésie, des tremblements, une forte rigidité ou encore des difficultés de posture. Pour lutter contre cette neurodégénérescence, la L-DOPA est administrée aux patients. Cette molécule est tout simplement un précurseur de la dopamine qui est capable de passer la BHE contrairement à cette dernière. Cependant, cette stratégie de remplacement entraîne, après quelques années, des effets secondaires très importants comme de la dyskinésie et des troubles psychotiques. Le traitement des patients avec la L-DOPA ne permet pas de guérir la maladie mais il ne faut pas oublier qu'il a permis à de nombreux patients de prolonger leur vie dans de bonnes conditions. Aujourd'hui, de nombreuses études sont menées afin de découvrir de nouveaux moyens pour guérir cette maladie ou du moins diminuer les

symptômes associés. Comme nous pouvons le remarquer sur la figure 35,¹⁵² la dégénérescence des neurones dopaminergiques au niveau des GB a pour conséquence un déséquilibre total au niveau des neurotransmetteurs (notamment glutamate et GABA) avec certaines voies de neurotransmission sous-activées et d'autres suractivées (Figure 35, l'épaisseur de la flèche indique l'intensité de la neurotransmission). Les récepteurs mGlu sont capables de moduler la transmission glutamatergique et GABAergique ; ces récepteurs sont donc des cibles thérapeutiques possibles pour rétablir l'équilibre. De plus, les récepteurs mGlu et notamment ceux du groupe III sont très présents sur les neurones au niveau des GB.¹⁵³ Enfin, Valenti *et al.* ont montré que le rétablissement de l'équilibre pouvait-être envisagé en modulant la voie striatopallidale (réduction de GABA au niveau de ces synapses).¹⁵⁴

SNc : Substance Noire pars compacta ; SNr : Substance Noire pars reticula ; D1-R et D2-R : récepteurs à dopamine 1 et 2 ; l'épaisseur de la flèche indique l'intensité de la neurotransmission

Figure 35 Voies de neurotransmission schématiques dans les ganglions de la base (GB) parkinsoniens¹⁵²

Depuis quelques années, les récepteurs métabotropiques du groupe III et notamment le sous-type 4 sont beaucoup étudiés afin de diminuer les symptômes induits par cette maladie. Ces récepteurs sont essentiellement localisés sur des neurones (glutamate ou GABA) présynaptiques. L'activation de ces récepteurs permettrait de réduire la quantité de neurotransmetteur libérée et ainsi rééquilibrer la transmission striatopallidale. En plus des tests *in vitro* mesurant les courants électriques postsynaptiques, plusieurs modèles animaux ont été développés afin de mimer la maladie de Parkinson. Le premier modèle consiste à inhiber la transmission dopaminergique par injection d'halopéridol ou de réserpine. L'halopéridol est un

antagoniste des récepteurs D2 et la réserpine est capable d'éliminer toute la dopamine stockée dans les vésicules. Le second modèle est basé sur l'administration d'une toxine, la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) dans le cerveau d'un rat (toxine MPTP pour la souris) afin de reproduire la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Cette injection peut se faire de deux manières ; soit bilatérale, soit unilatérale.

Les premières expériences ont été menées avec le L-AP4 sur les deux modèles présentés ci-dessus. Cet agoniste sélectif du groupe III montre des effets dose-dépendant antiparkinsoniens sur les modèles de catalepsie (halopéridol et réserpine)¹⁵⁴ et il est aussi efficace que la L-DOPA sur le modèle induit par la 6-OHDA.¹⁵⁵ Ces tests effectués sur des souris dont le gène du récepteur mGlu4 n'est pas exprimé (souris KO mGlu4) ne donnant aucun effet anti-cataleptique, nous pouvons penser que ce récepteur peut jouer un rôle prépondérant dans le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson.¹⁵⁴ D'autres agonistes du groupe III ont été testés et l'ACPT-I a montré également des effets antiparkinsoniens sur un modèle avancé de neurodégénérescence induit par la 6-OHDA.¹⁰⁸ Le L-SOP a également été testé sur le modèle de catalepsie par injection intracérébrale avec des résultats également satisfaisants.¹⁵⁶ D'autres analogues du L-AP4 (ACPD, APCPr¹¹³ ou encore (Z)-(+)-cyclopentyl-AP4) ont également été testés sur les mêmes modèles mais ont montré des problèmes de sélectivité et de passage de la BHE.¹¹⁷ Nos collaborateurs ont également utilisé ces tests de catalepsie sur nos composés (ACPT-I, APCPr, **LSP1-2111**, **LSP4-2022** et le **LSP1-3081**¹⁵⁷). Je présenterai une partie de ces résultats dans le chapitre I.

Dû au manque de sélectivité des ligands orthostériques, la majorité des recherches se sont concentrées sur la découverte de modulateur allostérique et plus particulièrement des PAM du récepteur mGlu4 afin de diminuer la quantité de GABA au niveau des synapses striatopallidales. Le PHCCC étant un bon PAM du sous-type 4,¹²⁹ il fut testé sur les modèles de catalepsie (halopéridol et réserpine) et également sur le test du MPTP sur la souris. Sur les deux modèles, le PHCCC montre des effets antiparkinsoniens alors qu'il ne montre aucun effet sur des souris KO du récepteur mGlu4 ; ce qui témoigne une nouvelle fois de l'implication de ce récepteur.¹⁵⁸ Comme nous l'avons vu précédemment, ce PAM n'est pas sélectif (NAM sur le récepteur mGlu1) et montre des problèmes de solubilité pour passer la BHE.^{128,129} Les PAM développés par l'équipe de J. Conn ont alors été testés en commençant par les composés VU0155041 et VU0080241 qui ont montré des résultats positifs sur les modèles de catalepsie. Ces modulateurs allostériques possèdent de meilleures propriétés physicochimiques mais ne sont pas non plus

sélectifs du récepteur mGlu1. De nouvelles optimisations ont donné les composés VU0001171 et VU0092145 qui eux montrent une sélectivité par rapport au récepteur mGlu1 tout en conservant les données positives requises.^{133,134} Enfin, basé sur une série 2-pyridylamine développée par l'équipe de J. Conn, Addex et Amgen ont également travaillé sur l'implication du récepteur mGlu4 dans le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson.

5.2. La douleur

Selon l'Association internationale pour l'étude de la douleur (IASP), "la douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite dans ces termes". Elle est donc subjective et repose avant tout sur le ressenti du patient, ce qui la rend difficile à quantifier et à qualifier. Aujourd'hui, environ 20% de la population est sujet à des douleurs chroniques (ou pathologiques) qui sont considérées comme des maladies. Contrairement aux douleurs aiguës qui sont brèves et intenses, les douleurs pathologiques excèdent généralement 3 mois et peuvent provenir de multiples raisons. On peut classer ces dernières en trois groupes :

- les *douleurs inflammatoires* qui recouvrent toutes les douleurs associées aux phénomènes d'inflammation : lésions, arthrose, etc.
- les *douleurs neuropathiques* associées à des atteintes du système nerveux central et périphérique : lésion de la moelle épinière, du nerf sciatique, etc.
- les *douleurs cancéreuses* qui associent souvent une composante inflammatoire et neuropathique. Paradoxalement, certains traitements anti-tumoraux peuvent également déclencher des neuropathies périphériques.

Les récepteurs mGlu et plus particulièrement ceux du groupe III sont présents au niveau de tous les acteurs de la voie de neurotransmission de la douleur, c'est-à-dire de l'action nociceptive jusqu'au cortex frontal (Figure 36).¹⁵⁹ Ils représentent donc une cible thérapeutique potentielle pour traiter les douleurs chroniques.

Figure 36 Voie de neurotransmission nociceptive¹⁶⁰

Les récepteurs mGlu du groupe III, notamment les sous-types 4 et 7 sont surtout situés sur les neurones présynaptiques. Les premières études ont été menées avec deux agonistes orthostériques du groupe III, le L-AP4 et l'ACPT-I sur des tests de douleur inflammatoire et neuropathique. L'activation des récepteurs mGlu du groupe III montre des effets analgésiques très intéressants, équivalents à ceux de la morphine.¹⁰⁷ L'implication du récepteur mGlu4 a été une nouvelle fois prouvée en expérimentant ce même test avec du PHCCC, PAM du récepteur mGlu4, et en observant également une inhibition de la douleur.¹⁶¹ L'activation du récepteur mGlu7 par le PAM AMN082 sur un test *in vivo* de Von Frey a également montré des effets antidouleur semblables à ceux de la morphine.¹⁶²

5.3. L'anxiété et le stress

L'anxiété est caractérisée par un sentiment d'appréhension, de tension, de malaise, de terreur face à un péril de nature indéterminée. Elle est souvent exprimée par le patient sous les termes de nervosité ou de soucis. On différencie deux types d'anxiété : le trouble panique (correspondant à des crises d'angoisse aiguës survenant de manière périodique) et l'anxiété permanente (trouble anxieux généralisé, ou névrose d'angoisse), qui affecte les sujets de manière durable. Cette distinction est importante car les traitements sont différents. L'anxiété aiguë bénéficie d'un traitement préventif de la survenue des crises par les antidépresseurs alors que l'anxiété généralisée est accessible aux tranquillisants classiques.

De nombreuses études ont montré l'implication des récepteurs mGlu du groupe III dans le traitement de l'anxiété. Tout d'abord, l'ACPT-I qui n'est pas sélectif au sein du groupe III, a été testé sur divers modèles animaux contre l'anxiété (Test de Vogel, labyrinthe surélevé EPM, test de la nage forcée... etc). Le test de Vogel¹⁶³ permet de mesurer l'anxiété d'un rongeur. Après 24 h sans boire, un rat est placé dans une cage test pendant 10 minutes dans laquelle il a de l'eau disposée afin de pouvoir s'hydrater. Remis dans sa cage, il est autorisé à boire pendant 30 min. Après une nouvelle journée sans boire, le rat est remis dans la cage test et est autorisé à boire pendant 30 secondes. Une fois ce temps écoulé, à chaque fois que le rat ira boire, il subira un léger choc électrique. On mesure alors le nombre de chocs que le rat subit pendant 5 min. L'ACPT-I a montré des effets anxiolytiques dans toutes les expériences avec des résultats similaires au diazépam qui est très utilisé comme référence.^{109,164} Le sous-type 6 étant essentiellement situé dans la rétine, nous pouvons nous demander lequel des sous-types 4, 7 ou 8 est responsable de ces effets anxiolytiques. Tout d'abord, l'ACPT-I est capable d'activer le récepteur mGlu7 à des concentrations millimolaires alors qu'il active les récepteurs mGlu4 et mGlu8 à ces concentrations micromolaires.¹⁶¹ On peut donc penser que le récepteur mGlu7 n'est pas responsable de ces effets. Le PHCC, PAM sélectif du sous-type 4, montrant également des effets anxiolytiques au niveau de l'amygdale,¹⁶⁵ est un signe que le récepteur mGlu4 est impliqué. Les résultats obtenus avec nos composés (développés plus tard) confirmeront cette hypothèse. Malgré cela, des études ont montré que le composé AZ12216052, PAM sélectif du sous-type 8, possède des effets anxiolytiques (Test EPM) sur des souris sauvages et pas sur des souris KO du récepteur mGlu8.^{145,166} D'autres études doivent encore être menées afin d'identifier le récepteur responsable surtout que le rôle du récepteur mGlu7 est aussi ambigu. Effectivement, il a été montré que des souris sauvages¹⁶⁷ et des souris KO du récepteur

mGlu7¹⁶⁸ possédaient toutes les deux des effets anxiolytiques. L'agoniste du récepteur mGlu6, (S)-HomoAMPA, a également montré des effets positifs contre l'anxiété sur le test de Vogel.¹⁶⁴ Il est très difficile de tirer des conclusions définitives sur l'implication de tel ou tel récepteur mais dans tous les cas, les récepteurs mGlu du groupe III jouent un rôle prépondérant dans le traitement de l'anxiété.

5.4. La dépression

Être en dépression est très différent d'un sentiment de tristesse passager comme nous en vivons tous. Un épisode dépressif peut durer plusieurs semaines, mois ou même années et peut interférer de manière sérieuse avec le travail et la vie sociale d'une personne qui en souffre. Des centaines de millions de personnes dans le monde souffrent de cette maladie qui deviendra en 2020 la deuxième maladie la plus mortelle.¹⁶⁹ Cette maladie constitue donc un enjeu de santé publique majeur et le développement de nouvelles thérapies semble primordial. Actuellement, les traitements mis en place pour lutter contre cette maladie sont des médicaments qui visent les récepteurs monoamines (sérotonine, noradrénaline et dopamine) et notamment les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ex : Prozac). En effet, le taux de sérotonine intra-synaptique régule l'humeur et ce taux ne doit pas être ni trop fort, ni trop faible. Une forte diminution de ce taux est souvent signe de dépression.¹⁷⁰ Cependant, tous les traitements du marché sont souvent très longs et engendrent de forts effets secondaires. De fortes anomalies de concentration en glutamate ont été mesurées dans le plasma, le sérum, le fluide cébrospinal ainsi que dans les tissus cérébraux de patients atteints de troubles de l'humeur.^{171,172} Les voies de neurotransmission ont alors été étudiées pour essayer de lutter contre cette maladie. Alors que des antagonistes des récepteurs NMDA sont déjà en phase clinique II, la modulation de ces récepteurs reste tout de même délicate avec de forts effets secondaires.¹⁷⁰ C'est pour ces raisons que les récepteurs métabotropiques du glutamate sont devenus des cibles thérapeutiques prometteuses pour le traitement de la dépression.

Alors que les antagonistes des récepteurs mGlu du groupe II montrent de bons résultats contre l'état dépressif,¹⁵ des études menées sur ceux du groupe III ont été réalisées récemment. Sur le test de la nage forcée, l'activation de ces récepteurs par l'ACPT-I (injection intracérébrale) a montré une dose-réponse contre l'immobilité du rat en question. Lors de ce test, on plonge un rongeur dans l'eau et on observe sa mise en action pour rester à la surface. Plus le rongeur est immobile et plus il est dans un état de résignation dépressive. L'ajout du PHCCC, PAM du

récepteur mGlu4, produit l'accentuation de cet effet antidépresseur. Cet effet est totalement neutralisé en présence de CPPG qui est un antagoniste du groupe III ; ce qui signifie que les récepteurs mGlu du groupe III sont vraiment impliqués dans les voies de signalisation de la dépression.¹⁷³ Dans les mêmes conditions, l'activation de ces récepteurs par le (\pm)-PPG, agoniste sélectif du récepteur mGlu8, conduit à des effets antidépresseurs sont observés alors que l'ajout de l'agoniste sélectif du sous-type 6, le (*S*)-HomoAMPA est totalement inefficace.¹⁶⁴ Le récepteur mGlu7 a également montré des effets contre la dépression dans le même modèle animal en étant activé par l'AMN082 alors qu'aucun effet n'est observé sur des souris KO du récepteur mGlu7.¹⁷⁴ L'association de l'AMN082 avec des ligands des récepteurs de sérotonine ont montré que cet agoniste du récepteur mGlu7 exerce un effet dépendant de la sérotonine.¹⁷⁵ Comme pour l'anxiété, il est difficile de déterminer quel récepteur est directement impliqué dans le rétablissement de l'équilibre sérotoninergique.

5.5. L'épilepsie

L'épilepsie se caractérise par une hausse de l'activité cérébrale anormale partielle ou générale au sein du système nerveux central. Il existe différents types de crise d'épilepsie qui se traduit dans la majorité des cas par des pertes de connaissances et des convulsions. Lors de ces crises, le système glutamatergique est déséquilibré et la concentration synaptique en glutamate est plus abondante.¹⁷⁶ Les antagonistes des récepteurs iGlu développés ont alors montré une bonne efficacité sur des tests animaux pour réduire ces crises.¹⁷⁷ Cependant, les essais cliniques de ces molécules n'ont pas pu aboutir à cause du rôle majeur des récepteurs iGlu dans la transmission nerveuse.¹⁷⁸ Les récepteurs mGlu, modulateurs de la transmission synaptique, sont alors de bonnes cibles pour diminuer la quantité de glutamate au niveau de la synapse. Les récepteurs mGlu du groupe III sont essentiellement présents sur les neurones présynaptiques ; l'activation de ces derniers pourrait réduire la libération de glutamate. Alors qu'en 1996, Suzuki *et al.*¹⁷⁹ ont démontré que l'activation des récepteurs mGlu du groupe III (par le L-AP4 ou le L-SOP) permettait d'éviter toute crise épileptique, Ghauri *et al.* observaient le contraire.¹⁸⁰ De plus, l'inhibition des récepteurs du groupe III par l'antagoniste MCPA montre des effets antiépileptiques alors qu'avec deux autres antagonistes, le MAP4 et le MPPG, on observe le contraire.¹⁸⁰ Cependant, quelques années après, l'implication proépileptique du récepteur mGlu4 était mise en avant.¹⁸¹ En effet, sur des modèles animaux, aucun signe de convulsion n'est observé lorsque le gène du récepteur mGlu4 n'est pas exprimé ou lors de l'injection

d'antagoniste de ce récepteur (CPPG).¹⁸² Au contraire, en présence de PHCCC, on retrouve des effets pro-épileptiques.¹⁸³ Le développement de ligands du groupe III étant encore assez en retard par rapport aux groupes I et II, le rôle des trois autres sous-types dans les modèles épileptiques n'est pas encore très clair même si le récepteur mGlu7 semble jouer un rôle prépondérant.^{184,185}

5.6. L'addiction

Les récepteurs métabotropiques du glutamate sont également impliqués dans les processus d'addiction de certaines drogues. Cela est favorisé par leur large distribution au niveau des ganglions de la base du système limbique et de l'amygdale qui sont les régions responsables du comportement.¹⁸⁶ L'injection de L-AP4 dans le striatum du rat diminue certains comportements induits par l'administration de drogues.¹⁸⁷ L'activation des récepteurs mGlu du groupe III permettrait de diminuer la libération de dopamine dans les régions corticales.¹⁸⁸ Le sous-type 7 semble une bonne cible pour réduire les phénomènes comportementaux induits par la prise plus ou moins massive de drogue et le phénomène de manque. En effet, l'activation de ce récepteur par l'AMN082 a permis de réduire ces phénomènes contre la cocaïne^{189,190} ainsi que l'addiction pour l'alcool (préférence et consommation) chez le rat. L'inhibition du récepteur mGlu7, soit en présence du NAM MMPIP,¹⁹¹ soit en diminuant son expression génétiquement,¹⁹² est responsable de l'augmentation de la consommation d'alcool chez le rat. L'activation du sous-type 8 par son agoniste préférentiel, le DCPG, montre également des effets contre l'addiction d'alcool.¹⁹³

5.7. Autres applications

Nous avons pu remarquer que les récepteurs métabotropiques du glutamate du groupe III étaient impliqués dans la majorité des maladies psychiatriques et neurodégénératives. Il est important d'ajouter que ces récepteurs jouent également un rôle prépondérant dans la schizophrénie¹⁹⁴ ou encore dans la maladie d'Alzheimer.¹⁹⁵ Toujours au niveau du système nerveux central, il a été montré que le récepteur mGlu4 jouait un rôle majeur dans le mécanisme d'action de l'inflammation de la myéline chez les patients atteints de sclérose en plaque. Des signes de résistance contre cette démyélination ont été observés en activant le sous-type 4 par le PHCC.¹⁹⁶ En parallèle de leur large distribution dans le SNC, les récepteurs mGlu sont

également présents dans le système nerveux périphérique. Les applications de ces récepteurs vont bien au-delà du cerveau et sont référencées dans une revue publiée en 2011 (Figure 37).¹⁹⁷

Figure 37 Schéma résumé des applications des récepteurs mGlu dans les tissus périphériques¹⁹⁷

La modulation synaptique du glutamate par les récepteurs mGlu a notamment été évoquée dans la régulation des fonctions pancréatiques,¹⁹⁸ les processus auditifs¹⁹⁹ et dans le syndrome de l’X fragile où le récepteur mGlu5 est une cible très prometteuse pour lutter contre ce syndrome génétique.²⁰⁰ Enfin, le rôle de neurotransmetteur du glutamate a été mis en évidence très tardivement alors que l’omniprésence du glutamate dans le système nerveux central était prouvée depuis longtemps. Il n’est donc pas étonnant de retrouver du glutamate en dehors des neurones avec des activités différentes de la transmission synaptique. Effectivement, les récepteurs mGlu sont exprimés dans diverses cellules autres que les neurones, comme les cellules immunitaires, les cellules pancréatiques, les cellules intestinales, les hépatocytes... etc. Des études ont alors montré que ces récepteurs pouvaient jouer un rôle déterminant dans la lutte contre différents types de cancer.^{27,201}

5.8. Bilan

Les recherches autour des récepteurs métabotropiques du glutamate ont vu le jour bien après celles des récepteurs ionotropiques mais le potentiel thérapeutique des récepteurs mGlu est aujourd'hui énormément étudié et de nombreuses avancées ont été développées pendant ces quinze dernières années. Le développement de nombreux projets visant les récepteurs mGlu entrepris par différentes sociétés pharmaceutiques n'est pas étranger à la nouvelle reconnaissance de ces récepteurs. La compréhension des mécanismes d'action de ces récepteurs et le développement de nouveaux outils pharmacologiques puissants et sélectifs sont donc primordiaux pour élaborer de futurs médicaments pour un traitement efficace, précis et fiable des nombreuses maladies qui touchent la population mondiale.

6. Objectifs et présentation de notre approche

Malgré l'avancée tardive des recherches autour des récepteurs métabotropiques du glutamate du groupe III, l'intérêt pour ces récepteurs est de plus en plus important depuis ces dernières années. Le sous-type 4 fut à l'origine de la prise de conscience que les récepteurs mGlu du groupe III possédaient un potentiel thérapeutique très prometteur. Effectivement, la majorité des PAM du récepteur mGlu4 ont été synthétisés depuis 2005 et montrent des résultats très encourageants, particulièrement pour le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson. Ces résultats préliminaires ainsi que le manque d'outils pharmacologiques nous ont donc poussés à travailler sur cette famille de récepteurs et notamment sur le récepteur mGlu4.

La construction de ce projet pluridisciplinaire à l'interface de la chimie et de la biologie a également vu le jour grâce à l'élaboration d'un réseau de collaboration très important comme c'est souvent le cas dans les thématiques de chimie médicinale. Au niveau de la chimie, tous les premiers résultats relatés dans le chapitre **I** ont été obtenus au sein du laboratoire de Francine Acher à l'Université Paris Descartes. En ce qui me concerne, mes trois années de thèse furent partagées entre le laboratoire de Francine Acher et celui de Françoise Colobert et Frédéric Leroux à l'Université de Strasbourg. Cette codirection m'a été très bénéfique afin de mener mes travaux de recherches dans les meilleures conditions. En effet, les premières étapes de synthèse des composés fluorés (Chapitre **II**) ainsi que le développement de la nouvelle voie de synthèse pour obtenir les deux diastéréomères (Chapitre **III**) ont été mises au point à Strasbourg alors que les dernières étapes et les purifications finales se sont déroulées à Paris. La mise en valeur des

composés synthétisés a été effectuée avec différents collaborateurs. Les tests pharmacologiques *in vitro* ont été menés par l'équipe de Jean-Philippe Pin à l'Institut Génomique Fonctionnel (IGF) de Montpellier. Les meilleurs composés ont ensuite été valorisés *in vivo* sur différents modèles animaux. L'équipe de Marianne Amalric à l'Université de Marseille a évalué nos composés sur des modèles de catalepsie, symptôme majeur observé chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Enfin, l'équipe d'Alain Eschalier, à Clermont-Ferrand, a pu mettre en avant des propriétés antidouleur intéressantes sur des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique.

Contrairement à la majorité des laboratoires qui travaillent sur la découverte de nouveaux ligands allostériques du groupe III des récepteurs mGlu, notre laboratoire s'est focalisé depuis quelques années sur la découverte de ligands agonistes orthostériques du récepteur mGlu4. Cette approche, non concurrencée par les industries pharmaceutiques qui sont focalisées sur la synthèse de ligands allostériques, permettra d'obtenir de nouveaux outils afin de comprendre plus précisément les mécanismes d'action de ces récepteurs.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les propriétés physico-chimiques entre les ligands orthostériques et allostériques sont totalement différentes, ce qui engendre par conséquent des contraintes synthétiques. Effectivement, notre objectif est de synthétiser des analogues du glutamate en respectant les données pharmacologiques nécessaires pour obtenir de possibles "candidats-médicaments". En effet, les composés doivent être solubles en milieu physiologique, capables de passer la BHE et non toxiques tout en étant actifs et sélectifs sur la cible visée.

Notre objectif est donc de concevoir et de synthétiser de nouveaux agonistes du **LSP4-2022** qui était le composé référence lors du début de mon doctorat. Pour cela, en première partie, je reviendrai sur la naissance de ce projet et les résultats préliminaires collectés depuis 15 années sur ce sujet. Dans un second temps, nous nous intéresserons à la relation structure-activité autour du **LSP4-2022** en synthétisant différents types de composés. Enfin, tous les composés synthétisés et testés étant sous forme de mélange de deux diastéréomères ; la plus grande partie de ma thèse fut de développer une nouvelle voie de synthèse afin d'obtenir et de tester les deux diastéréomères séparément.

7. Références bibliographiques

1. Ikeda, K. New Seasonings. *Chem. Senses* **2002**, 27, 847.
2. Lindemann, B., *et al.* The Discovery of Umami. *Chem. Senses* **2002**, 27, 843.
3. Watkins, J. C.; Jane, D. E. The glutamate story. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147, S100.
4. Waelsch, H. Metabolism of glutamic acid and glutamine. In *Neurochemistry. The Chemical Dynamics of Brain and Nerve*, ed. Elliott, K. A. C., Page, I. H. & Quastel, J. H., **1955**, 173.
5. Krebs, H. A.; Johnson, W. A. Metabolism of ketonic acids in animal tissues. *Biochem. J.* **1937** 31, 645.
6. Krnjević, K. When and why amino acids? *J. Physiol.* **2010**, 588, 33.
7. Eccles, J. C., *et al.* Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. *J. Physiol.* **1954**, 126, 524.
8. Curtis, D. R., *et al.* The depression of spinal neurones by γ -amino-n-butyric acid and β -alanine. *J. Physiol.* **1959**, 146, 185.
9. Curtis, D. R., *et al.* The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J. Physiol.* **1960**, 150, 656.
10. Curtis, D. R.; Watkins, J. C. The Excitation and Depression of Spinal Neurones by Structurally Related Amino Acids. *J. Neurochem.* **1960**, 6, 117.
11. Featherstone, D. E. Intercellular Glutamate Signaling in the Nervous System and Beyond. *ACS Chem. Neurosci.* **2009**, 1, 4.
12. Sundaram, R. S., *et al.* The role of excitatory neurotransmitter glutamate in brain physiology and pathology. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2012**, 5, 1.
13. Choi, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1998**, 1, 623.
14. Choi, D. W.; Rothman, S. M. The Role of Glutamate Neurotoxicity in Hypoxic-Ischemic Neuronal Death. *Ann. Rev. Neurosci.* **1990**, 13, 171.
15. Sanacora, G., *et al.* Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7, 426.
16. Hollmann, M., *et al.* Cloning by Functional Expression of a Member of the Glutamate Receptor Family. *Nature* **1989**, 342, 643.
17. Mayer, M. L.; Armstrong, N. Structure and Function of Glutamate Receptor Ion Channels. *Ann. Rev. Physiol.* **2004**, 66, 161.
18. Burnashev, N. Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, 6, 311.
19. Magleby, K. L. Modal gating of NMDA receptors. *Trends. Neurosci.* **2004**, 27, 231.
20. Attwell, D.; Gibb, A. Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, 6, 841.
21. Barbour, B.; Hausser, M. Intersynaptic diffusion of neurotransmitter. *Trends. Neurosci.* **1997**, 20, 377.
22. Dingledine, R., *et al.* The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **1999**, 51, 7.
23. Kew, J. N. C.; Kemp, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* **2005**, 179, 4.
24. Rosenmund, C., *et al.* The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* **1998**, 280, 1596.
25. Armstrong, N.; Gouaux, E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-Sensitive glutamate receptor: Crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* **2000**, 28, 165.
26. Madden, D. R. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, 3, 91.
27. Willard, S. S.; Koochekpour, S. Glutamate, Glutamate Receptors, and Downstream Signaling Pathways. *Int. J. Biol. Sci.* **2013**, 9, 948.
28. Horning, M., *et al.* Molecular mechanism of glutamate receptor desensitization. *Biophys. J.* **2002**, 82, 182a.

29. Weston, M. C., *et al.* Conformational restriction blocks glutamate receptor desensitization. *Nat Struct Mol Biol* **2006**, 13, 1120.
30. Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* **1999**, 79, 1431.
31. Bordet, R., *et al.* Cerebral ischaemia: tomorrow's therapeutic tracks. *M S-Med. Sci.* **2009**, 25, 847.
32. Gielen, M. Molecular operation of ionotropic glutamate receptors: proteins that mediate the excitatory synaptic neurotransmission. *M S-Med. Sci.* **2010**, 26, 65.
33. Hansen, K. B., *et al.* Structural aspects of AMPA receptor activation, desensitization and deactivation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2007**, 17, 281.
34. Traynelis, S. F., *et al.* Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol. Rev.* **2010**, 62, 405.
35. Pinheiro, P. S.; Mulle, C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, 9, 423.
36. Sladeczek, F., *et al.* Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* **1985**, 317, 717.
37. Nicoletti, F., *et al.* Excitatory Amino-Acid Recognition Sites Coupled with Inositol Phospholipid-Metabolism - Developmental-Changes and Interaction with Alpha-1-Adrenoceptors. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 1931.
38. Nicoletti, F., *et al.* Coupling of Inositol Phospholipid-Metabolism with Excitatory Amino-Acid Recognition Sites in Rat Hippocampus. *J. Neurochem.* **1986**, 46, 40.
39. Nicoletti, F., *et al.* The Activation of Inositol Phospholipid-Metabolism as a Signal-Transducing System for Excitatory Amino-Acids in Primary Cultures of Cerebellar Granule Cells. *J. Neurosci.* **1986**, 6, 1905.
40. Pearce, B., *et al.* Astrocyte Glutamate Receptor Activation Promotes Inositol Phospholipid Turnover and Calcium Flux. *Neurosci Lett* **1986**, 72, 335.
41. Foster, A. C.; Fagg, G. E. Acidic Amino-Acid Binding-Sites in Mammalian Neuronal Membranes - Their Characteristics and Relationship to Synaptic Receptors. *Brain Res. Rev.* **1984**, 7, 103.
42. Pin, J. P.; Duvoisin, R. The Metabotropic Glutamate Receptors - Structure and Functions. *Neuropharmacology* **1995**, 34, 1.
43. Vilardaga, J. P., *et al.* G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *J. Cell Sci.* **2010**, 123, 4215.
44. Venkatakrisnan, A. J., *et al.* Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **2013**, 494, 185.
45. Flower, D. R. Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochem. Biophys. Rev. Biomembranes* **1999**, 1422, 207.
46. Robas, N., *et al.* Maximizing serendipity: strategies for identifying ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2003**, 3, 121.
47. Salon, J. A., *et al.* The Significance of G Protein-Coupled Receptor Crystallography for Drug Discovery. *Pharmacol. Rev.* **2011**, 63, 901.
48. Wood, M. R., *et al.* "Molecular Switches" on mGluR Allosteric Ligands That Modulate Modes of Pharmacology. *Biochemistry* **2011**, 50, 2403.
49. Vassilatis, D. K., *et al.* The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 4903.
50. Overington, J. P., *et al.* Opinion - How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 993.
51. Milligan, G. G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 158, 5.
52. McGrath, N. A., *et al.* A Graphical Journey of Innovative Organic Architectures That Have Improved Our Lives. *J. Chem. Educ.* **2010**, 87, 1348.
53. Bockaert, J.; Pin, J.-P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **1999**, 18, 1723.
54. Hofmann, K. P., *et al.* A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem. Sci.* **2009**, 34, 540.
55. Neves, S. R., *et al.* G protein pathways. *Science* **2002**, 296, 1636.

56. Rasmussen, S. G. F., *et al.* Crystal structure of the [bgr]2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **2011**, 477, 549.
57. Houamed, K. M., *et al.* Cloning, Expression, and Gene Structure of a G-Protein-Coupled Glutamate Receptor from Rat-Brain. *Science* **1991**, 252, 1318.
58. Masu, M., *et al.* Sequence and Expression of a Metabotropic Glutamate Receptor. *Nature* **1991**, 349, 760.
59. Abe, T., *et al.* Molecular Characterization of a Novel Metabotropic Glutamate Receptor Mglur5 Coupled to Inositol Phosphate/Ca²⁺ Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 13361.
60. Minakami, R., *et al.* A Variant of Metabotropic Glutamate-Receptor Subtype-5 - an Evolutionally Conserved Insertion with No Termination Codon. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1993**, 194, 622.
61. Nakajima, Y., *et al.* Molecular Characterization of a Novel Retinal Metabotropic Glutamate Receptor Mglur6 with a High Agonist Selectivity for L-2-Amino-4-Phosphonobutyrate. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 11868.
62. Okamoto, N., *et al.* Molecular Characterization of a New Metabotropic Glutamate-Receptor Mglur7 Coupled to Inhibitory Cyclic-Amp Signal-Transduction. *Invest. Opth. Vis. Sci.* **1994**, 35, 1584.
63. Pin, J. P., *et al.* Alternative Splicing Generates Metabotropic Glutamate Receptors Inducing Different Patterns of Calcium Release in Xenopus Oocytes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 10331.
64. Tanabe, Y., *et al.* A Family of Metabotropic Glutamate Receptors. *Neuron* **1992**, 8, 169.
65. Pin, J. P., *et al.* Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Therapeut.* **2003**, 98, 325.
66. Chun, L., *et al.* Structure and ligand recognition of class C GPCRs. *Acta Pharmacol Sin.* **2012**, 33, 312.
67. Conn, P. J., *et al.* Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, 8, 41.
68. O'Hara, P. J., *et al.* The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **1993**, 11, 41.
69. Adams, M. D.; Oxender, D. L. Bacterial periplasmic binding protein tertiary structures. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 15739.
70. Muto, T., *et al.* Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 3759.
71. Niswender, C. M.; Conn, P. J. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Ann. Rev. Pharmacol. and Toxicol.* **2010**, 50, 295.
72. Gomeza, J., *et al.* The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptor 1 cooperates with the other intracellular domains to control coupling to G-proteins. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 2199.
73. Havlickova, M., *et al.* The Second Intracellular Loop of Metabotropic Glutamate Receptors Recognizes C Termini of G-protein α -Subunits. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 35063.
74. Romano, C., *et al.* Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 28612.
75. Robbins, M. J., *et al.* Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1 alpha. *J. Neurochem.* **1999**, 72, 2539.
76. Tsuji, Y., *et al.* Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 28144.
77. Kunishima, N., *et al.* Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **2000**, 407, 971.
78. Tsuchiya, D., *et al.* Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd³⁺. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 2660.
79. Kniazeff, J., *et al.* Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat Struct Mol Biol* **2004**, 11, 706.

80. Huang, S. L., *et al.* Interdomain movements in metabotropic glutamate receptor activation. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 15480.
81. Parsons, C. G. <http://www.chrisparsons.de/Chris/Metabotropic.htm>
82. Conn, P. J.; Pin, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1997**, 37, 205.
83. Gasparini, F.; Spooren, W. Allosteric modulators for mGlu receptors. *Curr. Neuropharmacol.* **2007**, 5, 187.
84. Atwood, B. K., *et al.* Presynaptic long-term depression mediated by G-coupled receptors. *Trends. Neurosci.* **2014**.
85. Ferraguti, F.; Shigemoto, R. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* **2006**, 326, 483.
86. Corti, C., *et al.* Distribution and synaptic localisation of the metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) in the rodent CNS. *Neuroscience* **2002**, 110, 403.
87. Ottersen, O. P.; Landsend, A. S. Organization of glutamate receptors at the synapse. *Eur. J. Neurosci.* **1997**, 9, 2219.
88. Lujan, R., *et al.* Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **1996**, 8, 1488.
89. Hanson, J. E.; Smith, Y. Group I Metabotropic Glutamate Receptors at GABAergic Synapses in Monkeys. *J. Neurosci.* **1999**, 19, 6488.
90. Cartmell, J.; Schoepp, D. D. Regulation of Neurotransmitter Release by Metabotropic Glutamate Receptors. *J. Neurochem.* **2000**, 75, 889.
91. Schoepp, D. D., *et al.* Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* **1999**, 38, 1431.
92. Ohishi, H., *et al.* Distribution of the Messenger-Rna for a Metabotropic Glutamate Receptor, Mglur2, in the Central-Nervous-System of the Rat. *Neuroscience* **1993**, 53, 1009.
93. Kinoshita, A., *et al.* Presynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR4a, in the cerebellar cortex: A light and electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett* **1996**, 207, 199.
94. Corti, C., *et al.* Cloning and characterization of alternative mRNA forms for the rat metabotropic glutamate receptors mGluR7 and mGluR8. *Eur. J. Neurosci.* **1998**, 10, 3629.
95. Parsons, C. G., *et al.* Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* **2007**, 53, 699.
96. Shigemoto, R., *et al.* Differential Presynaptic Localization of Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes in the Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* **1997**, 17, 7503.
97. Palmer, E., *et al.* Trans-Acpd, a Selective Agonist of the Phosphoinositide-Coupled Excitatory Amino-Acid Receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **1989**, 166, 585.
98. Yin, S.; Niswender, C. M. Progress toward advanced understanding of metabotropic glutamate receptors: structure, signaling and therapeutic indications. *Cell. Signalling* **2014**, 26, 2284.
99. Pin, J. P., *et al.* The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biol. Cell* **2004**, 96, 335.
100. Jeffrey Conn, P., *et al.* Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, 8, 41.
101. Flor, P. J.; Acher, F. C. Orthosteric versus allosteric GPCR activation: The great challenge of group-III mGluRs. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, 84, 414.
102. Dore, A. S., *et al.* Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature* **2014**, 511, 557.
103. Wu, H., *et al.* Structure of a Class C GPCR Metabotropic Glutamate Receptor 1 Bound to an Allosteric Modulator. *Science* **2014**, 344, 58.
104. Conn, P. J.; Pin, J.-P. Pharmacology and functions of metabotropic cglutamate receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. and Toxicol.* **1997**, 37, 205.
105. Mercier, M. S.; Lodge, D. Group III Metabotropic Glutamate Receptors: Pharmacology, Physiology and Therapeutic Potential. *Neurochem. Res.* **2014**.

106. Acher, F. C., *et al.* Synthesis and pharmacological characterization of aminocyclopentanetricarboxylic acids: New tools to discriminate between metabotropic glutamate receptor subtypes. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3119.
107. Goudet, C., *et al.* Group III metabotropic glutamate receptors inhibit hyperalgesia in animal models of inflammation and neuropathic pain. *PAIN* **2008**, 137, 112.
108. Lopez, S., *et al.* Targeting group III metabotropic glutamate receptors produces complex behavioral effects in rodent models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **2007**, 27, 6701.
109. Stachowicz, K., *et al.* The group III mGlu receptor agonist ACPT-I exerts anxiolytic-like but not antidepressant-like effects, mediated by the serotonergic and GABA-ergic systems. *Neuropharmacology* **2009**, 57, 227.
110. Chapman, A. G., *et al.* Anticonvulsant activity of a mGlu4 α receptor selective agonist, (1S,3R,4S)-1-aminocyclopentane-1,2,4-tricarboxylic acid. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, 424, 107.
111. Schann, S., *et al.* Design and synthesis of APTCs (aminopyrrolidinetricarboxylic acids): Identification of a new group III metabotropic glutamate receptor selective agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4856.
112. Frauli, M., *et al.* Amino-Pyrrolidine Tricarboxylic Acids Give New Insight into Group III Metabotropic Glutamate Receptor Activation Mechanism. *Mol. Pharmacol.* **2007**, 71, 704.
113. Sibille, P., *et al.* Synthesis and biological evaluation of 1-amino-2-phosphonomethylcyclopropanecarboxylic acids, new group III metabotropic glutamate receptor agonists. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 3585.
114. Thomas, N. K., *et al.* (S)-3,4-DCPG, a potent and selective mGlu8 α receptor agonist, activates metabotropic glutamate receptors on primary afferent terminals in the neonatal rat spinal cord. *Neuropharmacology* **2001**, 40, 311.
115. Gasparini, F., *et al.* (R,S)-4-phosphonophenylglycine, a potent and selective group III metabotropic glutamate receptor agonist, is anticonvulsive and neuroprotective in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 289, 1678.
116. Mercier, M. S., *et al.* Characterisation of an mGlu8 receptor-selective agonist and antagonist in the lateral and medial perforant path inputs to the dentate gyrus. *Neuropharmacology* **2013**, 67, 294.
117. Filosa, R., *et al.* Synthesis and biological evaluation of (2S)- and (2R)-2-(3'-phosphonobicyclo[1.1.1]pentyl)glycines as novel group III selective metabotropic glutamate receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 14, 3811.
118. Acher, F. C. P., J.P.; Goudet, C.; Eschalier, A.; Busserolles, J.; Rigault, D.; Lemasson, I.; Cesarini, S.; Commare, B. Hypophosphorous acid derivatives having antihyperalgesic activity and biological applications thereof. *WO 2012/156931 A1* **2012**.
119. Ahmadian, H., *et al.* (S)-Homo-AMPA, a specific agonist at the mGlu(6) subtype of metabotropic glutamic acid receptors. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3700.
120. Tuckmantel, W., *et al.* Synthesis, molecular modeling, and biology of the 1-benzyl derivative of APDC - An apparent mGluR6 selective ligand. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 601.
121. Brabet, I., *et al.* Comparative effect of L-CCG-I, DCG-IV and gamma-carboxy-L-glutamate on all cloned metabotropic glutamate receptor subtypes. *Neuropharmacology* **1998**, 37, 1043.
122. Kingston, A. E., *et al.* LY341495 is a nanomolar potent and selective antagonist of group II metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* **1998**, 37, 1.
123. Jane, D. E., *et al.* New phenylglycine derivatives with potent and selective antagonist activity at presynaptic glutamate receptors in neonatal rat spinal cord. *Neuropharmacology* **1995**, 34, 851.
124. Jane, D. E., *et al.* Potent antagonists at the L-AP4- and (1S,3S)-ACPD-sensitive presynaptic metabotropic glutamate receptors in the neonatal rat spinal cord. *Neuropharmacology* **1996**, 35, 1029.
125. Miller, J. C., *et al.* Phenylglycine derivatives as antagonists of group III metabotropic glutamate receptors expressed on neonatal rat primary afferent terminals. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, 139, 1523.
126. Celanire, S.; Campo, B. Recent advances in the drug discovery of metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) activators for the treatment of CNS and non-CNS disorders. *Expert Opin. Drug. Dis.* **2012**, 7, 261.

127. Hopkins, C. R., *et al.* mGluR4-positive allosteric modulation as potential treatment for Parkinson's disease. *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 501.
128. Maj, M., *et al.* (-)-PHCCC, a positive allosteric modulator of mGluR4: characterization, mechanism of action, and neuroprotection. *Neuropharmacology* **2003**, *45*, 895.
129. Marino, M. J., *et al.* Allosteric modulation of group III metabotropic glutamate receptor 4: a potential approach to Parkinson's disease treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13668.
130. Niswender, C. M., *et al.* Discovery, characterization, and antiparkinsonian effect of novel positive allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor 4. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 1345.
131. Niswender, C. M., *et al.* Positive allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor subtype 4 (mGluR4): Part I. Discovery of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as novel mGluR4 positive allosteric modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5626.
132. Williams, R., *et al.* Positive allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor subtype 4 (mGluR4). Part II: Challenges in hit-to-lead. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 962.
133. Engers, D. W., *et al.* Synthesis and Evaluation of a Series of Heterobiaryl amides That Are Centrally Penetrant Metabotropic Glutamate Receptor 4 (mGluR4) Positive Allosteric Modulators (PAMs). *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4115.
134. Jones, C. K., *et al.* The metabotropic glutamate receptor 4-positive allosteric modulator VU0364770 produces efficacy alone and in combination with L-DOPA or an adenosine 2A antagonist in preclinical rodent models of Parkinson's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *340*, 404.
135. Williams, R., *et al.* Re-exploration of the PHCCC Scaffold: Discovery of Improved Positive Allosteric Modulators of mGluR4. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 411.
136. Le Poul, E., *et al.* A potent and selective metabotropic glutamate receptor 4 positive allosteric modulator improves movement in rodent models of Parkinson's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *343*, 167.
137. East, S. P., *et al.* An orally bioavailable positive allosteric modulator of the mGlu4 receptor with efficacy in an animal model of motor dysfunction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4901.
138. Bennouar, K. E., *et al.* Synergy between L-DOPA and a novel positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor 4: implications for Parkinson's disease treatment and dyskinesia. *Neuropharmacology* **2013**, *66*, 158.
139. Yin, S., *et al.* Selective actions of novel allosteric modulators reveal functional heteromers of metabotropic glutamate receptors in the CNS. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 79.
140. Schann, S., *et al.* Novel oxime derivatives and their use as allosteric modulators of metabotropic glutamate receptors. *WO 2011/051478 A1* **2011**.
141. Mitsukawa, K., *et al.* A selective metabotropic glutamate receptor 7 agonist: activation of receptor signaling via an allosteric site modulates stress parameters in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 18712.
142. Suzuki, G., *et al.* In vitro pharmacological characterization of novel isoxazolopyridone derivatives as allosteric metabotropic glutamate receptor 7 antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *323*, 147.
143. Kalinichev, M., *et al.* ADX71743, a potent and selective negative allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor 7: in vitro and in vivo characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, *344*, 624.
144. Gee, C. E., *et al.* Blocking Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 (mGlu7) via the Venus Flytrap Domain (VFTD) Inhibits Amygdala Plasticity, Stress, and Anxiety-related Behavior. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 10975.
145. Duvoisin, R. M., *et al.* Acute pharmacological modulation of mGluR8 reduces measures of anxiety. *Behav. Brain Res.* **2010**, *212*, 168.
146. Nicoletti, F., *et al.* Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, 1017.
147. Bleakman, D., *et al.* Glutamate receptors and pain. *Sem. Cell Dev. Biol.* **2006**, *17*, 592.
148. Neugebauer, V. Metabotropic glutamate receptors – important modulators of nociception and pain behavior. *PAIN* **2002**, *98*, 1.

149. Pilc, A., *et al.* Mood disorders: Regulation by metabotropic glutamate receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, 75, 997.
150. Swanson, C. J., *et al.* Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 131.
151. Alexander, G. M.; Godwin, D. W. Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy. *Epilepsy Res.* **2006**, 71, 1.
152. Duty, S. Therapeutic potential of targeting group III metabotropic glutamate receptors in the treatment of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, 161, 271.
153. Conn, P. J., *et al.* Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, 6, 787.
154. Valenti, O., *et al.* Group III metabotropic glutamate receptor-mediated modulation of the striatopallidal synapse. *J. Neurosci.* **2003**, 23, 7218.
155. Agari, T., *et al.* Intrapallidal metabotropic glutamate receptor activation in a rat model of Parkinson's disease: behavioral and histological analyses. *Brain Res.* **2008**, 1203, 189.
156. MacInnes, N., *et al.* Activation of group III metabotropic glutamate receptors in selected regions of the basal ganglia alleviates akinesia in the reserpine-treated rat. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, 141, 15.
157. Cuomo, D., *et al.* Metabotropic glutamate receptor subtype 4 selectively modulates both glutamate and GABA transmission in the striatum: implications for Parkinson's disease treatment. *J. Neurochem.* **2009**, 109, 1096.
158. Battaglia, G., *et al.* Pharmacological activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors reduces nigrostriatal degeneration in mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurosci.* **2006**, 26, 7222.
159. Goudet, C., *et al.* Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. *Brain Res. Rev.* **2009**, 60, 43.
160. Varney, M. A.; Gereau, R. W. t. Metabotropic glutamate receptor involvement in models of acute and persistent pain: prospects for the development of novel analgesics. *Curr. Drug Targets CNS and Neuro. Dis.* **2002**, 1, 283.
161. Goudet, C., *et al.* Group III metabotropic glutamate receptors inhibit hyperalgesia in animal models of inflammation and neuropathic pain. *Neuropharmacology* **2008**, 55, 599.
162. Osikowicz, M., *et al.* Glutamate receptor ligands attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate morphine effects in a mouse model of neuropathic pain. *PAIN* **2008**, 139, 117.
163. Vogel, J. R., *et al.* A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia* **1971**, 21, 1.
164. Pałucha, A., *et al.* Group III mGlu receptor agonists produce anxiolytic- and antidepressant-like effects after central administration in rats. *Neuropharmacology* **2004**, 46, 151.
165. Stachowicz, K., *et al.* Anxiolytic-like effects of PHCCC, an allosteric modulator of mGlu4 receptors, in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, 498, 153.
166. Linden, A. M., *et al.* Increased c-Fos expression in the centromedial nucleus of the thalamus in metabotropic glutamate 8 receptor knockout mice following the elevated plus maze test. *Neuroscience* **2003**, 121, 167.
167. Stachowicz, K., *et al.* Selective activation of metabotropic G-protein-coupled glutamate 7 receptor elicits anxiolytic-like effects in mice by modulating GABAergic neurotransmission. *Behav. Pharmacol.* **2008**, 19, 597.
168. Cryan, J. F., *et al.* Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7. *Eur. J. Neurosci.* **2003**, 17, 2409.
169. Murray, C. J.; Lopez, A. D. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* **1996**, 274, 740.
170. Mathew, S. J., *et al.* Novel Drugs and Therapeutic Targets for Severe Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology* **2008**, 33, 2080.
171. Mitani, H., *et al.* Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2006**, 30, 1155.
172. Frye, M. A., *et al.* Low cerebrospinal fluid glutamate and glycine in refractory affective disorder. *Biol. Psychiatry* **2007**, 61, 162.

173. Kłak, K., *et al.* Combined administration of PHCCC, a positive allosteric modulator of mGlu4 receptors and ACPT-I, mGlu III receptor agonist evokes antidepressant-like effects in rats. *Amino Acids* **2007**, 32, 169.
174. Palucha, A., *et al.* Activation of the mGlu7 receptor elicits antidepressant-like effects in mice. *Psychopharmacology* **2007**, 194, 555.
175. Palucha-Poniewiera, A., *et al.* The antidepressant-like action of metabotropic glutamate 7 receptor agonist N,N'-bis(diphenylmethyl)-1,2-ethanediamine (AMN082) is serotonin-dependent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, 334, 1066.
176. Scheyer, R. D. Involvement of glutamate in human epileptic activities. *Prog. Brain Res.* **1998**, 116, 359.
177. Meldrum, B. S., *et al.* The effects of AMPA receptor antagonists on kindled seizures and on reflex epilepsy in rodents and primates. *Epilepsy Res. Supp.* **1992**, 9, 307.
178. Moldrich, R. X.; Beart, P. M. Emerging signalling and protein interactions mediated via metabotropic glutamate receptors. *Curr. Drug Targets CNS and Neuro. Dis.* **2003**, 2, 109.
179. Suzuki, K., *et al.* Anticonvulsant action of metabotropic glutamate receptor agonists in kindled amygdala of rats. *Neurosci. Lett.* **1996**, 204, 41.
180. Ghauri, M., *et al.* Convulsant and anticonvulsant actions of agonists and antagonists of group III mGluRs. *Neuroreport* **1996**, 7, 1469.
181. Wang, X., *et al.* Altered glutamate and GABA release within thalamocortical circuitry in metabotropic glutamate receptor 4 knockout mice. *Neuroscience* **2005**, 134, 1195.
182. Snead, O. C., 3rd, *et al.* Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J. Neurosci.* **2000**, 20, 6218.
183. Ngomba, R. T., *et al.* Positive allosteric modulation of metabotropic glutamate 4 (mGlu4) receptors enhances spontaneous and evoked absence seizures. *Neuropharmacology* **2008**, 54, 344.
184. Sansig, G., *et al.* Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J. Neurosci.* **2001**, 21, 8734.
185. Duvoisin, R. M., *et al.* Increased measures of anxiety and weight gain in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR8. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, 22, 425.
186. Mao, L., *et al.* Group III metabotropic glutamate receptors and drug addiction. *Front. Med.* **2013**, 7, 445.
187. Mao, L.; Wang, J. Q. Distinct inhibition of acute cocaine-stimulated motor activity following microinjection of a group III metabotropic glutamate receptor agonist into the dorsal striatum of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2000**, 67, 93.
188. Mao, L., *et al.* Activation of group III metabotropic glutamate receptors inhibits basal and amphetamine-stimulated dopamine release in rat dorsal striatum: an in vivo microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, 404, 289.
189. Li, X., *et al.* Metabotropic Glutamate Receptor 7 Modulates the Rewarding Effects of Cocaine in Rats: Involvement of a Ventral Pallidal GABAergic Mechanism. *Neuropsychopharmacology* **2009**, 34, 1783.
190. Li, X., *et al.* Activation of mGluR7s inhibits cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior by a nucleus accumbens glutamate-mGluR2/3 mechanism in rats. *J. Neurochem.* **2010**, 114, 1368.
191. Bahi, A., *et al.* Pharmacological modulation of mGluR7 with AMN082 and MMPIP exerts specific influences on alcohol consumption and preference in rats. *Addict. Biol.* **2012**, 17, 235.
192. Bahi, A. Viral-Mediated Knockdown of mGluR7 in the Nucleus Accumbens Mediates Excessive Alcohol Drinking and Increased Ethanol-Elicited Conditioned Place Preference in Rats. *Neuropsychopharmacology* **2013**, 38, 2109.
193. Bäckström, P.; Hyttiä, P. Suppression of alcohol self-administration and cue-induced reinstatement of alcohol seeking by the mGlu2/3 receptor agonist LY379268 and the mGlu8 receptor agonist (S)-3,4-DCPG. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, 528, 110.
194. Moghaddam, B. Targeting metabotropic glutamate receptors for treatment of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Psychopharmacology* **2004**, 174, 39.

195. Lee, H. G., *et al.* The role of metabotropic glutamate receptors in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol. Exp.* **2004**, 64, 89.
196. Fallarino, F., *et al.* Metabotropic glutamate receptor-4 modulates adaptive immunity and restrains neuroinflammation. *Nat. Med.* **2010**, 16, 897.
197. Julio-Pieper, M., *et al.* Exciting Times beyond the Brain: Metabotropic Glutamate Receptors in Peripheral and Non-Neural Tissues. *Pharmacol. Rev.* **2011**, 63, 35.
198. Babic, T.; Travagli, R. A. Role of metabotropic glutamate receptors in the regulation of pancreatic functions. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, 87, 535.
199. Lu, Y. Metabotropic glutamate receptors in auditory processing. *Neuroscience* **2014**, 274, 429.
200. Pop, A., *et al.* Fragile X syndrome: a preclinical review on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists and drug development. *Psychopharmacology* **2014**, 231, 1217.
201. Teh, J.; Chen, S. mGlu Receptors and Cancerous Growth. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal* **2012**, 1, 211.

Chapitre I : État de l'art du projet

Chapitre I : État de l'art du projet

I.1. Découverte du (S)-PCEP

1.1. L-AP4 : un outil très utilisé

Anciennement appelé L-APB pour acide L-2-**amino-4-phosphorobutyrique**, le L-AP4 (acide L-2-**amino-4-phosphonobutanoïque**, Figure I-1) est un outil pharmacologique très utilisé aujourd'hui. Il y a 40 ans, ce composé, sous la forme racémique, était étudié en tant qu'inhibiteur de la transmission nerveuse comme par exemple au niveau du muscle d'un locuste²⁰². Il fut très vite étudié en neuroscience où plusieurs travaux montrent que ce composé sous sa forme (L), jouait un rôle d'antagoniste de la transmission synaptique au niveau de l'hippocampe²⁰³ et du cortex entorhinal latéral²⁰⁴ chez le rat. D'autres études ont montré son rôle inhibiteur de la transmission nerveuse au niveau de la moelle épinière chez la grenouille²⁰⁵ ou encore de la zone du cortex qui contrôle l'odorat.²⁰⁶ De plus, le L-AP4 fut aussi utilisé afin d'étudier le fonctionnement des récepteurs de goût.^{207,208}

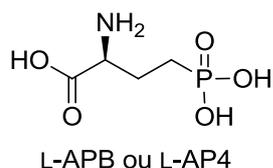


Figure I-1 Structure du L-AP4

Au fil des années, son rôle d'inhibiteur était moins étudié et c'est à l'inverse sa capacité agoniste qui fut observée, et notamment, sur les récepteurs mGlu.²⁰⁹ Aujourd'hui, de nombreux laboratoires utilisent ce composé afin d'étudier son potentiel thérapeutique sur les récepteurs mGlu du groupe III.^{91,115} Effectivement, à ce jour, le L-AP4 est toujours considéré comme un des meilleurs agonistes des récepteurs mGlu du groupe III avec des valeurs d' EC_{50} très intéressantes (Tableau I-1). Cependant, l'inconvénient majeur de cette molécule, est qu'elle n'est pas sélective au sein du groupe III, notamment entre mGlu4, mGlu6 et mGlu8 (son activité est 100 fois plus faible sur le sous-type 7). L'autre inconvénient à signaler, est son incapacité à passer la BHE.

Tableau I-1 EC₅₀ du L-AP4 sur les récepteurs mGlu²¹⁰

Mesure de la production d'inositol triphosphate (IP₃) et de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293

Composé	Test	mGlu4	mGlu6	mGlu7	mGlu8
		EC ₅₀ μM (n)			
L-AP4	Production d'IP ₃	0,096 ± 0,001 (61)	3,3 ± 0,5 (16)	306 ± 70 (10)	0,24 ± 0,025 (45)
	Libération de Ca ²⁺	0,13 ± 0,02 (34)	1,0 ± 0,3 (7)	249 ± 106 (3)	0,30 ± 0,08 (43)

1.2. Utilisation de la chimie informatique

Au fil des années, le développement de nouveaux médicaments s'est complexifié, notamment parce que les critères de mise sur le marché d'un nouveau médicament sont devenus de plus en plus drastiques. Par conséquent, le temps et le coût du processus de découverte d'un nouveau composé thérapeutique est de plus en plus conséquent (15 ans pour un budget de 1 milliard d'euros en moyenne). Il est donc important d'optimiser au maximum le temps des différentes étapes de développement d'un médicament et en particulier l'identification d'une touche et l'optimisation de cette dernière jusqu'au composé référence. Pour cela, la chimie informatique a permis de développer de nouveaux outils et notamment le criblage virtuel. Le terme de criblage virtuel comprend tout procédé de recherche électronique dans des banques de données moléculaires permettant la sélection de molécules.^{211,212} Le criblage virtuel est réalisé *in silico* et permet de réaliser de manière rapide et à moindre coût des prédictions de l'activité des molécules. Cette technique est complémentaire au criblage réel à haut débit car ce dernier est cependant limité par le nombre de composés qu'il est possible de tester en un temps raisonnable et par le coût des tests. La démarche peut se faire selon différents types de contraintes (descripteurs physicochimiques, pharmacophore, topologie d'un site actif) et doit aboutir à la sélection d'un faible pourcentage (1-2%) de molécules présentes dans la banque de données de molécules de départ (chimiothèque). Le docking (ou ancrage) à haut débit consiste à prédire à la fois la conformation active et l'orientation relative de chacune des molécules de la chimiothèque sélectionnée par rapport à la cible d'intérêt. Nous pouvons ensuite évaluer le niveau d'interaction entre chaque ligand et la cible thérapeutique. Toutes ces méthodes utilisent le principe de complémentarité stérique ou d'interactions moléculaires afin de placer un ligand dans le site actif d'une cible. Dans le cadre de nos travaux, un criblage virtuel basé sur la structure

tridimensionnelle de du récepteur mGlu4 a été mis en place afin de découvrir de nouveaux agonistes de ce récepteur. Ce travail a été effectué durant le doctorat de Nicolas Triballeau.^{210,213}

Avant de cribler un grand nombre de molécules, il faut tout d'abord identifier la structure de la cible visée et plus particulièrement la structure tridimensionnelle du domaine extracellulaire de du récepteur mGlu4. Ce travail a débuté durant le doctorat de Anne-Sophie Bessis qui a réussi à déterminer cette structure grâce à un modèle par homologie.²¹⁴ Pourquoi par homologie ? En fait, au début de sa thèse en 1999, il n'existait aucun domaine cellulaire cristallisé du sous-type 4. L'approche moléculaire fut alors basée sur les travaux de O'Hara⁶⁸ qui, en 1993, a identifié de fortes similarités entre le domaine extracellulaire de 5 récepteurs mGlu (1 à 5) et les Protéines Périplasmiques Bactériennes (PPB) dont la structure tridimensionnelle était déjà décrite⁶⁹ et plus particulièrement les protéines LBP (Leu Binding Protein) et LIVBP (Leu-Ile-Val Binding Protein). Ces protéines sont constituées de deux lobes reliés par une charnière stabilisée par des liaisons hydrogènes. Les ligands peuvent interagir avec la protéine lorsque les deux lobes sont ouverts et une fois ces derniers refermés, les ligands restent liés à la protéine par l'intermédiaire de différentes interactions. Ce mécanisme d'action est appelé Venus Flytrap (VFT) par homologie avec la façon dont la plante carnivore Vénus de Dionée capture sa proie (Figure I-2).

Figure I-2 Mécanisme d'action de la Vénus de Dionée

Etant donné que la similitude structurale entre les PBP et le domaine extracellulaire des récepteurs mGlu est vraiment forte, nous pouvons alors penser que le mécanisme de reconnaissance du ligand des récepteurs mGlu est similaire à celui des PBP, c'est-à-dire que l'activation de ces récepteurs nécessite la fermeture des deux lobes.

1.3. Une nouvelle poche d'interaction

L'ancrage du (*S*)-PCEP dans le récepteur mGlu4 révèle une nouvelle poche de liaison entre les ligands et le récepteur. Tout ce travail est extrêmement bien décrit dans l'article de Chelliah Selvam *et al.*²¹⁰ Pour bien comprendre cette étude, il faut tout d'abord repartir du docking du L-AP4 dans le récepteur mGlu4 (Figure **I-4**).

Figure **I-4** Docking du L-AP4 dans le récepteur mGlu4²¹³

C en gris, H en cyan, N en bleu, O en rouge

Nous pouvons apercevoir les résidus importants pour l'ancrage du L-AP4. En effet, la partie acide aminé est liée par liaisons hydrogènes avec l'alanine 180, la thréonine 182 du lobe 1 et la sérine 159 du lobe 1 ainsi qu'avec l'aspartate 312 et la tyrosine 230 du lobe 2. Ces résidus ont été décrits comme la signature de la poche glutamate car on les retrouve dans huit sous-types mGlu.²¹⁹ Puis, les oxygènes de l'acide phosphonique interagissent avec 4 résidus basiques qui sont l'arginine 78 et les deux lysines 74 et 405 du lobe 1 et avec la sérine 313 et la lysine 317 du lobe 2.

Lorsqu'on observe le docking du (*S*)-PCEP sur le récepteur mGlu4 (Figure **I-5**), on retrouve évidemment toutes ces interactions essentielles (sauf celle avec la sérine 313 qui est due au remplacement d'un oxygène de l'acide phosphonique par un carbone du phosphinique).

Figure **I-5** Docking du (*S*)-PCEP dans le récepteur mGlu4²²⁰

A gauche : interactions de la partie glutamate ; A droite : interactions de la nouvelle poche

En revanche, on observe une nouvelle poche de liaison où l'acide carboxylique distal du (*S*)-PCEP va interagir via des liaisons hydrogènes avec 4 résidus du lobe 1 et plus particulièrement, la lysine 74, les sérines 110 et 157 ainsi que la glycine 158. Nous avons alors défini ces deux poches distinctement avec la poche glutamate ou proximale (L-Glu poche en bleu) qui est conservée chez tous les récepteurs mGlu et sur laquelle aucune sélectivité ne pourra être trouvée et la seconde poche, la nouvelle poche ou poche distale (orange), qui ouvre de nouvelles perspectives avec la synthèse de nouveaux ligands sélectifs au sein du groupe III des récepteurs mGlu (Figure **I-6**).

Figure **I-6** Visualisation des deux poches d'interaction du (*S*)-PCEP dans le récepteur mGlu4²²⁰

Le résultat de cette étude est très bien résumé par le schéma ci-dessous (Figure I-7).

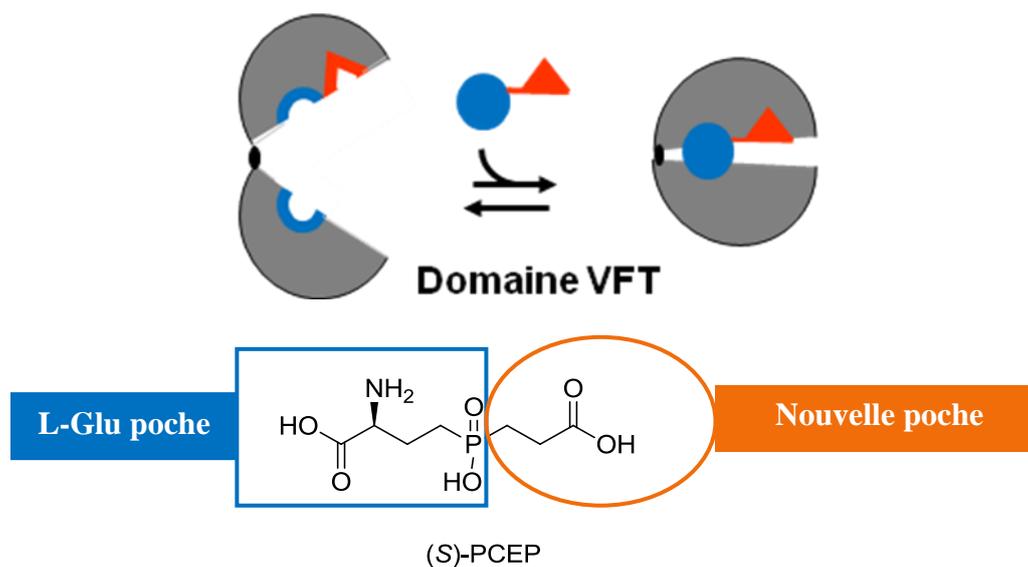


Figure I-7 Schéma résumant les deux poches d'interactions du (S)-PCEP dans le récepteur mGlu4

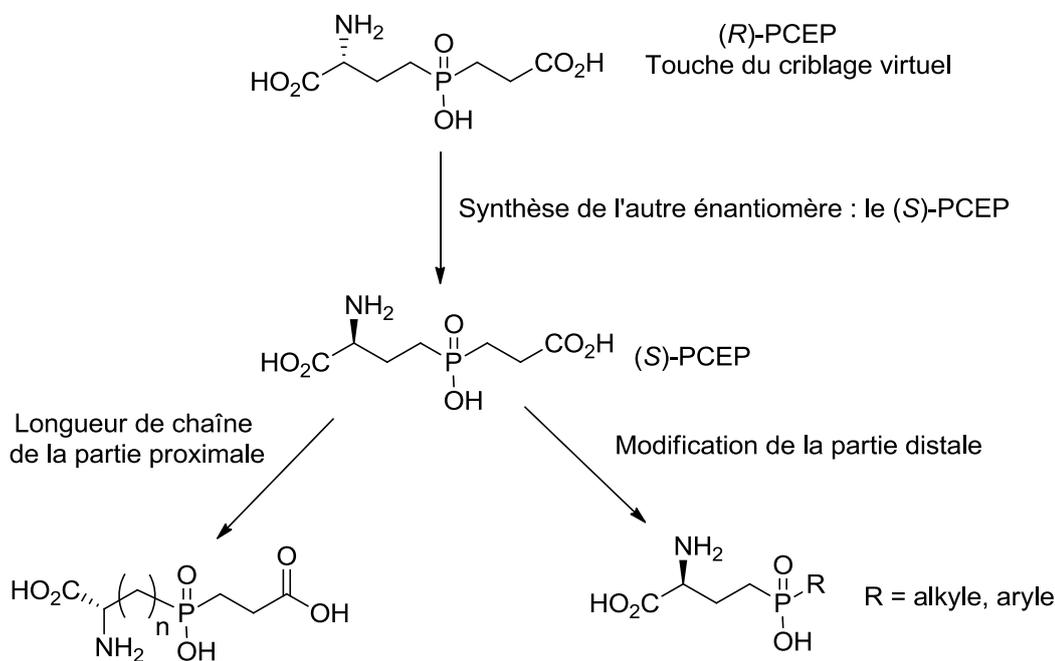
1.4. Sélectivité au sein des récepteurs mGlu du groupe III

Comme nous l'avons évoqué précédemment, il est très difficile, voir impossible, de trouver de la sélectivité au niveau de la poche du glutamate car tous les résidus responsables des interactions sont communs aux huit récepteurs mGlu. En revanche, comme nous pouvons le voir sur les séquences primaires (Figure I-8) des récepteurs mGlu, il existe de réelles différences au niveau des résidus de la nouvelle poche de liaison identifiée grâce au docking du (S)-PCEP dans le récepteur mGlu4. En effet, alors que la sérine 110 est conservée chez tous les sous-types des groupes II et III, la combinaison des trois autres résidus (Lys 74, Ser 157 et Gly 158) est différente chez les 4 sous-types au sein du groupe III et n'est pas du tout présente dans les autres groupes (groupes I et II). Ces observations vont alors nous conduire à moduler la partie chimique ancrée dans la nouvelle poche d'interactions (orange, partie distale) afin d'augmenter l'activité agoniste sur le récepteur mGlu4 mais surtout de gagner en sélectivité vis-à-vis des trois sous-types du groupe III, mGlu6, mGlu7 et mGlu8.

Figure I-8 Trois fractions des séquences primaires de rat des huit récepteurs mGlu²²⁰

I.2. Du (S)-PCEP au LSP4-2022

2.1. Objectifs

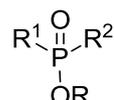
Schéma I-1 Optimisation du (S)-PCEP²²⁰

Comme nous l'avons évoqué précédemment (paragraphe I.1.4.), nous avons obtenu une touche intéressante, le (R)-PCEP, à l'issue du criblage virtuel mené par Nicolas Triballeau pendant son doctorat. A partir de ce composé, nous avons alors synthétisé son énantiomère opposé, le (S)-PCEP, qui montre une activité agoniste sur le récepteur mGlu4 vraiment intéressante. A partir de ce composé, un gros travail d'optimisation chimique (mené par le Dr. Chelliah Selvam lors de son stage postdoctoral entre 2004 et 2007) a été mené afin d'obtenir de nouveaux agonistes plus actifs et plus sélectifs. Pour cela, la longueur de chaîne proximale a été étudiée et une

librairie de phosphinates dissymétriques a été obtenue en diversifiant la partie distale (R, Schéma **I-1**).

2.2. Utilisation des acides phosphiniques et des phosphinates dissymétriques

Les acides phosphiniques et les phosphinates sont des composés phosphorés pentavalents où le phosphore est relié à 2 oxygènes (Figure **I-9**).



R, R¹ et R² = H, alkyle, aryle

Figure **I-9** Structure du motif phosphinate (acide phosphinique si R = H)

Ce motif est très présent dans les structures de molécules biologiques. Par exemple, comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, la phosphinotricine (Figure **I-10**), ainsi que ses dérivés (dont le (*S*)-PCEP) sont des inhibiteurs de la glutamine synthétase chez la plante.^{217,218}

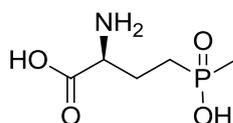


Figure **I-10** Structure de la phosphinotricine

D'autres biomolécules comportant ce motif sont très étudiées aujourd'hui et notamment les acides α -aminophosphiniques (Mucha *et al.*).²²¹ Ces derniers sont en fait des analogues d'acide aminés ou la fonction acide phosphinique mime parfaitement l'acide carboxylique. Les groupements acides carboxyliques et acides phosphiniques possèdent des propriétés assez similaires bien qu'ils soient différents sur trois points : 1) H₃PO₂ (acide hypophosphoreux) a une géométrie tétraédrique alors que CO₂H est plan. 2) H₃PO₂ est beaucoup plus acide que CO₂H. 3) L'atome de phosphore est plus gros que celui de carbone. En revanche, la géométrie tétraédrique de l'acide phosphinique lui confère une conformation ressemblante à l'état de transition de l'hydrolyse d'un ester ou d'un amide. Cette conformation est très connue pour stabiliser les sites actifs des enzymes et notamment des métalloprotéases.²²² On peut aussi retrouver des inhibiteurs d'aminopeptidase²²³⁻²²⁵ ou encore d'uréase.²²⁶ Enfin, un des inhibiteurs d'enzyme

comportant ce motif le plus connu est le Fosinopril (Figure I-11) qui est un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE pour angiotensin I converting enzyme)²²⁷ utilisé pour le traitement de l'hypertension.

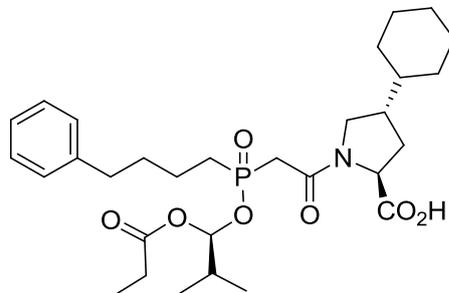


Figure I-11 Structure du Fosinopril

On peut aussi retrouver ces acides phosphiniques dans certaines structures de chélateurs de métaux et en particuliers des lanthanides utilisés pour l'imagerie médicale. Par exemple, Notni *et al*, ont récemment développé de nouveaux agents de marquages basés sur des chélateurs de Ga⁶⁸ et notamment le PrP9 (Figure I-12).²²⁸

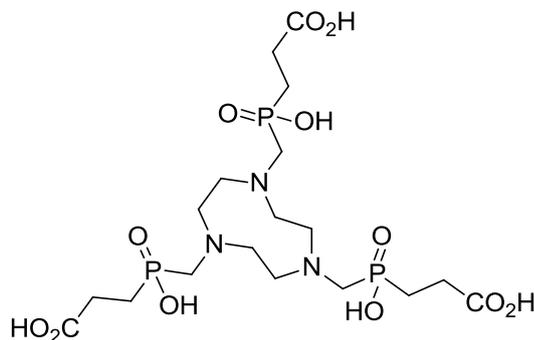


Figure I-12 Structure du PrP9

Enfin, dans le domaine des neurosciences qui nous intéresse plus particulièrement, le motif phosphinate est déjà utilisé dans la synthèse d'analogues du GABA possédant des activités agonistes^{229,230} ou antagonistes^{231,232} sur les récepteurs de ce neurotransmetteur. On peut le retrouver également, dans certaines structures d'inhibiteur de glutamate carboxypeptidase II.²³³ Après avoir référencé les principales applications des acides phosphiniques et des phosphinates dissymétriques, intéressons-nous à la synthèse de ces derniers.

2.3. Données bibliographiques : synthèse d'acides phosphiniques et de phosphinates dissymétriques

L'obtention de ce type de motif implique bien évidemment la formation de deux liaisons phosphore-carbone à partir de l'acide hypophosphoreux H_3PO_2 (ou bien d'un de ses sels). La plus grande difficulté dans la synthèse de ces composés est d'éviter d'obtenir des phosphinates symétriques.²³⁴ Pour éviter cela, il est donc très important de développer des méthodes de synthèses efficaces permettant d'obtenir exclusivement des dérivés dissymétriques. Les voies de synthèse donnant accès à des phosphinates non symétriques passeront donc forcément par un intermédiaire acide H-phosphinique ou H-phosphinate mono substitué. De nombreuses méthodes de synthèse de ce motif intermédiaire ont été rapportées par Montchamp *et al.*²³⁵

2.3.1. Synthèse d'acides H-phosphiniques et de H-phosphinates

Addition radicalaire

En 1980, Nifant'ev *et al.*,²³⁶ ont développé des conditions de réaction radicalaire (Schéma **I-2**) afin d'obtenir des acides H-phosphiniques. Pour cela, ils forment un radical centré sur l'atome de phosphore qui va venir s'additionner sur une double liaison. Plusieurs sources de radicaux ont été utilisées et notamment, des peroxydes,^{236,237} l'AIBN²³⁸ ainsi que des trialkyles boranes.^{237,239-241}

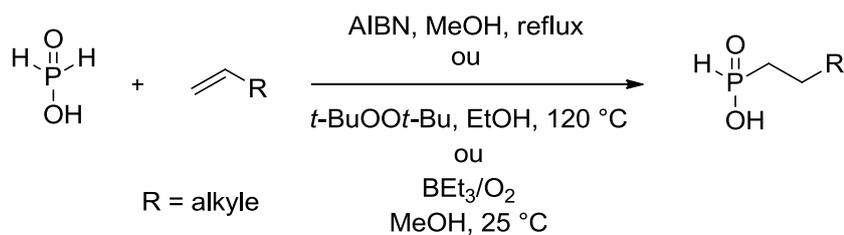


Schéma **I-2** Alkylation radicalaire de l'acide hypophosphoreux

Passage par le BTSP

Au début des années 1990, Boyd *et al.*, ont introduit une nouvelle méthode de synthèse d'acides H-phosphiniques²⁴² en passant par un intermédiaire silylé, le bis(triméthylsilyl)phosphonite BTSP. Cet intermédiaire phosphoré trivalent P^{III} est observé après réaction de l'hypophosphite d'ammonium avec de l'HMDS à 110°C pendant deux heures (ou en présence de TMSCl et de NEt_3). Ensuite, après avoir réagi avec un halogénure d'alkyle, le composé phosphoré

monoalkylé est isolé après hydrolyse des deux groupements silylés par le MeOH. Il faut signaler qu'un excès de BTSP (4-6 équiv) est nécessaire afin d'éviter la dialkylation symétrique observée par Majewski *et al.*²⁴³ En utilisant les mêmes conditions réactionnelles, Boyd *et al.*, ont également décrit des additions de Michael du BTSP sur divers acrylates (Schéma I-3).^{244,245}

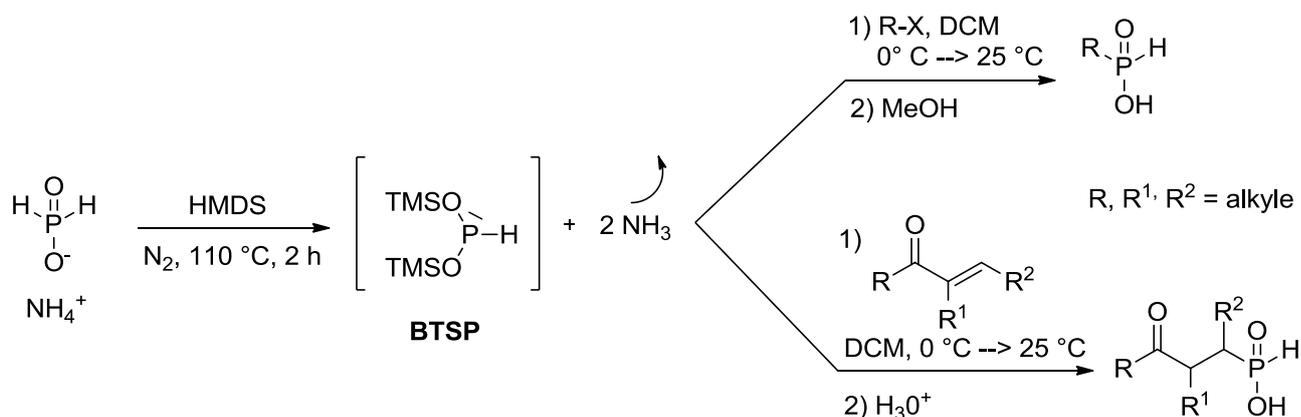


Schéma I-3 Addition du BTSP sur des halogénures d'alkyles et des acrylates

Addition nucléophile en milieu basique – déprotonation d'un ester de phosphinate

Contrairement aux deux premières méthodes décrites précédemment, les H-phosphinates peuvent aussi être obtenus par simple addition nucléophile à partir d'un ester de phosphinate. Après déprotonation de l'ester de l'acide hypophosphoreux à l'aide d'une base (NEt₃, NaH, LiHMDS, LDA.... etc), le nucléophile formé peut alors réagir avec plusieurs types d'électrophile : des halogénures d'alkyles,^{246,247} des aldéhydes,^{231,239,248} des imines^{249,250} ou encore des acrylates²³⁹ (Schéma I-4).

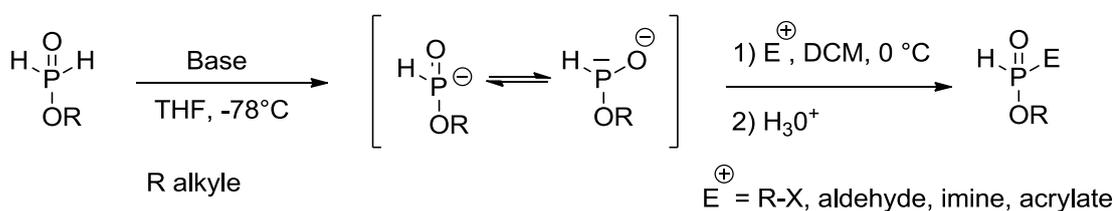


Schéma I-4 Addition nucléophile d'ester d'acide hypophosphoreux

Couplage pallado-catalysé

Cette méthode de synthèse d'acides H-phosphiniques a été élaborée par le Prof. Montchamp qui est un spécialiste de la phosphination catalytique. En effet, il a d'abord décrit une méthodologie de couplage croisé pallado-catalysé entre l'hypophosphite d'anilinium et des alcènes activés (Schéma I-5).

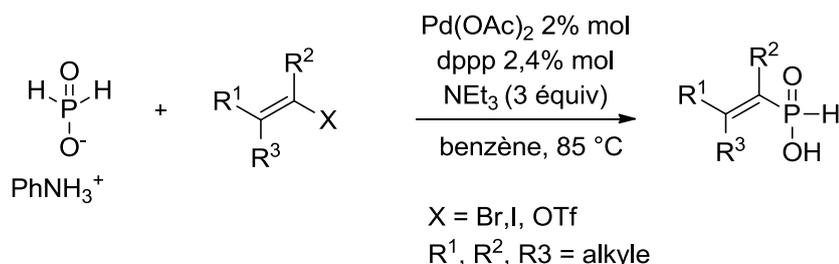


Schéma I-5 Synthèse d'acides H-phosphiniques par couplage pallado-catalysé

Puis il a aussi décrit l'obtention d'acides H-phosphiniques allyliques et benzyliques à partir d'acide hypophosphoreux (Schéma I-6).^{251,252}

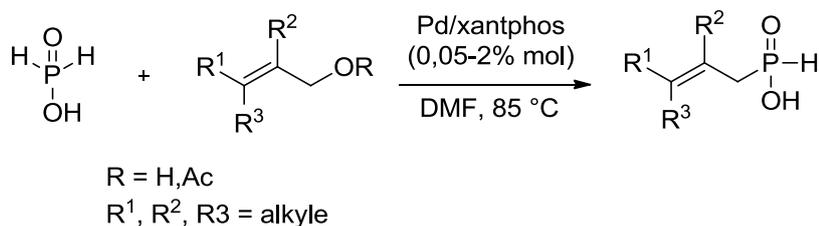


Schéma I-6 Allylation d'acide hypophosphoreux pallado-catalysée

Enfin, quelques méthodes d'arylation directe de l'hypophosphite d'anilinium ont été reportées dans le but d'obtenir des acides H-phosphiniques aromatiques (Schéma I-7).^{239,253} Quelques exemples sont aussi décrits à partir de phosphinate de méthyle ou de *t*-butyle.²⁵⁴

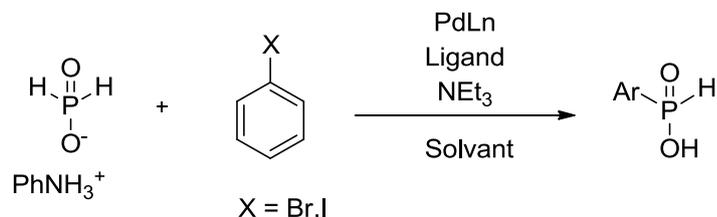


Schéma I-7 Arylation pallado-catalysée

Possédant l'intermédiaire acide H-phosphinique ou H-phosphinate synthétisé, l'objectif suivant est de former la seconde liaison P-C afin d'obtenir des acides phosphiniques ou des phosphinates dissymétriques.

2.3.2. Seconde alkylation de l'atome de phosphore

Tout abord, il est important de signaler que la seconde alkylation du phosphore est généralement plus difficile que la première. Pour former la seconde liaison P-C, on retrouve les mêmes méthodologies de synthèse, décrites précédemment, que pour la formation de la première liaison P-C. En effet, on retrouve des conditions radicalaires^{231,237,255} mais aussi des couplages pallado-catalysés.²⁵⁶ Ces deux voies de synthèses sont plus rares contrairement aux substitutions (réaction de Michaelis-Arbuzov) et additions nucléophiles d'un P^{III} sur un électrophile. Le P^{III} peut être formé de deux façons : soit par déprotonation de l'hydrogène relié au phosphore ou alors par silylation (Schéma I-8).

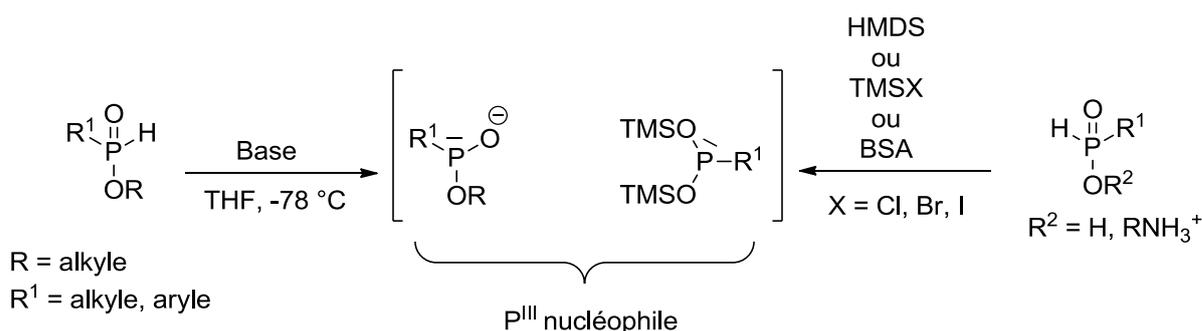


Schéma I-8 Obtention du P^{III} trivalent nucléophile

Les bases utilisées pour la déprotonation sont assez variées.²⁵⁷ En effet, il est possible d'utiliser des bases aminées (NEt₃, DIEA),²³⁹ de l'hydrure de sodium,^{229,231} des alcoolates de sodium²⁴⁶ ou encore des bases lithiées.^{247,258} De l'autre côté, les agents silylants rapportés sont l'HMDS²⁴², TMSX/NEt₃²⁵⁹ et la BSA (N,O-bis-(trimethylsilyl)acétamide).^{240,260} La BSA est très utilisée à ce jour car c'est un composé qui est plus facile à hydrolyser et souvent les réactions sont plus propres.

En ce qui concerne les électrophiles utilisés pour cette seconde alkylation de l'atome de phosphore, on retrouve principalement les mêmes que pour la première alkylation. Effectivement, nous pouvons retrouver des aldéhydes,²⁵⁸ des imines,^{261,262} des acrylates,^{249,263} des époxydes^{231,264} ou encore des halogénures d'alkyle^{240,264} (Schéma I-9). Cependant, pour ces

derniers, il est très important de signaler que la formation de la seconde liaison P-C est plus difficile à réaliser et qu'il faut que ces halogénures soient activés par conjugaison ou par un groupement électro attracteur pour que la substitution puisse avoir lieu (bromure de benzyle, bromure allylique, dibromoéthane...etc).^{240,259,260,265} Pour les halogénures non activés, la réaction peut fonctionner aussi mais avec des temps de réaction beaucoup plus longs et des rendements plus faibles.²⁵⁷

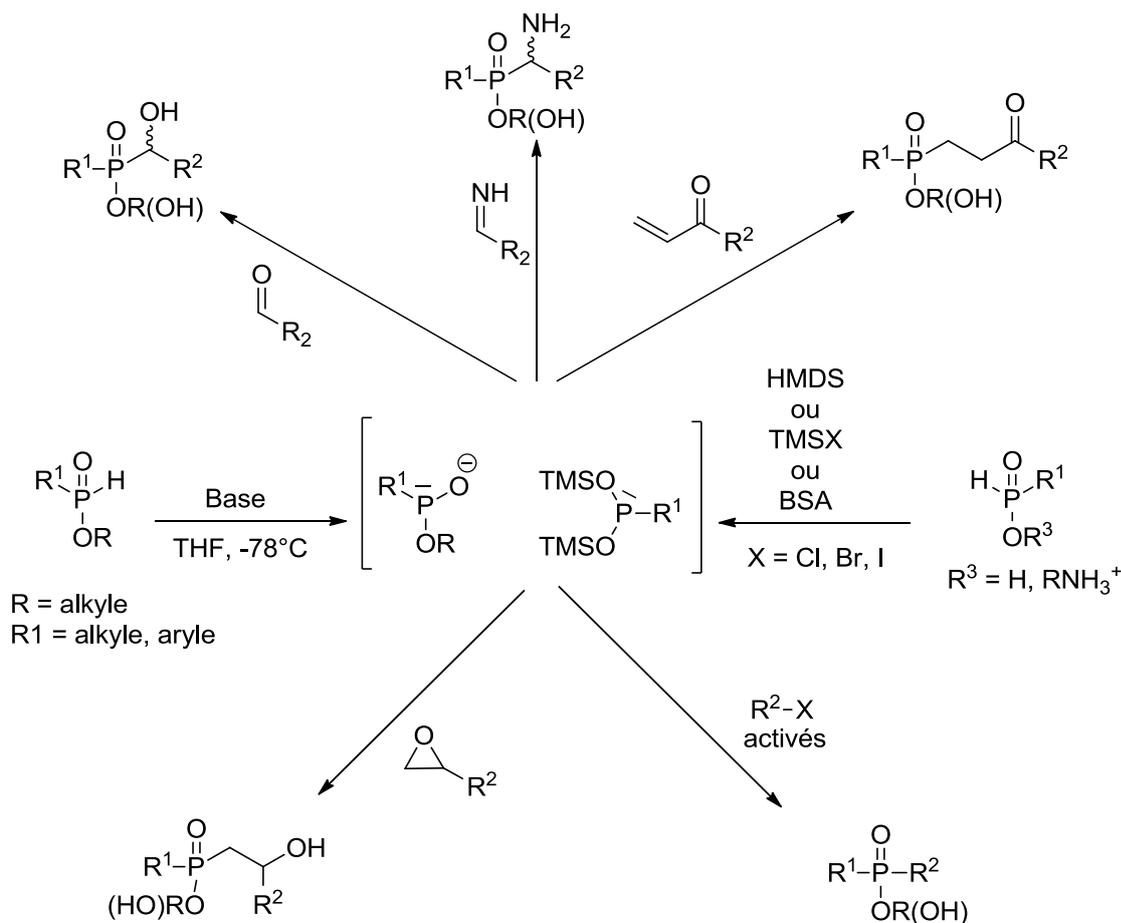
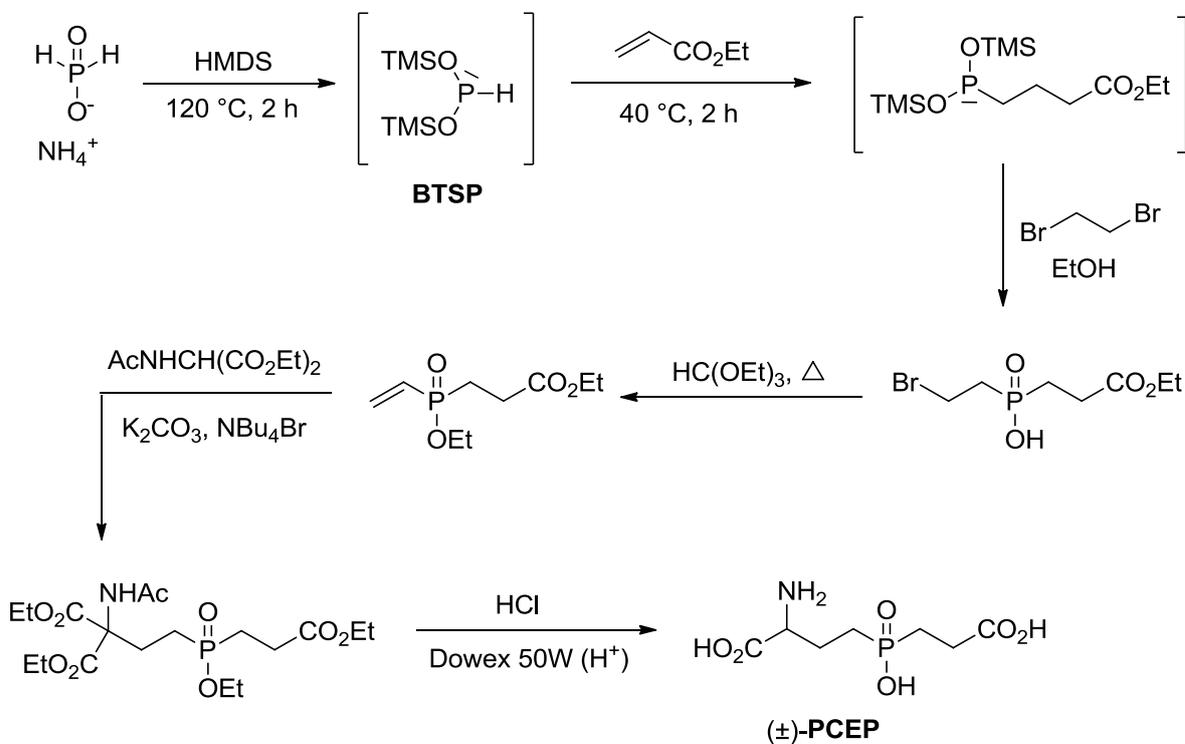


Schéma I-9 Résumé de la formation de la seconde liaison P-C d'acides phosphiniques et de phosphinates

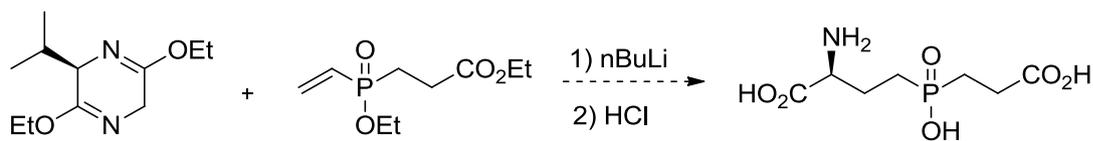
En se référant aux multiples méthodes décrites pour synthétiser des acides phosphiniques et des phosphinates dissymétriques relatées précédemment, nous avons pu appliquer ces dernières afin d'obtenir le (S)-PCEP ainsi que ses dérivés.

2.4. Données bibliographiques : synthèse du (*S*)-PCEPSynthèse du PCEP racémique

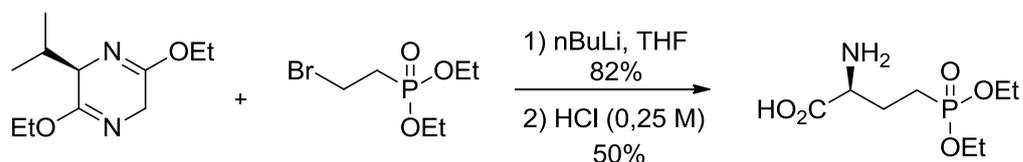
Le PCEP racémique a été synthétisé pour la première fois par Ragulin²⁶⁶ (Schéma I-10) à partir de l'hypophosphite d'ammonium. En présence d'un excès d'HMDS, le BTSP formé *in situ* va s'additionner successivement sur l'acrylate d'éthyle et le dibromoéthane pour obtenir l'acide phosphinique dialkylé. Cet acide est ensuite estérifié par réaction à chaud avec l'orthoformiate d'éthyle ; ce qui entraîne par la même occasion une β -élimination d'acide bromhydrique. Enfin, la fonction acide aminée est introduite par addition nucléophile de l'acétamidomalonate de diéthyle puis hydrolyse acide des groupements protecteurs pour donner le PCEP racémique.

Schéma I-10 Synthèse du (\pm)-PCEP par Ragulin²⁶⁶

Cette voie de synthèse pourrait être aussi utilisée pour la synthèse du (*S*)-PCEP. Il suffirait que l'introduction de la partie acide aminée se fasse de façon énantiosélective. L'utilisation de la copule de Schöllkopf²⁶⁷ semble un bon moyen de contrôler la configuration du carbone en α de l'acide aminé (Schéma I-11). Cependant, cette méthode n'assure pas l'obtention d'une chiralité (*S*) à 100% du fait que l'on utilise une base forte.

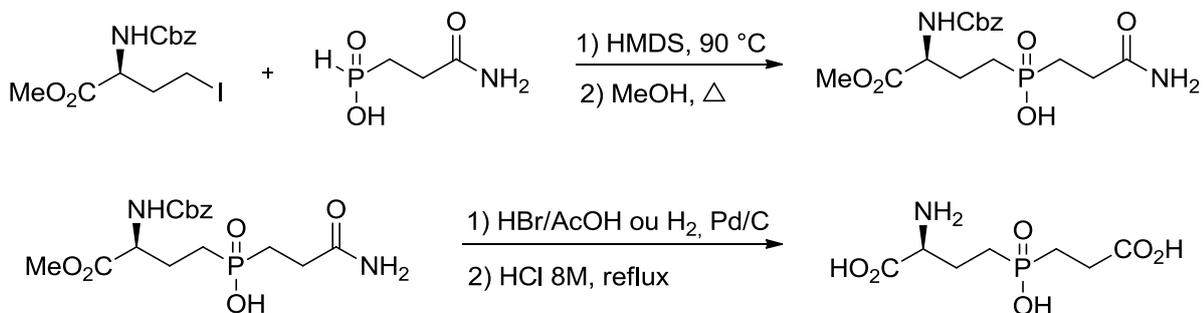

 Schéma I-11 Synthèse du (*S*)-PCEP via la copule de Schöllkopf

Cette méthode a déjà été décrite dans l'obtention de phosphono acide aminé (Schéma I-12).²⁴⁰


 Schéma I-12 Synthèse de l'acide (*S*)-2-amino-4-(diéthoxyphosphoryl)butanoïque

Synthèse du (*S*)-PCEP

Le (*S*)-PCEP a été synthétisé pour la première fois en 2005, par l'équipe de Berlicki.²¹⁷ Comme Ragulin, Berlicki a choisi d'insérer la partie acide aminé en deuxième étape par substitution de l'acide H-phosphinique (activé par l'HMDS) sur le (*S*)-methyl-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-iodobutanoate (Schéma I-13). L'utilisation permet de contrôler à 100% la chiralité du carbone en α de l'acide aminé. Cependant, l'acide phosphinique dialkylé n'est pas le seul produit observé lors de la réaction et les rendements varient entre 8 et 18%.


 Schéma I-13 Synthèse du (*S*)-PCEP par Berlicki²¹⁷

La méthode de synthèse du (*S*)-PCEP de Berlicki est rapide mais les rendements sont faibles. Cela signifie que cette voie synthétique ne pourra pas être utilisée pour obtenir de nombreux substrats.

2.5. Développement d'une voie de synthèse

2.5.1. Synthèse de l'acide H-phosphinique intermédiaire "**P-H_{int}**"

Comme nous l'avons explicité préalablement, notre objectif est de moduler chimiquement la partie ancrée dans la nouvelle poche d'interaction (poche distale). Il sera donc nécessaire de développer une voie de synthèse rapide et efficace à partir d'un même synthon de départ qui comporte la fonction acide aminée. A partir de l'acide hypophosphoreux, nous devons donc d'abord synthétiser l'acide H-phosphinique correspondant à la partie L-AP4 et ensuite insérer la partie ancrée dans la nouvelle poche. Ce qui nous donne l'**acide ((S)-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)phosphinique** comme intermédiaire clé de cette optimisation (Figure **I-13**). Par la suite, par souci de simplicité, nous nommerons ce composé "**P-H_{int}**".

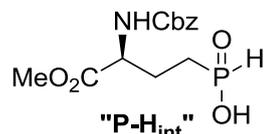


Figure **I-13** Structure de l'acide ((S)-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)phosphinique ("**P-H_{int}**")

En 2001, Montchamp a développé par voie radicalaire une réaction entre des dérivés de l'acide hypophosphoreux et différents alcènes.²⁶⁸ Certaines équipes ont alors repris ces conditions qu'elles ont appliquées à l'ester de (S)-vinylglycine protégé (Schéma **I-14**).²⁴⁰

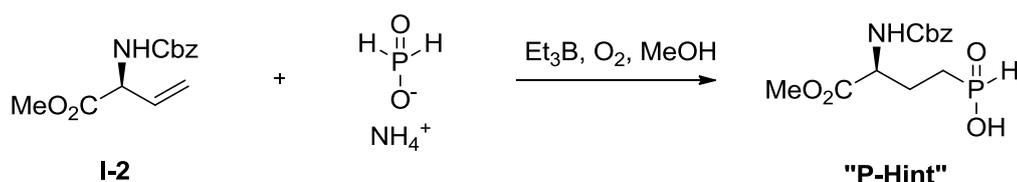


Schéma **I-14** Synthèse du "**P-H_{int}**" à partir de la vinylglycine protégée **I-2**

Chelliah Selvam a alors utilisé des conditions réactionnelles similaires en utilisant l'AIBN comme source de radicaux (Schéma **I-15**).²⁶⁹

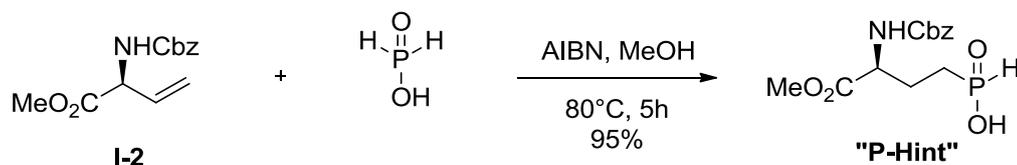


Schéma **I-15** Synthèse du "**P-H_{int}**" en utilisant l'AIBN

Nous pouvons signaler que l'ester de (*S*)-vinylglycine est facilement synthétisable à partir de la méthionine.²⁷⁰ Pour la suite de nos synthèses, nous utiliserons l'ester de (*S*)-vinylglycine protégé préparé à façon par Ascent Scientific (UK).

2.5.2. Synthèse du (*S*)-PCEP

Notre laboratoire a tout d'abord utilisé les conditions décrites par Ragulin (Chapitre **I.2.4.**) afin de synthétiser le PCEP racémique. Ce dernier a pu être isolé après purification sur une résine échangeuse d'ion. En ce qui concerne le (*S*)-PCEP (Schéma **I-16**), une tentative a été initiée avec la copule de Schöllkopf mais un mélange de plusieurs produits a été obtenu. Chelliah Selvam est donc parti du synthon de départ, le composé intermédiaire "**P-H_{int}**". Ce dernier est activé par la BSA afin de former le composé intermédiaire P^{III} capable de s'additionner sur l'acrylate d'éthyle. Enfin, après déprotection du groupementsu Cbz, hydrolyse des esters et purification sur une résine échangeuse de cations, le composé désiré est collecté avec une grande pureté.

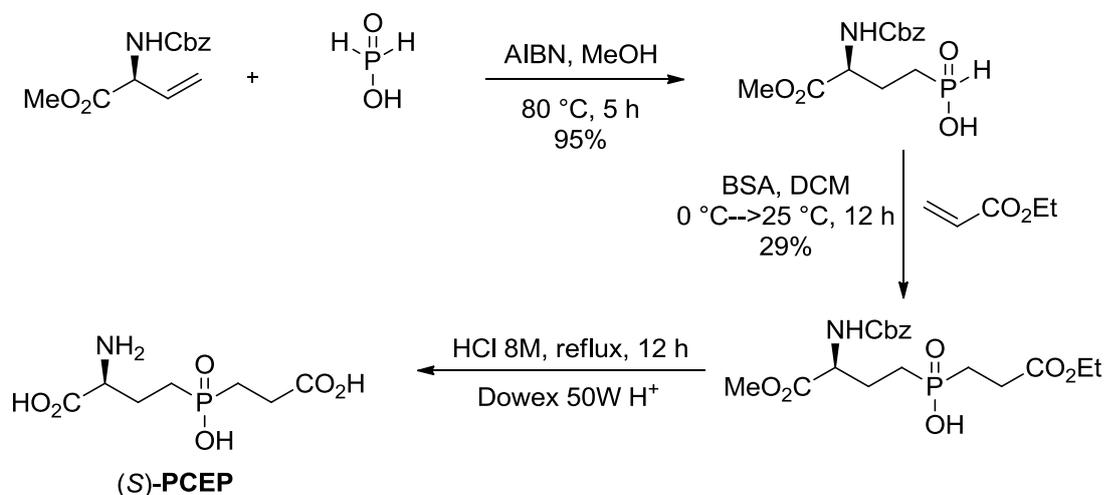


Schéma **I-16** Synthèse du (*S*)-PCEP²¹⁰

Cette nouvelle voie de synthèse développée par Chelliah Selvam est rapide et reproductible. Elle paraît donc prometteuse pour l'optimisation de la partie distale afin d'obtenir rapidement de nombreux dérivés.²¹⁰ Les résultats pharmacologiques (*S*)-PCEP enregistrés par mesure de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293 sont regroupés dans le tableau ci-dessous (Tableau **I-2**).

Tableau I-2 EC₅₀ du (S)-PCEP sur les récepteurs mGlu
Mesure de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293²¹⁰

Composé	Test	mGlu4 EC ₅₀ μM (n)	mGlu6 EC ₅₀ μM (n)	mGlu7 EC ₅₀ μM (n)	mGlu8 EC ₅₀ μM (n)
(S)-PCEP	Libération de Ca ²⁺	6,15 ± 0,01 (3)	6,70 ± 3,30 (3)	89 ± 15 (3)	6,60 ± 2,40 (3)

2.5.3. Optimisation de la partie proximale

Avant de modifier la partie distale, Chelliah Selvam s'est intéressé à la longueur de chaîne de la partie proximale. Le but de cette étude est d'observer l'influence du nombre d'atomes de carbone entre la fonction acide aminée et le phosphinate. Deux composés ont été préparés : 1) le **LSP1-1102** correspondant au PCEP racémique comportant un carbone de moins sur le bras portant l'acide aminé et 2) le **LSP8-1058** correspondant au (S)-PCEP comportant un carbone de plus.²¹⁰

Synthèse du LSP1-1102²¹⁰

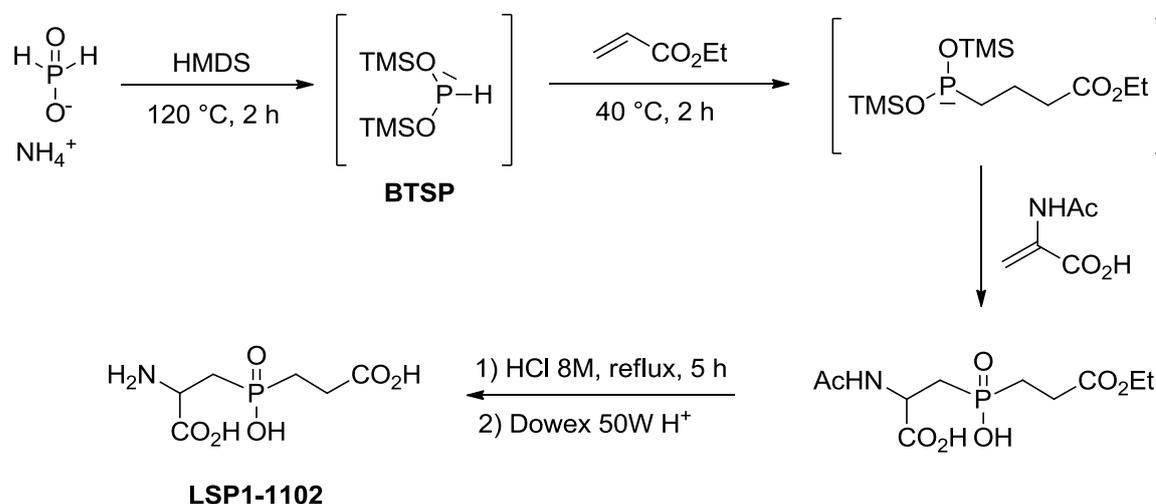
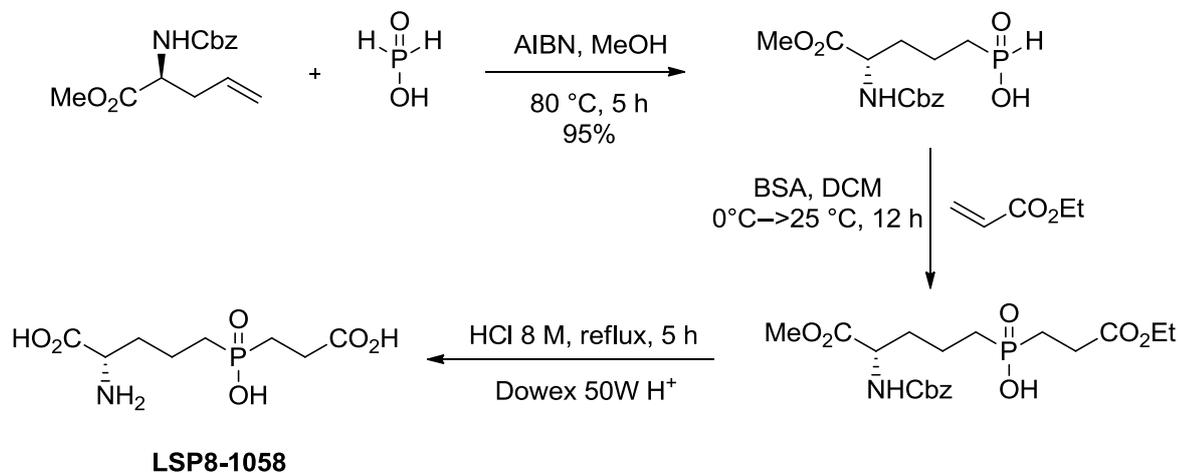


Schéma I-17 Synthèse du LSP1-1102²¹⁰

Le BTSP, obtenu par activation de l'hypophosphite d'ammonium avec l'HMDS, peut s'ajouter successivement sur l'acrylate d'éthyle puis sur l'acide acétamidoacrylique. Après hydrolyse acide et purification sur une résine échangeuse de cations, le produit final désiré est obtenu (Schéma I-17).

Synthèse du LSP8-1058²¹⁰Schéma I-18 Synthèse du LSP8-1058²¹⁰

La synthèse du **LSP8-1058** (Schéma I-18) nécessite les mêmes conditions réactionnelles que pour le (*S*)-PCEP sauf que la première alkylation radicalaire ne se fait pas sur l'ester de (*S*)-vinylglycine mais sur l'ester de (*S*)-allylglycine. Le composé final est obtenu après purification sur une résine échangeuse de cation.

Tableau I-3 EC₅₀ des dérivés du PCEP sur le récepteur mGlu4²¹⁰

Mesure de la production d'IP₃ et de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293

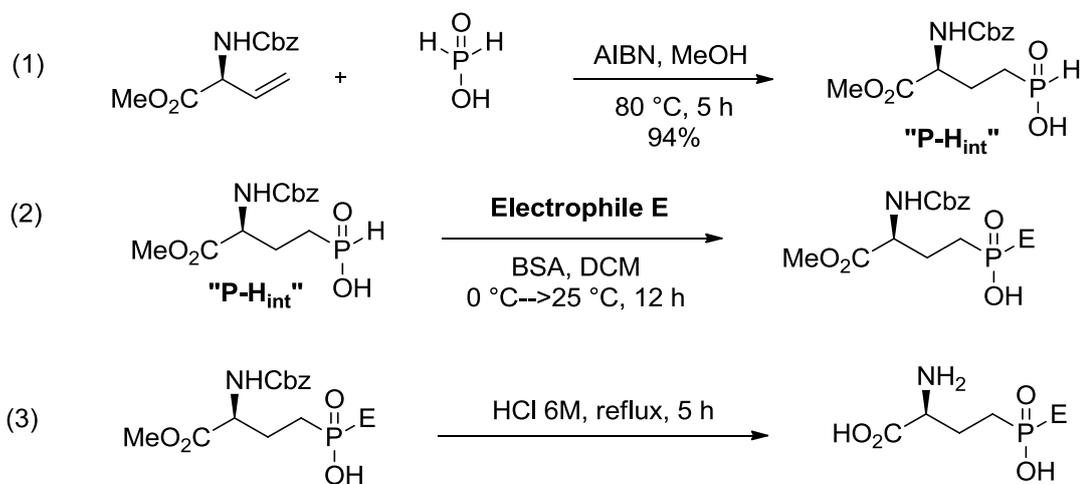
Composé	(<i>RS</i>)-PCEP	(<i>S</i>)-PCEP	LSP1-1102	LSP8-1058
EC ₅₀ (μM) (mGlu4)	7,1 ± 1,5 (5)	6,4 ± 1,4 (4)	inactif	inactif
	Mesure d'IP ₃	Mesure d'IP ₃	Mesure d'IP ₃	Libération de Ca ²⁺

Bien que le test fonctionnel pour mesurer l'EC₅₀ de nos composés ait changé entre temps, nous pouvons remarquer très rapidement que la longueur optimale est de deux carbones entre l'acide aminé et la fonction phosphinique. La longueur de chaîne est même plus importante que la configuration du carbone de l'acide aminé car les produits **LSP1-1102** et **LSP8-1058** sont inactifs sur le récepteur mGlu4 (Tableau I-3).²¹⁰ Pour la diversification de la partie distale, nous partirons donc du "P-H_{int}" qui contient la longueur de chaîne optimale.

2.6. Diversification de la partie distale

2.6.1. Voie de synthèse générale

La voie de synthèse (élaborée par Chelliah Selvam), qui a été optimisée en fonction des données bibliographiques et des premières synthèses du (*S*)-PCEP et des ses isomères, se divise en quatre grandes parties : trois étapes synthétiques (1), (2) et (3) et une dernière étape de purification (Schéma **I-19**). C'est une méthode rapide et très efficace qui a permis d'obtenir une chimiothèque assez conséquente en très peu de temps.²¹⁰

Schéma **I-19** Voie de synthèse générale des dérivés du (*S*)-PCEP²¹⁰Étape (1)

La première étape a été décrite précédemment ; il s'agit de la synthèse du composé "**P-H_{int}**". Cet intermédiaire va être le point de départ de toutes les variations chimiques qui vont suivre.

Étape (2)

La seconde étape consiste en la formation de la seconde liaison P-C, à partir du composé "**P-H_{int}**" intermédiaire. Il s'agit en fait d'une addition ou substitution nucléophile de cet acide phosphinique activé sous forme d'intermédiaire P^{III} sur un électrophile. La BSA a été privilégiée pour activer l'acide H-phosphinique "**P-H_{int}**" par rapport à l'HMDS et au TMSBr, car les réactions étaient plus propres. Quelques essais de purification par chromatographie ont été tentés mais très vite abandonnés du fait de la forte polarité des composés causée par la fonction acide phosphinique. En revanche, il est très facile d'observer la formation du produit désiré à l'aide de la RMN du phosphore (RMN ³¹P). Effectivement, le déplacement chimique de l'acide H-

phosphinique se situe entre 20 et 30 ppm alors que celui de l'acide phosphinique dialkylé est supérieur à 40 ppm.

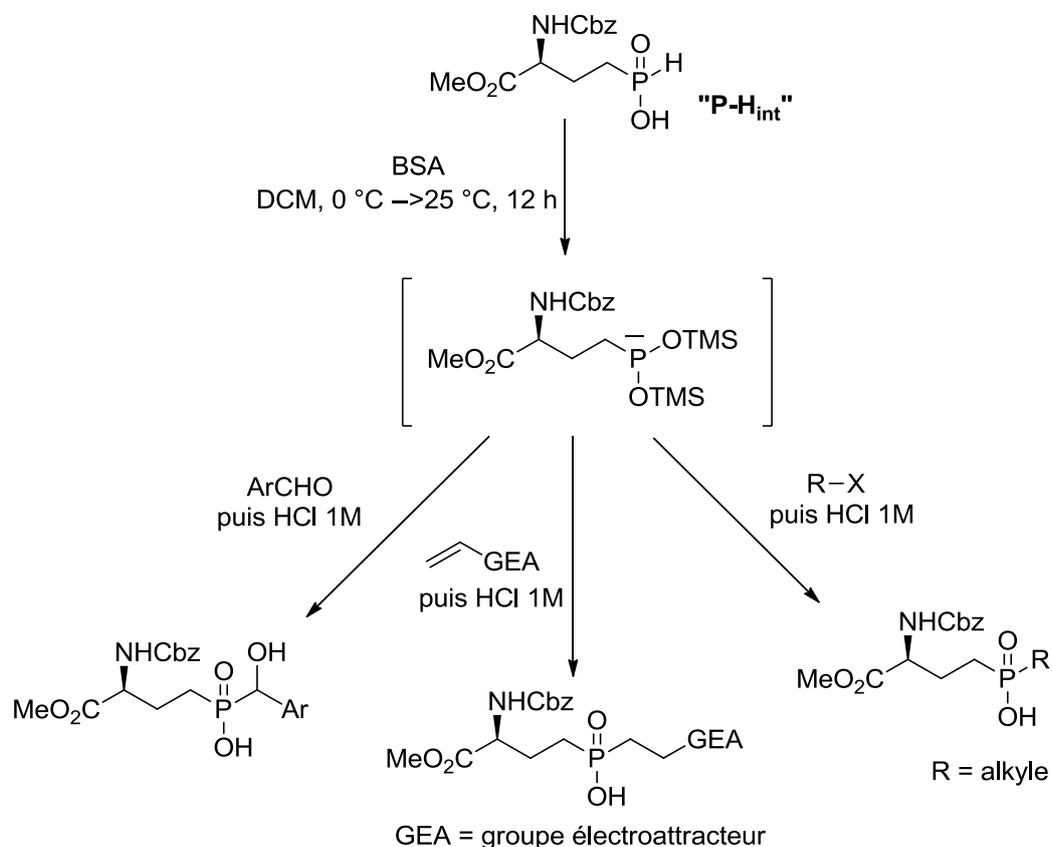


Schéma I-20 Addition (ou substitution) nucléophile du composé "P-H_{int}" activé sur différents électrophiles

Étape (3)

Cette troisième étape est une étape de déprotection de la fonction acide aminée et des groupements présents ou non sur la partie distale en fonction de l'électrophile utilisé (notamment pour les acrylates). Les groupements Cbz sont couramment déprotégés par hydrogénation mais dans notre cas, aucune déprotection n'a été possible dans ces conditions. L'hydrolyse acide (HCl 8 M, reflux, 12 h) utilisée pour la synthèse du (S)-PCEP a montré de bons résultats avec la déprotection du Cbz et l'hydrolyse des esters en une seule étape. Au fur à mesure des synthèses, nous avons pu nous apercevoir que les composés étaient totalement déprotégés en les chauffant à 100 °C pendant 5 h dans l'HCl 6 M. Au final, le composé brut est collecté dans la phase aqueuse acide et les réactifs restants de la seconde étape sont éliminés dans la phase organique.

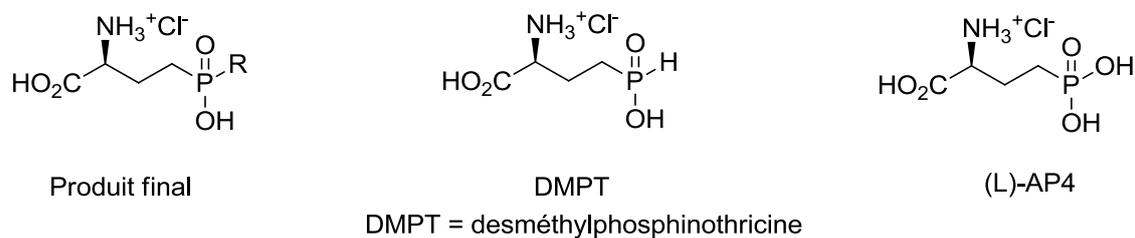
Purification

Figure I-14 Produits présents dans le brut réactionnel final

Les composés obtenus sont très polaires et ne peuvent pas être purifiés par les méthodes de chromatographie usuelles. La technique de choix fut donc l'utilisation de résines échangeuses d'ions. La purification de nos composés est essentielle car plusieurs sous-produits sont présents dans le brut réactionnel. Effectivement, en parallèle du composé désiré, nous pouvons observer la présence de DMPT qui est simplement l'acide H-phosphinique "P-H_{int}" déprotégé, ou alors du L-AP4 provenant de l'oxydation de la DMPT (Figure I-14). La pureté de ces produits finaux est critique car ils seront envoyés en test *in vitro* à l'IGF à Montpellier. Or, connaissant le fort effet agoniste du L-AP4 sur les récepteurs mGlu du groupe III, il est primordial d'éliminer toute impureté présente. Les composés obtenus dans la phase aqueuse acide sont chargés positivement, la première résine échangeuse d'ion utilisée est une échangeuse de cations (Dowex AG 50W-X4, H⁺, 50-100 mesh). Le dépôt se fait à pH acide (pH = 1-2) et l'élution se fait à l'eau. Les composés les plus acides étant très peu retenus, le L-AP4 et le DMPT sont donc très vite élués. Nos composés sont plus ou moins retenus selon la nature de la partie distale. En effet, si la partie distale est aliphatique, le composé est très peu retenu et est élué souvent en même temps que L-AP4 alors que si la partie distale est aromatique, le composé est plus retenu et collecté seul, sans impureté. Pour les composés aliphatiques, une seconde purification est nécessaire et effectuée sur une résine échangeuse d'anions (AG 1-X4, HCOO⁻, 200-400 mesh). Pour celle-ci, le dépôt se fait à pH = 7-8 et l'élution se fait à l'eau bouillie puis à l'acide acétique, chlorhydrique ou formique. La détection du composé dans les différentes fractions se fait par révélation sur plaque de silice par la nihydrine et les fractions positives sont donc analysées par RMN du proton et du phosphore. Les fractions propres sont alors réunies puis lyophilisées afin d'obtenir une poudre blanche, envoyée en test. Grâce à cette voie de synthèse une multitude de composés a pu être obtenue avec une partie distale très variée.^{210,271}

2.6.2. Dérivés linéaires

Tout d'abord, Chelliah Selvam a commencé par insérer différentes chaînes linéaires sur la partie distale en utilisant la voie de synthèse générale décrite précédemment. Il a notamment modulé trois critères de la partie distale : la longueur de la chaîne, l'acidité de la fonction acide carboxylique distale ainsi que la substitution de la chaîne distale. Premièrement, il a pu s'apercevoir que le nombre de carbone optimal entre la fonction phosphinique et l'acide carboxylique distal était de 2. Ensuite, en substituant l'acide carboxylique par un acide phosphonique (augmentation de l'acidité), il a observé une perte d'activité sur le récepteur mGlu4. Enfin, il a essayé d'insérer divers substituants sur les deux carbones de la chaîne linéaire de la partie distale du (*S*)-PCEP. Ces modifications montrent une perte d'activité quelque soit le substituant en position α de la fonction phosphinique et seul un chlore en position β de cette même fonction donne une activité intéressante sur le récepteur mGlu4 ($EC_{50} = 1,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ($n = 3$)). Enfin, l'analogue rigidifié du (*S*)-PCEP comportant une double liaison montre également une bonne activité avec une EC_{50} de $1,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ($n = 3$) sur le récepteur mGlu4.

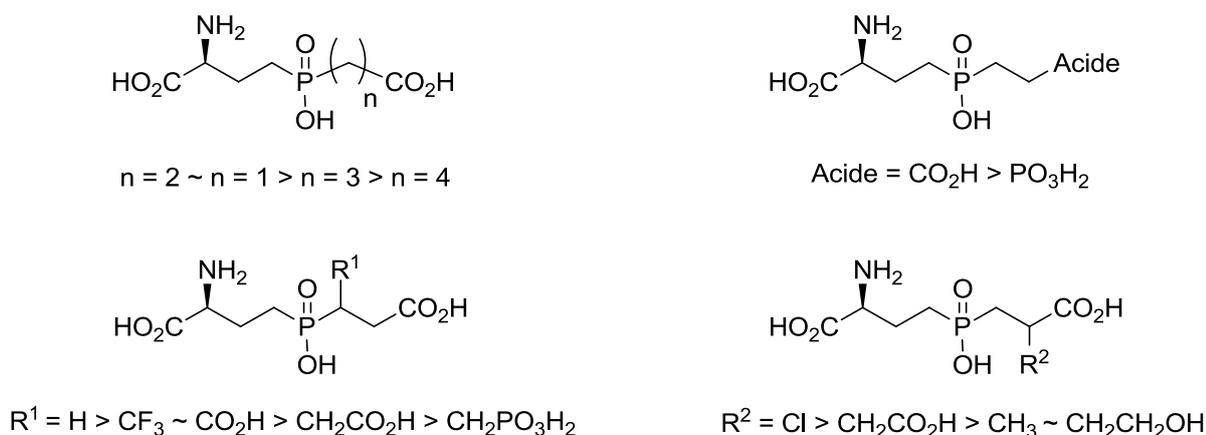
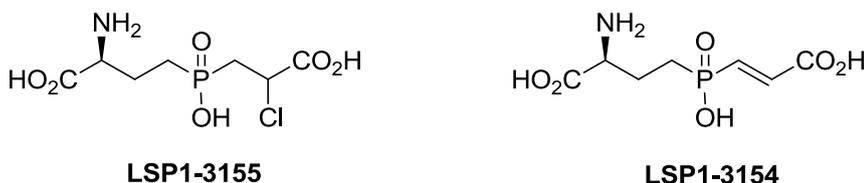
Figure I-15 Différents composés linéaires synthétisés²¹⁰

Figure I-16 Dérivés linéaires les plus affins sur le récepteur mGlu4

Comme nous l'avons dit précédemment, ce travail a essentiellement été réalisé par Chelliah Selvam et Delphine Rigault (technicienne de laboratoire) et a été breveté en 2007²⁷¹ et publié en 2010 dans la revue *Journal of Medicinal Chemistry*.²¹⁰

2.6.3. Dérivés aromatiques

Les dérivés linéaires nous ont permis d'augmenter l'activité agoniste sur le récepteur mGlu4 mais en revanche aucun dérivé n'est sélectif par rapport aux autres sous-types du groupe III et plus particulièrement le récepteur mGlu8. Il était donc intéressant de continuer cette modulation de la partie distale afin d'augmenter le potentiel et la sélectivité de nos composés. Le choix s'est orienté vers l'insertion de structure aromatique. De plus, la plupart des médicaments possèdent au minimum un groupement aromatique dans leur structure. Les acides phosphiniques aromatiques déjà décrits sont des acides arylphosphiniques où le cycle aromatique est directement lié à l'atome de phosphore et des acides α -hydroxy-phosphiniques obtenus par réaction entre un dérivé P^{III} nucléophile et un benzaldéhyde. Les acides arylphosphiniques ont été obtenus un peu plus tard par des réactions de couplage croisé pallado-catalysé²⁵³ mais les conditions n'étaient pas totalement optimisées lors du début de cette étude. Notre équipe s'est donc intéressée plus spécifiquement à la synthèse de différents acides α -hydroxy-phosphiniques en faisant varier les substituants sur les benzaldéhydes commerciaux.²⁷¹

Tout d'abord, d'après les résultats du (S)-PCEP, les premiers composés aromatiques choisis par Chelliah Selvam comportent une fonction acide carboxylique (en position ortho, méta ou para de l'aldéhyde) afin de mimer la charge négative du carboxylate distal (Schéma I-21). Lors de l'addition de l'acide phosphinique sur la fonction aldéhyde, la stéréochimie du carbinol stéréogène formé n'est pas contrôlée et un mélange de deux diastéréomères est obtenu.

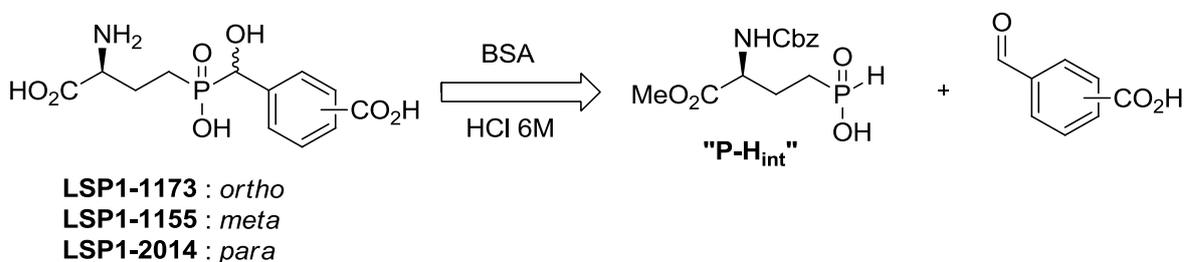


Schéma I-21 Synthèse des composés aromatiques carboxylés

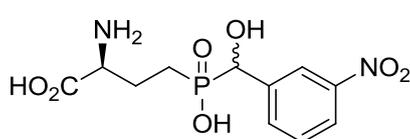
Tableau **I-4** Activités sur les récepteurs mGlu4 et mGlu8 des composés aromatiques carboxylés
Mesure de la production d'IP₃ sur des cellules HEK 293

Composé	LSP1-1173 <i>ortho</i>	LSP1-1155 <i>meta</i>	LSP1-2014 <i>para</i>
EC ₅₀ (mGlu4)	Inactif	21,65 ± 3,50 (n = 8)	7,97 ± 0,36 (n = 4)
EC ₅₀ (mGlu8)	/	124,67 ± 8,25 (n = 3)	141,00 ± 10,44 (n = 3)
Ratio 8/4	/	6	18

On peut remarquer que la substitution en position *ortho* n'est pas du tout favorable et que la position *para* semble la plus adaptée à une activité sur le sous-type 4 similaire au (*S*)-PCEP et une sélectivité très encourageante par rapport au récepteur mGlu8 (Tableau **I-4**).

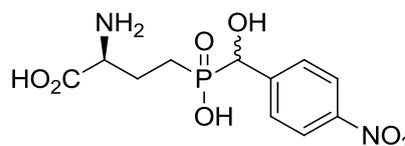
A partir de ces premiers résultats, de nombreux composés aromatiques mono, di et trisubstitués ont été synthétisés, toujours par Chelliah Selvam. Ces composés ont tous été testés et les résultats nous ont permis de tirer des conclusions très intéressantes autour de la relation structure-activité. Tout d'abord, la substitution en position *ortho* est totalement néfaste pour l'activité des molécules. Les positions *meta* et *para* montrent des résultats quasi-similaires et seront donc privilégiées.

Les composés monosubstitués par un groupement nitro en *meta* (**LSP1-2093**) ou en *para* (**LSP1-2147**) montrent les meilleures activités sur les récepteurs mGlu4 et mGlu8 (premiers composés sous-micromolaires).



LSP1-2093

EC₅₀ (mGlu4) = 0,42 ± 0,08 μM



LSP1-2147

EC₅₀ (mGlu4) = 0,64 ± 0,22 μM

Figure **I-17** Structure et activité des composés monosubstitués par un groupement nitro
Mesure de libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293

Le groupement nitro a donc été conservé pour la synthèse des dérivés di et trisubstitués. Ces derniers possèdent des activités et des sélectivités vraiment intéressantes et notamment les nitrophénols **LSP1-2109** et **LSP1-2111**. Ces deux dérivés sont les premiers à montrer une

sélectivité préférentielle pour le récepteur mGlu4 par rapport au sous-type 8 et sont sélectifs des groupes I et II. (Figure I-18).²⁷¹

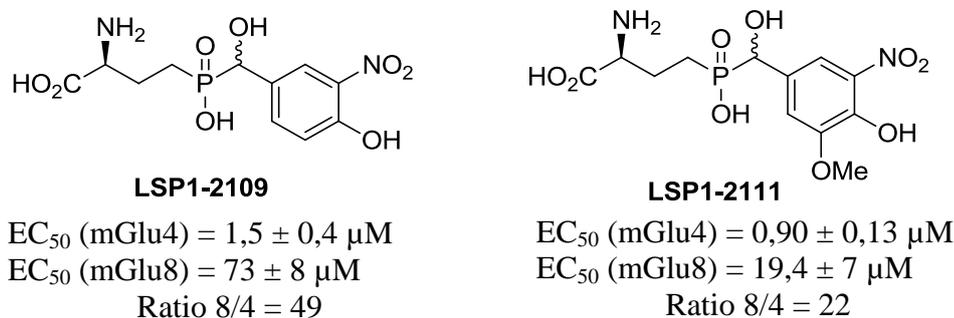


Figure I-18 Structure et activité des composés **LSP1-2109** et **LSP1-2111**

Mesure de libération de Ca^{2+} sur des cellules HEK 293

Enfin des acides phosphiniques porteurs d'une fonction amine au lieu d'alcool en position α ont été obtenus par Sara Cesarini (stagiaire postdoctoral) en effectuant la réaction non plus sur un benzaldéhyde mais plutôt sur une imine aromatique (Schéma I-22). Une nouvelle fois, on note que le groupement nitro est important pour l'activité des composés de la série (Figure I-19) car le composé **LSP1-3131** présente une EC_{50} de $0,54 \pm 0,14 \mu\text{M}$ sur le récepteur mGlu4.

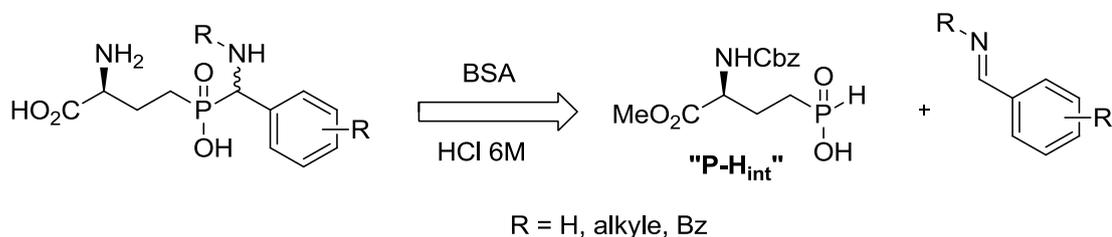
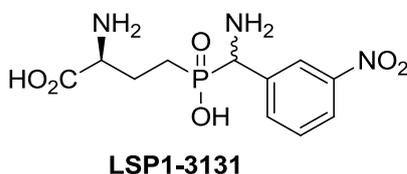


Schéma I-22 Synthèse des acides phosphiniques α -aminés



EC_{50} (mGlu4) = $0,54 \pm 0,14 \mu\text{M}$

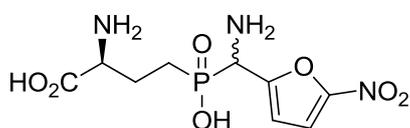
Figure I-19 Structure et activité du **LSP1-3131**

Mesure de la production d' IP_3 sur des cellules HEK 293

Cette nouvelle série de composés est intéressante avec la découverte de nouveaux agonistes plus affins du récepteur mGlu4 et une sélectivité qui commence à être encourageante. Nous pouvons en conclure que le groupement nitro est important pour l'affinité et que le motif phénol apporte de la sélectivité au sein du groupe III des récepteurs mGlu. Tous les composés linéaires et aromatiques synthétisés, avant 2006 ont été brevetés²⁷¹ et un article, incluant ces résultats, est en préparation.

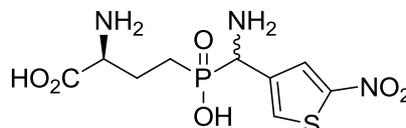
2.6.4. Dérivés hétérocycliques

Une série hétérocyclique a aussi été synthétisée de la même façon afin de voir l'influence de la nature du noyau aromatique. Des dérivés comportant un motif pyridine, furane ou encore thiophène ont été obtenus en fonction des possibilités synthétiques. Une fois encore, ce sont les dérivés comportant un groupement nitro qui montrent une très bonne activité sur le récepteur mGlu4. Cependant, la sélectivité est beaucoup plus faible pour ces motifs. Les deux composés les plus puissants sont le **LSP1-3003** et le **LSP1-3081** (Figure I-20).



LSP1-3003

EC_{50} (mGlu4) = $0,15 \pm 0,03 \mu\text{M}$



LSP1-3081

EC_{50} (mGlu4) = $0,16 \pm 0,03 \mu\text{M}$

Figure I-20 Structure et activité du **LSP1-3003** et **LSP1-3081**

Mesure de la production d'IP₃ sur des cellules HEK 293

L'importante diversification de la partie distale effectuée par Chelliah Selvam prend fin ici avec cette multitude de composés. Il a pu définir un composé référence, le **LSP1-2111**, sur lequel s'est basée Isabelle Lemasson au début de son doctorat (2007-2010). Ce composé ne possède pas une activité puissante sur le récepteur mGlu4 mais il est le premier composé montrant une préférence sur ce récepteur par rapport aux sous-types du groupe III et plus particulièrement les sous-types 7 et 8 (le récepteur mGlu6 se trouvant essentiellement dans la rétine, nous n'en tenons pas compte pour le moment, Tableau I-5).

Tableau **I-5** Activités sur les sous-types du groupe III du **LSP1-2111**
 Mesure de la production d'IP₃ sur des cellules HEK 293

Composé	mGlu4 EC ₅₀ μM (n)	mGlu6 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 6/4	mGlu7 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 7/4	mGlu8 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 8/4
LSP1-2111	0,90 ± 0,13 (13)	3,2 ± 1,4 (4)	4	101 ± 33 (3)	24	19,4 ± 7 (12)	22

2.7. Valorisation du **LSP1-2111**

Les tests *in vitro* sont réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. Jean-Philippe Pin à l'IGF de Montpellier. A cette occasion, je voudrais remercier une nouvelle fois Jean-Philippe et toute son équipe de m'avoir accueilli pendant quelques jours afin de participer à ces tests *in vitro*. Avant 2008, tous les composés synthétisés au laboratoire, étaient testés par mesure de l'augmentation d'IP₃ intracellulaire. Aujourd'hui, les tests ont été simplifiés et on ne mesure plus la production d'IP₃ mais plutôt la libération de Ca²⁺ intracellulaire induite par l'augmentation d'IP₃ (Figure **I-21**). Ce concept est plus simple car la libération de calcium est mesurée par fluorescence (via la sonde Fluo-4) alors que l'IP₃ était mesurée par radioactivité (utilisation de ³H-myoinositol). Toutes ces informations sont disponibles sur le site de la Plateforme Arpège de Montpellier.²⁷²

Figure **I-21** L'activation des récepteurs mGlu par une molécule agoniste induit, au travers de l'activation de son premier effecteur (la protéine Gq), une libération de calcium intracellulaire (Arpège)

A partir de ce tri, les meilleures molécules et notamment le **LSP1-2111** sont alors testées *in vivo* sur des modèles animaux. Ce ligand a été testé afin de confirmer le rôle prédominant du récepteur mGlu4 dans la mémoire et l'apprentissage.²⁷³ Puis, de nombreux tests ont été menés afin d'identifier les propriétés antiparkinsoniennes et anxiolytiques de ce composé.

Les différents tests pour le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson ont été décrits par Beurrier *et al.* en 2009.²⁷⁴ Ils ont tout d'abord montré sur des récepteurs natifs que le **LSP1-2111** était capable d'inhiber la transmission synaptique striatopallidale et que le récepteur mGlu4 était le récepteur mis en jeu lors de cette inhibition. Puis ce composé a également été testé sur un modèle d'akinésie avec le test du temps de réaction et sur un modèle de catalepsie induit par injection d'halopéridol. Dans les deux cas, notre ligand présente des effets antiparkinsoniens.

Le **LSP1-2111** a également été testé sur des modèles d'anxiété, de psychose et de dépression par l'équipe du Pr. Pilc à Cracovie. Un premier test antipsychotique a été développé en mesurant l'hyperactivité d'un rongeur drogué par la dizocilpine (MK-81) et l'amphétamine. L'injection de notre ligand a permis de réduire considérablement l'hyperactivité induite par ces deux drogues. Un test d'interaction sociale et un test de reconnaissance de nouvel objet ont également été élaborés afin de mesurer l'effet antipsychotique de notre composé sur des rongeurs drogués par le MK-81. Dans les deux cas, on observe des effets positifs de notre ligand.^{275,276} Ensuite, le **LSP1-2111** a montré des effets anxiolytiques intéressants dans deux tests : le test du labyrinthe surélevé (EPM pour elevated plus maze) et celui mesurant l'hyperthermie induite par un stress (changement d'environnement).²⁷⁷ Enfin, le **LSP1-2111** a été testé sur deux modèles de dépression (test de la nage forcée et test de la suspension par la queue) mais aucun effet antidépresseur de notre molécule n'a été observé.²⁷⁷

Tous ces tests animaux réalisés sur le **LSP1-2111** ont vraiment été une avancée dans nos travaux de recherche car ils ont permis de valider tout le travail réalisé au préalable, c'est-à-dire la modélisation moléculaire jusqu'aux tests *in vitro* sans oublier la synthèse chimique des molécules. Nous avons pu mettre en évidence des effets antiparkinsoniens et anxiolytiques vraiment encourageants alors que le **LSP1-2111** ne montre aucun effet antidépresseur. Tous ces effets ont aussi été montrés sur l'ACPT-I, que ce soit contre les symptômes de la maladie de Parkinson²⁷⁸ ou contre l'anxiété.¹⁰⁹ Cependant, le **LSP1-2111** est actif à des concentrations dix fois plus faibles que l'ACPT-I et il est plus sélectif au sein des récepteurs mGlu du groupe III. Tous ces tests montrent aussi que plusieurs voies synaptiques sont responsables des effets observés et plus précisément les systèmes glutamatergique, GABAergique et sérotoninergique.

Enfin, une donnée essentielle que démontrent ces tests, est que nos composés sont capables de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, dans la plupart des tests de comportement, l'injection des agonistes se fait par voie intra péritonéale (i.p.). La plupart atteignent le système nerveux central. En revanche, vu la structure de nos composés peu lipophiles et très polaires, nous supposons que le franchissement de la BHE se fait par transport actif via un transporteur. Il semble difficile d'imaginer un transfert passif par diffusion à travers les membranes hydrophobes. Récemment, l'équipe du Dr. Dario Doller a étudié la biodisponibilité du **LSP1-2111** dans le cerveau.²⁷⁹

Cependant, en supplément de sa sélectivité qui est encore trop faible, il existe tout de même un dernier point faible à améliorer : sa toxicité potentielle. Effectivement, les composés nitroaromatiques dont les nitrophénols sont décrits comme toxiques²⁸⁰ que ce soit sur l'environnement^{281,282} ou sur les êtres vivants.^{283,284} De plus, les tests *in vivo* de cette molécule ont montré qu'elle était très vite éliminée par l'organisme du fait de sa forte polarité. Ce composé ne peut donc servir que d'outil pharmacologique et les études sur ce composé ne seront donc pas poursuivies. L'objectif d'Isabelle Lemasson était donc d'optimiser ce composé afin d'obtenir des nouveaux agonistes plus sélectifs et plus affins.

2.8. Synthèse du **LSP4-2022**

Isabelle Lemasson a tout d'abord poursuivi le travail par le remplacement du groupement phényle par un hétérocycle. Elle a synthétisé deux nouveaux composés, le **LSP3-3184** et le **LSP3-4015** (Figure I-22).

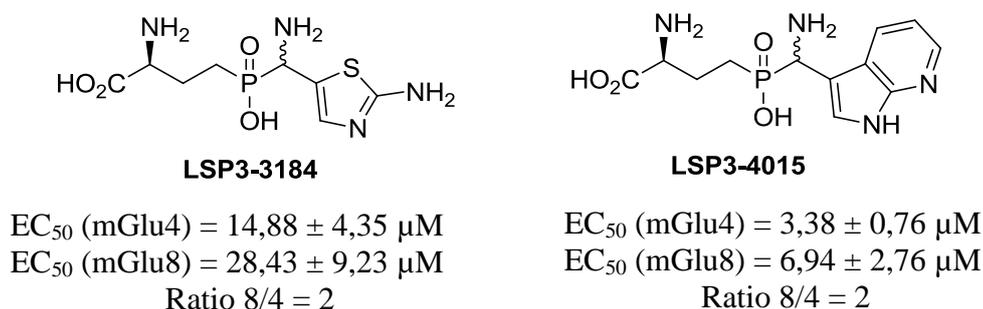


Figure I-22 Structure et activité pharmacologique du **LSP3-3184** et du **LSP3-4015**

Ces deux dérivés ne possèdent ni une bonne activité ni une bonne sélectivité. En revanche, la synthèse du **LSP3-4015** montre que ce composé est capable de donner d'autres interactions au niveau de la partie distale. Ce qui ouvre une nouvelle perspective et plus précisément

l'allongement chimique de la partie distale. La première idée, élaborée par Tiphane Courtiol (technicienne de laboratoire), fut à partir des composés phénoliques d'alkyler le groupement hydroxyle afin d'augmenter la taille de la molécule. Par comparaison avec le (*S*)-PCEP, la première idée fut d'ajouter une chaîne avec une fonction acide carboxylique terminale afin de mimer la charge négative distale. La voie de synthèse utilisée est identique à celle du (*S*)-PCEP en utilisant l'acétate 2-(4-formylphenoxy) d'éthyle obtenu facilement par alkylation de Williamson^{285,286} à partir du 4-hydroxybenzaldehyde (Schéma I-23).

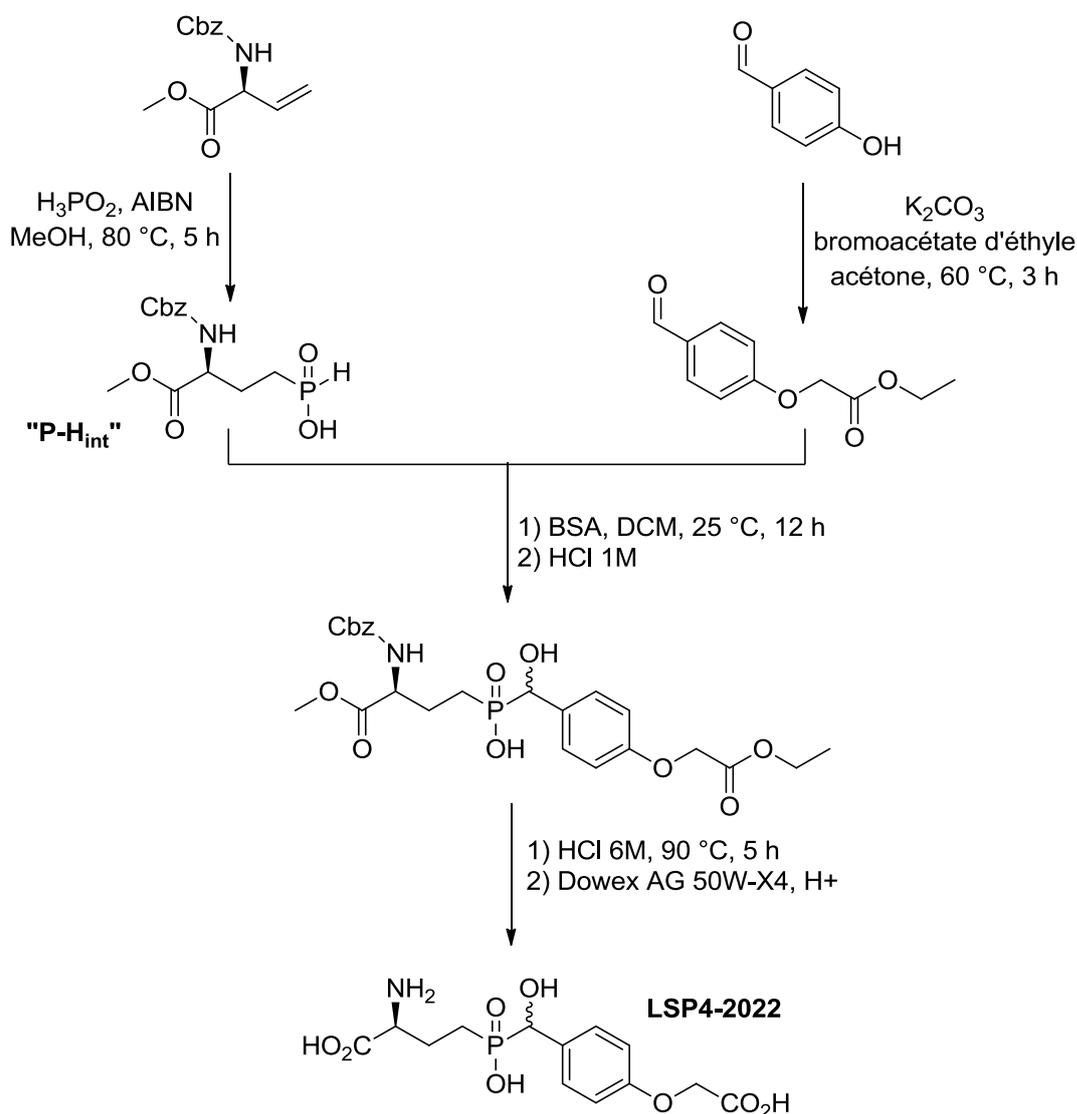


Schéma I-23 Voie de synthèse du LSP4-2022

La synthèse est très reproductible et le produit final est isolé avec un rendement global de 65%. Toutes les étapes sont très propres et la purification sur résine échangeuse d'ions (cations et

anions) est très efficace. Par chance, cette idée fut la bonne car, parmi les nombreux dérivés synthétisés, le **LSP4-2022** est le premier agoniste du récepteur mGlu4 sélectif par rapport au récepteur mGlu8. De plus, il est préférentiel vis-à-vis des autres sous-types du groupe III, mGlu6 et mGlu7, et sélectif par rapport aux deux autres groupes I et II (Tableau **I-6**).

Tableau **I-6** EC₅₀ du **LSP4-2022** sur les récepteurs mGlu²⁸⁷
Mesure de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293

EC ₅₀ (μM) (n)	mGlu4	mGlu8	Ratio 8/4	mGlu6	Ratio 6/4	mGlu7	Ratio 7/4
LSP4-2022	0,11 ± 0,02 (n = 30)	29,2 ± 4,2 (n = 27)	265	4,4 ± 0,6 (n = 14)	40	11,6 ± 1,6 (n = 19)	105

2.9. Valorisation du **LSP4-2022**

Afin de confirmer les valeurs obtenues avec le test de libération de calcium effectué à l'IGF de Montpellier, l'équipe du Pr. Alain Eschalier à Clermont-Ferrand a évalué l'activité inhibitrice du **LSP4-2022** sur le canal calcique Cav2.2 par électrophysiologie. Effectivement, lorsque les récepteurs mGlu sont activés, une sous-unité des protéines G peut alors interagir avec des canaux calciques (type N) comme Cav2.2 (Figure **I-23**). Nos composés seraient alors capables d'inhiber le transfert calcique à travers ce canal.

Figure **I-23** Inhibition du canal calcique Cav2.2

Les résultats obtenus par électrophysiologie sont similaires à ceux mesurés par fluorescence (Tableau I-7).²⁸⁷

Tableau I-7 EC₅₀ du **LSP4-2022** sur les récepteurs mGlu²⁸⁸

Mesure de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293 et inhibition du canal calcique Cav2.2

EC ₅₀ (μM) (n)	mGlu4	mGlu8	Ratio 8/4	mGlu6	Ratio 6/4	mGlu7	Ratio 7/4
LSP4-2022 Fluorescence	0,11 ± 0,02 (n = 30)	29,2 ± 4,2 (n = 27)	265	4,4 ± 0,6 (n = 14)	40	11,6 ± 1,6 (n = 19)	105
LSP4-2022 Cav2.2	0,12 ± 0,03 (n = 5)	51,6 ± 10,6 (n = 5)	430	3,68 ± 0,94 (n = 5)	31	15,7 ± 3,5 (n = 5)	79

Après avoir confirmé les données pharmacologiques *in vitro*, le **LSP4-2022** a été testé *in vivo* sur des modèles animaux de la maladie de Parkinson et de la douleur.

Premièrement, par électrophysiologie, Goudet *et al.*²⁸⁷ ont d'abord mesuré l'inhibition des transmissions postsynaptiques sur des couches de cerveau (fibre parallèle PF) de souris saines et des souris KO du récepteur mGlu4. Les résultats obtenus sont très simples, on ne retrouve aucune inhibition chez les souris KO de mGlu4 alors qu'on observe cette inhibition chez les souris sauvages. Ils ont pu en conclure que ce récepteur jouait un rôle prépondérant dans la transmission synaptique de la fibre parallèle dans des couches cérébrales de souris. De plus, le **LSP4-2022** montre des effets anti cataleptiques sur des modèles animaux de catalepsie induite par l'injection d'halopéridol. Cependant, comme pour le **LSP1-2111**, la fenêtre thérapeutique est trop étroite. Deux modes d'injection ont été étudiés ; l'injection intra cérébrale dans le GP (ICV) et l'injection intra péritonéale (i.p.). L'observation de résultats similaires dans les deux cas prouve une nouvelle fois que nos molécules sont capables de passer la BHE.

Deuxièmement, comme nous l'avons évoqué dans l'introduction (Figure 47), les récepteurs mGlu et plus particulièrement ceux du groupe III sont présents au niveau de tous les acteurs de la voie de neurotransmission de la douleur. Ils représentent donc une cible thérapeutique potentielle pour traiter les douleurs chroniques.

Après avoir montré que le récepteur mGlu4 était sur les neurones présents dans la moelle épinière et plus précisément dans la zone lamina II qui est la première zone du SNC où l'information nociceptive arrive et vérifié que ces récepteurs inhibaient la neurotransmission dans cette région du SNC, nos collaborateurs de Clermont-Ferrand (A. Eschalier et J. Busserolles) ont testé le **LSP4-2022** sur des modèles animaux de la douleur.²⁸⁹

Avant de tester le **LSP4-2022** sur des modèles de douleur chronique, nos collaborateurs ont tout d'abord vérifié que le récepteur mGlu4 n'avait aucun effet sur la douleur aiguë sur deux tests : le test d'immersion de la queue et celui de Randall et Selitto.²⁹⁰ Ce dernier test a également été effectué sur deux modèles de douleur chronique : une douleur inflammatoire induite par injection de carraghénine et une douleur neuropathique (modèle CCI *chronic constriction injury*)^{291,292} causée par ligature du nerf sciatique sur trois portions. Dans les deux cas, on retrouve des effets analgésiques. Dans les deux cas, on observe une dose-réponse du **LSP4-2022** avec un taux de vocalisation du rat qui augmente fortement lorsque la dose d'agoniste augmente. L'injection intra péritonéale (i.p.) de notre molécule confirme une nouvelle fois le fait que nos agonistes étaient capables de franchir la BHE. Le **LSP4-2022** a aussi été testé sur un modèle de douleur mécanique, le test Von Frey et on a pu observer que notre molécule est capable de diminuer des douleurs inflammatoires. De plus, cette dernière expérience a permis de prouver que le récepteur mGlu4 est vraiment essentiel à la réduction de la douleur chronique

2.10. Bilan et ouverture vers mes travaux de recherches

Toutes ces expériences ont permis de confirmer le nouveau composé référence, le **LSP4-2022**. Cependant, ce composé n'est pas encore assez actif ni sélectif pour envisager des tests plus poussés comme du marquage radioactif. Mon travail consistera à optimiser ce composé afin d'identifier de nouveaux agonistes plus affins et plus sélectifs.

I.3. Références bibliographiques

68. O'Hara, P. J., *et al.* The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **1993**, 11, 41.
69. Adams, M. D.; Oxender, D. L. Bacterial periplasmic binding protein tertiary structures. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 15739.
91. Schoepp, D. D., *et al.* Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* **1999**, 38, 1431.
109. Stachowicz, K., *et al.* The group III mGlu receptor agonist ACPT-I exerts anxiolytic-like but not antidepressant-like effects, mediated by the serotonergic and GABA-ergic systems. *Neuropharmacology* **2009**, 57, 227.
115. Gasparini, F., *et al.* (R,S)-4-phosphonophenylglycine, a potent and selective group III metabotropic glutamate receptor agonist, is anticonvulsive and neuroprotective in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 289, 1678.
202. Cullcandy, S. G., *et al.* 2-Amino-4-Phosphonobutyric Acid as a Glutamate Antagonist on Locust Muscle. *Nature* **1976**, 262, 408.
203. White, W. F., *et al.* The effect of acidic amino acid antagonists on synaptic transmission in the hippocampal formation in vitro. *Brain Research* **1979**, 164, 177.
204. Koerner, J. F.; Cotman, C. W. Micromolar L-2-amino-4-phosphonobutyric acid selectively inhibits perforant path synapses from lateral entorhinal cortex. *Brain Research* **1981**, 216, 192.
205. Evans, R. H., *et al.* The effects of a series of ω -phosphonic α -carboxylic amino acids on electrically evoked and excitant amino acid-induced responses in isolated spinal cord preparations. *Br. J. Pharmacol.* **1982**, 75, 65.
206. Collins, G. G. S. Some effects of excitatory amino acid receptor antagonists on synaptic transmission in the rat olfactory cortex slice. *Brain Research* **1982**, 244, 311.
207. Kurihara, K.; Kashiwayanagi, M. Physiological studies on umami taste. *J. Nutr.* **2000**, 130, 931.
208. Eschle, B. K., *et al.* Behavioral comparison of sucrose and l-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4) tastes in rats: Does l-AP4 have a sweet taste? *Neuroscience* **2008**, 155, 522.
209. Thomsen, C. The L-AP4 receptor. *Gen. Pharmacol.* **1997**, 29, 151.
210. Selvam, C., *et al.* A Virtual Screening Hit Reveals New Possibilities for Developing Group III Metabotropic Glutamate Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2797.
211. Walters, W. P., *et al.* Virtual screening - an overview. *Drug. Discov. Today* **1998**, 3, 160.
212. Kitchen, D. B., *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 935.
213. Triballeau, N., *et al.* Virtual Screening Workflow Development Guided by the "Receiver Operating Characteristic" Curve Approach. Application to High-Throughput Docking on Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 4. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2534.
214. Bessis, A.-S., *et al.* Three-dimensional model of the extracellular domain of the type 4a metabotropic glutamate receptor: New insights into the activation process. *Prot. Sci.* **2000**, 9, 2200.
215. Bertrand, H. O., *et al.* Common and selective molecular determinants involved in metabotropic glutamate receptor agonist activity. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3171.
216. Ragulin, V. V. Synthesis of phosphinic acids on the basis of hypophosphites: IV. Synthesis of pseudo-gamma-glutamylglycine and its enantiomers. *Russ. J. Gen. Chem.* **2004**, 74, 1177.
217. Berlicki, L., *et al.* Design, Synthesis, and Activity of Analogues of Phosphinothricin as Inhibitors of Glutamine Synthetase. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6340.
218. Forlani, G., *et al.* Phosphinothricin Analogues as Inhibitors of Plant Glutamine Synthetases. *J. Agri. Food Chem.* **2006**, 54, 796.
219. Acher, F. C.; Bertrand, H. O. Amino acid recognition by venus flytrap domains is encoded in an 8-residue motif. *Biopolymers* **2005**, 80, 357.
220. Selvam, C., *et al.* A Virtual Screening Hit Reveals New Possibilities for Developing Group III Metabotropic Glutamate Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2797.
221. Mucha, A., *et al.* Remarkable Potential of the α -Aminophosphonate/Phosphinate Structural Motif in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 5955.

222. Mucha, A., *et al.* Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Biochemistry* **2010**, 92, 1509.
223. Grzywa, R., *et al.* Identification of very potent inhibitor of human aminopeptidase N (CD13). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 2497.
224. Giannousis, P. P.; Bartlett, P. A. Phosphorus amino acid analogs as inhibitors of leucine aminopeptidase. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 1603.
225. Pícha, J., *et al.* Unusual activity pattern of leucine aminopeptidase inhibitors based on phosphorus containing derivatives of methionine and norleucine. *J. Enz. Inh. Med. Chem.* **2011**, 26, 155.
226. Berlicki, L., *et al.* N-substituted aminomethanephosphonic and aminomethane-P-methylphosphinic acids as inhibitors of ureases. *Amino Acids* **2012**, 42, 1937.
227. Krise, J. P.; Stella, V. J. Prodrugs of phosphates, phosphonates, and phosphinates. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, 19, 287.
228. Notni, J., *et al.* A Triazacyclononane-Based Bifunctional Phosphinate Ligand for the Preparation of Multimeric ⁶⁸Ga Tracers for Positron Emission Tomography. *Chem-Eur. J.* **2010**, 16, 7174.
229. Froestl, W., *et al.* Phosphinic Acid Analogs of GABA. 1. New Potent and Selective GABAB Agonists. *J Med Chem* **1995**, 38, 3297.
230. Alstermark, C., *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of novel gamma-aminobutyric acid type B (GABA(B)) receptor agonists as gastroesophageal reflux inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4315.
231. Froestl, W., *et al.* Phosphinic Acid Analogs of GABA. 2. Selective, Orally Active GABAB Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, 38, 3313.
232. Dumond, Y. R.; Montchamp, J.-L. Palladium-catalyzed cross-coupling reaction of anilinium hypophosphite with alkenyl bromides and triflates: application to the synthesis of GABA analogs. *J. Organomet. Chem.* **2002**, 653, 252.
233. Tsukamoto, T., *et al.* Enantiospecificity of glutamate carboxypeptidase II inhibition. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2319.
234. Boyd, E. A., *et al.* Facile synthesis of phosphorus-containing heterocycles. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, 5425.
235. Montchamp, J.-L. Recent advances in phosphorus-carbon bond formation: synthesis of H-phosphinic acid derivatives from hypophosphorous compounds. *J. Organomet. Chem.* **2005**, 690, 2388.
236. Nifantev, E. E., *et al.* Acid Catalysis in Hydrophosphorylation of Olefins. *Zhurnal Obshchei Khimii* **1980**, 50, 1744.
237. Gautier, A., *et al.* The Preparation of New Phosphorus-Centered Functional Groups for Modified Oligonucleotides and Other Natural Phosphates. *Molecules* **2005**, 10, 1048.
238. Karanewsky, D. S., *et al.* (Phosphinyloxy)Acyl Amino-Acid Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme (Ace) .1. Discovery of (S)-1-[6-Amino-2-[[Hydroxy(4-Phenylbutyl)Phosphinyl]Oxy]-1-Oxo-hexyl]-L-Proline, a Novel Orally Active Inhibitor of Ace. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 204.
239. Deprèle, S.; Montchamp, J.-L. A novel and convenient preparation of hypophosphite esters. *J. Organomet. Chem.* **2002**, 643-644, 154.
240. Bartley, D. M.; Coward, J. K. A Stereoselective Synthesis of Phosphinic Acid Phosphopeptides Corresponding to Glutamyl- γ -glutamate and Incorporation into Potent Inhibitors of Folylpoly- γ -glutamyl Synthetase. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70, 6757.
241. Montel, S., *et al.* Functionalized Phosphanyl-Phosphonic Acids as Unusual Complexing Units as Analogues of Fosmidomycin. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 3237.
242. Boyd, E. A., *et al.* Synthesis of Alkyl Phosphinic Acids from Silyl Phosphonites and Alkyl-Halides. *Tetrahedron Lett* **1994**, 35, 4223.
243. Majewski, P. New synthetic route to dialkylphosphinic acids. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **1989**, 45, 151.
244. Boyd, E. A., *et al.* A Versatile Route to Substituted Phosphinic Acids. *Tetrahedron Letters* **1990**, 31, 2933.
245. Boyd, E. A., *et al.* Synthesis of Gamma-Keto-Substituted Phosphinic Acids from Bis(Trimethylsilyl)Phosphonite and Alpha,Beta-Unsaturated Ketones. *Tetrahedron Lett* **1992**, 33, 813.

246. Gallagher, M. J., *et al.* Mono- and dialkylation of isopropyl phosphinate - a simple preparation of alkylphosphinate esters. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **1996**, 115, 255.
247. Abrunhosa-Thomas, I., *et al.* Direct Monoalkylation of Alkyl Phosphinates to Access H-Phosphinic Acid Esters. *Synthesis* **2006**, 2006, 325.
248. Cox, P. B., *et al.* The solid phase synthesis of unsymmetrical phosphinic acids. *Tetrahedron Lett* **2001**, 42, 125.
249. Cristau, H.-J., *et al.* Preparation of phosphinodipeptide analogs as building blocks for pseudopeptides synthesis. *J. Organomet. Chem.* **2002**, 643–644, 381.
250. Pirat, J.-L., *et al.* A Convenient One-Pot Synthesis of Phosphino-Dipeptide Analogs. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2002**, 177, 1793.
251. Bravo-Altamirano, K.; Montchamp, J.-L. Palladium-Catalyzed Dehydrative Allylation of Hypophosphorous Acid with Allylic Alcohols. *Org. Lett.* **2006**, 8, 4169.
252. Coudray, L.; Montchamp, J.-L. Green, Palladium-Catalyzed Synthesis of Benzylic H-Phosphinates from Hypophosphorous Acid and Benzylic Alcohols. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008, 4101.
253. Kalek, M.; Stawinski, J. Efficient synthesis of mono- and diarylphosphinic acids: a microwave-assisted palladium-catalyzed cross-coupling of aryl halides with phosphinate. *Tetrahedron* **2009**, 65, 10406.
254. Schwabacher, A. W.; Stefanescu, A. D. Improved preparation of phosphinate esters for palladium-catalyzed cross-coupling. *Tet. Lett.* **1996**, 37, 425.
255. Barinka, C., *et al.* Structural Basis of Interactions between Human Glutamate Carboxypeptidase II and Its Substrate Analogs. *J. Mol. Biol.* **2008**, 376, 1438.
256. Yamagishi, T., *et al.* Diastereoselective Synthesis of the Leu-Pro Type Phosphinyl Dipeptide Isostere. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 5472.
257. Abrunhosa-Thomas, I., *et al.* Alkylation of H-Phosphinate Esters under Basic Conditions. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 2851.
258. Kehler, J., *et al.* Syntheses and GABA receptor binding properties of 4-amino-1-, 2-, and 3-hydroxybutylphosphinic acids. *Tetrahedron* **1999**, 55, 771.
259. Fougère, C., *et al.* Rapid and Efficient Synthesis of Unsymmetrical Phosphinic Acids R'P(O)OHR". *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 6048.
260. Valiaeva, N., *et al.* Phosphinic Acid Pseudopeptides Analogous to Glutamyl- γ -glutamate: Synthesis and Coupling to Pteroyl Azides Leads to Potent Inhibitors of Folylpoly- γ -glutamate Synthetase†. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 5146.
261. Chen, S.; Coward, J. K. Investigations on New Strategies for the Facile Synthesis of Polyfunctionalized Phosphinates: Phosphinopeptide Analogues of Glutathionylspermidine. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 502.
262. Ravaschino, E. L., *et al.* Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Phosphinopeptides against *Trypanosoma cruzi* Targeting Trypanothione Biosynthesis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 49, 426.
263. Zeng, B., *et al.* A Phosphinate Inhibitor of the meso-Diaminopimelic Acid-Adding Enzyme (MurE) of Peptidoglycan Biosynthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 10081.
264. Belley, M., *et al.* Synthesis of the Nanomolar Photoaffinity GABAB Receptor Ligand CGP 71872 Reveals Diversity in the Tissue Distribution of GABAB Receptor Forms. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 7, 2697.
265. Thottathil, J. K., *et al.* Mild Arbuzov reactions of phosphonous acids. *Tet. Lett.* **1984**, 25, 4737.
266. Ragulin, V. V. Synthesis of Phosphine Analog of Glutamylglycine. *Russ. J. Gen. Chem.* **2001**, 71, 1823.
267. Schöllkopf, U., *et al.* Asymmetric syntheses via heterocyclic intermediates, XXXI. Asymmetric synthesis of various non-proteinogenic amino acid methyl esters (functionalized in the carbon chain) and amino acids by the bislactim ether method. *Liebigs Annalen der Chemie* **1986**, 1986, 2150.
268. Deprèle, S.; Montchamp, J.-L. Triethylborane-Initiated Room Temperature Radical Addition of Hypophosphites to Olefins: Synthesis of Monosubstituted Phosphinic Acids and Esters. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 6745.

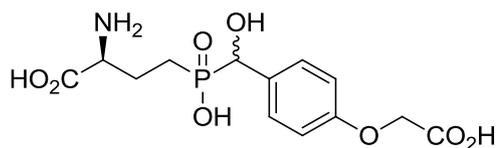
269. Selvam, C., *et al.* 1-(+)-2-Amino-4-thiophosphonobutyric Acid (1-thioAP4), a New Potent Agonist of Group III Metabotropic Glutamate Receptors: Increased Distal Acidity Affords Enhanced Potency. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 4656.
270. Marchand, D., *et al.* Straightforward Synthesis of Chiral Silylated Amino Acids through Hydrosilylation. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008, 3107.
271. Acher, F. S., C.; Triballeau, N.; Pin, J. P.; Bertrand, H. O. Hypophosphorus acid derivatives and their therapeutical applications. *WO 2007/052169* **2007**.
272. Arpège, P. <http://www.arpege.cnrs.fr/>.
273. Davis, M. J., *et al.* Role of mGluR4 in acquisition of fear learning and memory. *Neuropharmacology* **2013**, 66, 365.
274. Beurrier, C., *et al.* Electrophysiological and behavioral evidence that modulation of metabotropic glutamate receptor 4 with a new agonist reverses experimental parkinsonism. *FASEB J.* **2009**, 23, 3619.
275. Wierońska, J., *et al.* Opposing efficacy of group III mGlu receptor activators, LSP1-2111 and AMN082, in animal models of positive symptoms of schizophrenia. *Psychopharmacology* **2012**, 220, 481.
276. Wierońska, J., *et al.* The antipsychotic-like effects of the mGlu group III orthosteric agonist, LSP1-2111, involves 5-HT1A signalling. *Psychopharmacology* **2013**, 227, 711.
277. Wierońska, J. M., *et al.* Metabotropic glutamate receptor 4 novel agonist LSP1-2111 with anxiolytic, but not antidepressant-like activity, mediated by serotonergic and GABAergic systems. *Neuropharmacology* **2010**, 59, 627.
278. Lopez, S., *et al.* Targeting Group III Metabotropic Glutamate Receptors Produces Complex Behavioral Effects in Rodent Models of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* **2007**, 27, 6701.
279. Cajina, M., *et al.* Qualification of LSP1-2111 as a Brain Penetrant Group III Metabotropic Glutamate Receptor Orthosteric Agonist. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 5, 119.
280. Isayev, O., *et al.* Structure-toxicity relationships of nitroaromatic compounds. *Mol. Divers.* **2006**, 10, 233.
281. Megharaj, M., *et al.* Toxicity of phenol and three nitrophenols towards growth and metabolic activities of *Nostoc linckia*, isolated from soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1991**, 21, 578.
282. Kovacic, P.; Somanathan, R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *J. Applied Toxicol.* **2014**, 34, 810.
283. Boelsterli, U. A., *et al.* Bioactivation and hepatotoxicity of nitroaromatic drugs. *Curr. Drug. Metab.* **2006**, 7, 715.
284. Koizumi, M., *et al.* Comparative study of toxicity of 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol in newborn and young rats. *J. Toxicol. Sci.* **2001**, 26, 299.
285. Williamson, A. Ueber die Theorie der Aetherbildung. *Liebigs Ann.* **1851**, 77, 37.
286. Williamson, A. W. XXII.-On etherification. *Quart. J. Chem. Soc. London* **1852**, 4, 229.
287. Goudet, C., *et al.* A novel selective metabotropic glutamate receptor 4 agonist reveals new possibilities for developing subtype selective ligands with therapeutic potential. *FASEB J.* **2012**, 26, 1682.
288. Goudet, C., *et al.* A novel selective metabotropic glutamate receptor 4 agonist reveals new possibilities for developing subtype selective ligands with therapeutic potential. *FASEB J.* **2012**, 26, 1682.
289. Vilar, B., *et al.* Alleviating Pain Hypersensitivity through Activation of Type 4 Metabotropic Glutamate Receptor. *J. Neurosci.* **2013**, 33, 18951.
290. Randall, L. O.; Selitto, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* **1957**, 111, 409.
291. Bennett, G. J.; Xie, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *PAIN* **1988**, 33, 87.
292. Gabay, E.; Tal, M. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. *PAIN* **2004**, 110, 354.

Chapitre II : Relation structure-activité autour du LSP4-2022

Chapitre II : Relation structure-activité autour du LSP4-2022

II.1. Point de départ de mon doctorat

Lorsque j'ai commencé ma thèse en octobre 2011, le **LSP4-2022** était donc désigné comme le composé référence de ce projet (Figure **II-1**).



LSP4-2022

Figure **II-1** Structure du **LSP4-2022**

Comme nous l'évoquions précédemment, ce composé possède une EC_{50} de 0,11 μ M sur le récepteur mGlu4 avec une bonne sélectivité par rapport aux autres sous-types du groupe III et notamment par rapport au récepteur mGlu8. Nous avons alors étudié les différentes interactions entre ce ligand et son récepteur afin d'identifier les résidus responsables de cette sélectivité. Intéressons-nous un peu plus au docking du **LSP4-2022** sur le récepteur mGlu4 (Figure **II-2**).

Figure **II-2** (A) Docking du **LSP4-2022** dans le domaine VFT du récepteur mGlu4

(B) Agrandissement du site de liaison

On peut remarquer que le composé se lie au récepteur au niveau de la charnière en se liant dans la fente entre les deux lobes (lobe 1 et lobe 2).²⁸⁸ En zoomant sur le site actif, on peut identifier les résidus du récepteur responsable de l'affinité dans la nouvelle poche. Nous n'avons pas

représenté les interactions dans la poche glutamate (commune à tous les récepteurs mGlu) que nous avons décrit dans le chapitre **I.1.4**. On peut s'apercevoir que le **LSP4-2022** se lie au récepteur mGlu4 via des liaisons ioniques et des interactions de van der Waals :

- Liaison entre l'oxygène du phénoxy du **LSP4-2022** avec l'hydroxyle distal de la sérine 110
- Liaison entre le carboxylate distale du **LSP4-2022** avec l'hydroxyle de la thréonine 108 et le N-H de la chaîne principale de la séquence sérine 157 – glycine 158.
- Liaison cation- π entre le cycle aromatique et la lysine 74. Cette interaction n'est pas représentée sur le docking car nous en discuterons plus en détail dans le paragraphe **II.4.4**.

Comme nous pouvons le remarquer sur l'alignement de séquence (Figure **II-3**), la séquence T108-C109-S110 est conservée dans les quatre sous-types du groupe III. La sélectivité entre les deux sous-types 4 et 8 ne se situe donc pas à ce niveau. En revanche, la séquence S157-G158 ainsi que la boucle 1 (Figure **II-3**, surlignée en gris) sont différentes entre les deux sous-types (S157-G158 sont substituées par deux alanines). Un travail de mutagenèse a alors été effectué sur ces deux zones où les résidus de du récepteur mGlu4 ont été mutés par ceux du sous-type 8. Tout d'abord, la séquence S157-G158 a été mutée par deux alanines mais la perte d'activité n'est pas totale. Chaque résidu de la boucle 1 a alors été muté mais il s'est avéré que la sélectivité entre les deux sous-types était due à l'ensemble de la boucle 1. La séquence S157-G158 et la boucle 1 sont donc nécessaires pour la sélectivité. La boucle 1 n'est pas directement liée au ligand car tous les résidus responsables de l'ancrage de la molécule sont situés sur la boucle 2. Cependant, les boucles 1 et 2 sont reliées entre elles par de fortes interactions (liaisons hydrogènes et pont disulfure). On peut donc supposer que la position de la boucle 1 a une très forte influence sur celle de la boucle 2 et donc sur les résidus liant le ligand.

résidu de mGlu4R n°	Feuillet β 1	74 78 Hélice α 1
rmGlu1	RSVARMGDGVIIGALF SVHHQPPAEKVPERKCGEIREQYGIQRVEAMFHTLDKINADPVLNITLGSEIRD	
rmGlu5	RVVAHMPGDIIGALF SVHHQPTVDKVERKCGAVREQYGIQRVEAMLHTLERINS DPTLLPNI TLGCEIRD	
rmGlu2	KKVLTLEGLDLVGGFL PVHQKGG---PAEECGPVNEHRGIQRLEAMLFALDRINRDPHLLPGVRLGAHILD	
rmGlu3	RREIKIEGDLVGGFL PINEKGT---GTEECGRINEDRGIQRLEAMLFALDEINKDNYPVLLGKLVHILD	
rmGlu4	MNSIRIDGDIITLGGFL PVHGRGS---EGKACGELKKEKGIHRLEAMLFALDRINNDPDLNITLGARILD	
rmGlu6	AGSVRLAGGLITLGGFL PVHARGA---AGRACGALKKEQGVHRLEAMLYALDRVNADPELLPGVRLGARILD	
rmGlu7	PHSIRIEGDTVTLGGFL PVHAKGP---SGVPCGDIKRENGIHRLEAMLYALDQINS DPNLLPNVTLGARILD	
rmGlu8	AHSIRVDGDIITLGGFL PVHAKGE---RGVPCGELKKEKGIHRLEAMLYALDQINKDPDLLSNITLGVRIID	
lobe 1	<hr/>	
résidu de mGlu4R n°		157
rmGlu1	SCWHSVALEQSIEFIRDSLISIRDEKDG LNRCLPDGQTLPPGR TKK- IAGVI GPGSSSVAIQVQNLQLFDIP	
rmGlu5	SCWHSAVALEQSIEFIRDSLISS-EEEEGLVRCVD-GSSS--FRSKK- PIVGI GPGSSSVAIQVQNLQLFNIP	
rmGlu2	SCKSDTHALEQALDFVRASLSRG--ADGSRHICPD-GS-YATHSDAPTA VTGVI GGSYSDVSIQVANLLRFLQIP	
rmGlu3	TCSRDTYALEQSLEFVRASLTK---VDEAEYMC PD-GS-YAIQENIPLL IAGVI GGSYSSVSIQVANLLRFLQIP	
rmGlu4	TCSRDT HALEQSLTFVQALIEK---DGTEVRCGS-GG-PPIITKP-ERV VGVI GASGSSVIMVANILRFLFKIP	
rmGlu6	TCSRDTYALEQALS FVQALIRGRGDGEASV CPG -GV-PPLRSAP PERVVAVV GASASSVIMVANILRFLFAIP	
rmGlu7	TCSRDTYALEQSLTFVQALIQK---DTSDVRC TN-GE-PPV FVK P-EK VVGI GASGSSVIMVANILRFLQIP	
rmGlu8	TCSRDT YALEQSLTFVQALIEK---DASDVKCAN-GD-PP IFT KP-DKIS GVIGAA ASSVIMVANILRFLFKIP	
lobe 1	<hr/>	

Figure II-3 Portion de l'alignement de séquences des récepteurs mGlu du rat
 Surligné en gris : boucle 1 α 1- β 1 ; Surligné en vert : boucle 2 ; Surligné en magenta : séquence S157-G158
 En vert : feuillets β ; En rouge : hélices α

Le dernier point que l'on peut retenir de l'ancrage du **LSP4-2022** sur le récepteur mGlu4 est le rôle de la nouvelle poche de liaison découverte grâce au criblage virtuel et la découverte du (S)-PCEP (Chapitre I.1.3.).

En 1993, O'Hara *et al.*²⁹³ ont démontré que les récepteurs mGlu possédaient un site de liaison extracellulaire qui se comporte comme celui des LIVPB (Chapitre I.1.2.). Un autre type de récepteur appartenant à la classe C des RCPG, l'ANPR (Atrial Natriuretic Peptide Receptor), se comporte également comme les LIVPB et possède un site allostérique liant le chlore. Ogawa *et al.*²⁹⁴ ont montré que ce site allostérique était conservé chez le récepteur mGlu1. Chez l'ANPR, le site chlorure se situe entre les deux feuillets β 2 et β 3. Notre laboratoire a alors fait l'analogie avec le récepteur mGlu4 et a montré que la nouvelle poche était potentiellement un site chlorure.²⁹⁵ Par comparaison, le carboxylate distal du **LSP4-2022** joue le même rôle que le chlorure et se fixe dans le site allostérique du chlore. Ce site, très étroit, relie alors les résidus S157-G158 du feuillet β 3 à la T108 du feuillet β 2. Chez le sous-type 8, les deux alanines 157 et 158 se positionnent différemment et empêchent la liaison du carboxylate au site chlore. La sélectivité entre les récepteurs mGlu4 et mGlu8 se réalise à ce niveau.²⁸⁸ La validation de ce site chlorure du récepteur mGlu4 est en cours par Amélie Tora lors de son doctorat effectué sous la

supervision du Dr. Cyril Goudet dans l'équipe du Dr. Jean-Philippe Pin à l'Institut Génomique Fonctionnel de Montpellier.

II.2. Premières optimisations par Isabelle Lemasson

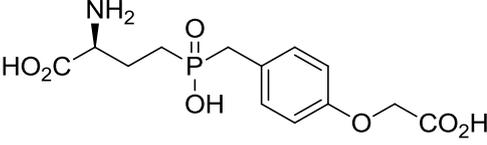
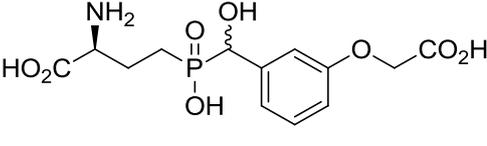
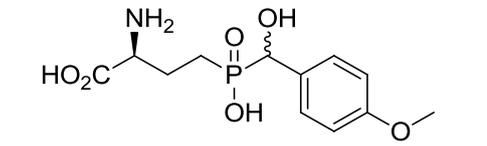
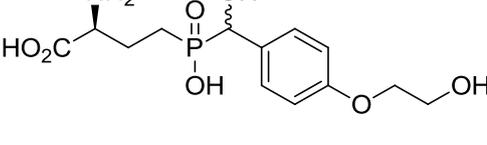
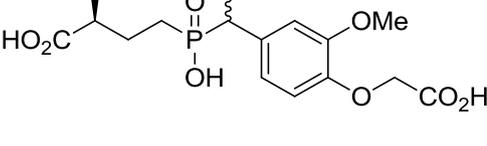
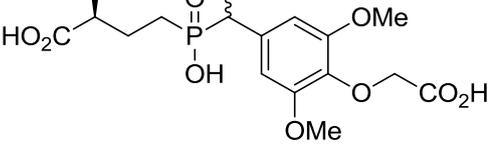
Isabelle Lemasson a étudié la relation structure-activité du **LSP4-2022** en faisant varier une par une les différentes parties structurales de ce ligand. Évidemment, aucune modification n'a été effectuée sur la partie glutamate car l'objectif principal est d'augmenter la sélectivité par rapport au récepteur mGlu8 et de maintenir, voir d'augmenter l'activité sur le récepteur mGlu4. La voie de synthèse de ces composés est basée sur celle du **LSP4-2022** avec l'addition du composé "**P-H_{int}**" sur des électrophiles différents (benzaldéhydes, imine, bromure de benzyle).

Tout d'abord, le groupement hydroxyle en α du phosphinate a été remplacé par un hydrogène (**LSP3-2156**). Le composé est sélectif par rapport au sous-type 8 mais moins actif sur le récepteur mGlu4 avec une EC_{50} de 1,59 μ M. Le groupement OH paraît donc indispensable à l'activité. Ensuite, la partie carboxyméthylphénoxy a été positionnée en position *meta* sur le cycle et non plus en position *para* (**LSP3-3108**). Dans ce cas, on perd en activité et sélectivité. Il est donc important de conserver la substitution du cycle aromatique en position *para*. Précédemment, nous avons montré par modélisation que l'acide carboxylique distal était important. Cette observation fut vérifiée par la synthèse des deux composés **LSP3-3171** et **LSP3-3141** où l'acide carboxylique est supprimé ou remplacé par un alcool primaire. L'activité ainsi que la sélectivité de ces deux composés chutent drastiquement ; l'acide carboxylique est donc indispensable. Effectivement, la perte des liaisons hydrogènes avec les résidus hydrophiles est préjudiciable à l'activité. De plus, sans cette fonction, la liaison entre les feuillettes $\beta 2$ et $\beta 3$ n'est plus assurée et le site chlore n'est plus occupé. Enfin, le cycle aromatique fut substitué par un (**LSP3-3159**) ou deux (**LSP3-3165**) groupements méthoxyle en position *meta*. Pour le premier, on peut remarquer que l'on conserve la même activité sur le récepteur mGlu4 mais que la sélectivité sur le sous-type 8 diminue légèrement ; on retrouve à peu près les mêmes propriétés que pour le composé hit, le **LSP4-2022**. L'ajout du second méthoxyle n'améliore pas les résultats. Tous ces résultats sont regroupés dans le tableau **II-1**.

Tableau II-1 Activités sur les récepteurs mGlu4 et mGlu8 des premiers composés issus du

LSP4-2022 (Thèse Isabelle Lemasson)

 Mesure de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293

Composé	Structure	EC ₅₀ (μM) mGlu4 (n)	EC ₅₀ (μM) mGlu8 (n)	Ratio 8/4
LSP4-2022		0,10 ± 0,02 (22)	29,2 ± 4,2 (27)	265
LSP3-2156		1,59 ± 0,81 (4)	> 100	> 100
LSP3-3108		4,88 ± 1,05 (4)	36,30 ± 18,11 (4)	7
LSP3-3171		6,53 ± 0,78 (3)	60,57 ± 15,09 (3)	9
LSP3-3141		12,20 ± 0,10 (3)	22,50 (1)	2
LSP3-3159		0,10 ± 0,02 (3)	18,37 ± 2,44 (3)	182
LSP3-3165		0,48 ± 0,12 (5)	27,22 ± 4,06 (5)	56

A partir de ces résultats préliminaires, nous pouvons en conclure que le **LSP4-2022** reste le meilleur composé en terme de compromis activité-sélectivité.

II.3. Poursuite de l'optimisation chimique

La seule modification intéressante du **LSP4-2022** fut l'ajout de substituant sur le cycle aromatique en position *meta*. Ce travail a donc été poursuivi par Delphine Rigault qui a synthétisé différents analogues du **LSP4-2022** substitués en position *meta* sur le cycle aromatique en utilisant la voie de synthèse de ce composé référence à partir d'hydroxybenzaldéhydes commerciaux. Ce travail a été effectué entre la thèse d'Isabelle Lemasson et le début de mon doctorat en 2011.

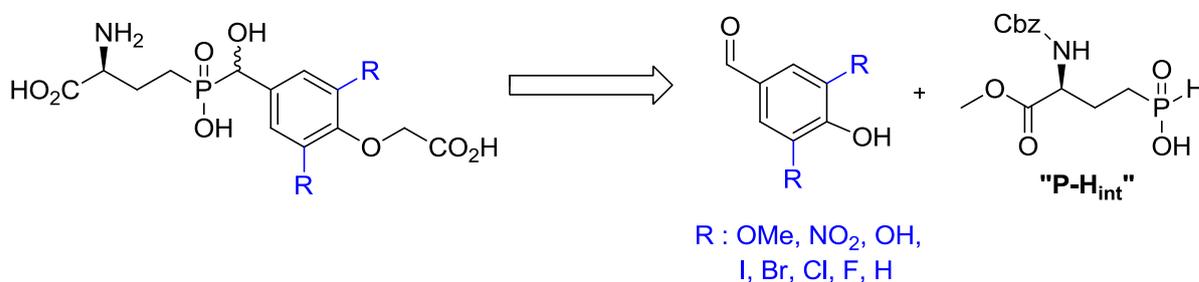


Schéma II-1 Voie de synthèse générale des analogues du **LSP4-2022**

Les premiers composés choisis furent des composés possédant un substituant polaire capable de faire des liaisons hydrogènes supplémentaires avec le récepteur mGlu4 comme un groupement nitro (**SB-1087**), un acide carboxylique (**LSP2-10087**) ou un groupement hydroxyle (**LSP2-10076**). Nous pouvons remarquer que l'ajout de fonction polaire ne permet pas d'augmenter l'activité sur le récepteur mGlu4 car la meilleure activité est celle comprenant le groupement nitro avec une EC_{50} de $0,26 \pm 0,07 \mu\text{M}$. Ce résultat n'est pas étonnant car les premiers composés actifs obtenus par Chelliah Selvam étaient des nitrophénols (Chapitre I.2.6.3.). Cependant, en termes de sélectivité, le ratio mGlu8/mGlu4 est égal à 6, ce qui signifie que le **LSP3-1087** n'est pas du tout sélectif du sous-type 4. Le manque de sélectivité peut-être dû au fait que justement cette partie de la molécule ne se situe pas dans la poche chlore mais ailleurs.

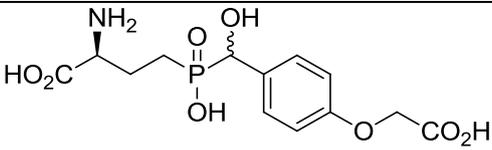
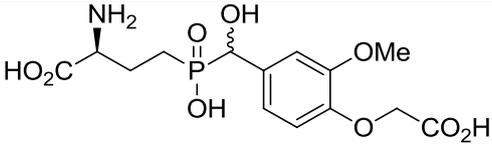
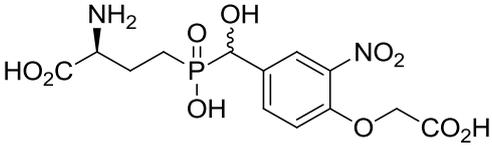
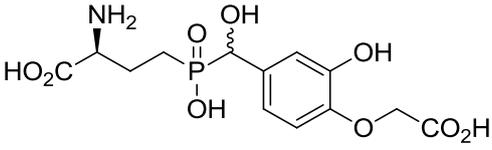
Il est donc plus favorable d'ajouter des substituants hydrophobes afin qu'ils interagissent avec ces résidus hydrophobes. Le **LSP2-9105** comportant deux méthyles sur le noyau aromatique a alors été synthétisé. L'activité sur le récepteur mGlu4 est de $0,53 \pm 0,12 \mu\text{M}$ mais la sélectivité vis-à-vis du sous-type 8 reste préférentielle. Le composé contenant un OMe reste le meilleur des dérivés du **LSP4-2022** possédant un substituant. On s'est dit pourquoi ne pas allonger la chaîne

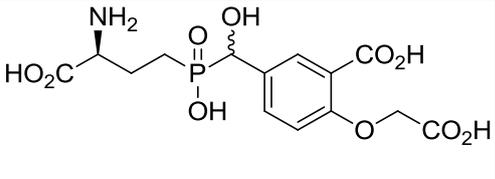
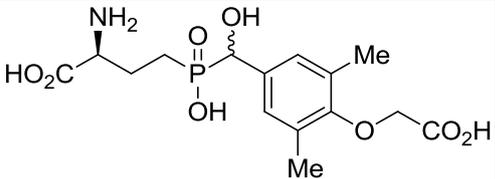
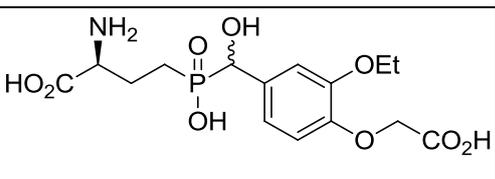
du substituant avec OEt par exemple. Le composé a donc été obtenu (**LSP2-9159**) mais ses données pharmacologiques ne sont pas aussi bonnes que **LSP3-3159**, contenant un OMe, avec une activité 16 fois faible sur le récepteur mGlu4 et une mauvaise sélectivité. Il faut croire que le substituant est trop encombré et ne rentre pas correctement dans le site chlore qui est extrêmement étroit. Ces résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau **II-2**).

C'est en me basant sur toutes ces données que j'ai commencé mon travail de synthèse et d'optimisation du **LSP4-2022**. Comme nous l'avons dit précédemment, le seul changement structural du **LSP4-2022** qui a été bénéfique, c'est l'introduction de substituant sur le cycle aromatique. Nous avons donc continué cette optimisation en synthétisant de nouveaux composés en espérant que leurs données pharmacologiques soient meilleures que celles du composé de référence, le **LSP4-2022**.

Tableau **II-2** Activités sur les récepteurs mGlu4 et mGlu8 des analogues substitués du **LSP4-2022**

Mesure de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293

Composé	Structure	EC ₅₀ (μM) mGlu4 (n)	EC ₅₀ (μM) mGlu8 (n)	Ratio 8/4
LSP4-2022		0,10 ± 0,02 (22)	29,2 ± 4,2 (27)	265
LSP3-3159		0,10 ± 0,02 (3)	18,37 ± 2,44 (3)	182
LSP3-1087		0,26 ± 0,07 (3)	1,59 ± 0,82 (3)	6
LSP2-10076		1,12 ± 0,41 (3)	34,0 ± 19,0 (3)	30

LSP2-10087		$3,99 \pm 0,56$ (3)	$7,42 \pm 1,57$ (3)	1,9
LSP2-9105		$0,53 \pm 0,12$ (3)	$21,90 \pm 6,32$ (3)	41
LSP2-9159		$1,67 \pm 0,33$ (3)	$24,97 \pm 5,97$ (3)	15

II.4. Synthèses de dérivés fluorés du LSP4-2022

4.1. Pourquoi le fluor ?

Le fluor élémentaire fut isolé pour la première fois en 1886 par le chimiste français Henri Moissan à partir d'acide fluorhydrique (Figure II-4).²⁹⁶

Figure II-4 Appareil utilisé pour décomposer l'acide fluorhydrique en fluor élémentaire

Les premières utilisations de cet élément chimique furent exclusivement inorganiques. C'est seulement à partir des années 1950 que le fluor fut intégré dans des structures organiques et bio-organiques. Effectivement, jusqu'en 1957, aucun médicament sur le marché ne comportait

d'atome de fluor. C'est d'ailleurs cette année là que fut synthétisé le premier principe actif fluoré, le 5-fluorouracil (Figure II-5), en tant qu'anticancéreux en inhibant la thymidylate synthase.²⁹⁷



Figure II-5 Structure du 5-fluorouracil

D'autres composés fluorés biologiquement actifs ont vu le jour au début des années 1950 et notamment les corticostéroïdes fluorés.²⁹⁸ Ces premiers composés sont encore très utilisés aujourd'hui à des fins thérapeutiques. Il a fallu attendre les années 1970 pour que la chimie organique du fluor connaisse une véritable expansion. Les progrès énormes réalisés en méthodologie de synthèse ont rendu accessibles des molécules de plus en plus variées et complexes et ont ainsi permis l'essor rapide de la chimie médicinale du fluor. Aujourd'hui, le nombre de biomolécules fluorées représente 20% des médicaments. Parmi les 150 médicaments commercialisés, nous pouvons citer 3 blockbusters (Figure II-6). Tout d'abord la fluoxétine, plus connu sous le nom de Prozac[®]²⁹⁹, qui est l'antidépresseur le plus vendu au monde. Puis, le médicament le plus vendu en 2010, l'atorvastatine³⁰⁰ (Lipitor) contre le cholestérol. Enfin, l'antibiotique Ciprofloxacine (Ciprobay)³⁰¹ qui est très efficace contre de nombreuses bactéries.

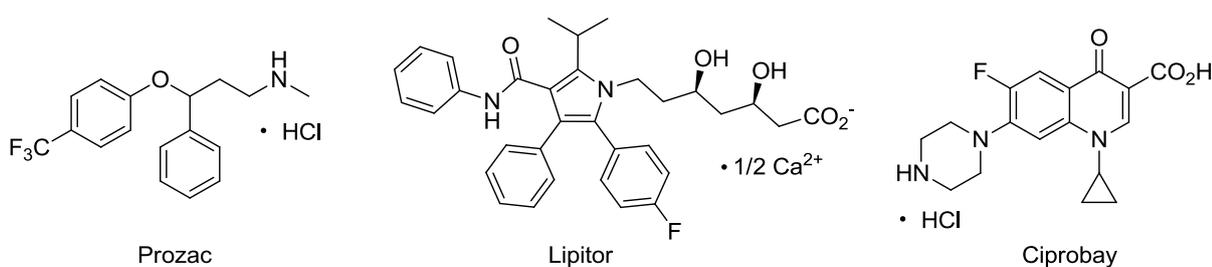


Figure II-6 Trois médicaments fluorés majeurs : Le Prozac, le Lipitor et le Ciprobay

Il faut souligner que les composés fluorés sont également très présents dans d'autres domaines de la chimie du vivant, comme celui des matériaux biocompatibles et des composés phytosanitaires. Les molécules fluorées représentent près de 50% du marché en agrochimie. Les propriétés intrinsèques de l'atome de fluor confèrent aux molécules organofluorées des propriétés uniques qui sont de plus en plus exploitées dans le domaine pharmaceutique.³⁰²⁻³⁰⁴

Effectivement, l'introduction de fluor permet d'accroître la stabilité métabolique, la biodisponibilité et les interactions ligand-protéine (médicament-récepteur).

Stabilité métabolique

La stabilité métabolique d'un médicament est un des facteurs-clé qui détermine sa biodisponibilité. En effet, un médicament doit être suffisamment disponible pour pouvoir atteindre sa cible efficacement mais pas trop au risque de devenir toxique pour l'organisme. Il est donc important de trouver le juste équilibre. Avant d'atteindre sa cible biologique, la molécule exogène subit des processus de métabolisation qui tendent à son élimination. Les principales enzymes responsables de cette métabolisation sont les cytochromes P450 appartenant à la famille des hémoprotéines. Ces enzymes oxydent les principes actifs qui deviennent alors moins lipophiles et donc plus facilement éliminés. Pour lutter contre ce processus, l'introduction de fluor est un atout majeur. Effectivement, la substitution d'un hydrogène aromatique par un fluor permet de bloquer des positions oxydables par les cytochromes. Par exemple, une étude sur un inhibiteur de cholestérol, le SCH 48461 (Schéma II-2), a montré que des sous-produits issus de la métabolisation étaient retrouvés dans la bile chez le rat. Une optimisation chimique a été réalisée afin d'améliorer la biodisponibilité de ce dernier et a mené au composé Ezetimib-SCH 58235 qui est plus actif que son prédécesseur. Ce nouveau composé a aussi montré une activité 400 fois supérieure que le composé initial sur un modèle de singe avec une ED₅₀ de 0,0005 mg/kg/j.³⁰⁵

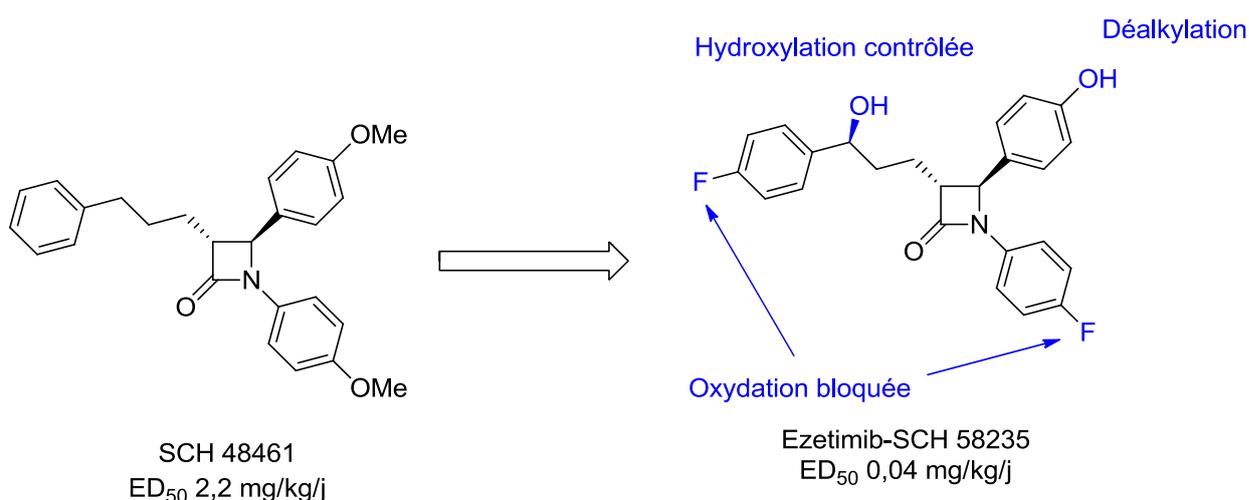
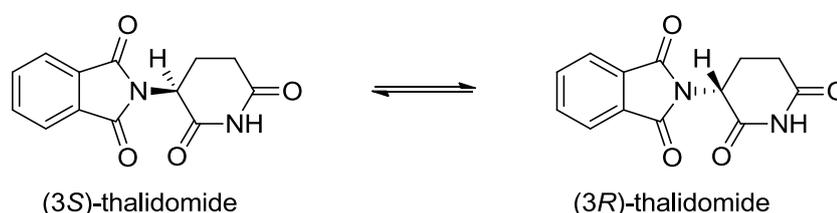
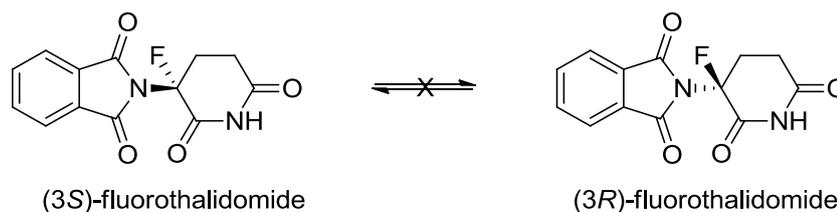


Schéma II-2 Optimisation métabolique de l'Ezetimibe

Le fluor peut aussi éviter la racémisation *in vivo* d'un composé. Nous pouvons citer aussi l'exemple du Thalidomide qui est le plus gros désastre médical avéré à ce jour. Ce médicament mis sur le marché en 1956 en tant que sédatif et anti-nauséeux fut retiré du marché 6 ans plus tard car il était la cause de nombreuses malformations congénitales. En fait, le Thalidomide était administré chez la femme enceinte sous sa forme racémique. Or, seul l'énantiomère (*R*) possède les effets sédatifs alors que l'autre énantiomère, le (*S*), est totalement tératogène. Des essais biologiques ont alors été réalisés sur l'énantiomère (*R*) seul mais les résultats ne furent pas concluants à cause de la racémisation *in vivo* du centre stéréogène (Schéma II-3).³⁰⁶

Schéma II-3 Racémisation *in vivo* du thalidomide

L'introduction d'un atome de fluor à la place de l'hydrogène acide permet de contrôler la chiralité du carbone asymétrique et donc les effets biologiques du composé (Schéma II-4). Le (*S*)-fluorothalidomide montre alors de meilleurs effets, en tant qu'inhibiteur du facteur α de la nécrose tumorale (TNF- α), par rapport à l'énantiomère (*R*) et au mélange racémique.³⁰⁷

Schéma II-4 Pas de racémisation *in vivo* du fluorothalidomide

Lipophilicité

Un médicament est bien absorbé par l'organisme s'il est bien soluble dans le sang, donc hydrophile. En revanche, pour pénétrer dans les cellules, le médicament doit aussi posséder des propriétés lipophiles. Un équilibre entre ces deux propriétés antagonistes doit être trouvé et c'est ici que le fluor a un rôle à jouer. En effet, l'introduction d'un atome de fluor sur une molécule a de forts effets sur la lipophilicité de la molécule. Alors que la monofluoration ou la

trifluoromethylation sur une chaîne alkyle insaturée diminue la lipophilicité de la molécule à cause de l'importante force des dipôles C-F et C-CF₃, la monofluoruration ou la trifluoromethylation de composés aromatiques ou de carbones aliphatiques proches d'hétéroatomes, augmente significativement la lipophilicité des composés.³⁰⁸

Acidité et basicité

La perturbation du pKa d'une molécule peut modifier fortement l'affinité et les propriétés pharmacocinétiques de cette dernière. Cette modulation a aussi un impact sur la biodisponibilité du composé dû au processus d'absorption qui est affecté. Or, le fluor est l'élément le plus électronégatif [χ_P (Pauling) 4.0] et l'introduction de cet atome dans des biomolécules peut totalement faire varier l'acidité ou la basicité de la fonction proximale de l'atome de fluor. Par exemple, l'insertion d'un atome de F ou d'un groupement CF₃ en α d'un alcool ou d'un acide rend ce dernier plus acide et renforce donc les liaisons hydrogènes, et par la même occasion l'affinité d'un médicament avec sa cible. Autre exemple, l'ajout de fluor (ou CF₃) en position β d'une amine influe sur la basicité de l'amine en raison de l'effet électro attracteur du fluor. Cela induira une diminution de la basicité, ce qui entraîne une meilleure absorption de la molécule étant donné que l'amine ne sera pas protonée à pH physiologique. Une étude sur des inhibiteurs tricycliques de la prothrombine répertoriée, met en valeur cette caractéristique du fluor.³⁰⁹ Le tableau **II-3** réunit les valeurs de pKa de l'amine tertiaire (rouge) en fonction des substituants R.

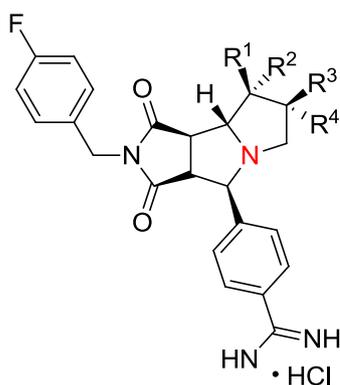


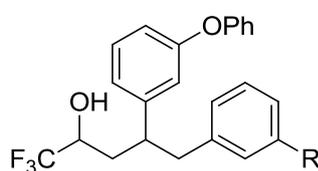
Figure **II-7** Structure des inhibiteurs tricycliques de la prothrombine

Tableau **II-3** Effet du fluor sur la basicité de l'amine tertiaire

Composé	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	pKa
Inhibiteur 1	H	H	H	H	4,5
Inhibiteur 2	F	H	H	H	3,4
Inhibiteur 3	H	F	H	H	3,3
Inhibiteur 4	H	H	F	H	3,3
Inhibiteur 5	H	H	H	F	3,3
Inhibiteur 6	OH	H	H	H	4,1
Inhibiteur 7	OMe	H	H	H	3,7
Inhibiteur 8	F	F	H	H	< 2
Inhibiteur 9	H	H	F	F	< 2

Structure

L'introduction d'atomes de fluor peut induire des changements de conformation des molécules. Bien que l'insertion d'un fluor à la place d'un hydrogène ou d'un hydroxyle soit assez bien tolérée, l'ajout d'un groupement CF₃ provoque de forts changements structuraux. L'augmentation du volume de van der Waals associé à l'électronégativité du fluor a des conséquences très importantes. Par exemple, Massa *et al.*³¹⁰ ont étudié l'influence d'un groupement TFE (tétrafluoroéthyle) sur des inhibiteurs de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP). Ils ont observé lors de la substitution d'un groupement TFE par un groupement éthyle une perte significative d'activité (8 fois moins actif). En effet, l'activité inhibitrice de **inh 1** est de 0,2 μM alors que celle de **inh 2** est de 1,6 μM (Figure **II-8**). L'encombrement stérique des deux substituants R est quasi identique. La différence d'activité est due à la conformation différente. En effet, le groupement éthoxyle est coplanaire avec le groupement aromatique alors que le groupement TFE est lui hors du plan et peut aller chercher d'autres interactions avec sa cible biologique.



inh 1 R : OCF₂CF₂H

inh 2 R : OCH₂CH₃

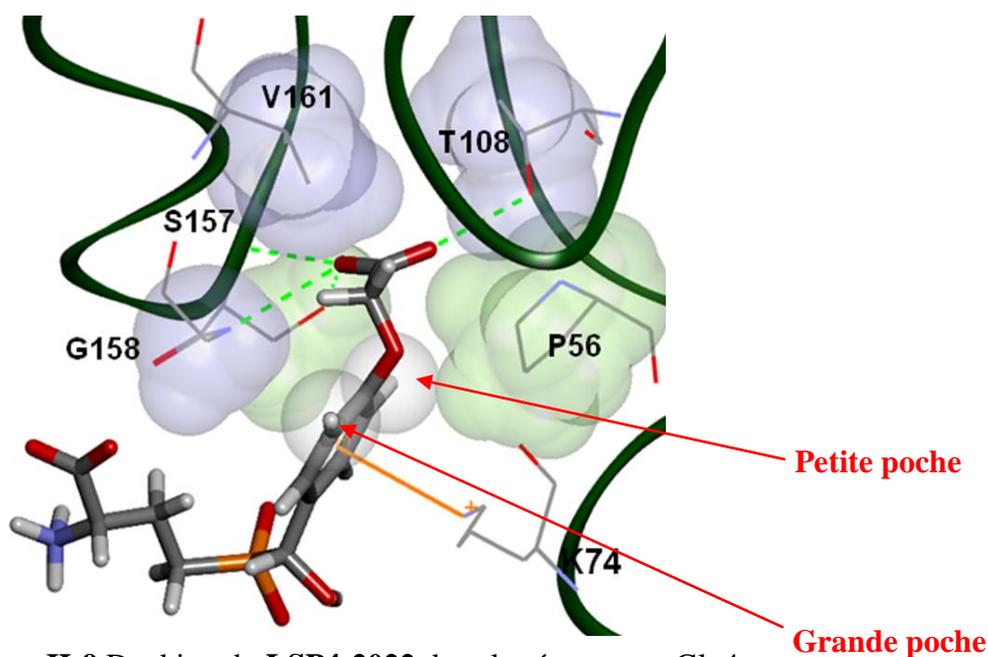
Figure **II-8** Structure des deux inhibiteurs de la CETP

Toutes ces études prouvent que le fluor est un élément essentiel en chimie médicinale et que ses différentes propriétés peuvent apporter des solutions afin d'améliorer l'équilibre activité-sélectivité-biodisponibilité d'un médicament. Nous avons alors décidé de synthétiser des analogues du **LSP4-2022** fluorés.

4.2. Synthèse des analogues fluorés du **LSP4-2022**

A partir du **LSP4-2022**, les modifications précédemment citées n'ont pas apporté d'améliorations que ce soit au niveau du potentiel agoniste ou bien de la sélectivité au sein du groupe III des récepteurs mGlu. Seul le composé comportant un groupement methoxy sur le cycle aromatique possède les mêmes résultats pharmacologiques que le composé référence avec une EC_{50} de 0,1 μ M sur le récepteur mGlu4. En revanche, d'après les résultats obtenus de la première optimisation, l'ajout de fonction polaire n'a pas amélioré les résultats. Nous avons choisi d'insérer de nouveaux substituents et plus particulièrement des substituants fluorés.

Un autre point important est pris en compte dans cette synthèse de nouveaux dérivés. Comme nous pouvons le voir sur le docking du **LSP4-2022** (Figure II-9) dans le sous-type 4, l'espace de van der Walls disponible sur les deux positions *meta* est totalement différent. En effet, une position est plus encombrée que l'autre et les futurs composés seront donc dissymétriques avec deux substituants de taille différente.



4.3. Synthèse du **LSP3-9166**

Le premier substituant choisi fut donc un groupement trifluorométhoxyle en position *meta*. Le choix s'est orienté vers ce groupement car de nombreuses études ont montré qu'il possédait des propriétés très intéressantes.³¹¹⁻³¹⁴ Tout d'abord, l'introduction de ce dernier va nous permettre d'obtenir une molécule plus stable métaboliquement et plus lipophile comme nous l'avons évoqué précédemment. Ce qui pourra faciliter le passage de la BHE même si nous pensons que nos composés atteignent le système nerveux central par transport actif. Ensuite, contrairement à un groupement CF₃ qui possède un fort effet attracteur d'électron modifiant significativement l'acidité des fonctions voisines, l'introduction d'un groupement OCF₃, causera moins de perturbations dû à l'atome d'oxygène qui stabilise l'effet attractif des atomes de fluor. Enfin, le groupement OCF₃ est intéressant au niveau structural. En effet, si on compare le méthoxybenzène et le trifluorométhoxybenzène sans substituant en position *ortho*, on peut remarquer que le groupement OMe se situe favorablement dans le plan du cycle aromatique alors que le groupement OCF₃ s'éloigne de ce plan.³¹⁵ Ce point peut-être très intéressant pour créer de nouvelles interactions ligand-récepteur avec des résidus situés en dehors du plan du noyau aromatique. Grâce à ces caractéristiques, le groupement trifluorométhoxyle est très utilisé dans le développement de médicaments ou de molécules agrochimiques. C'est pour cette raison que notre première idée s'est orientée vers ce groupement.

Ce composé fut synthétisé par Delphine Rigault. La voie de synthèse utilisée est identique à celle du **LSP4-2022** en partant du 4-hydroxy-3-(trifluorométhoxy)benzaldehyde **II-1**. Le phénol de ce dernier est tout d'abord alkylé par alkylation de Williamson pour introduire le carboxylate distal avec un rendement de 73%. En parallèle, le composé "**P-H_{int}**" est obtenu par addition radicalaire de l'H₃PO₂ sur la vinylglycine protégée avec un rendement de 95% sans purification. L'addition du composé "**P-H_{int}**" sur l'aldéhyde **II-2** en présence de BSA nous permet d'obtenir le composé **II-3**. Enfin, le composé final est obtenu après hydrolyse acide (HCl 6 M, 100 °C, 5 h) et purification sur résine échangeuse de cation (Schéma **II-5**).

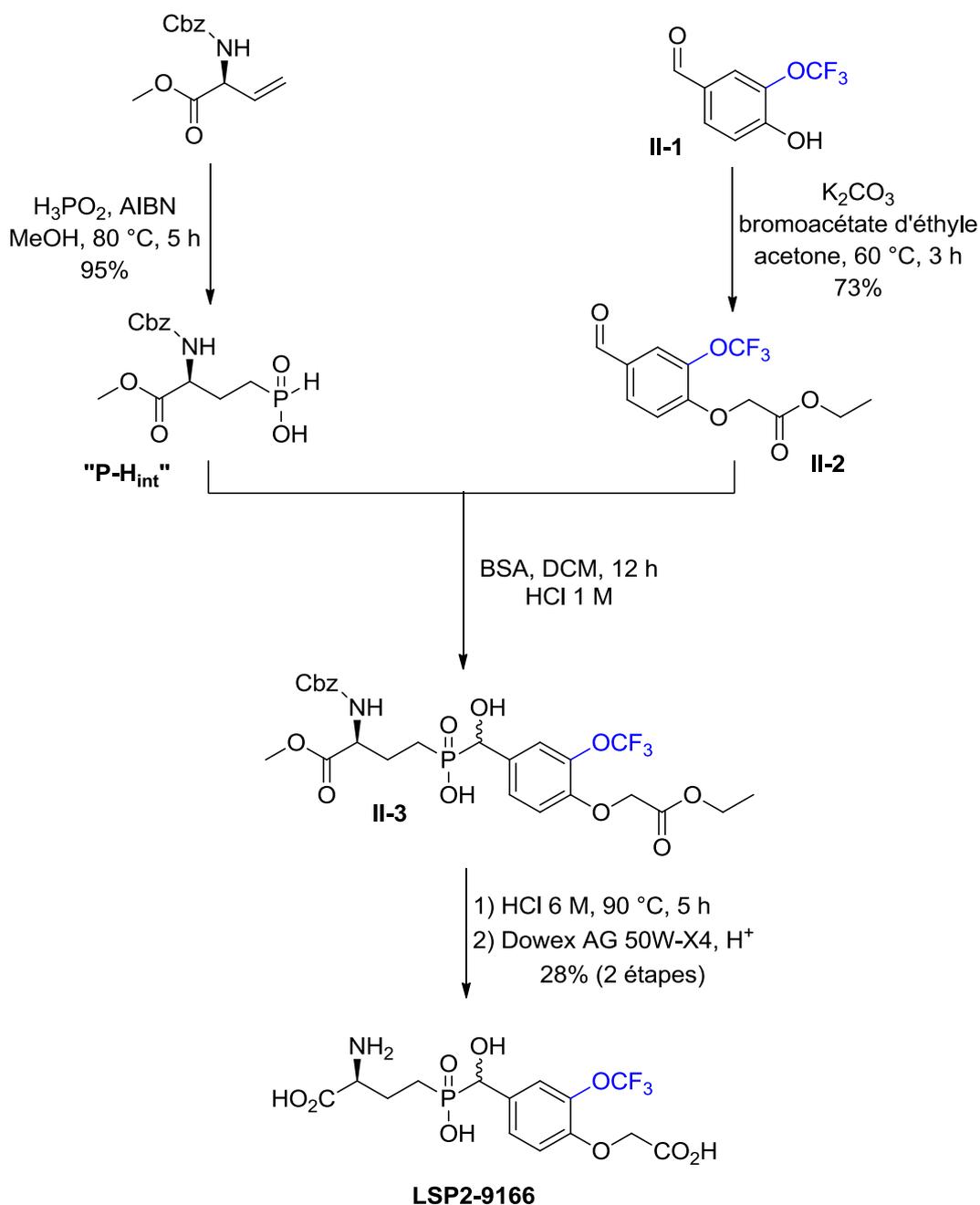


Schéma II-5 Synthèse du LSP2-9166

Le composé final a ensuite été envoyé à l'IGF (Montpellier) afin d'être testé *in vitro* sur les cellules HEK 293 sur la plateforme ARPEGE. Les résultats sont regroupés dans le tableau II-4.

Tableau **II-4** EC₅₀ du **LSP2-9166** sur les récepteurs mGlu du groupe III
Mesure de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293

Composé	mGlu4 EC ₅₀ μM (n)	mGlu6 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 6/4	mGlu7 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 7/4	mGlu8 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 8/4
LSP2-9166	0,06 ± 0,01 (5)	5,30 ± 1,43 (2)	88	1,58 ± 0,20 (5)	26	40,30 ± 11,40 (5)	671

Ce premier composé montre des résultats vraiment intéressants avec une EC₅₀ de 0,06 μM sur le récepteur mGlu4 et une très bonne sélectivité vis-à-vis du sous-type 8. Cependant, il a perdu en sélectivité vis-à-vis du sous-type 7. Ces deux récepteurs possèdent un fort pourcentage d'homologie de séquence primaire (> 70%). La séquence S157-G158 et la T108, résidus responsables de l'interaction ligand récepteur, sont aussi présents chez le sous-type 7. Ce résultat n'est donc pas étonnant. A partir de maintenant, il sera donc nécessaire de considérer la sélectivité vis à vis des récepteurs mGlu8 et mGlu7. De plus, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, les récepteurs mGlu4 et mGlu7 possèderaient des effets antagonistes dans le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson.¹¹³

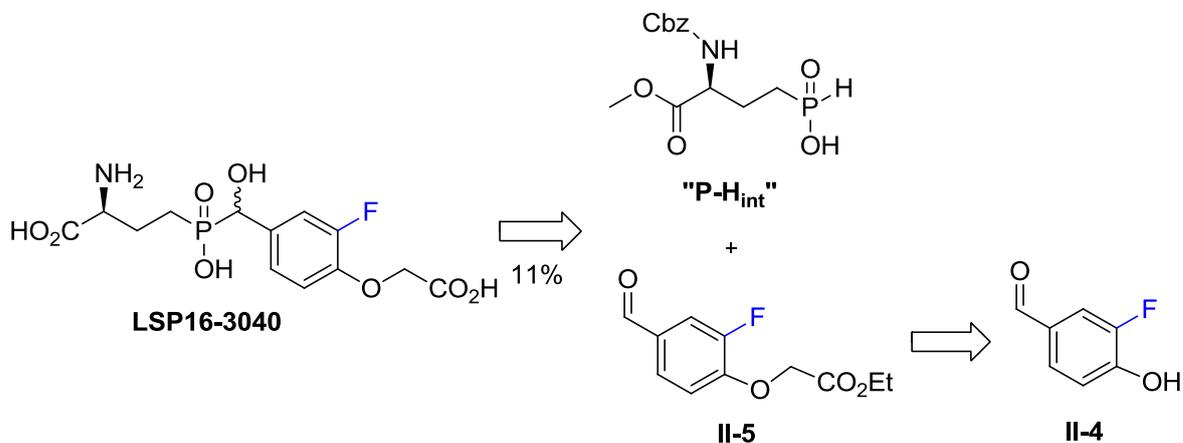
Étant donné la taille d'un groupement OCF₃, nous supposons qu'il se place dans la grande poche et que l'hydrogène sur l'autre position *meta* s'introduit dans la petite poche. Les composés comportant comme substituant un OMe (**LSP3-3159**) et un OEt (**LSP2-9159**) sont moins actifs alors que leur taille est proche du OCF₃, nous pouvons alors supposer que le groupement OCF₃ est le meilleur substituant pour bloquer cette grande poche. Le prochain objectif est donc d'optimiser la petite poche d'interaction.

4.4. Optimisation de la petite poche

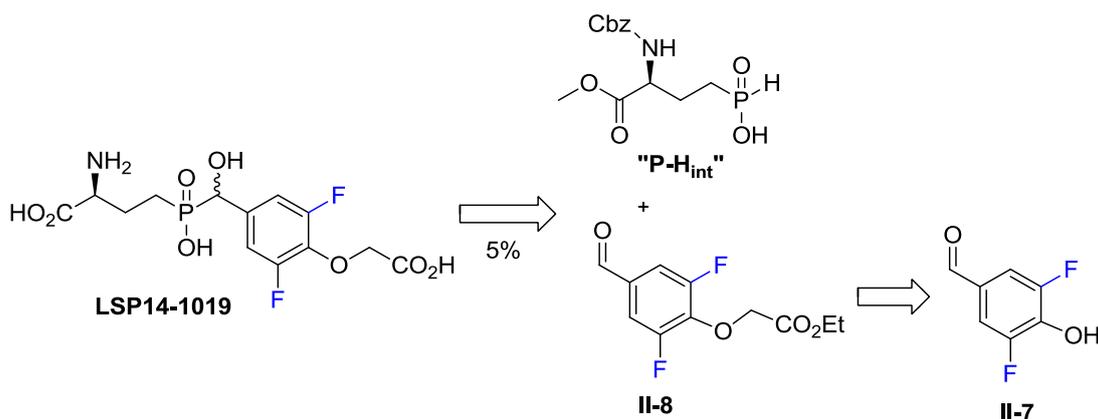
Synthèse du LSP16-3040 et du LSP14-1019

Nous avons choisi d'avoir d'une part sur une des positions méta du cycle aromatique un atome de fluor et d'autre part deux atomes de fluor sur les deux positions *meta*. Le rayon de van der Waals de cet atome se situe entre celui de l'hydrogène et d'un groupement hydroxyle, la taille devrait donc être propice pour rentrer dans la petite poche.

Le premier composé, comportant un atome de fluor (**LSP16-3040**), a été synthétisé par un stagiaire Romain Rodriguez, que j'ai encadré pendant 3 mois, selon la voie de synthèse générale utilisée à partir du 3-fluoro-4-hydroxybenzaldehyde **II-4** (Schéma **II-6**).

Schéma **II-6** Synthèse du RR-3040

Le composé final est obtenu après purification sur une résine échangeuse de cation avec un rendement global de 11%. Le second composé, comportant deux atomes de fluor (**LSP14-1019**) a été synthétisé en utilisant également la voie de synthèse générale à partir du 3,5-difluoro-4-hydroxybenzaldehyde **II-7** qui n'était pas commercial au moment de la synthèse (Schéma **II-7**). Le composé final est obtenu avec un global de 5% à partir de l'aldéhyde. Ce faible rendement est surtout dû aux deux purifications finales nécessaires sur résine échangeuse de cations puis sur résine échangeuse d'anions.

Schéma **II-7** Synthèse du **LSP14-1019**

La formylation peut également se faire en position *ortho* et en position *para* du phénol. Dans notre cas, les deux positions *ortho* du phénol étant bloquées par les atomes de fluor, la formylation ne peut se faire qu'en *para*. Cette réaction fonctionne très bien avec des cycles riches en électron. Depuis, cette réaction est beaucoup moins utilisée au profit de la réaction de Vilsmeier-Haack (Schéma II-10).³²⁰⁻³²²



Schéma II-10 Réaction de formylation de Vilsmeier-Haack

Tableau II-5 EC₅₀ de **LSP16-3040** et du **LSP14-1019** sur les récepteurs mGlu du groupe III
Mesure de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293

Composé	mGlu4 EC ₅₀ μM (n)	mGlu6 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 6/4	mGlu7 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 7/4	mGlu8 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 8/4
	0,31 ± 0,09 (3)	1,99 ± 0,73 (3)	6	4,35 ± 0,55 (3)	14	9,22 ± 2,21 (3)	30
	0,33 ± 0,14 (3)	2,52 ± 0,60 (3)	8	3,87 ± 0,45 (3)	12	27,53 ± 6,70 (3)	83

R = (CH₂)₂CH(NH₂)CO₂H

En ce qui concerne les activités pharmacologiques de ces deux composés, on retrouve des résultats assez similaires avec un EC₅₀ sur le récepteur mGlu4 de 0,30 μM et une sélectivité assez faible par rapport aux autres sous-types du groupe III. Ces résultats font partie des plus actifs bien que moins actifs que le **LSP4-2022** et le **LSP3-9166**. Deux raisons peuvent expliquer ces données.

Premièrement, nous avons dit précédemment que les deux poches autour des deux positions *meta* du cycle aromatique ne faisaient pas la même taille avec une plus grande que l'autre. Or, l'atome de fluor est assez petit pour s'introduire dans la petite poche mais il peut évidemment se

positionner dans la grande poche. Ce qui signifie que la molécule est capable de bouger et de se positionner dans différentes conformations avec forcément un impact négatif sur l'activité.

Deuxièmement, par rapport au **LSP4-2022** sans substituant aromatique en position *meta*, on peut se demander pourquoi l'activité est plus faible en ajoutant un ou deux atomes de fluor. L'effet électro attracteur du fluor ne doit pas être étranger à cela. Le docking du composé de référence montre une interaction importante de type cation- π entre le cycle aromatique et l'ammonium de la lysine 74 (Figure **II-10**). Cette liaison est d'autant plus forte que le cycle aromatique est riche en électron. Or, l'ajout de fluor va diminuer la densité électronique au niveau de noyau aromatique. La perte de cette interaction peut alors expliquer cette diminution du potentiel agoniste de ces deux composés.

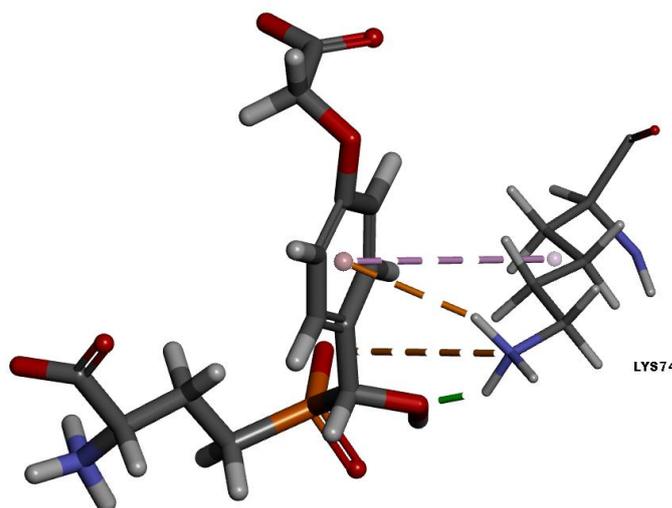


Figure **II-10** Interaction cation- π entre le phényle du **LSP4-2022** et la lysine 74

Synthèse du **LSP4-3024**

Pour vérifier cette seconde hypothèse, un autre analogue fluoré du **LSP4-2022** a été préparé ; le **LSP4-3024** qui contient un groupement CF_3 en position *meta* du cycle aromatique. Le cycle aromatique de ce composé sera encore plus dépourvu en électron et l'interaction de type cation- π devrait donc être encore plus faible. Le composé est obtenu (Schéma **II-11**) à partir du 4-hydroxy-3-(trifluorométhyl)benzaldehyde **II-9** avec un rendement de 2% (deux purifications furent nécessaires).

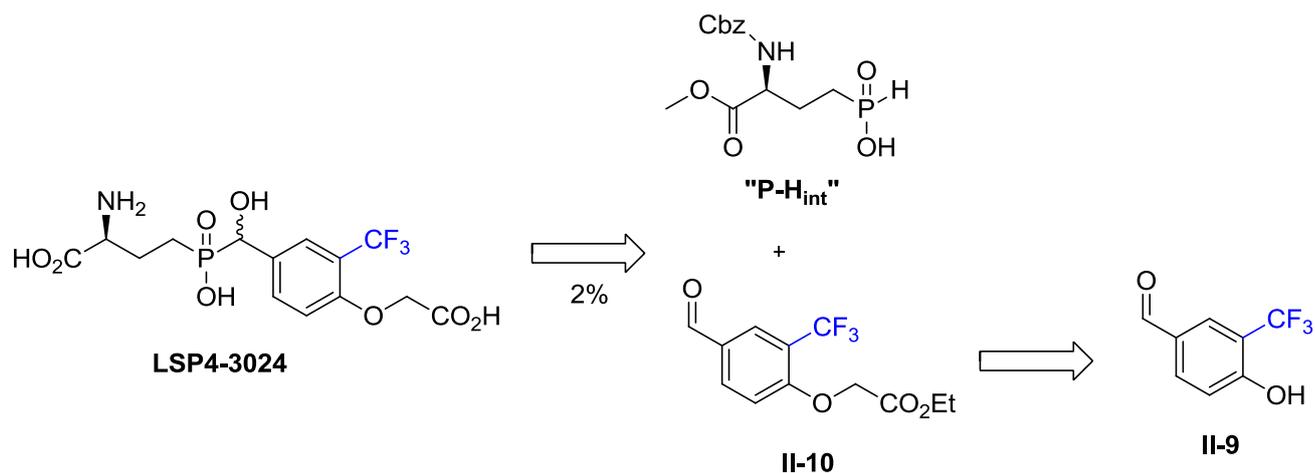


Schéma II-11 Synthèse du composé LSP4-1024

L'hypothèse émise est vérifiée car ce composé est encore moins actif sur le récepteur mGlu4 avec une EC_{50} de 0,90 μM et aucune sélectivité par rapport au sous-type 8 et une sélectivité partielle par rapport au sous-type 7 (Tableau II-6).

Tableau II-6 EC_{50} du LSP4-3024 sur les récepteurs mGlu du groupe III

Mesure de la libération de Ca^{2+} sur des cellules HEK 293

Composé	mGlu4 EC_{50} μM (n)	mGlu6 EC_{50} μM (n)	Ratio 6/4	mGlu7 EC_{50} μM (n)	Ratio 7/4	mGlu8 EC_{50} μM (n)	Ratio 8/4
	0,90 \pm 0,06 (5)	/	/	35,47 \pm 4,02 (3)	39	6,86 \pm 1,83 (3)	8

R = $(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$

Synthèse des dérivés du LSP3-3159

Les résultats obtenus avec l'ajout d'un ou de deux atomes de fluor montrent qu'il faut d'abord contrôler la grande poche puis ensuite moduler les substituants sur la seconde position *meta*. On est parti du LSP3-3159 où le groupement OMe occupe la grande poche. Quatre analogues de ce composé ont été synthétisés avec 4 substituants différents (Schéma II-12). La voie de synthèse est toujours la même ; seuls les réactifs commerciaux changent. Le composé avec deux groupements OMe a été préparé par Isabelle Lemasson et les autres par Delphine Rigault.

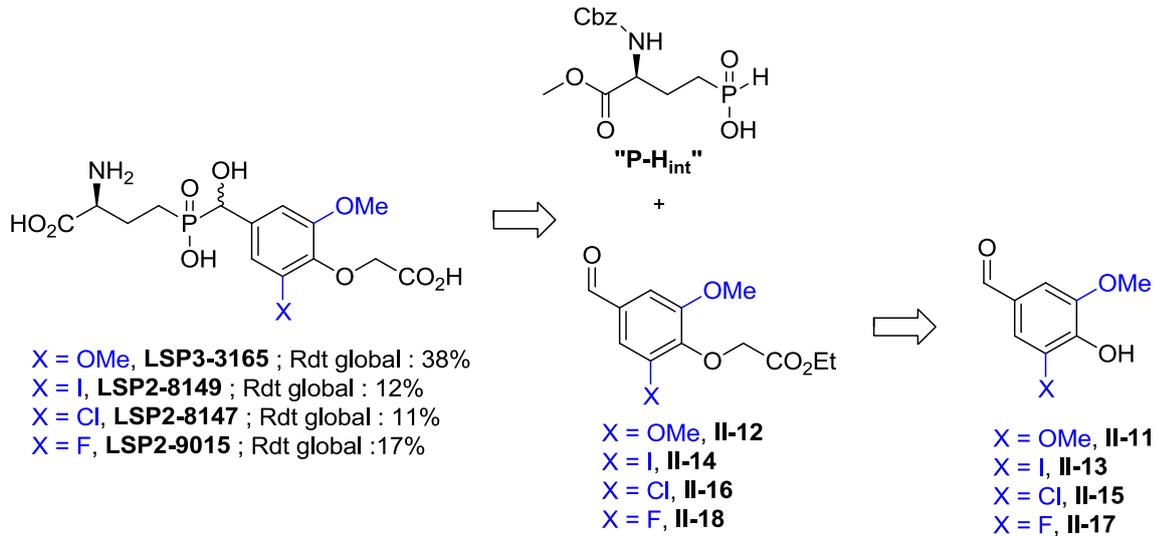


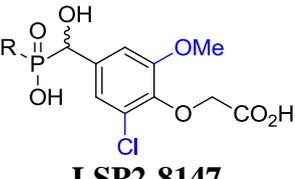
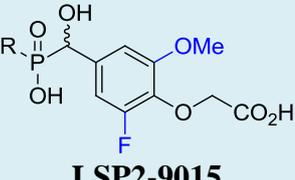
Schéma II-12 Synthèse des analogues du LSP3-3159

Les résultats pharmacologiques de ces 4 composés sont regroupés dans le Tableau II-7.

 Tableau II-7 EC₅₀ des quatre nouveaux analogues sur les récepteurs mGlu du groupe III

Mesure de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293

Composé	mGlu4 EC ₅₀ μM (n)	mGlu6 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 6/4	mGlu7 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 7/4	mGlu8 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 8/4
 LSP4-2022	0,11 ± 0,02 (30)	4,4 ± 0,6 (14)	40	11,60 ± 1,60 (19)	105	29,2 ± 4,2 (27)	265
 LSP3-3159	0,10 ± 0,02 (3)	/	/	11,50 ± 4,20 (3)	115	18,40 ± 2,44 (3)	184
 LSP3-3165	0,50 ± 0,12 (5)	9,0 ± 0,8 (3)	18	127 ± 24 (6)	254	27,20 ± 4,10 (5)	54
 LSP2-8149	0,15 ± 0,03 (6)	/	/	6,56 ± 1,55 (3)	44	28,27 ± 3,44 (6)	188

 <p>LSP2-8147</p>	0,13 ± 0,02 (6)	/	/	11,40 ± 1,30 (3)	88	44,0 ± 7,0 (6)	338
 <p>LSP2-9015</p>	0,08 ± 0,02 (3)	/	/	3,49 ± 0,13 (3)	44	10,29 ± 1,33 (3)	129



Nous pouvons remarquer que ces 4 composés possèdent des activités intéressantes sur le sous-type 4 avec des EC_{50} variant de 0,08 à 0,50 μM . Cela prouve que le substituant OMe le plus encombré est essentiel à l'activité de la molécule. Nous pouvons remarquer que l'introduction d'un second groupement OMe n'a pas permis d'augmenter l'activité sur le récepteur mGlu4. Ensuite, l'introduction d'un halogène a permis de retrouver une activité intéressante et notamment avec un atome de fluor. En effet, le composé **LSP2-9015**, comportant un groupement méthoxyle et un atome de fluor possède une EC_{50} de 0.08 μM sur notre cible. En suivant la logique établie au fil de ces synthèses et de ces résultats pharmacologiques, il serait très intéressant de synthétiser l'analogue du **LSP4-2022** possédant un groupement OCF_3 et un atome de fluor sur les deux positions *meta*.

4.5. Synthèse du **LSP14-1086**

Nous avons utilisé une nouvelle fois la voie de synthèse du **LSP4-2022**. Aucun souci synthétique n'a été rencontré lors de ces étapes. Cependant, il a fallu optimiser la synthèse du 3-fluoro-4-hydroxy-5-(trifluoromethoxy)benzaldehyde **II-21** qui n'est pas commercial.

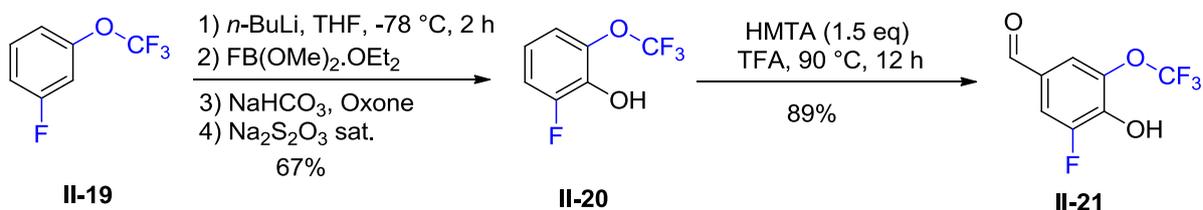


Schéma **II-13** Synthèse du 3-fluoro-4-hydroxy-5-(trifluoromethoxy)benzaldehyde **II-21**

Cet intermédiaire est obtenu en 2 étapes (Schéma **II-13**) à partir du 1-fluoro-3-(trifluoromethoxy)benzene **II-19** vendu chez TCI chemicals. La première étape consiste à

introduire la fonction hydroxyle entre les deux groupements fluorés afin d'obtenir le phénol **II-20**. Cette étape décrite par Castagnetti et Schlosser en 2001³²³ se déroule plus exactement en trois étapes : déprotonation, borylation et oxydation. La déprotonation s'effectue par du *n*-BuLi dans le THF à -78 °C pendant 2 heures. Le piégeage électrophile se fait avec du fluorodiméthoxyborane diéthyle éther préalablement synthétisé^{324,325} (réaction entre le triméthylborate [B(OMe)₃] et du BF₃.OEt₂ dans du diéthylether anhydre) pour obtenir l'acide boronique intermédiaire directement oxydé en phénol. Cette oxydation peut se faire soit en milieu acide ou en milieu basique. Schlosser a décrit cette étape par ajout sur l'acide boronique d'eau oxygénée et d'hydroxyde de sodium. L'utilisation de ces conditions rend difficile l'isolement du composé souhaité. Nous avons alors choisi d'utiliser un mélange constitué d'Oxone® et de NaHCO₃ (solution aqueuse saturée) pour oxyder l'intermédiaire boronique et nous avons pu isoler après distillation le phénol **II-20** avec un rendement de 67%. La seconde étape est tout simplement la réaction de Duff déjà utilisée pour la synthèse du **LSP14-1019**. L'aldéhyde **II-21**, intermédiaire clé de la voie de synthèse est ainsi isolé avec un bon rendement de 89%. Une fois l'aldéhyde **II-21** en main, le composé final a pu être obtenu avec un

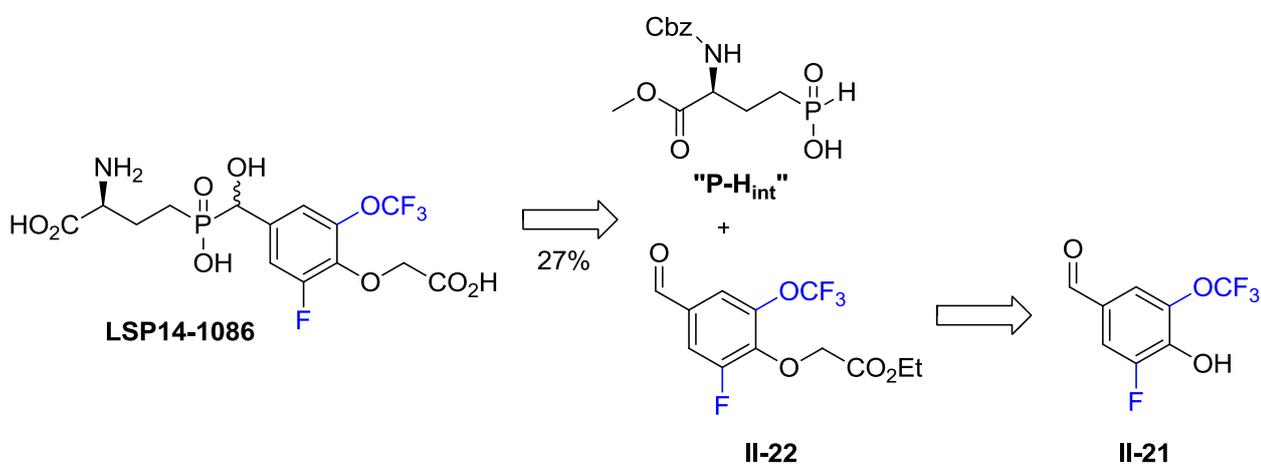


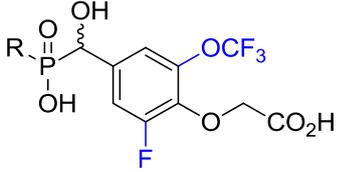
Schéma **II-14** Synthèse du **LSP14-1086**

Le composé final a alors été testé sur les cellules HEK 293 toujours dans les mêmes conditions. Les résultats, regroupés dans le tableau **II-8**, sont extrêmement bons avec une EC₅₀ de 0,037 μM sur le récepteur mGlu4 et une totale sélectivité vis-à-vis du récepteur mGlu8. C'est le premier composé aussi actif sur le récepteur mGlu4 qui est totalement sélectif vis-à-vis du sous-type 8.

Cependant, ce composé est aussi très puissant sur le sous-type 7. Il s'agit du premier agoniste sous-micromolaire sur le récepteur mGlu7.

Tableau II-8 EC₅₀ du **LSP14-1086** sur les récepteurs mGlu du groupe III

Mesure de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293

Composé	mGlu4 EC ₅₀ μM (n)	mGlu6 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 6/4	mGlu7 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 7/4	mGlu8 EC ₅₀ μM (n)	Ratio 8/4
	0,037 ± 0,008 (4)	1,69 ± 0,39 (3)	46	0,42 ± 0,10 (3)	11	67,07 ± 12,19 (3)	1813

R = (CH₂)₂CH(NH₂)CO₂H

4.6. Conclusions et perspectives

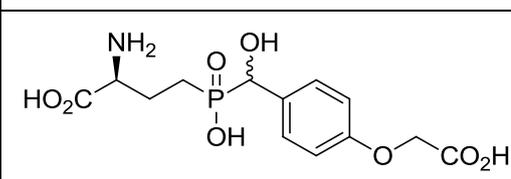
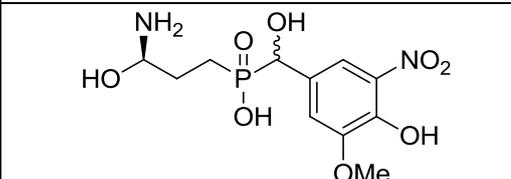
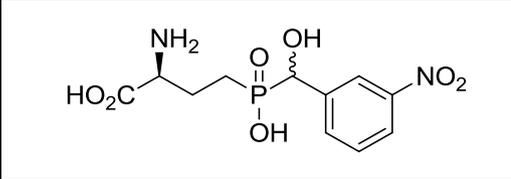
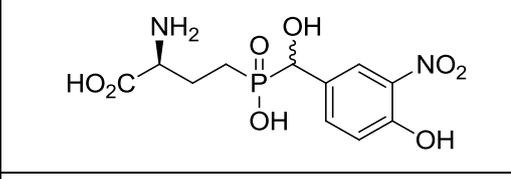
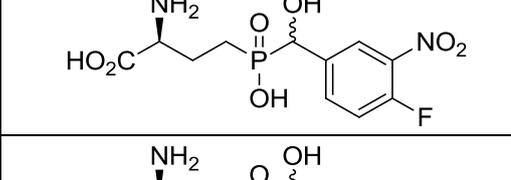
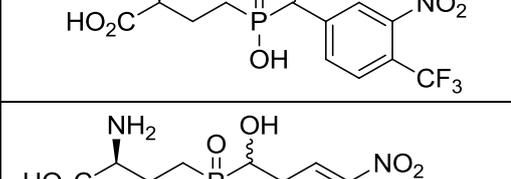
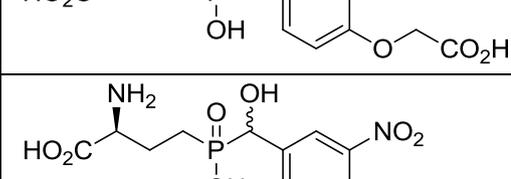
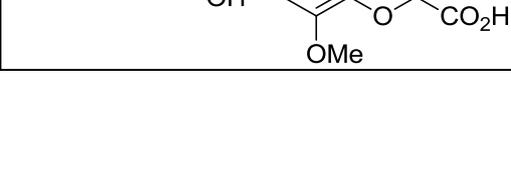
Nous avons développé la synthèse du **LSP14-1086** qui permet d'augmenter l'activité sur le récepteur mGlu4 tout en étant sélectif vis-à-vis du sous-type mGlu8 et ceci par rapport à la référence initiale, le **LSP4-2022**. Malheureusement, ce composé n'est pas sélectif vis-à-vis du récepteur mGlu7 avec une EC₅₀ sur ce récepteur de 0,37 μM. Cette nouvelle série chimique de composés nous ouvre alors de nouveaux objectifs et plus particulièrement la synthèse de ligands sélectifs du récepteur mGlu4 par rapport au sous-type 7 et à contrario d'autres ligands sélectifs du récepteur mGlu7 par rapport au sous-type 4. Tous ces dérivés du **LSP4-2022** ont été brevetés en 2012 et seront publiés un peu plus tard.³²⁶

II.5. Étude sur la sélectivité mGlu4 vs mGlu7

Pour cette étude deux stratégies ont été suivies. Premièrement, d'après les résultats pharmacologiques antérieurs, nous avons essayé de synthétiser des composés comportant un groupement nitro et un substituant fluoré en position *meta*. Deuxièmement, nous essayerons de remplacer le noyau aromatique par différents hétérocycles.

5.1. Importance du groupement nitro

Tableau II-9 Activités pharmacologiques sur les récepteurs mGlu4 et mGlu7 des dérivés porteurs d'un groupement nitro

Composé	Structure	EC ₅₀ (μM) mGlu4 (n)	EC ₅₀ (μM) mGlu7 (n)	Ratio 7/4
LSP4-2022		0,10 ± 0,02 (22)	11,6 ± 1,6 (19)	105
LSP1-2111		2,19 ± 0,27 (26)	52,87 ± 20,66 (3)	24
LSP1-2093		0,54 ± 0,05 (3)	> 1000	> 1000
LSP1-2109		1,54 ± 0,42 (8)	125 ± 55 (4)	81
LSP1-2080		0,44 ± 0,05 (4)	> 100 (3)	> 227
LSP1-2012		0,44 ± 0,06 (3)	> 100 (3)	> 227
SB-1087		0,26 ± 0,07 (3)	11,21 ± 3,90 (3)	43
SC-1140		0,28 ± 0,06 (3)	> 100	> 357

La majorité des analogues du glutamate possédant un groupement nitro montre des rapports d'activité sur mGlu7/mGlu4 élevés, signe d'une bonne sélectivité entre les deux récepteurs (Tableau II-9). En effet ces rapports vont de 24 pour le **LSP1-2111** jusqu'à des valeurs supérieures à 1000 pour le **LSP1-2093**. Nous pouvons remarquer que les deux premiers composés associant fluor et nitro qui ont été synthétisés par Chiellah Selvam, le **LSP1-2080** et le **LSP1-2012**, montrent une très bonne sélectivité pour le récepteur mGlu4 par rapport au récepteur mGlu7.

Or, nous avons montré précédemment que l'ajout de fluor apportait un réel bénéfice en termes d'activité sur le récepteur mGlu4. Pourquoi ne pas mélanger ces deux critères afin d'obtenir des composés plus affins sur le sous-type 4 et pas sur le 7. L'acide carboxylique distal étant très important pour l'activité sur le récepteur mGlu4, nous avons décidé de synthétiser l'analogue de **LSP4-2022** avec un atome de fluor et un groupement nitro sur les deux positions *meta*. Ce composé, nommé **LSP14-3048**, a été obtenu avec un rendement global de 11% à partir du 3-fluoro-4-hydroxy-5-nitrobenzaldehyde **II-23** (Schéma II-15).

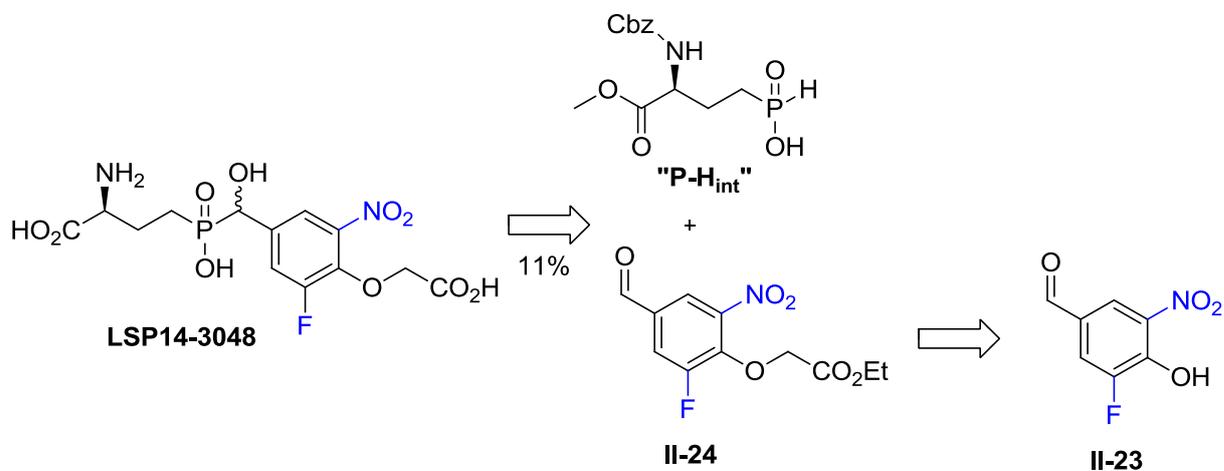


Schéma II-15 Synthèse du LSP14-3048

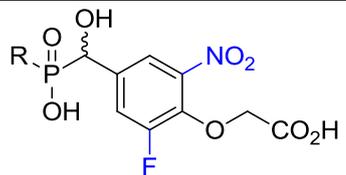
Deux remarques peuvent être faites sur cette synthèse. Premièrement, lorsque j'ai commencé la synthèse de ce composé l'aldéhyde **II-23** n'était pas commercial. Pour l'obtenir, j'ai voulu appliquer la réaction de Duff sur le 2-fluoro-6-nitrophenol dans les mêmes conditions que précédemment avec l'analogue difluoré (**LSP14-1019**). En présence d'un équivalent d'HMTA, la conversion fut très faible. Après plusieurs essais, il a fallu monter jusqu'à 60 équivalents d'HMTA et un temps de réaction de 96 heures à 85 °C pour observer une conversion de 98%. Après purification, nous avons réussi à isoler le composé désiré. Nous pouvons expliquer cette

faible réactivité par la présence des groupements attracteurs (nitro et fluor) qui appauvrissent en électron le cycle aromatique.

Deuxièmement, l'alkylation du phénol ne s'est pas réalisée en utilisant les conditions de Williamson (base, bromoacétate d'éthyle, acétone, 60 °C). En effet, une très faible conversion est observée malgré des essais d'optimisation des conditions. Le remplacement de K_2CO_3 par Cs_2CO_3 ou NaOH, l'utilisation de la DMF à la place de l'acétone afin de pouvoir chauffer plus fort ou encore l'introduction de NaI ou d'éther couronne pour aider la réaction n'ont pas donné une meilleure conversion. Nous avons alors utilisé les conditions de Mitsunobu³²⁷ (PPh_3 , DEAD) qui ont fonctionné. L'effet attracteur des deux substituants, nitro et fluor, apporte une acidité élevée du phénol, ce qui favorise incontestablement la réaction de Mitsunobu.

Le composé a été testé *in vitro* sur des cellules HEK 293 (mesure de la libération de calcium, Tableau II-10).

Tableau II-10 EC_{50} du **LSP14-3048** sur les récepteurs mGlu du groupe III
Mesure de la libération de Ca^{2+} sur des cellules HEK 293

Composé	mGlu4 EC_{50} μ M (n)	mGlu6 EC_{50} μ M (n)	Ratio 6/4	mGlu7 EC_{50} μ M (n)	Ratio 7/4	mGlu8 EC_{50} μ M (n)	Ratio 8/4
	$0,20 \pm 0,02$ (3)	$2,91 \pm 0,24$ (2)	15	$7,59 \pm 0,06$ (2)	38	$0,21 \pm 0,10$ (2)	1

R = $(CH_2)_2CH(NH_2)CO_2H$

On peut remarquer que l'activité sur le récepteur mGlu4 est bonne avec une EC_{50} de $0,20 \pm 0,02$ μ M. En revanche, la sélectivité mGlu4/mGlu7 n'est pas aussi bonne que l'on espérait avec une EC_{50} de $7,59 \pm 0,06$ μ M sur le sous-type 7 soit un ratio mGlu4/mGlu7 de 38. Ces résultats auraient pu être très encourageants et nous ont poussé à synthétiser d'autres composés fluoronitrés si la sélectivité avait été bonne par rapport au récepteur mGlu8 ; malheureusement ce n'est pas le cas. Effectivement, on observe une même activité sur les deux sous-types 4 et 8. On peut donc conclure que le mélange des deux types de substituant, nitro et fluor, n'a pas abouti aux suppositions faites préalablement en fonction des premiers résultats. Une autre stratégie a donc été développée afin de conserver cette très forte activité du **LSP14-1086** sur le sous-type 4 tout en augmentant la sélectivité par rapport au récepteur mGlu7.

5.2. Substitution du cycle aromatique par des hétérocycles

La deuxième stratégie consiste à moduler le cycle aromatique du **LSP4-2022** afin d'y insérer des hétéroatomes. Chelliah Selvam a déjà synthétisé des composés hétérocycles non substitués par la chaîne carboxyméthylphénoxy.²⁷¹ Ici, nous souhaitons conserver cette chaîne tout en modifiant la structure aromatique. Ce projet a été mené avec un stagiaire de Master 2 Rémy Jouclas que j'ai encadré pendant six mois.

5.2.1. Synthèse de composés triazoles

Le premier motif choisi fut un triazole. Initialement, nous n'avions pas d'avis précis sur les activités biologiques que posséderaient ces composés mais ce changement structural implique des variations sur la taille du cycle aromatique et par conséquent probablement sur les interactions avec la cible biologique.

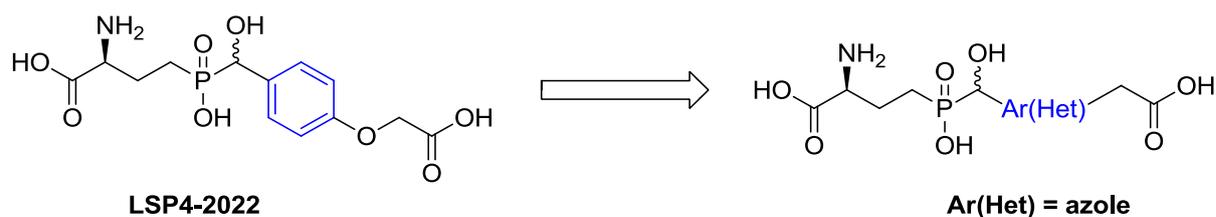


Schéma **II-16** Substitution du phényle par un triazole

Ces triazoles seront obtenus par cycloaddition [3+2] de Huisgen qui est l'exemple le plus connu de la chimie click.

Ce concept fut inventé et décrit pour la première fois par Sharpless en 2001.³²⁸ Associées à ce concept, les réactions-click doivent être modulables et applicables à des substrats très différents, être stéréospécifiques (pas forcément énantiospécifiques), donner de bons rendements et ne générer, en plus du bon composé désiré que des sous-produits non toxiques et éliminables par des techniques non chromatographiques. Ce qui engendre forcément des conditions de réactions très faciles à mettre en œuvre (solvant ou non, température ambiante, pression atmosphérique, produit facilement isolable par cristallisation ou distillation). Cette technique s'est très vite développée au début du 21^{ème} siècle et est très utilisée en chimie médicinale.^{329,330}

La réaction classique thermique de Huisgen³³¹ donne accès facilement à deux régioisomères : le 1,4-disubstitué-1,2,3-triazole **II-25** et le 1,5-disubstitué-1,2,3-triazole **II-26**. Ces conditions

furent très vite optimisées avec l'utilisation de sels de cuivre (I).³³²⁻³³⁶ Ces mesures ont permis de mener cette réaction à température ambiante, dans de nombreux solvants et surtout d'obtenir un seul régioisomère, le 1,4-disubstitué-1,2,3-triazole **II-25** (Schéma **II-17**).

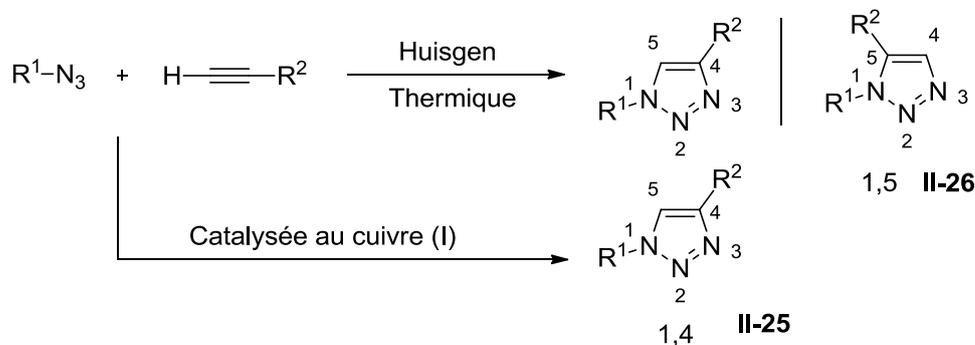


Schéma **II-17** Cycloaddition [3+2] de Huisgen et sa version catalysée au cuivre (I)

La procédure usuelle de cette cycloaddition implique l'utilisation du sel de cuivre (I) et d'une base organique ou non que l'on ajoute au mélange composé d'un azoture et d'un alcyne dans un solvant aqueux ou non.³³⁷ Des systèmes utilisant des sels de cuivre (II) réduits *in situ* ont aussi été développés.^{338,339}

Depuis, certains groupes de recherche ont continué à optimiser cette réaction en utilisant des catalyseurs de cuivre supportés sur des minéraux, des polymères ou des résines.³⁴⁰⁻³⁴⁷ Nous nous sommes basés sur les travaux de Girard³⁴⁸ qui a développé un catalyseur de cuivre sur une résine Amberlyst A-21.

Synthèse du catalyseur

L'Amberlyst A-21 est tout d'abord lavée par agitation 30 minutes dans du méthanol puis filtrée. Cette étape est répétée 3 fois dans le MeOH et également dans le DCM. Enfin la résine est stockée 24 heures sous vide en présence de pentoxyde de phosphore P_4O_{10} afin de s'assurer d'éliminer les dernières traces d'eau potentiellement présentes. La résine (5 g, 24 mmol d'amine) est ensuite agitée pendant 24 heures à température ambiante dans l'acétonitrile (75 mL) en présence d'iodure de cuivre CuI (1,905 g, 10 mmol). Le catalyseur est ensuite obtenu après une simple filtration et conservé sous argon (Schéma **II-18**).

Une analyse élémentaire aurait été nécessaire pour connaître la proportion de CuI dans le catalyseur. Dans notre cas, ce point n'est pas très important car nous n'avons pas cherché à

optimiser les conditions réactionnelles. Nous nous sommes basés sur les données bibliographiques³⁴⁹ qui indiquent une proportion de 1,35 mmol CuI.g⁻¹.

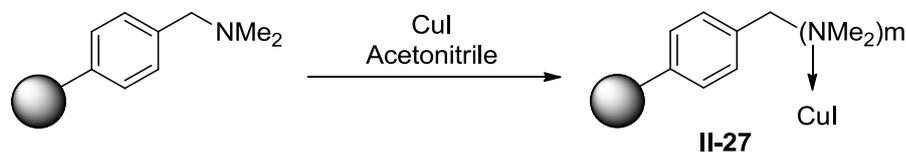


Schéma II-18 Synthèse du catalyseur supporté II-27 utilisé pour la réaction de Huisgen

Synthèse des aldéhydes intermédiaires - Réaction de Huisgen

Une fois le catalyseur en main, nous nous sommes focalisés sur la synthèse du motif triazole en utilisant la cycloaddition [3+2] de Huisgen. Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'objectif est de substituer le cycle aromatique par un triazole tout en conservant la chaîne carboxyméthylphénoxy. Comme pour le LSP4-2022, l'étape clé sera d'ajouter le "P-H_{int}" sur une fonction aldéhyde positionnée sur un triazole (Schéma II-19).

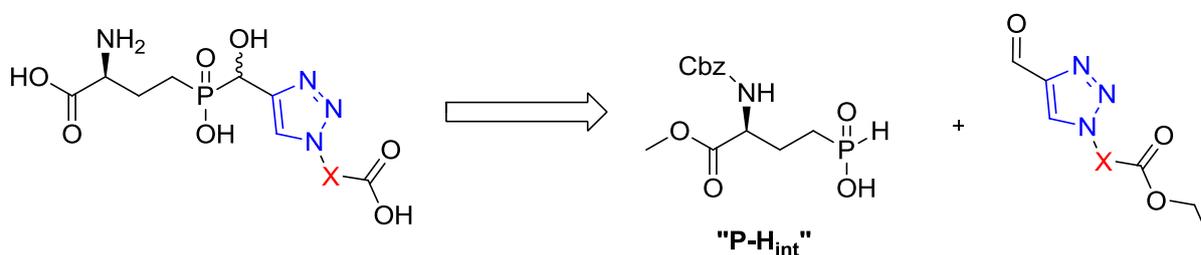


Schéma II-19 Rétrosynthèse des dérivés triazoles

Le composé "P-H_{int}" utilisé dans toutes les synthèses est toujours obtenu par réaction radicalaire. Nous avons alors développés la synthèse aldéhydes en faisant varier le linker X entre l'hétérocycle et l'acide carboxylique distal. Les linkers choisis, en fonction des réactifs commerciaux disponibles, permettent de vérifier l'influence de la longueur de chaîne entre le motif triazole et le carboxylate. Les aldéhydes ont été obtenus en suivant la voie de synthèse suivante (Schéma II-20).

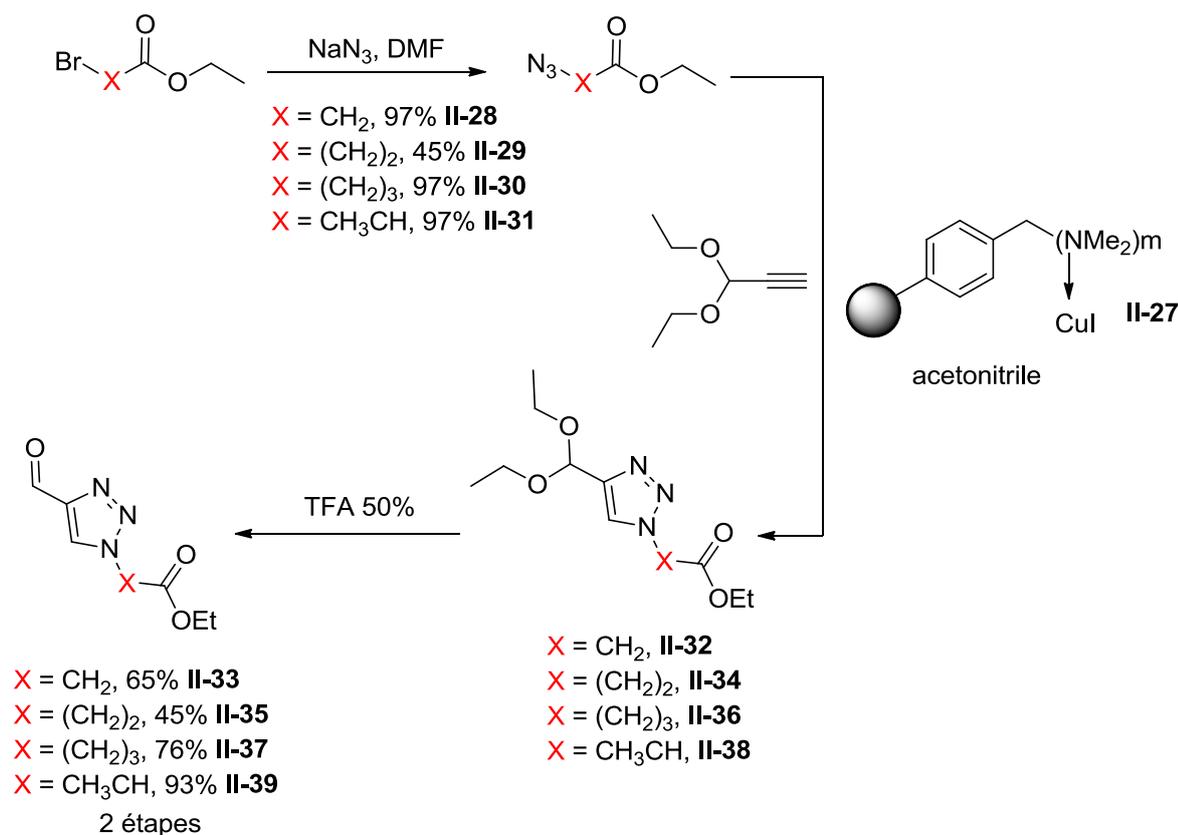


Schéma II-20 Synthèses des aldéhydes par chimie click

Les azotures **II-28** à **II-31** sont obtenus par simple substitution nucléophile des dérivés bromés commerciaux par l'azoture de sodium. Aucune purification n'est nécessaire et les rendements sont très bons mis à part pour le composé **II-29**. Cela est probablement dû à l'élimination favorable du brome menant à l'acrylate correspondant qui est très stable. La seconde étape est donc la cycloaddition de Huisgen entre les azotures obtenus et le 3,3-diéthoxyprop-1-yne, en présence du catalyseur de CuI supporté **II-27**, pour obtenir les dérivés intermédiaires protégés. Il est important de signaler que le catalyseur est facilement éliminé par simple filtration mais surtout qu'il est recyclable en le lavant avec du DCM. Le même catalyseur a été utilisé pour les 4 composés synthétisés. L'acétal éthylique est ensuite hydrolysé en milieu acide en utilisant une solution aqueuse de TFA à 50% pour obtenir les composés finaux **II-36** à **II-39** avec des rendements sur deux étapes encourageants. Les aldéhydes obtenus étant purs, aucune purification ne fut nécessaire mis à part pour le composé **II-37** où une chromatographie sur gel de silice a permis d'éliminer les impuretés présentes.

Synthèse des composés finaux

Maintenant que nous possédons ces aldéhydes triazoles et le composé “P-H_{int}”, le couplage entre ces parties a pu être effectué (Schéma II-21).

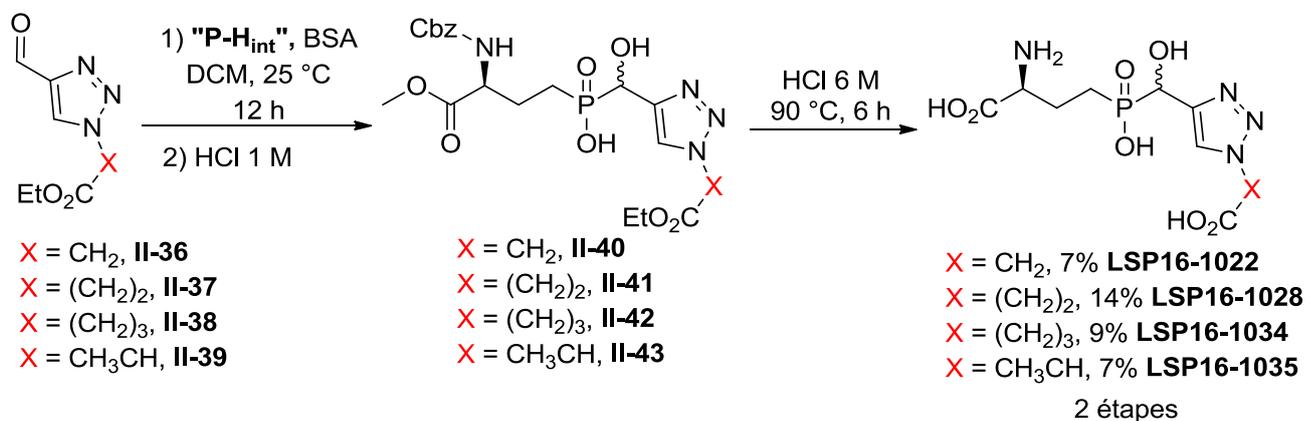


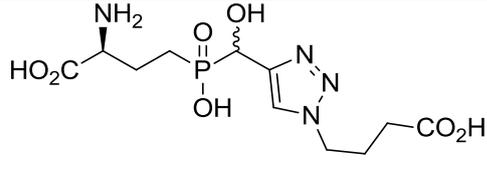
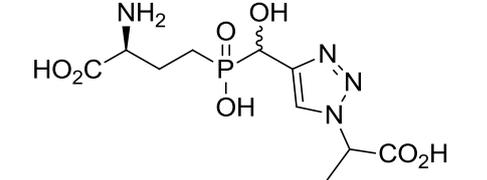
Schéma II-21 Synthèse des analogues triazoles du LSP4-2022

Les conditions de couplage sont identiques aux voies de synthèses des analogues précédents avec l'utilisation de la BSA pour synthétiser le composé intermédiaire P^{III} silylé. La dernière étape de déprotection se fait toujours en milieu acide (HCl 6 M) pour obtenir les composés finaux. Ces composés ont alors été testés *in vitro* sur des cellules HEK 293 (mesure de la libération de calcium, Tableau II-11).

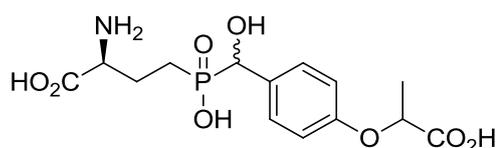
Tableau II-11 Activités pharmacologiques sur les récepteurs mGlu4 et mGlu7 des dérivés triazole

Mesure de la libération de Ca²⁺ sur des cellules HEK 293

Composé	Structure	EC ₅₀ (μM) mGlu4 (n)	EC ₅₀ (μM) mGlu7 (n)	Ratio 7/4
LSP16-1022		15,6 ± 2,80 (2)	> 100 (2)	> 6
LSP16-1028		1,12 ± 0,25 (2)	17,70 ± 7,20 (2)	16

LSP16-1034		$9,89 \pm 2,52$ (2)	> 100	> 10
LSP16-1035		$38,3 \pm 3,35$ (2)	> 100	> 3

Nous pouvons conclure de ces résultats que ces composés ne sont pas très actifs que ce soit sur le récepteur mGlu4 ou sur le récepteur mGlu7 avec des EC_{50} micromolaires. On remarque que le composé le plus puissant des quatre est le **LSP16-1028** ($EC_{50} = 1,12 \pm 0,25 \mu\text{M}$) comportant deux CH_2 entre le triazole et l'acide carboxylique distal. Si on compare au **LSP4-2022**, on retrouve la même longueur de chaîne avec l'oxygène du phénol remplacé par un CH_2 . Les composés **LSP16-1022** et **LSP16-1034** semblent avoir une chaîne soit trop courte pour le premier ou trop longue pour le second. En ce qui concerne le quatrième ligand, le **LSP16-1035**, on trouve des valeurs d'activité vraiment très faibles. La ramification entre le triazole et l'acide semble donc défavorable à l'activité. On retrouve des résultats similaires avec le composé **LSP2-10061** qui est l'analogue du **LSP4-2022** avec un groupement méthyle supplémentaire sur le même CH_2 (Figure II-11). Ce composé est 10 fois moins actif que le **LSP4-2022** sur le récepteur mGlu4 avec une EC_{50} de $0,95 \pm 0,16 \mu\text{M}$.

Figure II-11 Structure de **LSP2-10061**

De plus, l'ajout d'un nouveau centre stéréogène engendre un mélange d'isomère encore plus complexe (4 isomères).

5.2.2. Sélectivité pour le récepteur mGlu7 - Synthèse d'imidazoles

Suite aux résultats obtenus avec les triazoles, nous avons opté pour un autre motif : l'imidazole. Pourquoi avons-nous choisi ce motif ? Notre idée était d'étudier l'interaction cation- π entre le cycle aromatique du **LSP4-2022** et l'ammonium de la lysine 74 chez le récepteur mGlu4 (Figure II-12).

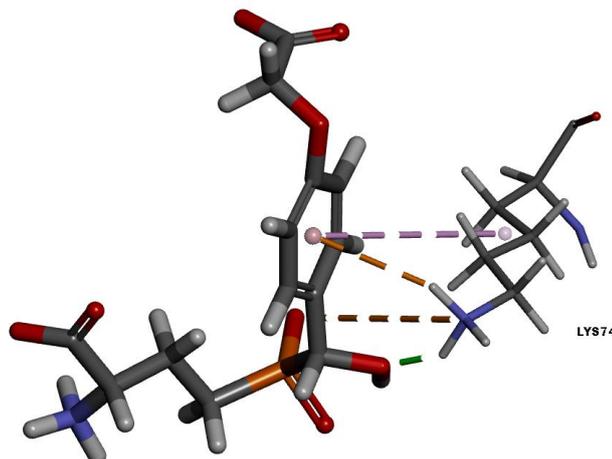
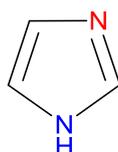


Figure II-12 Interaction cation- π du phényle du **LSP4-2022** avec la lysine 74

Nous avons déjà prouvé que cette interaction était importante pour l'activité de nos composés. Effectivement, lorsqu'on appauvrit en électrons le cycle aromatique, en ajoutant des groupements électroattracteurs, on observe une baisse d'activité de nos composés. Nous supposons que cela est dû à un affaiblissement de l'interaction cation- π ; la densité électronique du noyau aromatique étant plus faible. L'imidazole peut donc avoir une forte influence sur cette interaction, c'est donc pour cela que ce motif a été choisi. Effectivement, comme on peut le voir sur la figure II-13, le pKa du NH de l'imidazole est de 14,4 mais ce qui est le plus intéressant c'est le pKa de l'acide conjugué de l'azote N. Ce dernier est de 6,9, ce qui signifie qu'à pH physiologique, cet azote est à 50% protoné. Avec une charge positive sur le cycle aromatique, l'interaction cation- π sera défavorable en raison d'une répulsion entre la charge positive du cycle et celle de l'ammonium de la lysine 74.



pKa NH^+ (acide conjugué) : 6,9

pKa NH : 14,4

Figure II-13 pKa des deux azotes de l'imidazole (Baran et Richter)

Or, chez le sous-type 7, cette lysine 74 est remplacée par une asparagine (Figure **II-14**).

Figure **II-14** A gauche : fraction de l'alignement de séquence primaire des différents récepteurs mGlu ; A droite : substitution de la lysine 74 (mGlu4) par une arginine 74 (mGlu7)

On a donc synthétisé un analogue comportant un imidazole en utilisant la voie de synthèse générale, c'est-à-dire l'addition du composé intermédiaire "**P-H_{int}**" avec une fonction aldéhyde située cette fois sur un imidazole. Cet aldéhyde est obtenu par substitution nucléophile du bromoacétate d'éthyle par l'azote **NH** de l'imidazole déprotonné en présence de NaH (30 min dans le THF à 0 °C). Ensuite, les étapes sont similaires avec les autres synthèses : addition du composé "**P-H_{int}**" avec l'aldéhyde, déprotection en milieu acide (HCl 6 M, 90 °C, 5 heures) puis purification sur résine échangeuse d'ions (Schéma **II-22**).

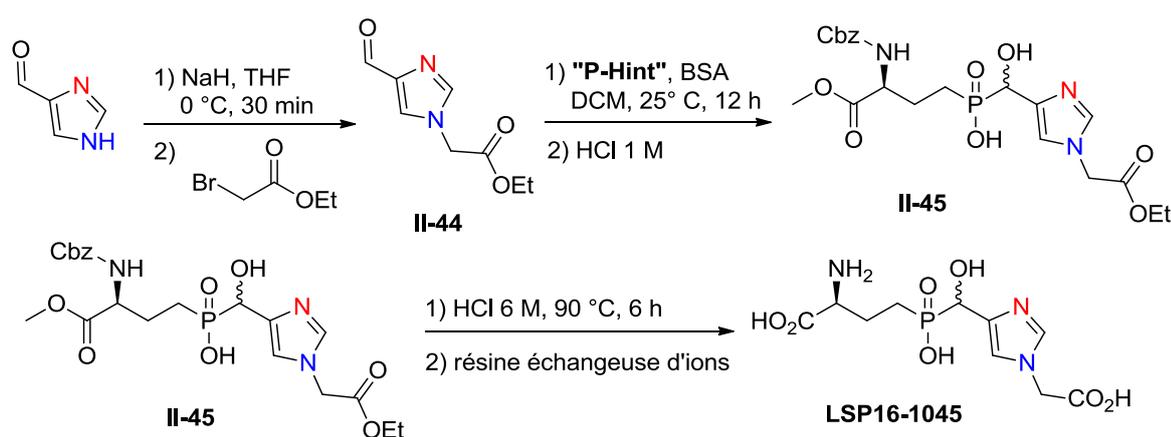


Schéma **II-22** Synthèse du composé **LSP16-1045**

Le composé final collecté a été envoyé en test à Montpellier. Nous sommes en attente des résultats *in vitro* de ce nouvel analogue.

5.2.3. Sélectivité pour le récepteur mGlu4 – Synthèse de pyridines

Si on fait le raisonnement inverse par rapport à cette interaction cation- π , l'enrichissement électronique du cycle aromatique pourrait renforcer la force de cette interaction et augmenter la spécificité sur le récepteur mGlu4 vis-à-vis de mGlu7 étant donné que la lysine 74 n'est pas présente chez ce dernier. Dans le but d'enrichir le cycle en électron, nous avons pensé substituer le phényle par une pyridine (Schéma II-23). Cette partie est une perspective de ce projet car aucun composé n'a encore été synthétisé.

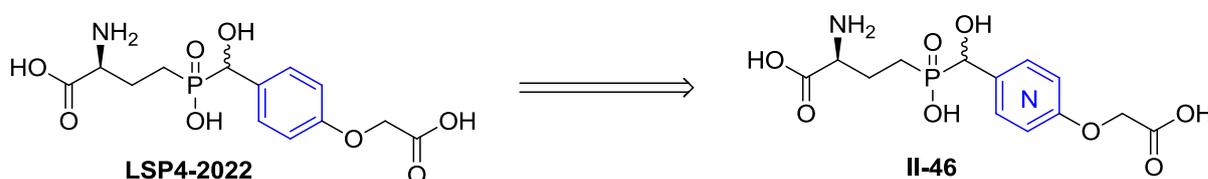


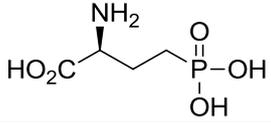
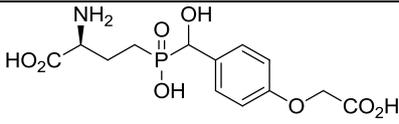
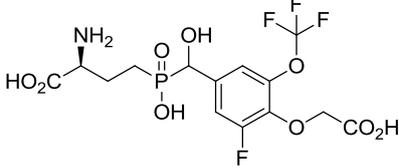
Schéma II-23 Substitution du groupement phényle par une pyridine

5.2.4. Vérification de ces hypothèses par mutagenèse

Afin de vérifier l'importance de cette interaction cation- π entre la lysine 74 du récepteur mGlu4 et le cycle aromatique des ligands, des expériences de mutagenèse ont été effectuées à l'IGF (Montpellier). Les résultats sont regroupés dans le tableau II-12. Les deux premières expériences ont été de muter chez le récepteur mGlu4, la lysine 74 en alanine et en asparagine (présente chez le sous-type 7). Pour le L-AP4, on observe une légère diminution de l'activité mais qui reste du même ordre de grandeur. Cela peut-être expliqué par le docking du L-AP4 dans le récepteur mGlu4 qui présente une liaison hydrogène entre la fonction phosphonique et cette lysine 74. Mais, comme cette fonction acide est reliée à des résidus basiques, la suppression d'une d'entre elles est compensée par les autres. De plus, grâce à des expériences de mutagenèse dirigée, l'équipe de Hampson³⁵⁰ a pu montrer que la forte activité du L-AP4 avec le récepteur mGlu4 (et mGlu8) était due à la liaison entre la fonction phosphonique et la lysine 74.

L'activité de ce ligand sur le sous-type 7 peut-être expliqué par l'intermédiaire d'une molécule d'eau capable de relier un oxygène de l'acide phosphonique à l'azote de l'asparagine 74 (d'après les modèles par homologie la distance entre les deux hétéroatomes est de 4,3Å, suffisante pour permettre à une molécule d'eau de s'insérer).³⁵⁰

Tableau II-12 Vérification de l'interaction cation- π par mutagenèse

	Structure	EC ₅₀ μ M mGlu4	EC ₅₀ μ M mGlu4 K74A	EC ₅₀ μ M mGlu4 K74N	EC ₅₀ μ M mGlu7	EC ₅₀ μ M mGlu7 N73A	EC ₅₀ μ M mGlu7 N73K
L-AP4		0,076 \pm 0,02 n=4	0,23 \pm 0,07 n=3	0,19 \pm 0,06 n=3	>100 n=3	10,5 \pm 1,9 n=3	43 \pm 18 n=3
LSP4-2022		0,082 \pm 0,017 n=26	0,024 \pm 0,009 n=3	0,013 \pm 0,004 n=4	5,2 \pm 2,1 n=3	14,1 \pm 2 n=4	0,59 \pm 0,18 n=3
LSP14-1086		0,037 \pm 0,008 n=4	0,0054 \pm 0,001 n=4	0,0078 \pm 0,002 n=4	0,42 \pm 0,1 n=3	1,40 \pm 0,16 n=3	0,044 +/-0,011 n=3

En revanche pour le **LSP4-2022** et le **LSP14-1086**, cette mutation montre une augmentation de l'activité. Étant donné qu'avec l'alanine ou l'asparagine l'interaction cation- π n'existe plus, cela signifie que cette interaction apporte peu de stabilisation. De plus, s'il y a un gain d'activité, cela signifie que la liaison de ces deux composés avec ce mutant est plus favorable qu'avec le récepteur mGlu4 normal. Nous pouvons penser que cette mutation engendre un ancrage différent de ces deux ligands dans le récepteur mGlu4 muté. Il est possible qu'en absence de cette lysine 74, cette interaction cation- π se fasse avec un autre résidu et notamment avec les deux lysines les plus proches en position 71 et 72 ou bien avec l'arginine 78. L'insertion d'une molécule d'eau reliant la fonction phosphinique à l'asparagine (mutation de la lysine 74 en asparagine) pourrait également expliquer ces résultats observés.

Pour vérifier ces premières observations, ces deux mutations ont été réalisées en parallèle sur le sous-type 7 avec la mutation de l'asparagine 73 en alanine ou en lysine. Dans ce cas, les deux substitutions n'apportent pas les mêmes résultats. Pour le changement en alanine, on observe une augmentation d'un log pour le L-AP4 et une perte d'activité pour les deux composés plus longs **LSP4-2022** et **LSP14-1086**. Ces résultats sont difficiles à interpréter. Pour le L-AP4, la diminution stérique entre l'asparagine et l'alanine permet peut-être un meilleur ancrage du ligand dans le récepteur mGlu7. En ce qui concerne les deux autres composés, il est possible que l'on perde la liaison hydrogène formée entre l'amide de l'asparagine avec l'oxygène de la

fonction phénol des ligands ou avec la fonction phosphinique à travers une molécule d'eau.³⁵⁰ Pour vérifier cela, il faudrait faire les modèles moléculaires de ces deux ligands avec ces récepteurs mutés. La seconde substitution de l'asparagine pour la lysine, montre un gain d'activité d'un log pour les trois composés. Dans ce cas présent, l'ammonium ne joue pas de rôle dans une cation- π mais il forme plutôt une nouvelle interaction avec la fonction acide phosphinique du ligand. Chez le sous-type 4, cet ammonium est assez proche de la fonction acide, on peut donc supposer que c'est aussi le cas chez ce récepteur mGlu7 muté. Cela serait cohérent avec les observations de Hampson *et al.* qui ont montré que cette liaison hydrogène avec la lysine 74 était importante pour l'activité des ligands sur le récepteur mGlu4.³⁵⁰

Ces expériences de mutagenèse nous apportent des informations importantes pour cette relation structure-activité. Aucune logique générale ne peut ressortir de cette étude sans posséder tous les modèles moléculaires en parallèle. Malgré quelques disparités, nous pouvons tout de même conclure que cette lysine et surtout son ammonium distal est tout de même important pour l'activité. Il est peut-être responsable d'une interaction avec la fonction phosphinique ou bien d'une interaction cation- π avec le noyau aromatique.

II.6. Autres voies d'optimisation

6.1. Ligands bitopiques

Une courte étude a été menée en parallèle afin de savoir si nos ligands n'agissent pas comme des ligands bitopiques. Ce sont des molécules capables d'interagir avec les deux sites de liaison, orthostérique et allostérique (Figure **II-15**).³⁵¹ Plusieurs études sur ce nouveau type de ligand ont déjà été menées par le groupe du Pr. Christopoulos sur des récepteurs à dopamine³⁵² et des récepteurs muscariniques.^{353,354} Comme nous l'avons déjà présenté dans l'introduction générale, il existe à ce jour deux sites de liaison sur les récepteurs mGlu : un site orthostérique et un site allostérique. Le site orthostérique est situé sur le domaine extracellulaire et correspond au site de liaison du glutamate. Le site allostérique est localisé au niveau du domaine transmembranaire. Cependant, récemment un NAM du récepteur mGlu7, le XAP044, a été identifié comme se liant dans le domaine VFT.¹⁴⁴ D'autres sites de liaison sont en effet possibles pour la liaison de modulateurs allostériques.

Figure **II-15** Différents modes d'activations des récepteurs mGlu³⁵¹

Or, il semble que tous les analogues que nous avons synthétisés soient compétitifs du glutamate et se fixent exclusivement sur le site orthostérique. Cependant, d'après les modèles 3D validés par une étude de mutagenèse dirigée, il serait possible qu'une partie de nos molécules se fixe sur le site du glutamate et l'autre partie sur un site adjacent pouvant être un site allostérique modulant l'activité du récepteur. (Figure **II-16**). Il s'agirait dans notre cas d'un nouveau site allostérique n'étant pas situé dans le domaine transmembranaire qui correspondrait au site chlore identifié précédemment.

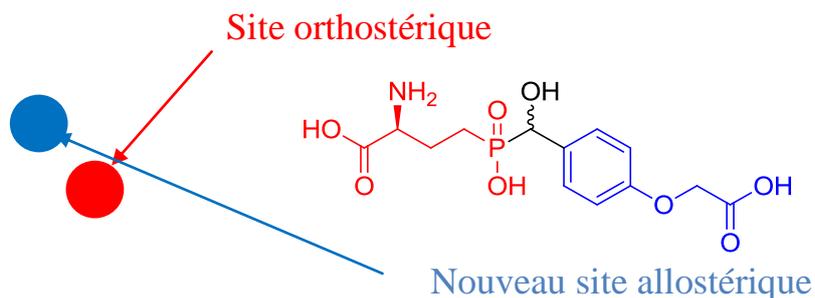


Figure II-16 Fixation du **LSP4-2022** sur les deux sites de liaison?

Si notre hypothèse est exacte, le **LSP4-2022** et ses dérivés seraient des ligands bitopiques, c'est-à-dire associant un ligand orthostérique et un allostérique. Nous devrions pouvoir alors les séparer en deux parties : une partie glutamate libre (partie rouge) et une autre partie modulatrice (partie bleue). Nous avons donc synthétisé trois composés tronqués de leur partie glutamate afin de n'obtenir que la partie modulatrice. Ces composés sont issus du **LSP4-2022** (**BC 288**), du **LSP2-9166** (**BC 289**) et du **LSP14-1086** (**BC 292**) (Figure II-17).

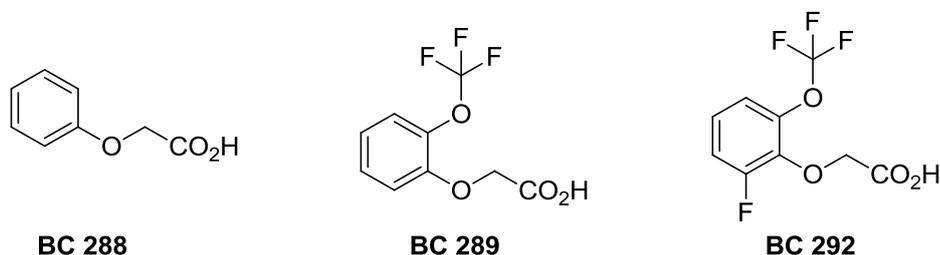


Figure II-17 Structures de trois composés tronqués testés

Le composé **BC 288** était disponible commercialement mais nous possédions l'ester méthylique (**II-47**) correspondant au laboratoire. Une simple saponification avec du KOH dans le MeOH³⁵⁵ a permis d'obtenir le composé souhaité avec un rendement de 96%. Le composé **BC 289** est obtenu exactement de la même façon avec un rendement de 90% à partir de l'ester méthylique correspondant (**II-48**) (Schéma II-24). Enfin, le **BC 292** est obtenu après trois étapes.

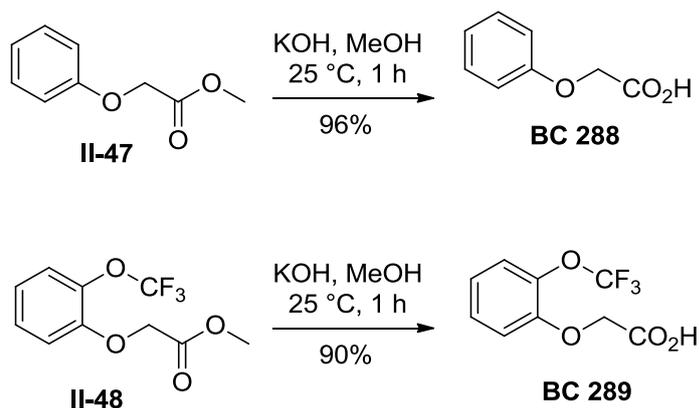


Schéma II-24 Synthèse de **BC 288** et **BC 289** par saponification

La première, similaire à la synthèse du **LSP14-1086**, consiste à introduire la fonction hydroxyle sur le 1-fluoro-3-(trifluorométhoxy)benzene **II-19**. Le phénol est ensuite alkylé dans des conditions classiques et enfin l'ester de méthyle est saponifié pour donner le composé **BC 292** (Schéma II-25).

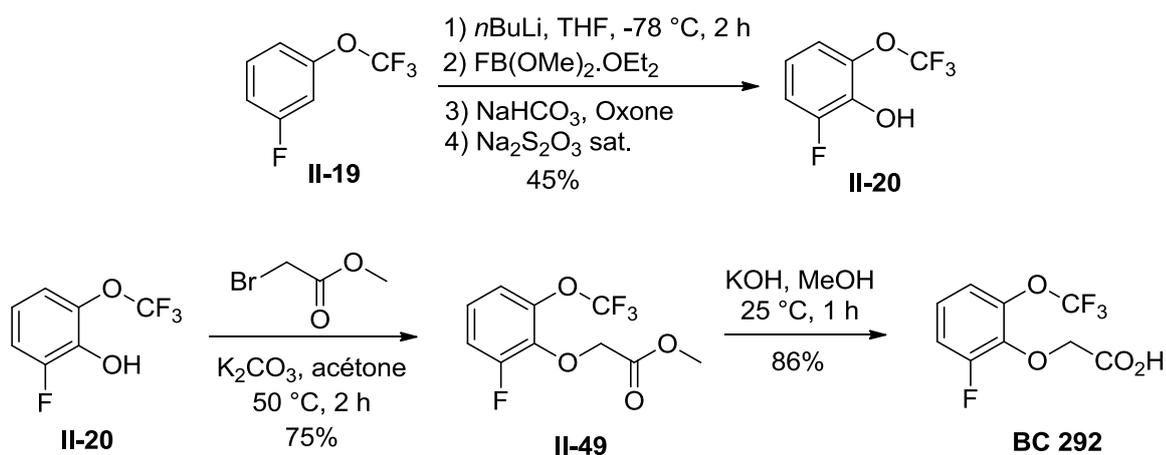


Schéma II-25 Synthèse du **BC 292**

Plusieurs expériences pharmacologiques (fluorescence – mesure de libération de Ca^{2+}) ont alors été effectuées sur ces trois composés tronqués à l'IGF. Nous avons mesuré l'activité du glutamate sur les cellules HEK 293 en présence des trois dérivés à 1, 10 et 100 μM afin de visualiser si ces derniers jouent un rôle de modulateur allostérique de l'activité glutamatergique (Figures II-18, II-19 et II-20). Les résultats observés sont identiques pour les trois composés ; quelque soit la concentration, nous n'observons aucun effet PAM des trois dérivés tronqués sur l'activité glutamatergique. Les composés ont même été testés seuls sans glutamate afin de savoir si ils avaient un effet agoniste mais une fois encore aucun effet n'a été observé.

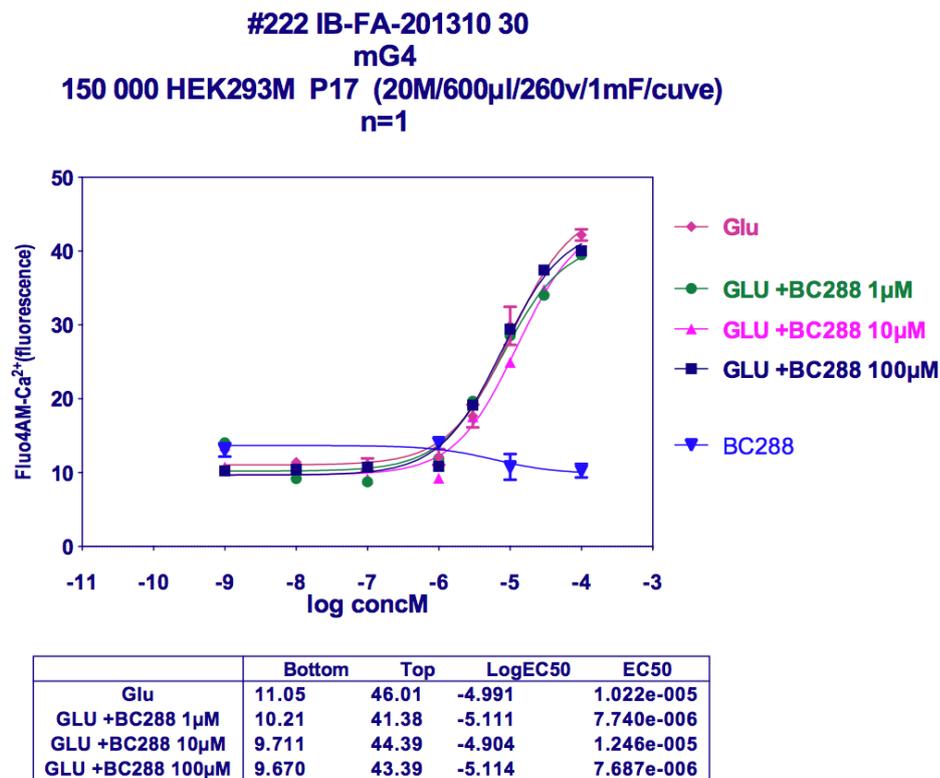


Figure II-18 Mesure de la libération de Ca^{2+} du glutamate + BC 288

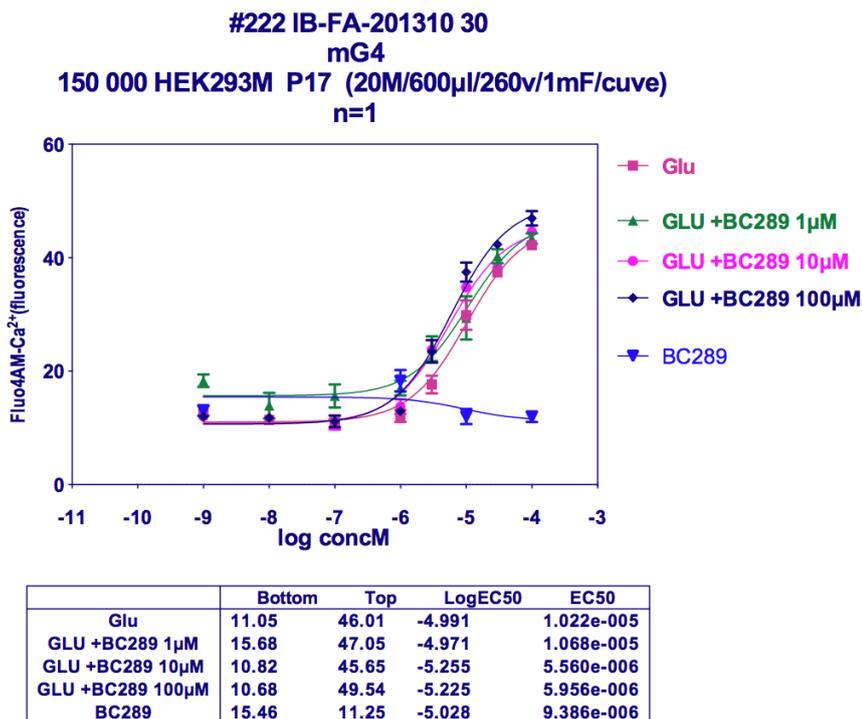


Figure II-19 Mesure de la libération de Ca^{2+} sur des cellules HEK 293 du glutamate + BC 289

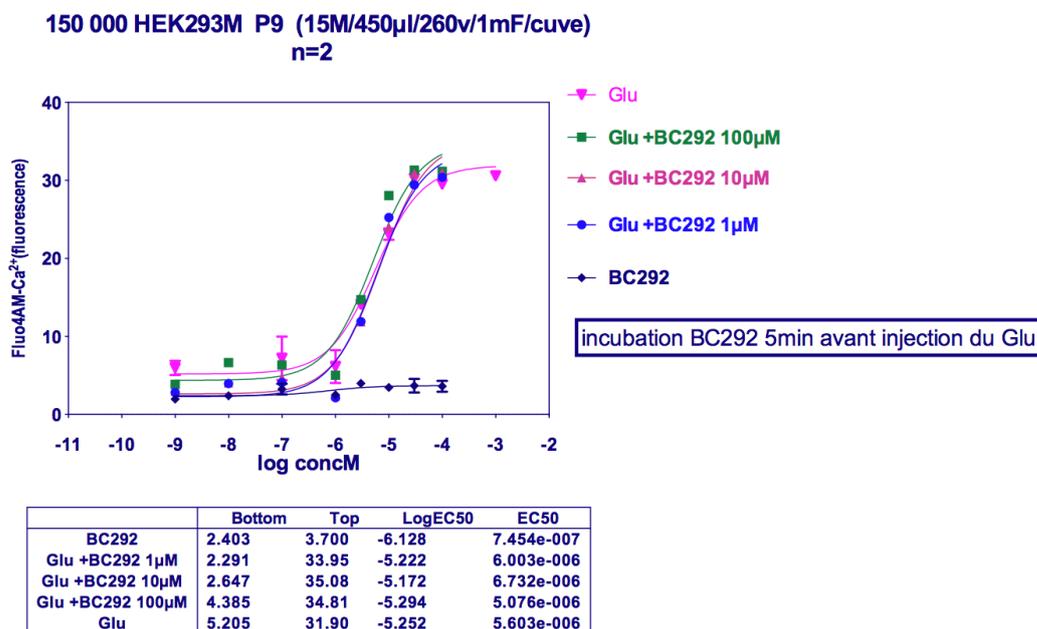


Figure II-20 Mesure de la libération de Ca^{2+} sur des cellules HEK 293 du glutamate + BC 292

Les composés tronqués ont aussi été testés à des concentrations en glutamate de 1, 10 et 100 μ M et à deux concentrations différentes en chlore, 25 et 154 mM (Figure II-21 et II-22). Ces tests permettent de vérifier si l'activité de ces trois dérivés dépend de la concentration en chlore.

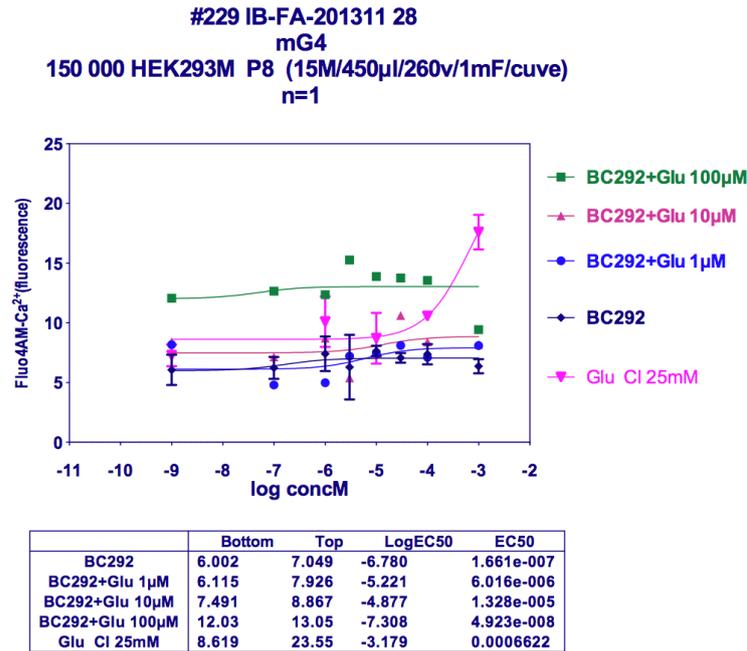


Figure II-21 Mesure de la libération de Ca^{2+} sur des cellules HEK 293 du glutamate + composés tronqués à 25 mM en chlore

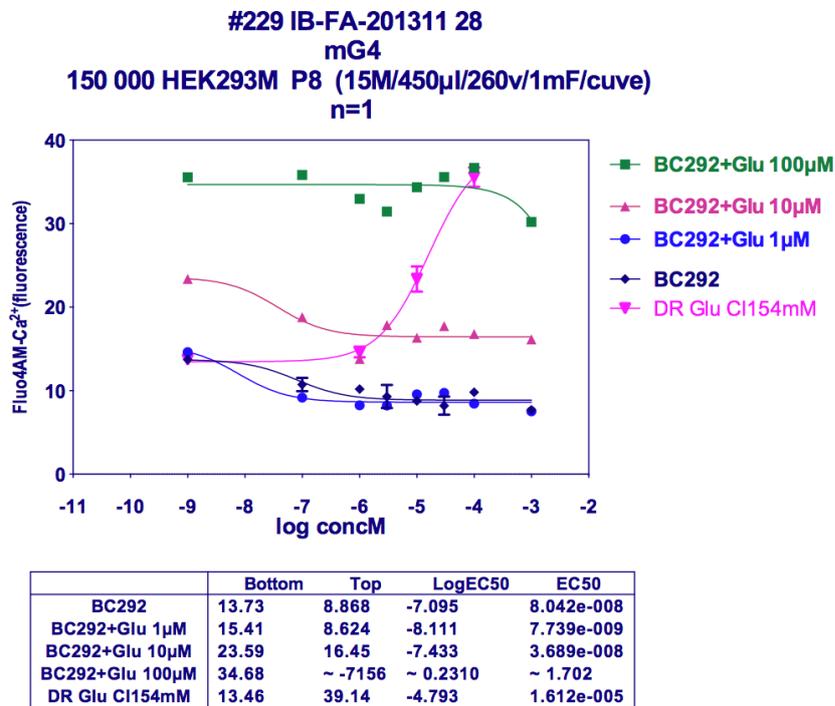


Figure II-22 Mesure de la libération de Ca^{2+} du glutamate + composés tronqués à 154 mM en chlore

Dans les deux cas de figure, nous n’observons aucun effet agoniste des ligands et aucun effet PAM de l’activité du glutamate. Cette étude montre que nos composés, non tronqués, se lient seulement au site orthostérique et ne sont pas des ligands bitopiques. Il serait très intéressant de tester dans les mêmes conditions de nouveaux dérivés tronqués incluant la fonction α -hydroxyle.

6.2. Synthèse du “LSP4-2022 cyclopentène”

6.2.1. Objectif

Tous nos projets sont orientés autour d’un point de départ : le L-AP4. Ce composé phosphonate est l’agoniste des récepteurs mGlu de groupe III le plus utilisé encore aujourd’hui. Nous avons pu remarquer qu’il existe des dérivés cycliques du L-AP4 montrant de bons résultats pharmacologiques et notamment le (Z)-(\pm)-Cyclopentyl-AP4³⁵⁶ et le (Z)-(-)APCPr.¹¹³

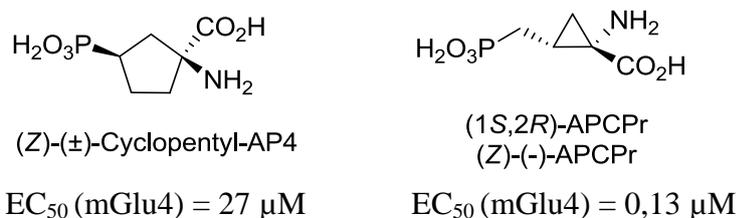


Figure II-23 Structure du (Z)-(+)-Cyclopentyl-AP4 et du (Z)-(-)APCPr

Par rapport au L-AP4, le motif cyclique apporte plus de rigidité à la molécule qui est alors capable de se maintenir au maximum dans sa conformation bioactive. C’est sur cette notion de rigidité que l’on souhaite travailler et la transposer aux composés phosphinates et plus particulièrement au LSP4-2022. Effectivement, l’objectif est d’obtenir l’analogue cyclique de LSP4-2022, le “LSP4-2022 cyclopentène”.

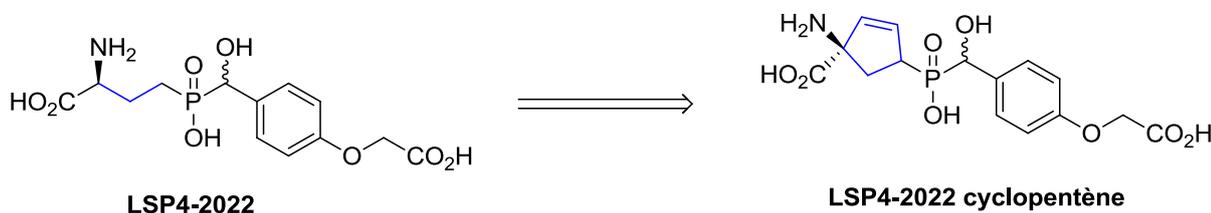


Schéma II-26 Cyclisation du LSP4-2022 – Synthèse du “LSP4-2022 cyclopentène”

Nous pouvons remarquer sur le docking du dérivé cyclique (Figure II-24) qu’il y a assez de place pour que ce nouveau dérivé puisse interagir avec la récepteur mGlu4.

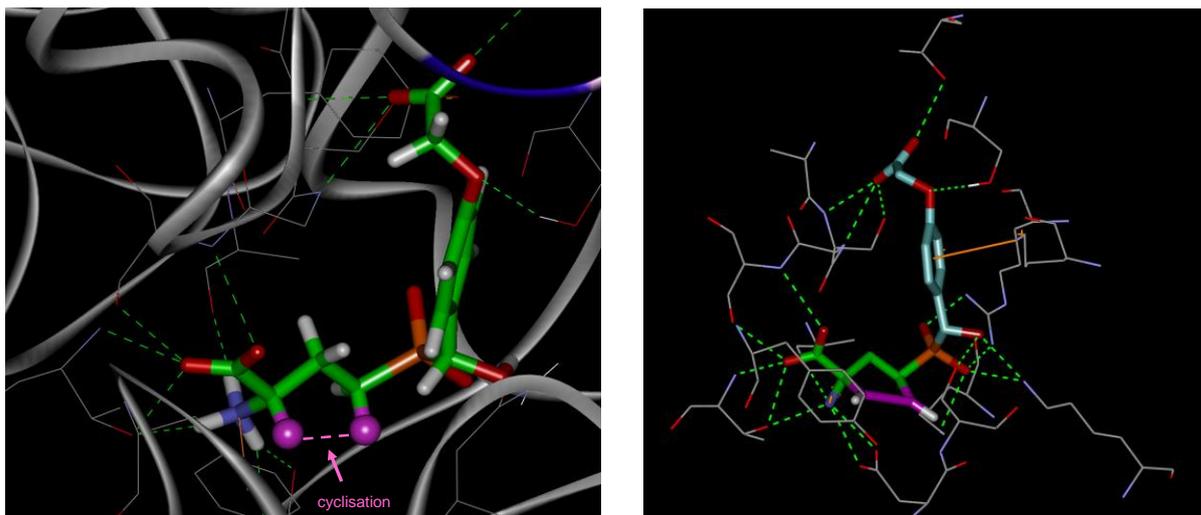


Figure II-24 Docking du **LSP4-2022** et de son dérive cyclique cyclopentène dans le récepteur mGlu4

6.2.2. Travaux de synthèse

Ce changement de structure engendre par la même occasion une voie de synthèse totalement différente qui est divisée en deux grandes parties. Tout d'abord, nous présenterons la synthèse du composé intermédiaire cyclopentène **II-55a** puis dans un second temps l'introduction de la partie phosphorée.

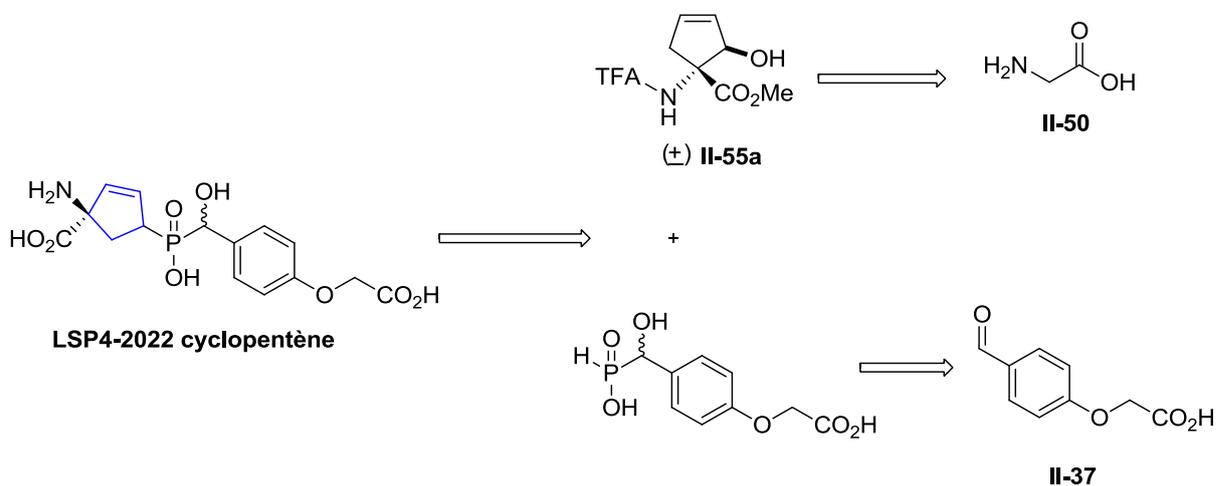
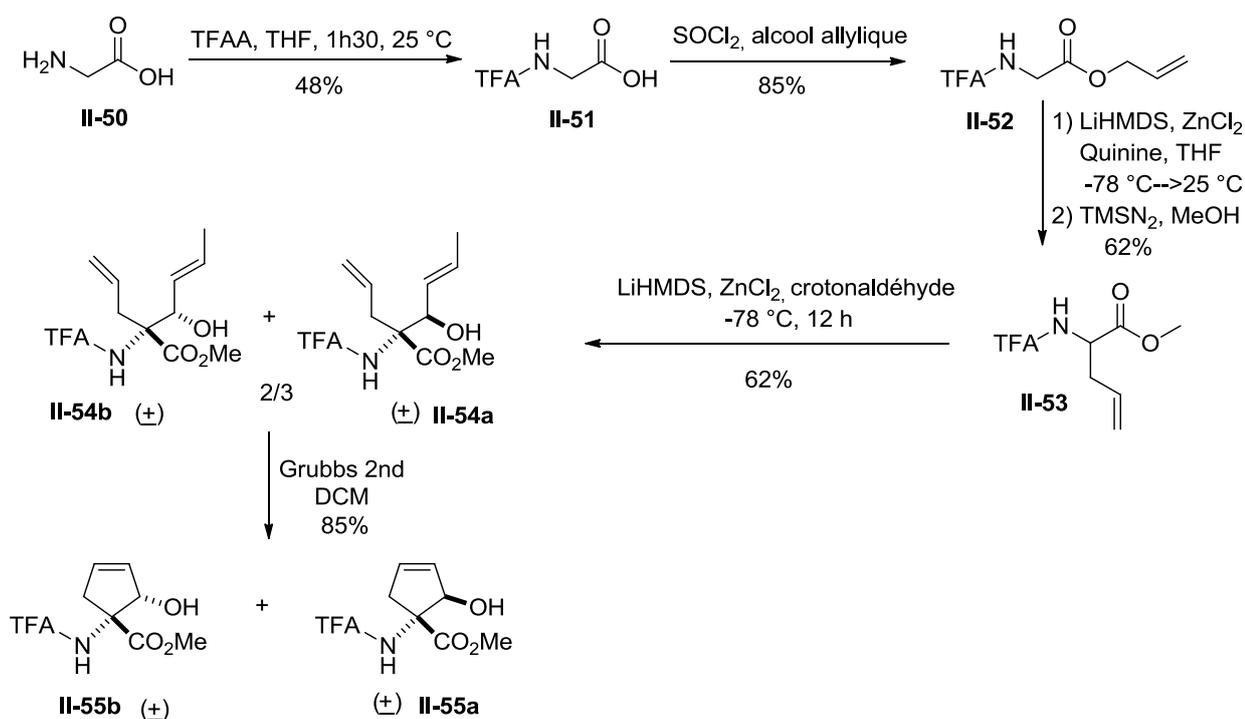


Schéma II-27 Schéma rétrosynthétique du “LSP4-2022 cyclopentène”

6.2.2.1. Synthèse du composé intermédiaire **II-55a**

Pour la synthèse de ce composé, nous avons reproduit les travaux de Kazmaier³⁵⁷ qui a synthétisé ce même composé (Schéma **II-28**). Les deux premières étapes consistent à protéger les deux fonctions polaires amines et acides carboxyliques de la glycine. Tout d'abord, l'amine est protégée sous forme de N-TFA et l'ester allylique est formé dans des conditions classiques (SOCl_2 , alcool allylique). L'étape suivante qui consiste en un réarrangement de Claisen est l'étape clé de cette voie de synthèse. Cette réaction fut mise au point et optimisée également par Kazmaier.³⁵⁸⁻³⁶¹ Des problèmes de reproductibilité ont été observés lors de la mise en œuvre de cette réaction et après de nombreux essais nous avons réussi à obtenir le composé **II-53** avec un rendement de 62% après deux étapes en utilisant du LiHMDS comme base et du ZnCl_2 comme sel métallique chélatant.

Schéma **II-28** Synthèse des deux diastéréomères **II-55a** et **II-55b**

L'ajout d'un ligand chiral, comme la quinine, permet de rendre ce réarrangement asymétrique mais surtout de former un intermédiaire réactionnel plus stable et donc d'augmenter le rendement de la réaction. Effectivement, ce ligand permet de former un complexe intermédiaire bimétallique (Figure **II-25**). Puis, l'ester méthylique est obtenu après activation de l'acide par le triméthylsilyldiazométhane dans le MeOH. Ensuite l'énolate obtenu en présence de LiHMDS et

de ZnCl_2 à partir de **II-53** s'additionne sur le crotonaldéhyde pour obtenir le mélange de deux diastéréomères **II-54a** et **II-54b** avec un rendement de 62% et un rapport 3:2 en faveur du composé **II-54a**. Le mélange est alors soumis à une métathèse cyclisante, en présence du catalyseur de Grubbs de 2nd génération, pour obtenir après séparation par flash chromatographie les deux diastéréomères **II-55a** et **II-55b** avec un rendement de 85% (les composés **II-54a** et **II-54b** ont été séparés une seule fois afin de les caractériser mais la purification est beaucoup plus facile après l'étape de métathèse). Grâce à des études RMN (NOESY), il a été montré que le dérivé majoritaire **II-54a** est de configuration *trans* et que le minoritaire **II-54b** est *cis*.

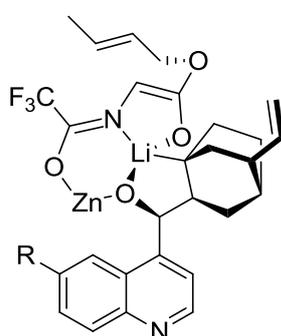


Figure **II-25** Structure du complexe bimétallique intermédiaire

Les deux isomères **II-55a** et **II-55b** sont sous forme racémique. L'objectif serait donc d'obtenir à partir de l'isomère majoritaire **II-55a** les deux énantiomères purs. Pour cela, nous utiliserons toujours les travaux de Kazmaier qui a obtenu les énantiomères via une résolution enzymatique (Schéma **II-29**).

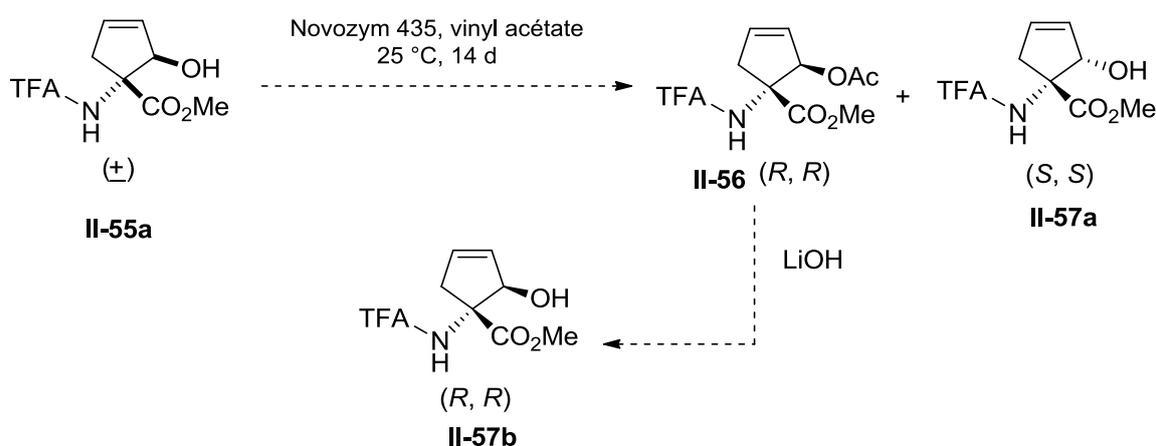


Schéma **II-29** Résolution enzymatique – obtention des deux énantiomères **II-57a** et **II-57b**

Après 14 jours de réaction avec la Novozym 435 dans l'acétate de vinyle à 25 °C, seul l'énantiomère (*R, R*) est acétylé tandis que le (*S, S*) n'est pas reconnu par l'enzyme. L'alcool (*R, R*) **II-57b** sera facilement obtenu par hydrolyse de l'acétylé par LiOH. Dans notre cas, nous avons d'abord travaillé sur l'introduction de la partie phosphorée sur le composé racémique **II-55a**.

6.2.2.2. Introduction de la partie phosphorée

Substitution allylique SN'2

La première stratégie fut d'ajouter la partie phosphorée par substitution nucléophile de type SN'2 sur l'acétate cyclopenténique **II-60** (Schéma **II-30**). L' H_3PO_2 serait d'abord additionné sur l'aldéhyde **II-58** pour obtenir l'acide H-phosphinique **II-59**. Puis, toujours en formant le P^{III} nucléophile par silylation, l'acide phosphinique pourrait s'ajouter en 1,4 sur l'acétate allylique avec élimination d'acide acétique. Après hydrolyse acide, le composé souhaité **LSP4-2022 cyclopenténique** serait obtenu.

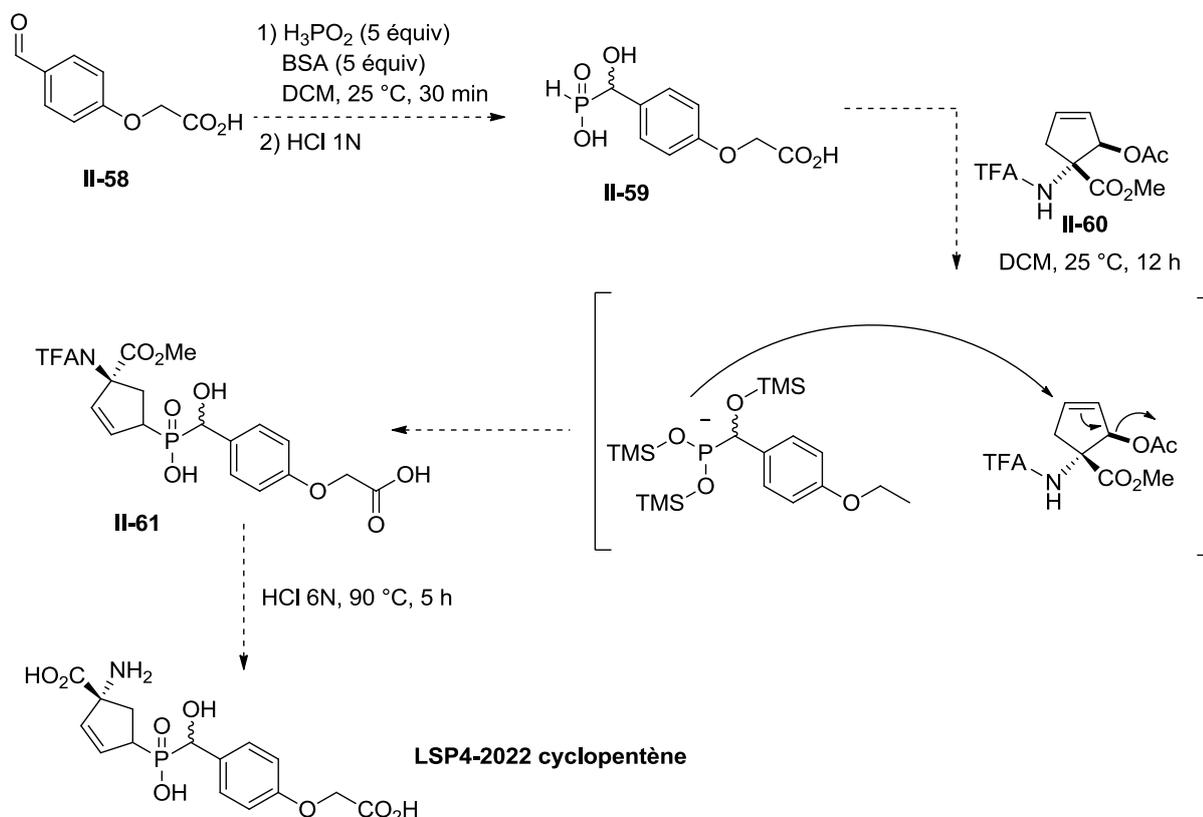


Schéma **II-30** Première stratégie envisagée pour l'introduction de la partie phosphorée

Premièrement, nous avons acétylé l'alcool allylique en ester en utilisant des conditions classiques Ac_2O , DMAP dans le DCM. Après purification sur colonne chromatographique, l'ester allylique est isolé avec 81% de rendement (Schéma II-31).

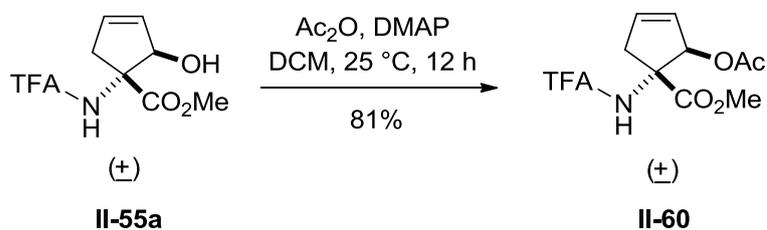


Schéma II-31 Synthèse de l'ester allylique II-60

A partir de cet acétate, nous avons essayé d'ajouter un acide H-phosphinique que nous avons sous la main afin de voir si l'addition $\text{S}_{\text{N}}2$ était possible. On a alors utilisé le "P-H_{int}" synthétisé sur grosse quantité (Schéma II-32).

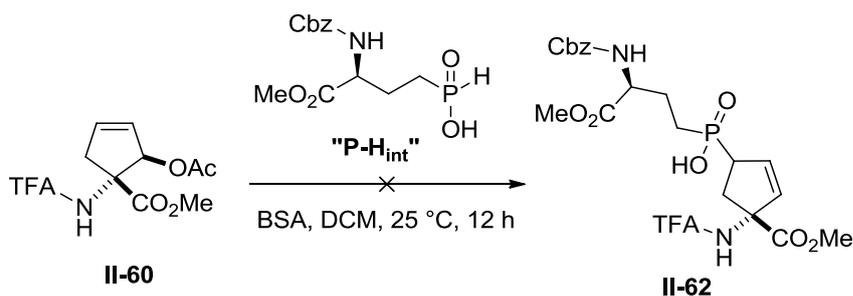
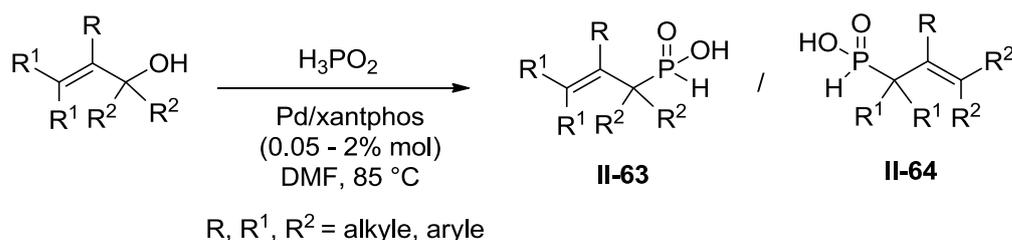


Schéma II-32 $\text{S}_{\text{N}}2$ du "P-H_{int}" sur l'ester allylique II-60

Aucune addition n'est observée et on récupère seulement les réactifs de départ. Vu les difficultés rencontrées pour former la seconde liaison P-C, nous décidons de poursuivre cette addition en passant par un complexe π -allyle.

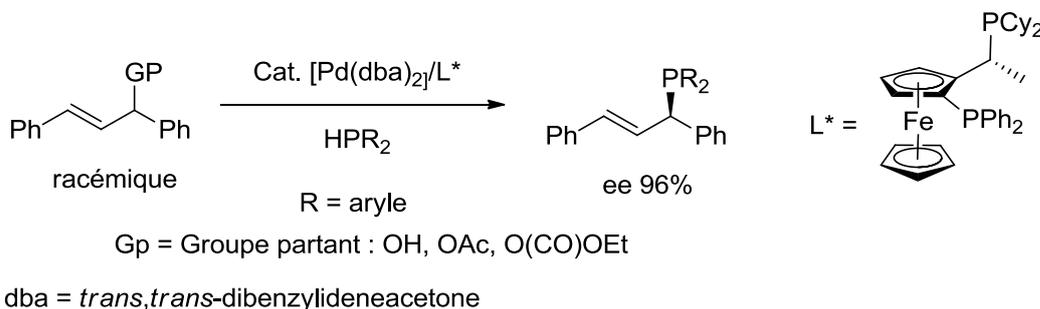
Substitution allylique pallado-catalysée type Tsuji-Trost

Effectivement, les substitutions allyliques catalysées au palladium sont très connues (réaction de Tsuji-Trost)³⁶²⁻³⁶⁴ et de multiples exemples sont référencés avec des nucléophiles carbonés, oxygénés ou azotés³⁶⁵ mais moins avec des nucléophiles phosphorés. Premièrement, nous pouvons citer les travaux du groupe de Montchamp qui a montré l'addition pallado-catalysée de l'acide hypophosphoreux sur des alcools allyliques (Schéma II-33).^{251,366}

Schéma **II-33** Alkylation de l' H₃PO₂ de Montchamp *et al.*^{73, 74}

Les composés **II-63** et **II-64** sont obtenus en fonction des substituants R¹ et R². Si R² < R¹, le composé obtenu sera **II-63** alors que si R¹ < R², c'est le composé **II-64** qui sera isolé car l'addition sur le π-allène se fait toujours sur le côté le moins encombré. Cette méthodologie a également été développée sur d'autres substrats comme des allènes et des diènes.³⁶⁷

Deuxièmement, quelques exemples de phosphination allylique pallado-catalysée énantiosélective ont été mis en évidence (Schéma **II-34**). Le groupe de Togni a montré l'efficacité des ligands de type Josiphos dans ce type de réaction avec de bons excès énantiomériques.³⁶⁸

Schéma **II-34** Phosphination énantiosélective de Togni *et al.*³⁶⁸

Ce même type de réaction a également été décrit avec des carbohydrates diphosphites en tant que ligands.³⁶⁹

Notre but est donc de former un complexe π-allène avec du palladium pour que le P^{III} puisse s'additionner en espérant avoir une addition régiosélective en position β de l'aminooester (Schéma **II-35**).^{370,371}

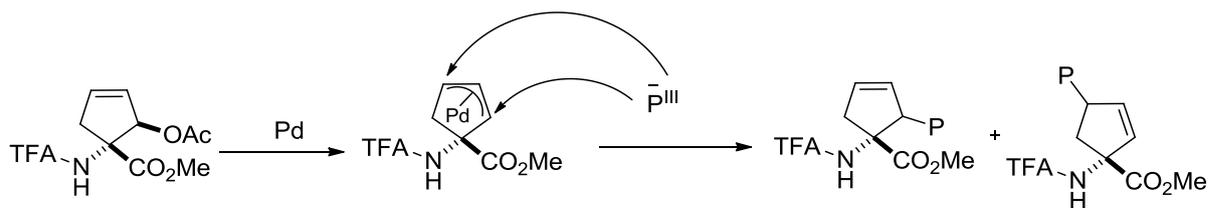
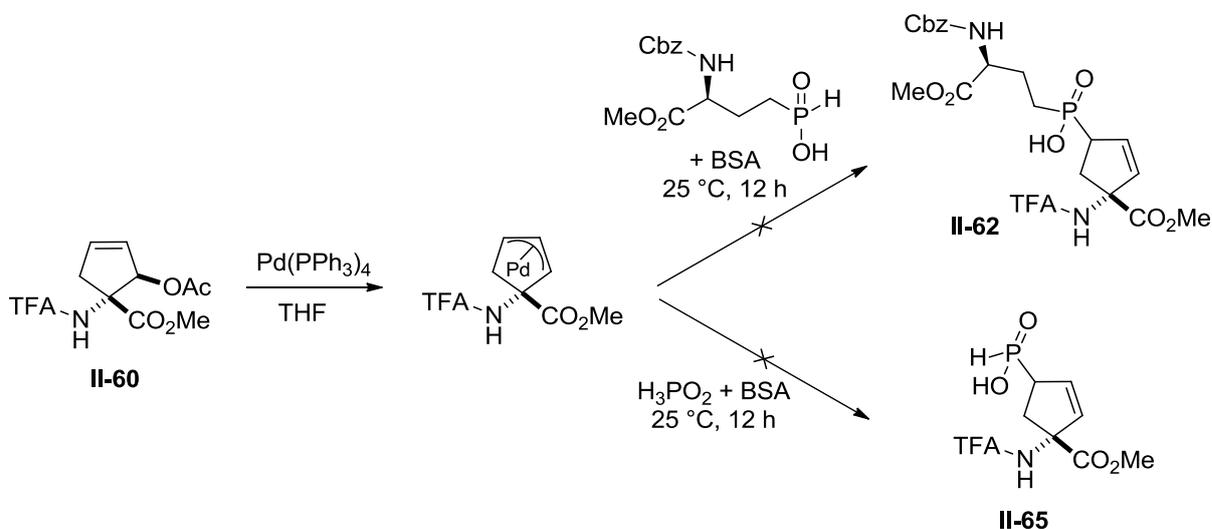
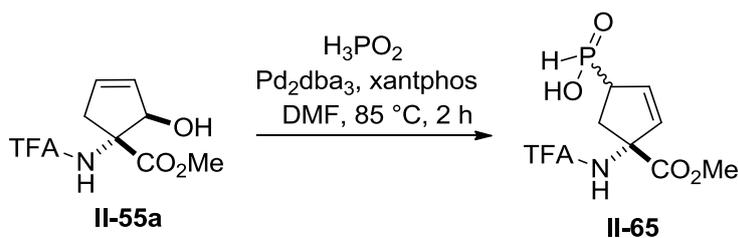


Schéma II-35 Schéma synthétique de la substitution allylique pallado-catalysée

Deux essais ont été menés en utilisant comme nucléophile soit le “**P-H_{int}**” soit l’ H_3PO_2 activés par la BSA. (Schéma II-36).


 Schéma II-36 Essais de substitution allylique pallado-catalysée par le “**P-H_{int}**” et l’ H_3PO_2 sur **II-60**

Le complexe π -allyle est formé par addition du palladium tetrakis sur l’ester allylique **II-60**. Le P^{III} est quand à lui synthétisé *in situ* à partir du substrat respectif et de BSA (25 °C, 1 heure) puis est canulé ensuite sur le complexe au palladium. Malheureusement, aucune addition de phosphore n’est observée. Devant cet échec, nous avons décidé d’essayer la méthodologie développée par Montchamp sur notre composé **II-55a** (Schéma II-37).


 Schéma II-37 Méthodologie de Montchamp appliquée à l’alcool allylique **II-55a**

Différentes tentatives ont été réalisées en modulant la température, le temps de réaction et la quantité de catalyseur mais malheureusement, aucune trace du composé désiré n'est observée. Effectivement, en RMN du phosphore, aucun pic n'est visible. Cependant, on peut s'apercevoir que les déplacements chimiques des protons éthyléniques entre le substrat **II-55a** et le composé brut isolé sont différents. On peut donc supposer que le complexe allylique se forme bien mais que l'addition de phosphore ne s'effectue pas. Ce résultat prouve une nouvelle fois que la nucléophilicité du P^{III} silylé est assez faible. Suite à ces observations, nous avons choisi de changer de stratégie et de réaliser une substitution nucléophile de type 2 pour introduire la partie phosphorée.

Isomérisation de la double liaison + substitution nucléophile de type 2

Cette dernière stratégie repose sur deux étapes. La première consisterait à un réarrangement pallado-catalysé de l'acétate allylique afin de déplacer le groupement acétate qui serait alors dans une deuxième étape substitué par un nucléophile phosphoré (Schéma **II-38**).

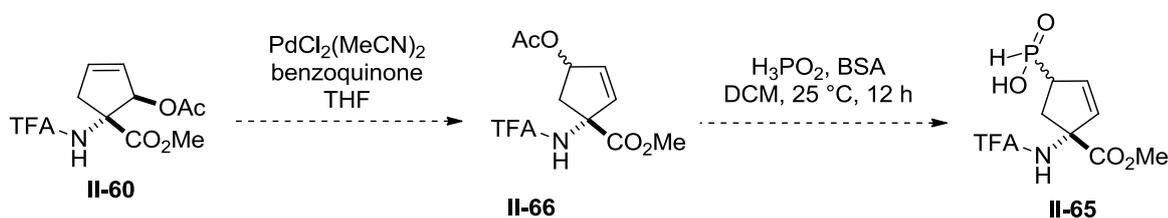


Schéma **II-38** Réarrangement de l'acétate allylique + addition nucléophile de l' H_3PO_2

Ce réarrangement, décrit en premier par Oehlschlager *et al.* en 1984³⁷², a été utilisé par deux groupes de recherche sur des substrats très ressemblants au nôtre (Schéma **II-39**).^{373,374}

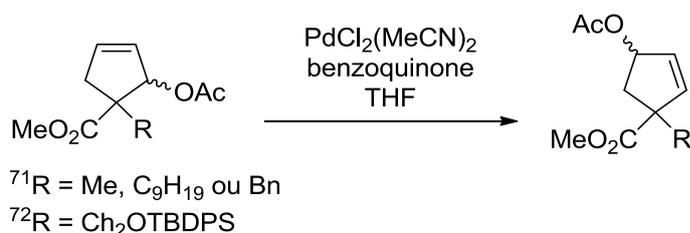


Schéma **II-39** Réarrangements d'acétate allylique pallado-catalysés décrits dans la littérature

Nous avons alors reproduit exactement ces conditions sur notre substrat **II-40** (Schéma **II-40**) mais malheureusement aucune conversion n'est observée. Malgré de nombreuses tentatives en essayant d'autres sources de palladium ($\text{PdCl}_2(\text{PhCN})_2$ ou $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$), aucune amélioration n'a été observée. Cette stratégie a donc également été abandonnée.

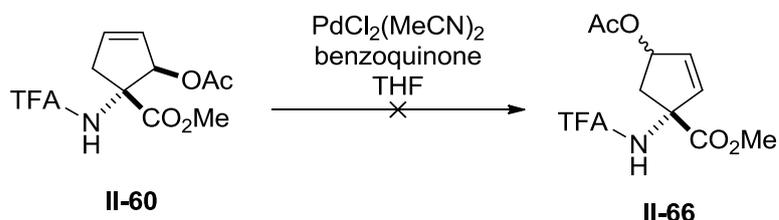


Schéma **II-40** Réarrangement pallado-catalysé de l'acétate allylique **II-60**

Suite à ces échecs, nous souhaitons tout de même continuer à travailler sur cette synthèse d'analogue cyclique de **LSP4-2022**. Nous avons passé quelques semaines à optimiser les conditions du réarrangement de Claisen pour la synthèse du cyclopentène intermédiaire **II-55a** et nous souhaitons valoriser ce travail.

6.2.2.3. Synthèse du “LSP4-2022 cyclopentanone”

En prenant compte des difficultés rencontrées pour synthétiser le “LSP4-2022 cyclopenténique” nous avons décidé de synthétiser un autre dérivé cyclique mais possédant une fonction carbonyle en plus, le “LSP4-2022 cyclopentanone” (Schéma **II-41**).

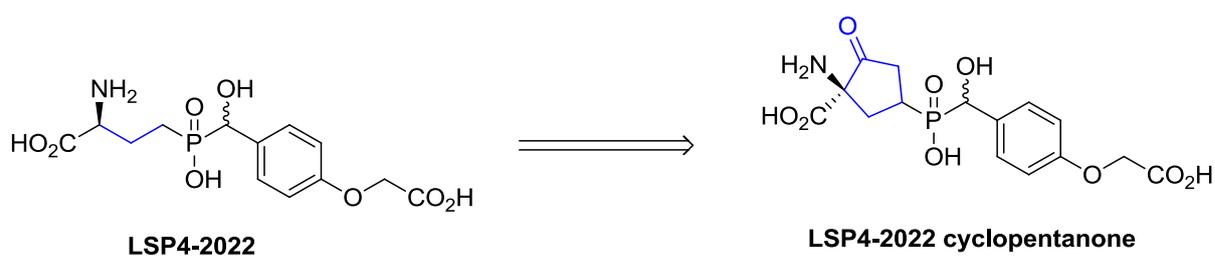
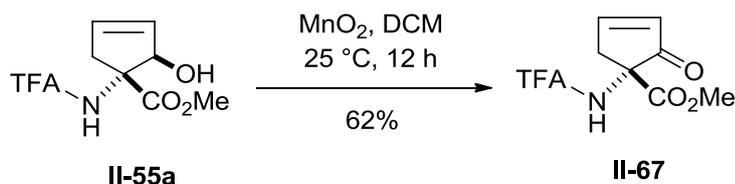


Schéma **II-41** Synthèse du “LSP4-2022 cyclopentanone”

A partir du cyclopenténol, nous avons tout d'abord oxydé la fonction hydroxyle pour obtenir la cétone α,β insaturée. Nous avons choisi d'utiliser du dioxyde de manganèse MnO_2 comme agent oxydant comme dans les travaux de Dias *et al.*³⁷⁵ Les conditions sont extrêmement faciles à mettre en œuvre et la réaction est très propre puisqu'une simple filtration sur célite (élimination du MnO_2) permet d'isoler le produit souhaité pur avec un rendement de 62% (Schéma **II-42**).

Schéma II-42 Oxydation de l'alcool allylique en cétone α,β insaturée

Cette réaction d'oxydation nous permet d'obtenir un très bon électrophile sur lequel il sera possible d'ajouter la partie phosphorée par addition de Michael. Nous avons choisi d'ajouter l'acide hypophosphoreux car la première alkylation est plus facile. Après avoir tenté divers essais d'activation de l' H_3PO_2 avec HMDS ou des mélanges $\text{TMSBr}/\text{NEt}_3$, il s'est avéré que les meilleures conditions étaient H_3PO_2 sec, BSA, DCM, 25 °C, 12 h (Schéma II-43) soient les mêmes conditions que celles utilisées pour la seconde alkylation du "P-H_{int}" sur la fonction aldéhyde lors de la synthèse du LSP4-2022 et de ses analogues. Mori *et al.* ont utilisé les mêmes conditions pour l'addition 1,4 de Michael du diéthyle triméthylsilyle phosphite sur diverses cétones α,β insaturées cycliques.³⁷⁶

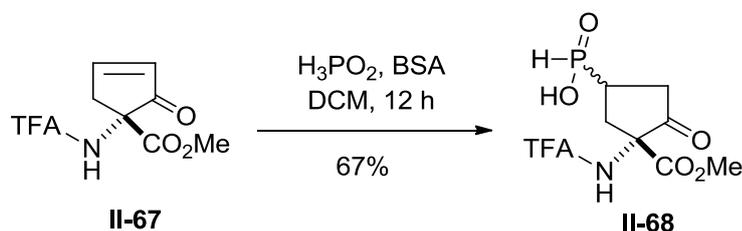
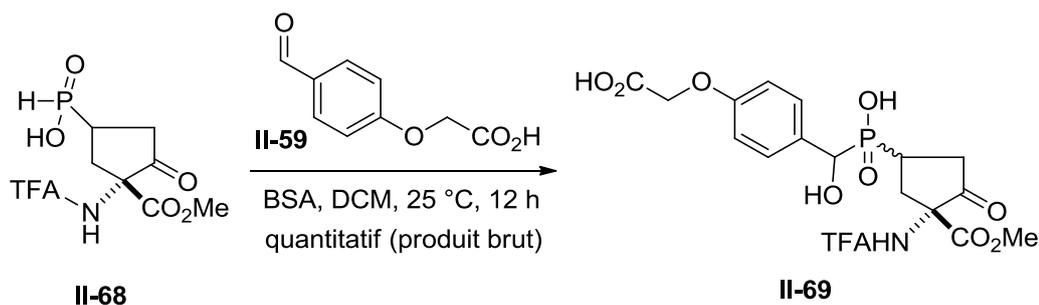
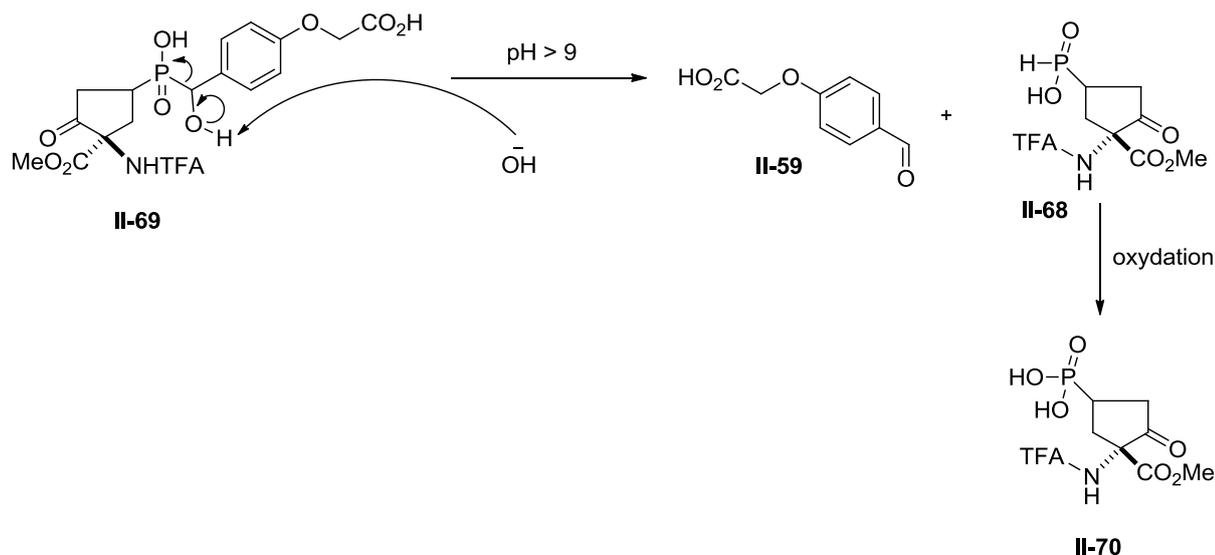


Schéma II-43 Addition de l'acide hypophosphoreux sur l'accepteur de Michael II-67

Le composé n'a pas été purifié mais les données RMN du résidu brut sont cohérentes avec la structure de la molécule attendue. Effectivement, en RMN du phosphore, on observe un pic à 34,7 ppm, soit la zone des acides H-phosphiniques. Puis, en RMN ^1H , on observe une constante de couplage de 551 Hz à 7,02 ppm correspondant au couplage J_1 H-P. Nous avons alors poursuivi la synthèse par l'addition de cet acide H-phosphinique sur l'aldéhyde précurseur du LSP4-2022. Cette seconde substitution s'effectue en utilisant les mêmes conditions, c'est-à-dire en activant le phosphore par silylation avec la BSA dans le DCM (Schéma II-44).

Schéma **II-44** Addition de l'acide phosphinique **II-68** sur **II-59**

Après 12 h d'agitation à 25 °C, la réaction est hydrolysée par ajout d'HCl 1 M et le résidu brut est isolé après extraction dans l'EtOAc. En RMN ^{31}P , on peut observer un pic majoritaire à 45,5 ppm correspondant à l'acide phosphinique relié à deux carbones. Aucune purification n'est effectuée à cette étape et le composé brut est directement soumis à l'étape d'hydrolyse acide (HCl 6 M, 95 °C, 5 h) afin de déprotéger la fonction acide aminé. Une nouvelle fois, on suit l'efficacité de la réaction par RMN ^{31}P avec l'observation d'un pic à 45,7 ppm. 220 mg de composé brut sont collectés et vont être purifiés sur une résine échangeuse de cations. La première purification effectuée sur une petite résine n'a pas permis d'obtenir le composé pur. Une seconde purification sur une résine échangeuse de cations plus grande a donc été effectuée mais une nouvelle fois, nous n'avons pas réussi à obtenir le composé pur. Une résine échangeuse d'anions a alors été utilisée pour purifier les 200 mg de composé récolté après les deux premières résines. Le dépôt est réalisé à pH = 9 et l'élution se fait à l'eau bouillie puis à l'acide formique de concentration croissante (1 à 4 molaire par pallier). Malheureusement, aucun bon produit n'est isolé. En RMN ^1H , nous observons un pic d'aldéhyde et aucun pic qui pourrait correspondre à la structure finale du composé. En RMN ^{31}P , nous n'observons seulement qu'un pic très minime vers 25 ppm correspondant à un l'acide phosphinique. Cela signifierait que l'on obtiendrait l'aldéhyde initial ainsi qu'un composé dérivé d'acide phosphinique. Nous pouvons penser qu'il s'agit de la coupure de la liaison phosphore-carbone à cause du pH un peu trop basique. Effectivement, si l'alcoolate se forme sur la fonction hydroxyle en α de l'acide phosphinique, le doublet peut alors basculer et éliminer l'aldéhyde et l'acide H-phosphinique correspondant. En RMN du phosphore, nous observons un pic vers 25 ppm qui pourrait correspondre au composé **II-70**, le phosphonate issu de l'oxydation de l'acide phosphinique **II-68** (Schéma **II-45**). Cela reste seulement une supposition mais ce phénomène a déjà été observé par Chelliah Selvam et Isabelle Lemasson.



L'absence du produit souhaité pourrait également être due aux conditions réactionnelles utilisées lors de l'hydrolyse finale (HCl 6 M). Effectivement, dans des conditions aussi dures, une hydrolyse de l'ester en acide suivie d'une décarboxylation en position β de la fonction cétone est tout à fait envisageable.^{377,378}

Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps de continuer sur cette voie qui semble encourageante. Le problème de reproductibilité du réarrangement de Claisen, avec des rendements allant de 10 à 62%, nous a empêché d'obtenir rapidement de grandes quantités de produit cyclopentène. Les conditions d'hydrolyse finale et de purification doivent être optimisées afin de pouvoir synthétiser et surtout tester un dérivé cyclique du **LSP4-2022**.

6.2.2.4. Bilan et perspectives

Nous avons pu tirer quelques conclusions de ces deux projets d'optimisation élaborés en parallèle de nos principaux projets.

Tout d'abord, aucune activité agoniste ni PAM n'a été observée sur les trois dérivés tronqués **BC 288**, **BC 289** et **BC 292**. La taille de la molécule et les interactions avec le récepteur des composés entiers LSP semblent optimales même si des problèmes de sélectivité sont encore à améliorer. En ce qui concerne l'analogue cyclique du LSP4-2022, quelques optimisations sont encore au programme et notamment au niveau des étapes finales de la synthèse. Cette cyclisation engendre forcément une voie de synthèse différente demandant une optimisation en particulier au niveau du réarrangement de Claisen. Les premiers résultats obtenus constituent

une bonne base de travail pour la suite en espérant que les activités pharmacologiques de ces analogues seront intéressantes.

Finalement, de nouveaux projets d'optimisation seront à l'étude prochainement. Effectivement, il serait intéressant de remplacer la fonction acide carboxylique distale par un tétrazole car ces deux groupements possèdent des propriétés très proches.³⁷⁹ Par ailleurs, des composés où la fonction acide phosphinique centrale serait remplacée par une sulfone ou un hydrate pourraient également être synthétisés et testés. Cela permettrait de conserver les points d'ancrage de la partie centrale mais aussi d'ajouter une nouvelle diversité moléculaire (Schéma II-46).

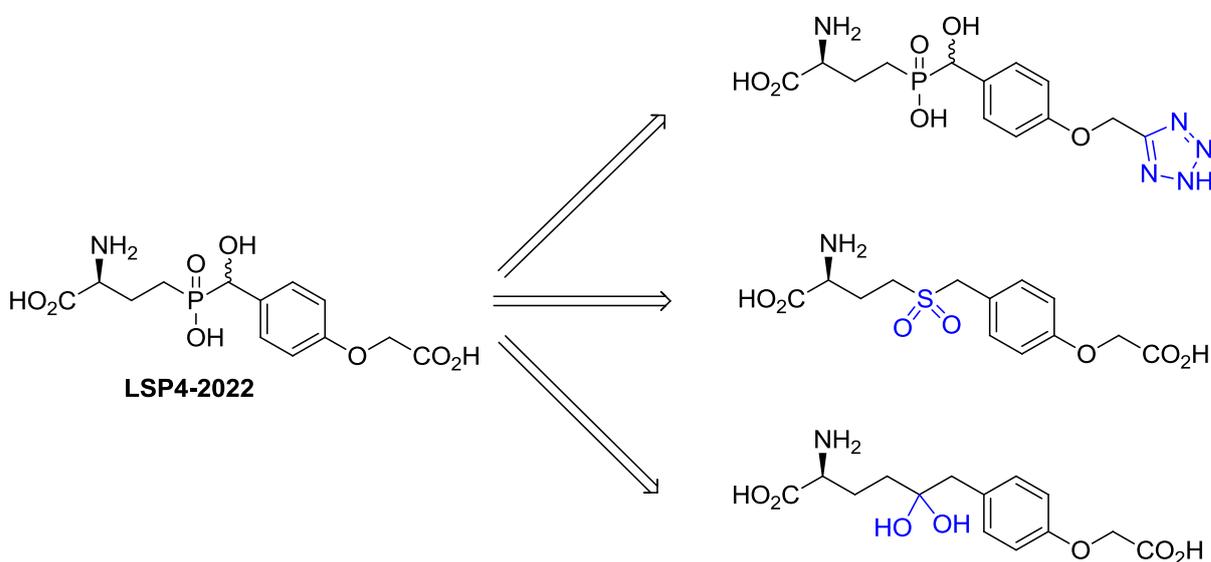


Schéma II-46 Futures voies d'optimisation

II.7. Références bibliographiques

113. Sibille, P., *et al.* Synthesis and biological evaluation of 1-amino-2-phosphonomethylcyclopropanecarboxylic acids, new group III metabotropic glutamate receptor agonists. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 3585.
144. Gee, C. E., *et al.* Blocking Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 (mGlu7) via the Venus Flytrap Domain (VFTD) Inhibits Amygdala Plasticity, Stress, and Anxiety-related Behavior. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 10975.
251. Bravo-Altamirano, K.; Montchamp, J.-L. Palladium-Catalyzed Dehydrative Allylation of Hypophosphorous Acid with Allylic Alcohols. *Org. Lett.* **2006**, 8, 4169.
271. Acher, F. S., C.; Triballeau, N.; Pin, J. P.; Bertrand, H. O. Hypophosphorus acid derivatives and their therapeutical applications. *WO 2007/052169* **2007**.
288. Goudet, C., *et al.* A novel selective metabotropic glutamate receptor 4 agonist reveals new possibilities for developing subtype selective ligands with therapeutic potential. *FASEB J.* **2012**, 26, 1682.
293. Ohara, P. J., *et al.* The Ligand-Binding Domain in Metabotropic Glutamate Receptors Is Related to Bacterial Periplasmic Binding-Proteins. *Neuron* **1993**, 11, 41.
294. Ogawa, H., *et al.* Reversibly bound chloride in the atrial natriuretic peptide receptor hormone-binding domain: Possible allosteric regulation and a conserved structural motif for the chloride-binding site. *Prot. Sci.* **2010**, 19, 544.
295. Acher, F. C., *et al.* A critical pocket close to the glutamate binding site of mGlu receptors opens new possibilities for agonist design. *Neuropharmacology* **2011**, 60, 102.
296. Moissan, H. Le fluor. *C.R. Acad. Sci.* **1886**, 103, 202.
297. Heidelberger, C., *et al.* Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature* **1957**, 179, 663.
298. Fried, J.; Sabo, E. F. 9 α -Fluoro derivatives of cortisone and hydrocortisone. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 1455.
299. Wong, D. T., *et al.* Prozac (Fluoxetine, Lilly-110140), the First Selective Serotonin Uptake Inhibitor and an Antidepressant Drug - 20 Years since Its First Publication. *Life Sci.* **1995**, 57, 411.
300. Roth, B. D. 1 The Discovery and Development of Atorvastatin, A Potent Novel Hypolipidemic Agent. In *Progress in Medicinal Chemistry*, F.D. King, A. W. O. A. B. R.; Scott, L. D., Eds. Elsevier: 2002; Vol. Volume 40, pp 1-22.
301. Drlica, K.; Malik, M. Fluoroquinolones: Action and resistance. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, 249.
302. Purser, S., *et al.* Fluorine in medicinal chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 320.
303. Muller, K., *et al.* Fluorine in pharmaceuticals: Looking beyond intuition. *Science* **2007**, 317, 1881.
304. Bonnet-Delpon, D. Le fluor : un élément essentiel en chimie médicinale. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **2008**, 66, 56.
305. Rosenblum, S. B., *et al.* Discovery of 1-(4-Fluorophenyl)-(3R)-[3-(4-fluorophenyl)-(3S)-hydroxypropyl]-(4S)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone (SCH 58235): A Designed, Potent, Orally Active Inhibitor of Cholesterol Absorption. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 973.
306. Eriksson, T., *et al.* Stereospecific Determination, Chiral Inversion in-Vitro and Pharmacokinetics in Humans of the Enantiomers of Thalidomide. *Chirality* **1995**, 7, 44.
307. Takeuchi, Y., *et al.* (R)- and (S)-3-Fluorothalidomides: Isosteric Analogues of Thalidomide. *Org. Lett.* **1999**, 1, 1571.
308. Smart, B. E. Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J. Fluorine Chem.* **2001**, 109, 3.
309. Morgenthaler, M., *et al.* Predicting and Tuning Physicochemical Properties in Lead Optimization: Amine Basicities. *Chem. Med. Chem.* **2007**, 2, 1100.
310. Massa, M. A., *et al.* Novel heteroaryl replacements of aromatic 3-tetrafluoroethoxy substituents in trifluoro-3-(tertiaryamino)-2-propanols as potent inhibitors of cholesteryl ester transfer protein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1625.

311. Leroux, F., *et al.* alpha-fluorinated ethers, thioethers, and amines: Anomerically biased species. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 827.
312. Leroux, F. Inhibition of P450 17 as a new strategy for the treatment of prostate cancer. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 1623.
313. Jeschke, P., *et al.* alpha-fluorinated ethers as "exotic" entity in medicinal chemistry. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, 7, 1027.
314. Landelle, G., *et al.* Trifluoromethyl Ethers and -Thioethers as Tools for Medicinal Chemistry and Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14, 941.
315. Leroux, F. R., *et al.* Trifluoromethyl ethers - synthesis and properties of an unusual substituent. *Beilstein J. Org. Chem.* **2008**, 4.
316. Lawrence, N. J., *et al.* Synthesis and anticancer activity of fluorinated analogues of combretastatin A-4. *J. Fluorine Chem.* **2003**, 123, 101.
317. Duff, J. C.; Bills, E. J. 273. Reactions between hexamethylenetetramine and phenolic compounds. Part I. A new method for the preparation of 3- and 5-aldehydosalicylic acids. *J. Chem. Soc.* **1932**, 1987.
318. Smith, W. E. Formylation of aromatic compounds with hexamethylenetetramine and trifluoroacetic acid. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3972.
319. Ferguson, L. N. The Synthesis of Aromatic Aldehydes. *Chem. Rev.* **1946**, 38, 227.
320. Vilsmeier, A.; Haack, A. Über die Einwirkung von Halogenphosphor auf Alkyl-formanilide. Eine neue Methode zur Darstellung sekundärer und tertiärer p-Alkylamino-benzaldehyde. *Chem. Ber.* **1927**, 60, 119.
321. Jones, G.; Stanforth, S. P. ChemInform Abstract: The Vilsmeier Reaction of Fully Conjugated Carbocycles and Heterocycles. *Chem. Inform.* **1997**, 28, no.
322. Ramadas, S.; Krupadanam, G. L. D. Enantioselective acylation of 2-hydroxymethyl-2,3-dihydrobenzofurans catalysed by lipase from *Pseudomonas cepacia* (Amano PS) and total stereoselective synthesis of (-)-(R)-MEM-protected arthrographol. *Tetrahedron-Asymmetry* **2000**, 11, 3375.
323. Castagnetti, E.; Schlosser, M. 2-, 3-, and 4-(trifluoromethoxy)phenyllithiums: Versatile intermediates offering access to a variety of new organofluorine compounds. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 691.
324. Rauchschnalbe, G.; Schlosser, M. Selektive Synthesen mit Organometallen IV: Gezielte Hydroxylierung von Allylstellungen. *Helv. Chim. Acta* **1975**, 58, 1094.
325. Schlosser, M.; Franzini, L. The Regioselectivity of 1,3-Disubstituted Allylmethyl Species Towards Electrophiles: 1-(Trimethylsilyl)alk-2-enylpotassium Compounds. *Synthesis* **1998**, 1998, 707.
326. Acher, F. C., *et al.* Hypophosphorous acid derivatives having antihyperalgiactivity and biological applications thereof. *WO 2012/156931 A1* **2012**.
327. Barvian, N. C. K., C.N.; Para, K.S.; Patt, W.C.; Visnick, M. Benzoxazin-3-ones and derivatives thereof as inhibitors of PI3K. *WO 2004/052373 A1* **2004**.
328. Kolb, H. C., *et al.* Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2001**, 40, 2004.
329. Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug. Discov. Today* **2003**, 8, 1128.
330. Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. The growing applications of click chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1249.
331. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1963**, 2, 565.
332. Tornøe, C. W., *et al.* Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057.
333. Rostovtsev, V. V., *et al.* A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2002**, 41, 2596.
334. Bock, V. D., *et al.* CuI-Catalyzed Alkyne-Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2006, 51.

335. Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952.
336. Amblard, F., *et al.* Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide–Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 4207.
337. Lee, L. V., *et al.* A Potent and Highly Selective Inhibitor of Human α -1,3-Fucosyltransferase via Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9588.
338. Appukkuttan, P., *et al.* A Microwave-Assisted Click Chemistry Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles via a Copper(I)-Catalyzed Three-Component Reaction. *Org. Lett.* **2004**, 6, 4223.
339. Feldman, A. K., *et al.* One-Pot Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles from In Situ Generated Azides. *Org. Lett.* **2004**, 6, 3897.
340. Lipshutz, B. H.; Taft, B. R. Heterogeneous Copper-in-Charcoal-Catalyzed Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2006**, 45, 8235.
341. Jliaia, I., *et al.* Copper(I)-doped Wyoming's montmorillonite for the synthesis of disubstituted 1,2,3-triazoles. *Tet. Lett.* **2008**, 49, 6756.
342. Chassaing, S., *et al.* Click Chemistry in CuI-zeolites: The Huisgen [3 + 2]-Cycloaddition. *Org. Lett.* **2007**, 9, 883.
343. Chtchigrovsky, M., *et al.* Functionalized Chitosan as a Green, Recyclable, Biopolymer-Supported Catalyst for the [3+2] Huisgen Cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2009**, 48, 5916.
344. Bonami, L., *et al.* Facile Access to an Efficient Solid-Supported Click Catalyst System Based on Poly(ethyleneimine). *Macromol. Rapid Comm.* **2009**, 30, 34.
345. Suzuka, T., *et al.* Reusable Polymer-Supported Terpyridine Copper Complex for [3+2] Huisgen Cycloaddition in Water. *Heterocycles* **2010**, 81, 601.
346. Sirion, U., *et al.* Ionic polymer supported copper(I): A reusable catalyst for Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition. *Synlett* **2008**, 2326.
347. Hagiwara, H., *et al.* Sustainable Click Reaction Catalyzed by Supported Ionic Liquid Catalyst (Cu-SILC) (pg 643, 2009). *Synlett* **2009**, 3224.
348. Girard, C., *et al.* Reusable Polymer-Supported Catalyst for the [3+2] Huisgen Cycloaddition in Automation Protocols. *Org. Lett.* **2006**, 8, 1689.
349. Jliaia, I., *et al.* Automated Synthesis of a 96 Product-Sized Library of Triazole Derivatives Using a Solid Phase Supported Copper Catalyst. *Molecules* **2010**, 15, 3087.
350. Rosemond, E., *et al.* Molecular Basis for the Differential Agonist Affinities of Group III Metabotropic Glutamate Receptors. *Mol. Pharmacol.* **2004**, 66, 834.
351. Kamal, M.; Jockers, R. Bitopic ligands: all-in-one orthosteric and allosteric. *F1000 Biol. Rep.* **2009**, 1, 77.
352. Lane, J. R., *et al.* A new mechanism of allostery in a G protein–coupled receptor dimer. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 745.
353. Valant, C., *et al.* A Novel Mechanism of G Protein-coupled Receptor Functional Selectivity: Muscarinic partial agonist McN-A-343 as a bitopic orthosteric/allosteric ligand. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 29312.
354. Christopoulos, A. Advances in G Protein-Coupled Receptor Allostery: From Function to Structure. *Mol. Pharmacol.* **2014**, 86, 463.
355. Khurana, J. M., *et al.* Facile Hydrolysis of Esters with KOH-Methanol at Ambient Temperature. *Monatshefte für Chemie* **2004**, 135, 83.
356. Johansen, P. A., *et al.* Type 4a metabotropic glutamate receptor: identification of new potent agonists and differentiation from the L-(+)-2-amino-4-phosphonobutanoic acid-sensitive receptor in the lateral perforant pathway in rats. *Molecular Pharmacology* **1995**, 48, 140.
357. Kummeter, M.; Kazmaier, U. Synthesis of polyhydroxylated aminocyclopentanes. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3325.
358. Kazmaier, U., *et al.* Asymmetric chelated Claisen rearrangements in the presence of chiral ligands - Scope and limitations. *Chem-Eur. J.* **2002**, 8, 1850.
359. Kazmaier, U.; Krebs, A. Synthesis Chiral Gamma,Delta-Unsaturated Amino-Acids by Asymmetric Ester Enolate Claisen Rearrangement. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1995**, 34, 2012.

360. Kazmaier, U. Diastereoselective Synthesis of Amino-Acids Containing Beta-Quaternary Carbon Centers Via Ester Enolate Claisen Rearrangement. *Synlett* **1995**, 1138.
361. Kazmaier, U. Synthesis of Unsaturated Amino-Acids by [3,3]-Sigmatropic Rearrangement of Chelate-Bridged Glycine Ester Enolates. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1994**, 33, 998.
362. Tsuji, J., *et al.* Organic syntheses by means of noble metal compounds XVII. Reaction of π -allylpalladium chloride with nucleophiles. *Tet. Lett.* **1965**, 6, 4387.
363. Trost, B. M.; Dietsch, T. J. New synthetic reactions. Asymmetric induction in allylic alkylations. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 8200.
364. Trost, B. M.; Fullerton, T. J. New synthetic reactions. Allylic alkylation. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 292.
365. Trost, B. M.; VanVranken, D. L. Asymmetric transition metal-catalyzed allylic alkylations. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 395.
366. Coudray, L., *et al.* Allylic phosphinates via palladium-catalyzed allylation of H-phosphinic acids with allylic alcohols. *Org. Lett.* **2008**, 10, 1123.
367. Bravo-Altamirano, K., *et al.* Palladium-catalyzed reactions of hypophosphorous compounds with allenes, dienes, and allylic electrophiles: Methodology for the synthesis of allylic H-phosphinates. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 2292.
368. Butti, P., *et al.* Palladium-Catalyzed Enantioselective Allylic Phosphination. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2008**, 47, 4878.
369. Favier, I., *et al.* Efficient recycling of a chiral palladium catalytic system for asymmetric allylic substitutions in ionic liquid. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 7869.
370. Maezaki, N., *et al.* Stereodivergent synthesis of 1,4-bifunctional compounds by regio- and diastereoselective Pd-catalyzed allylic substitution reaction. *Tetrahedron* **2006**, 62, 10361.
371. Konno, T., *et al.* Concise syntheses of nonracemic gamma-fluoroalkylated allylic alcohols and amines via an enantiospecific palladium-catalyzed allylic substitution reaction. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 1768.
372. Oehlschlager, A. C., *et al.* Metal-Catalyzed Rearrangements of Allylic Esters. *Can. J. Chem.* **1984**, 62, 791.
373. Kato, K., *et al.* Stereoselective synthesis of 4'-alpha-alkylcarbovir derivatives based on an asymmetric synthesis or chemoenzymatic procedure. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, 47, 1256.
374. Kumamoto, H., *et al.* Synthesis of (+/-)-4'-ethynyl and 4'-cyano carbocyclic analogues of stavudine (d4T). *Nucleos Nucleot Nucl* **2005**, 24, 73.
375. Dias, L. C., *et al.* Short synthesis of a new cyclopentene-1,3-dione derivative isolated from Piper carniconnectivum. *J. Brazil. Chem. Soc.* **2005**, 16, 482.
376. Mori, I., *et al.* Trimethylsilyl triflate promoted 1,4-addition of silyl phosphites to cyclic enones. *Tet. Lett.* **1997**, 38, 3543.
377. Zimmerman, H. E.; Wang, P. The α -Effect in the Stereochemistry of Kinetic Ketonization of Enols^{1,2}. *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, 68, 9226.
378. Minuti, L., *et al.* Synthesis of norborn-5-en-2-one and its homologue. *Synthetic Commun.* **2001**, 31, 707.
379. Matta, C. F., *et al.* The bioisosteric similarity of the tetrazole and carboxylate anions: Clues from the topologies of the electrostatic potential and of the electron density. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 1868.

Chapitre III : Détermination de la configuration du carbinol stéréogène

Chapitre III : Détermination de la configuration du carbinol stéréogène

III.1. Introduction

1.1. Contexte de la problématique

Depuis le début de ce projet, une multitude de composés a été préparée, ceux-ci portent une fonction acide phosphinique qui est primordiale pour les activités biologiques associées à ces agonistes. La série issue du **LSP4-2022** montre les meilleurs résultats pharmacologiques. Ces composés acides α -hydroxy-phosphiniques ont tous été obtenus sous forme d'un mélange de deux diastéréomères par une voie de synthèse générale que nous avons présentée dans le chapitre **I.2.6.1**. Effectivement, le carbone de l'acide aminé (*S*), issu de la vinylglycine protégée commerciale, est énantiomériquement pur. En revanche, lors de l'étape clé, c'est-à-dire l'addition de l'acide H-phosphinique "**P-H_{int}**" sur la fonction aldéhyde (Schéma **III-1**), l'addition du phosphore se fait équitablement sur les deux faces de l'aldéhyde. Nous obtenons alors un nouveau centre stéréogène qui n'est pas contrôlé avec 50% de (*R*) et 50 % de (*S*). Or, nous avons pu remarquer dans le chapitre précédent que ce groupement hydroxyle jouait un rôle important dans l'activité de nos molécules.

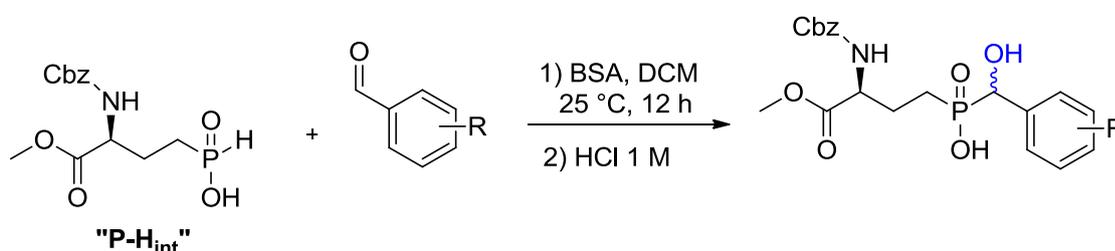


Schéma **III-1** Étape clé de la synthèse des dérivés aromatiques

Les tests *in vitro* et *in vivo* de ces composés (notamment du **LSP1-2111**) ont toujours été effectués sur ces mélanges de diastéréomères. Il est donc essentiel de contrôler la configuration de ce carbinol afin de pouvoir obtenir les deux diastéréomères séparément et de pouvoir tester leur activité. Il est important de préciser que les deux diastéréomères des composés finaux ne sont pas distinguables par RMN (proton et phosphore) lorsqu'on analyse les mélanges obtenus malgré l'éloignement important entre les deux carbones stéréogènes. De plus, on observe une seule tâche par chromatographie sur couche mince ; ils se comportent comme un couple d'énantiomères.

1.2. Importance de la stéréochimie des biomolécules

1.2.1. La chiralité : un outil essentiel

De nombreuses molécules, simples ou complexes, possédant des structures images miroir l'une de l'autre, non superposables sont nommées énantiomères. Cette propriété fut découverte par Pasteur à la fin des années 1840^{380,381} grâce au dédoublement du tartrate de sodium et d'ammonium. Ce principe structural est très important en chimie car deux énantiomères peuvent avoir des propriétés différentes, odeurs, goûts et activités biologiques. Le premier exemple illustrant une différence de propriété de deux énantiomères a été mis en avant par Piutti en 1894 qui a remarqué que la (D)-asparagine possédait un goût sucré alors que l'énantiomère (L) était insipide (Figure III-1).³⁸²

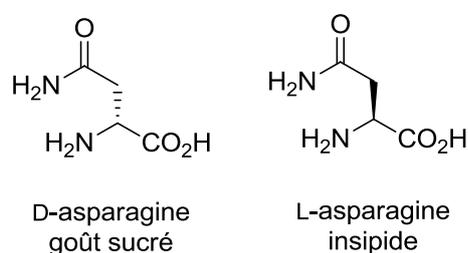
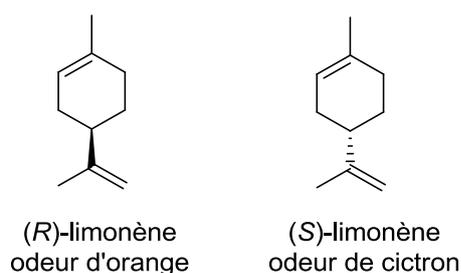


Figure III-1 Structures de la D-asparagine et la L-asparagine

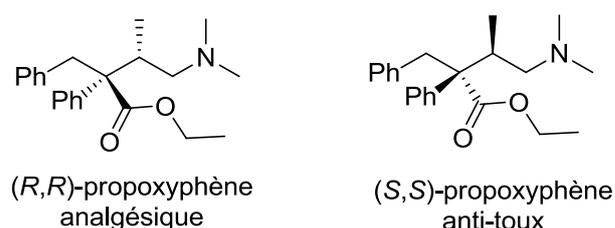
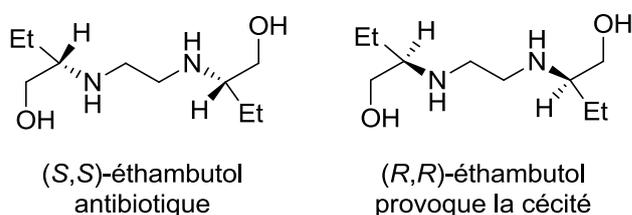
Autre exemple que l'on peut citer, les deux énantiomères du limonène possèdent des odeurs différentes. Le composé (*R*) destroyre a une odeur d'orange alors que le (*S*) lévogyre a une odeur de citron (Figure III-2).

Figure III-2 Structures du (*R*)-limonène et du (*S*)-limonène

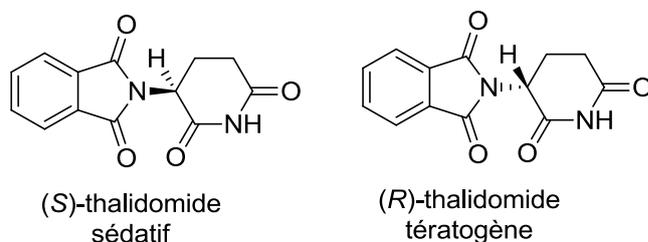
Deux énantiomères peuvent surtout posséder des propriétés biologiques complètement différentes.

1.2.2. Activités biologiques différentes

Effectivement, dans l'industrie des médicaments, il existe plusieurs cas où un énantiomère est actif sur une cible biologique alors que l'autre ne l'est pas ou bien est actif sur une autre cible voir même tératogène.³⁸³ Par exemple, le (*R,R*)-propoxyphène est un composé analgésique (retiré du marché à la fin des années 2000 car mortel en cas de forte dose) alors que son énantiomère (*S,S*) est utilisé pour traiter la toux (Figure III-3). Nous pouvons citer également le (*S,S*)-éthambutol, un antibiotique utilisé contre la tuberculose alors que son énantiomère (*R,R*) est quand à lui nocif ; il provoque des déficiences visuelles chez certains patients (Figure III-4).


 Figure III-3 Structures du (*R,R*)-propoxyphène et du (*S,S*)-propoxyphène

 Figure III-4 Structures du (*S,S*)-éthambutol et du (*R,R*)-éthambutol

Bien évidemment, nous pouvons rappeler le cas du thalidomide que nous avons déjà évoqué dans le chapitre II.4.1. où seul le composé (*S*) possède des propriétés sédatives alors que le composé (*R*) est tératogène (Figure III-5).³⁰⁶


 Figure III-5 Structures du (*S*)-thalidomide et du (*R*)-thalidomide

III.2. Résultats préliminaires

Le projet consistant à obtenir séparément les deux diastéréomères de nos composés actifs fut initié avant le début de ma thèse et fut l'objet d'une partie des travaux de recherche d'Isabelle Lemasson. Nous allons tout d'abord présenter les premières stratégies développées.

2.1. Introduction d'un troisième centre asymétrique

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction de ce chapitre, les composés finaux sous forme de deux diastéréomères se comportent comme un couple d'énantiomères. Généralement, pour séparer deux énantiomères d'un mélange racémique, on introduit une nouvelle chiralité afin de former un mélange de diastéréomères séparables par des méthodes chromatographiques. C'est cette idée qui a été adoptée pour séparer les deux diastéréomères du composé **LSP1-2093** (Schéma III-2).

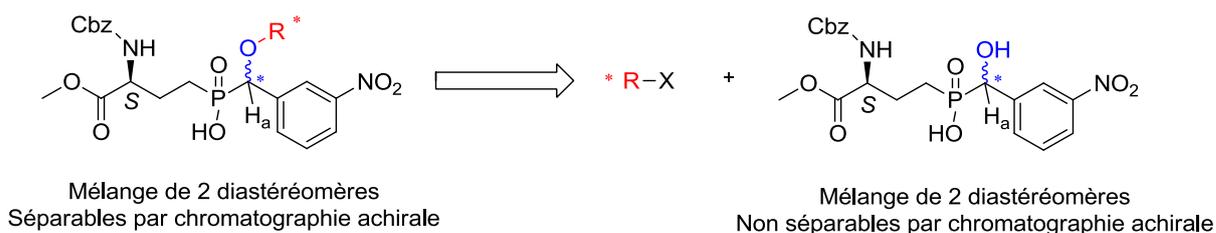


Schéma III-2 Introduction d'un troisième centre asymétrique afin de séparer les diastéréomères

L'objectif est donc d'insérer une copule chirale sur la fonction hydroxyle par estérification afin d'obtenir deux centres chiraux très proches en espérant pouvoir séparer les deux diastéréomères obtenus. Cette étape s'effectue après l'addition du "**P-H_{int}**" sur la fonction aldéhyde mais avant la déprotection en milieu acide de l'acide phosphinique afin de travailler sur une molécule soluble dans des solvants organiques contrairement aux composés finaux qui sont totalement insolubles dans les solvants classiques utilisés pour des réactions de chimie organique.

Les six copules chirales utilisés sont le chlorure de 1-adamantanecarbonyle, le chlorure du (1*S*)-(-)-camphanic,³⁸⁴ l'acétate de (2*S*)-chloro-1-oxo-2-propanyle, l'acide de Mosher (*R*), le (*S*)-acétyllactate et la (*S*)-*N*-acétylalanine (Figure III-6).

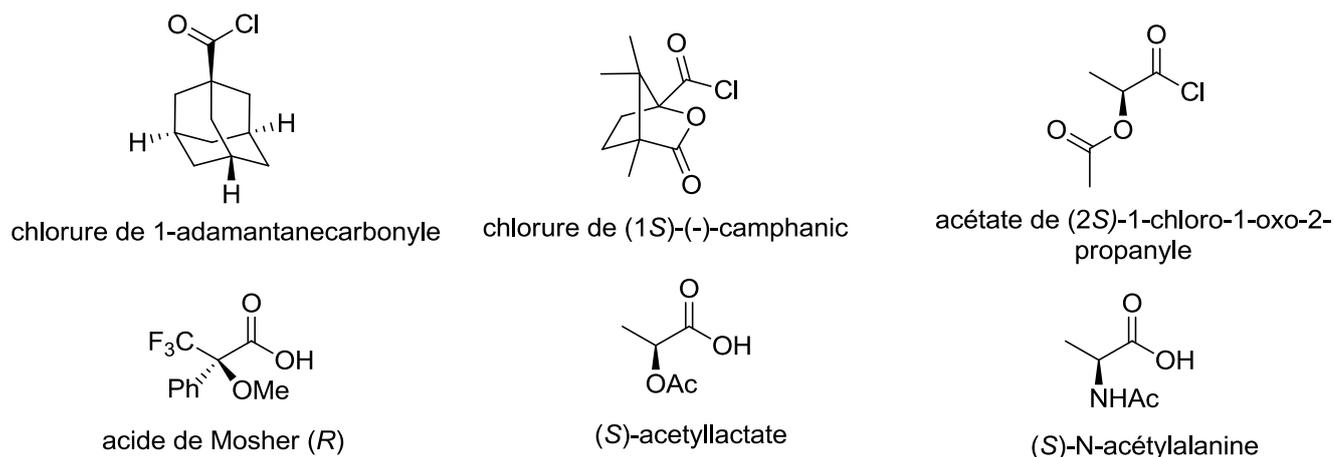


Figure III-6 Structures des copules chirales utilisées

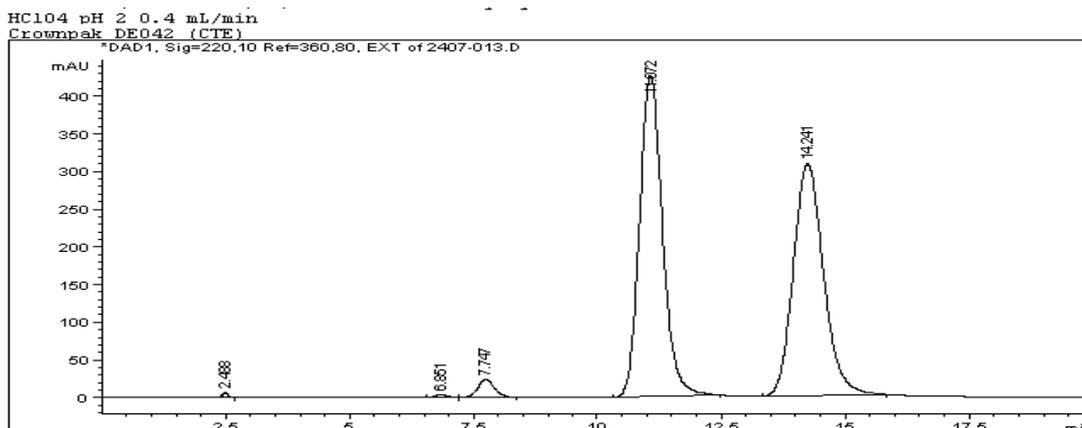
Les copules chirales sont introduites sur l'hydroxyle en α de la fonction phosphinique en utilisant des conditions classiques de couplage peptidique EDC/DMAP. L'objectif était donc de séparer les deux diastéréomères obtenus par chromatographie. Malheureusement, aucun des deux diastéréomères n'a été collecté, seuls des produits de dégradations sont observés. Cette stratégie fut donc abandonnée.

2.2. Méthode analytique : HPLC Crownpak

Il est aussi possible de séparer des énantiomères par le biais de la chromatographie chirale. Comme nos composés finaux se comportent comme des couples d'énantiomères, il était judicieux de tenter la séparation par HPLC chirale.

2.2.1. Chiral Technologies

Notre laboratoire a tout d'abord fait appel à une société nommée Chiral Technologies, qui comme son nom l'indique, est spécialisée dans le développement de méthodes chromatographiques chirales. Une colonne s'est révélée tout de suite très efficace pour séparer les deux diastéréomères du **LSP1-2093** : la colonne Crownpak CR(+) de Daicel (Figure III-7).



Colonne Crownpak CR(+) 150 x 4 mm, éluant HClO₄, pH 2, débit 0.4 mL.min⁻¹, T = 25°C

t_R dia I = 11,7 min , t_R dia II = 14,2 min

Figure III-7 Spectre du **LSP1-2093** de Chiral Technologies

Sur le spectre, on observe bien la présence des deux diastéréomères du **LSP1-2093** (Figure III-8). Le premier composé élué est nommé **LSP1-2093 dia I** et le second **LSP1-2093 dia II**.

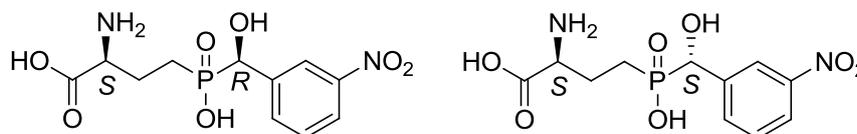


Figure III-8 Structures des diastéréomères du **LSP1-2093**

Cette colonne chirale fut développée par Shinbo *et al.*³⁸⁵ afin de séparer des acides α -aminés racémiques. La phase stationnaire de cette colonne est composée d'éthers couronnes reliés à un binaphthyle chiral (Figure III-9). La colonne CR(+) permet de séparer les acides aminés (*S*) car ces derniers sont plus retenus par la phase stationnaire que les acides aminés (*R*). Inversement, la colonne CR(-) sera utilisée pour séparer les énantiomères (*R*). Un inconvénient majeur est à signaler dans l'utilisation de cette colonne ; la phase stationnaire est liée à une silice C18 (support phase inverse) par interaction hydrophobe. Cela signifie que les solvants utilisés en tant qu'éluant ne peuvent pas être des solvants organiques (la phase mobile ne doit pas contenir plus de 15% de méthanol).^{386,387}

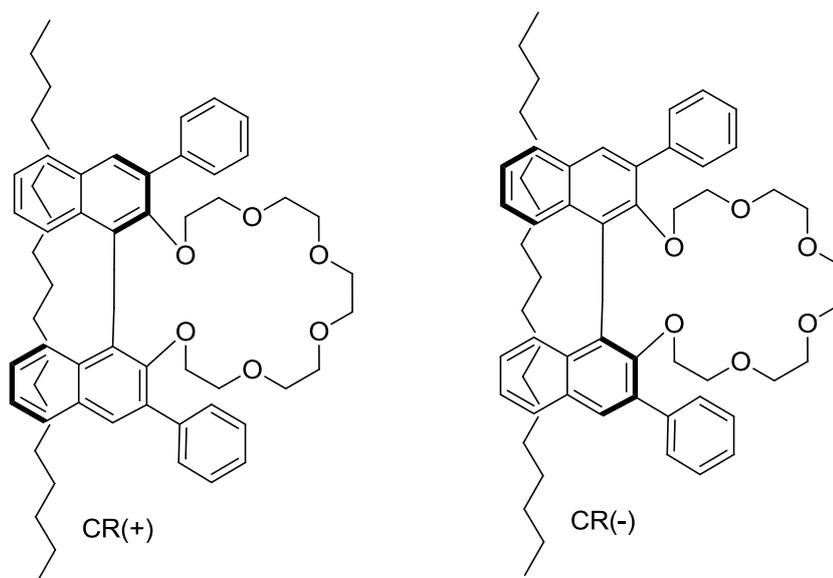


Figure III-9 Structure de la phase stationnaire des colonnes Crownpak CR(+) et CR(-)

L'interaction entre les acides aminés et la phase stationnaire se fait par liaison hydrogène (trois liaisons $^+N-H \cdots O$)³⁸⁸ entre l'ammonium de l'acide aminé et les six oxygènes de l'éther couronne.³⁸⁹⁻³⁹¹ Ce mécanisme de liaison, essentiel pour la discrimination des acides aminés, a été prouvé par RMN^{392,393} et cristallographie aux rayons X.³⁹⁴ Afin de faciliter les liaisons hydrogènes, un acide est ajouté à la phase mobile de façon à ce que les amines soient sous forme d'ammonium. Cependant, il existe une limite à ces colonnes Crownpak, la taille de la cavité. Cette dernière est assez faible et ne peut accueillir que des amines primaires et par conséquent que des acides aminés possédant un hydrogène sur le carbone en α de l'acide aminé. Parmi les acides aminés naturels, seule la proline ne peut-être résolue sur ce type de colonne.

Cette colonne est aussi adaptée pour d'autres composés que les acides aminés naturels. Effectivement, plusieurs études ont montré l'efficacité de cette colonne dans la résolution d'énantiomères d'acides aminés non naturels comme des analogues de phénylalanine³⁹⁵ ou de glutamate³⁹⁶, d'aminoalcools^{397,398} ou encore d'amines primaires³⁹⁸ et notamment des acides β -aminés^{399,400}. Par la suite, plusieurs résolutions énantiomériques de médicaments ont pu être mises au point.⁴⁰¹ Nous pouvons citer celles du Baclofène⁴⁰² (relaxant musculaire), de la Primaquine (antipaludéen), de l'aminoglutéthimide (anesthésique), de la Gemifloxacin⁴⁰³ (antibactérien) ou encore de la DOPA, dont son isomère (L) est utilisé pour traiter la maladie de Parkinson (Figure III-10).

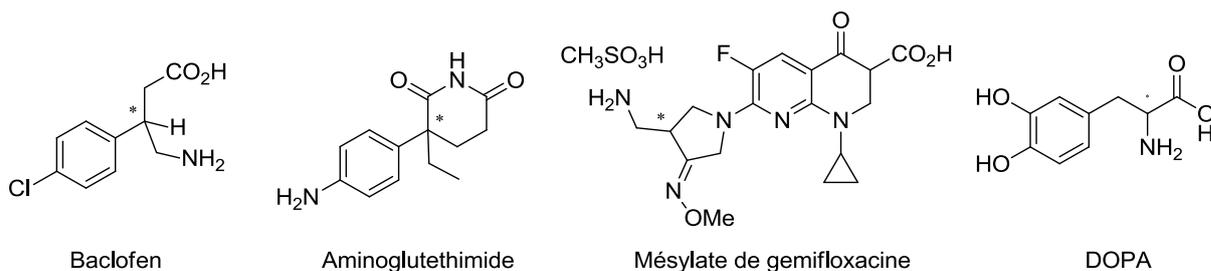


Figure III-10 Exemples de médicaments résolus par une colonne Crownpak

Les produits les mieux retenus contiennent, en général, des groupements lipophiles et notamment aromatiques afin de former des liaisons hydrophobes π - π avec les motifs naphthyles de la phase stationnaire.³⁸⁸ Ce qui est un avantage pour nos composés qui possèdent un noyau aromatique. La discrimination chirale de tous les exemples décrits montre que le centre chiral à discriminer est souvent très proche de l'ammonium terminal ancré dans l'éther couronne (à part pour l'aminoglutethimide). Pour nos composés, la distance entre la fonction acide aminé et le centre stéréogène en α du phosphinate est assez grande. Nous pensons que ce sont ces interactions π - π entre le noyau aromatique du **LSP1-2093** et le motif binaphtyle qui engendre la structure du complexe analyte-phase stationnaire favorable à la discrimination des deux diastéréomères du **LSP1-2093** (Figure III-11).

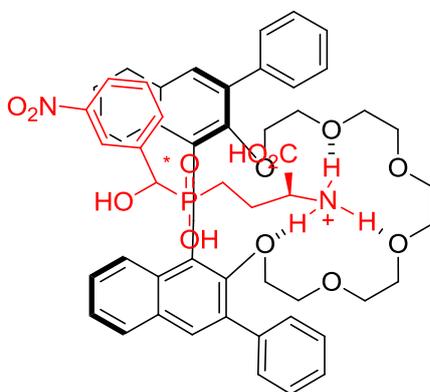
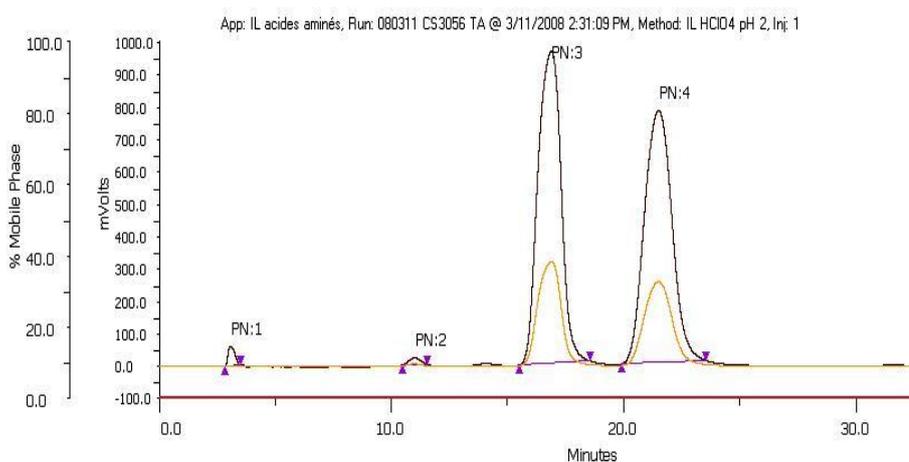


Figure III-11 Supposition de la structure du complexe formé entre le **LSP1-2093** et la phase stationnaire de la colonne CR(+)

2.2.2. Séparation des diastéréomères du **LSP1-2093** au laboratoire

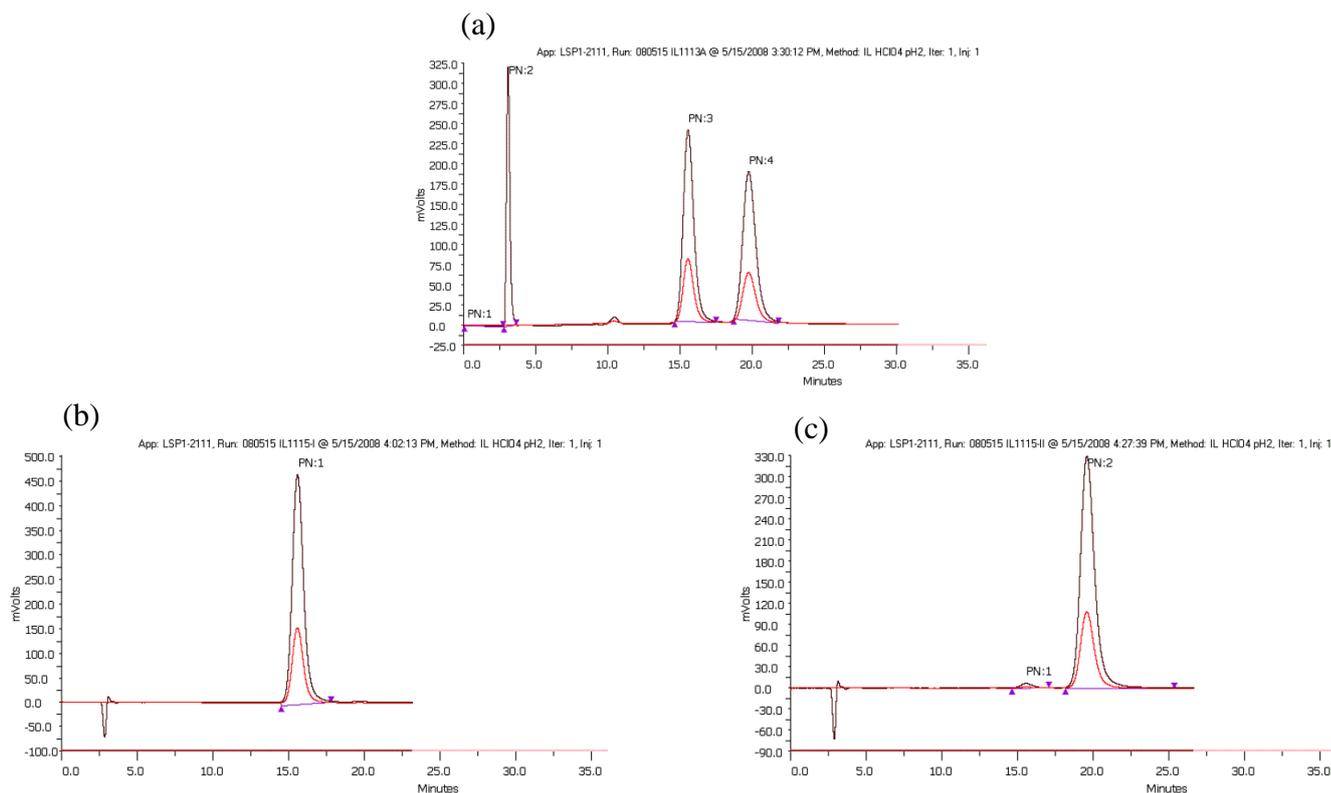
Notre laboratoire a alors optimisé les conditions de séparation utilisées par Chiral Technologies afin de pouvoir appliquer cette méthode chromatographique au laboratoire. De plus, nous possédions déjà deux colonnes Crownpak CR(+) : une colonne analytique et une colonne semi-préparative. La première chose a été de reproduire cette méthode en utilisant exactement les conditions définies par Chiral Technology qui nous a permis une séparation aussi efficace (Figure **III-12**).



Colonne Crownpak CR(+) 150 x 4 mm, éluant HClO₄, pH 2, débit 0.4 mL.min⁻¹, T = 21 °C t_R
dia I = 16.9 min , t_R dia II = 21.5 min

Figure **III-12** Spectre du **LSP1-2093** obtenu avec la CR(+)

L'objectif était alors d'adapter ces conditions à la colonne semi-préparative afin de pouvoir obtenir une quantité suffisante de chaque diastéréomère afin de les tester séparément. Après quelques mises au point, Isabelle Lemasson a réussi à séparer les deux isomères de **LSP1-2093** dans des quantités suffisantes pour les tests *in vitro*. Une fois les deux composés obtenus, leur pureté énantiomérique a été vérifiée à l'aide de la colonne CR(+) analytique (Figure **III-13**).



Colonne Crownpak CR(+) 150 x 4 mm, éluant HClO₄, pH 2, débit 0.4 mL.min⁻¹, T = 21 °C

Figure III-13 Séparation des diastéréomères du **LSP1-2093** obtenu avec la CR(+)

(a) spectre du **LSP1-2093** ; (b) spectre du **LSP1-2093-I**, $t_R = 15,6$ min ; (c) spectre du **LSP1-2093-II**, $t_R = 19,8$ min

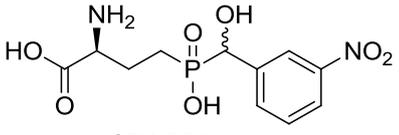
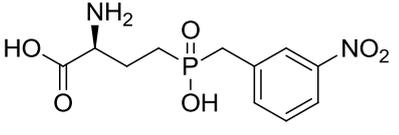
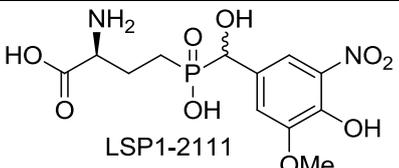
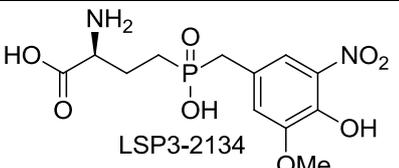
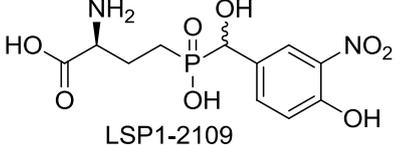
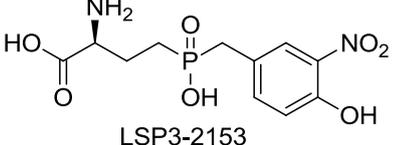
Le premier diastéréomère dia I a été nommé **LSP1-2093-I** et le second **LSP1-2093-II**. Les spectres de masse de ces deux diastéréomères sont parfaitement identiques et les spectres RMN ³¹P sont superposables. La seule différence est visible sur les spectres RMN ¹H. En effet, lorsqu'on analyse ces deux isomères séparément, nous pouvons remarquer que les protons méthyléniques en α de l'acide phosphinique du **LSP1-2093** donnent pour le dia I un unique multiplet à 1,83 ppm et pour le dia II deux doublets à 1,78 ($J_{H-P} = 12.0$ Hz) et 1,94 ppm ($J_{H-P} = 11.7$ Hz). Les pouvoirs rotatoires sont aussi différents avec une valeur de $[\alpha]_D^{20} = -2$ (c = 0.6, H₂O) pour le dia I et $[\alpha]_D^{20} = +29$ (c = 0.6, H₂O) pour le dia II.

Le développement d'une méthode analytique de séparation des deux diastéréomères du **LSP1-2093** en utilisant une colonne chirale Crownpak CR(+) fut un réel succès. Les résultats pharmacologiques seront discutés au chapitre III.2.2.4.

2.2.3. Applications à d'autres composés

Cette méthode fut alors appliquée à d'autres mélanges de diastéréomères et plus particulièrement aux composés porteurs de nitrophénols (lors de cette étude, le **LSP4-2022** n'était pas encore découvert). De plus, la présence d'un carbinol stéréogène en α de l'acide phosphinique a plus ou moins d'importance sur l'activité selon les substituants présents sur le cycle aromatique. Effectivement, comme nous pouvons le remarquer dans le tableau **III-1**, la présence ou non d'une fonction hydroxyle joue un rôle important pour les composés nitrophénols **LSP1-2111** et **LSP1-2109** alors que très peu pour les composés ne comportant pas de fonction hydroxyle sur le cycle aromatique (**LSP1-2093**).

Tableau **III-1** Importance de la fonction α -hydroxyle sur les dérivés nitrés

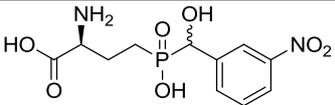
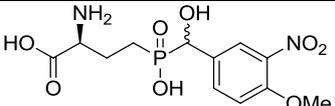
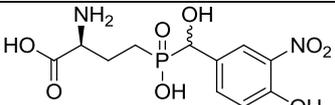
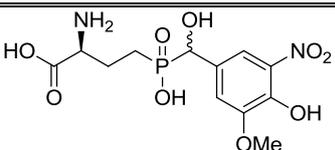
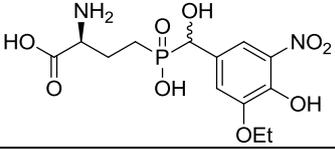
Dérivé avec α -hydroxyle	EC ₅₀ (μ M) mGlu4	Dérivé sans α -hydroxyle	EC ₅₀ (μ M) mGlu4
 LSP1-2093	0,55 \pm 0,06 (n=19)	 LSP3-1045	0,82 \pm 0,20 (n=5)
 LSP1-2111	2,45 \pm 0,79 (n=4)	 LSP3-2134	19,02 \pm 6,11 (n=3)
 LSP1-2109	1,54 \pm 0,42 (n=8)	 LSP3-2153	24,40 \pm 3,93 (n=3)

Nous avons donc choisi d'appliquer cette méthode analytique de séparation des diastéréomères aux composés pour lesquels la présence du carbinol stéréogène en α de l'acide phosphinique est indispensable à l'activité et notamment le **LSP1-2111** qui a montré des résultats *in vivo* très encourageants (Chapitre **I** et Annexe **2**). Cinq couples de diastéréosiomères ont alors pu être séparés en utilisant la même méthode en faisant quelques mises au point en fonction des composés respectifs.

2.2.4. Activités biologiques

Ces 10 composés, issus de la colonne CR(+) semi-préparative ont pu être testés *in vitro* sur les cellules HEK 293. Les résultats sont regroupés dans le tableau **III-2**.

Tableau **III-2** Activités biologiques des différents isomères séparés par HPLC chirale

Structure	Nom	EC ₅₀ (μM)		mGlu8 / mGlu4
		mGlu4	mGlu8	
	LSP1-2093	1.80 ± 0.15 (n=6)	2.30 ± 0.36 (n=10)	2
	LSP1-2093-I	1.09 ± 0.46 (n=4)	1.25 ± 0.30 (n=5)	1
	LSP1-2093-II	0.32 ± 0.10 (n=3)	1.29 ± 0.50 (n=5)	4
	LSP1-2101	3.45 ± 1.31 (n=3)	3.77 ± 1.06 (n=3)	1
	LSP1-2101-I	2.05 ± 0.41 (n=3)	2.48 ± 0.86 (n=3)	1
	LSP1-2101-II	1.74 ± 0.63 (n=3)	2.25 ± 0.64 (n=3)	1
	LSP1-2109	1.54 ± 0.42 (n=8)	73.56 ± 8.39 (n=6)	48
	LSP1-2109-I	0.51 ± 0.05 (n=4)	31.43 ± 8.01 (n=4)	61
	LSP1-2109-II	4.49 ± 0.21 (n=3)	39.80 ± 6.53 (n=4)	9
	LSP1-2111	2.45 ± 0.79 (n=7)	42.77 ± 12.02 (n=6)	37
	LSP1-2111-I	0.72 ± 0.08 (n=6)	17.72 ± 5.47 (n=7)	25
	LSP1-2111-II	4.37 ± 0.46 (n=6)	25.83 ± 8.81 (n=9)	6
	LSP3-1145	8.54 ± 1.12 (n=3)	20.41 ± 13.35 (n=3)	2
	LSP3-1145-I	5.13 ± 1.21 (n=3)	22.51 ± 21.10 (n=3)	4
	LSP3-1145-II	6.45 ± 2.38 (n=3)	6.53 ± 3.07 (n=3)	1

En fonction de ces données pharmacologiques, nous pouvons classer ces 5 composés en 2 groupes. Le premier groupe est composé de **LSP1-2093**, **LSP1-2101** et **LSP3-1145**. Nous remarquons que pour ces trois molécules, il n'y a aucune différence d'activité entre les deux diastéréomères. Pour les deux premiers composés **LSP1-2093** et **LSP1-2101**, sans fonction phénol, cette constatation est en accord avec le fait déjà constaté que la présence ou non d'une fonction hydroxyle ne modifie pas l'activité de ces molécules. Pour le troisième composé **LSP3-1145**, nous pensons que le groupement éthoxyle plus encombré pourrait modifier l'influence du carbinol stéréogène. Le second groupe est composé du **LSP1-2109** et du **LSP1-2111**. On remarque une différence significative d'activité entre les deux diastéréomères avec un dia I plus actif. On observe également des sélectivités vis-à-vis du récepteur mGlu8 comparables aux mélanges des deux isomères. Nous avons remarqué au préalable que pour ces deux composés la fonction hydroxyle stéréogène était indispensable à l'activité biologique ce qui est corroboré par la différence d'activité des deux diastéréomères.

2.2.5. Bilan de cette méthode

Plusieurs enseignements importants ressortent de cette étude. Tout d'abord, Isabelle Lemasson a réussi à séparer 5 couples de diastéréomères avec une colonne chirale Crownpak CR(+). Plusieurs paramètres ont dû être pris en compte et optimisés car selon les substituants sur le cycle aromatique des composés, les conditions de séparation sont légèrement différentes.

Par ailleurs les activités biologiques des diastéréomères testés seuls corrèlent parfaitement avec les premières constatations. Effectivement, on observe une différence d'activité entre deux diastéréomères lorsque la présence d'une fonction hydroxyle est importante pour l'activité du ligand. C'est le cas pour le **LSP1-2111** et le **LSP1-2109**. En revanche, lorsque cette fonction n'apporte pas d'activité agoniste, on n'observe aucune différence entre les deux isomères, notamment pour le **LSP1-2093**.

Finalement, cette méthode analytique a un inconvénient majeur ; elle ne peut pas être appliquée à tous les composés synthétisés. Effectivement, lors de cette étude le **LSP4-2022** n'avait pas encore été découvert. Mais depuis, Delphine Rigault a essayé de séparer les diastéréomères de ce composé ainsi que des analogues de ce hit en utilisant cette méthode. Cependant, malgré plusieurs tentatives en optimisant les conditions, aucune séparation n'a abouti à l'obtention de diastéréomères purs.

Deux nouveaux objectifs découlent de cette étude. Tout d'abord, trouver une nouvelle méthode de séparation afin d'obtenir de plus grandes quantités de composé, nécessaire pour les tests *in vivo*.

Ensuite, il semble primordial de déterminer la configuration absolue des diastéréomères obtenus par cette méthode analytique. En effet, on a remarqué, pour le **LSP1-2111** qu'un isomère était six fois plus actif que l'autre. Il serait donc intéressant de connaître la configuration absolue de cet isomère, ce qui serait une avancée majeure dans la relation structure-activité de ces composés.

2.3. Autres stratégies

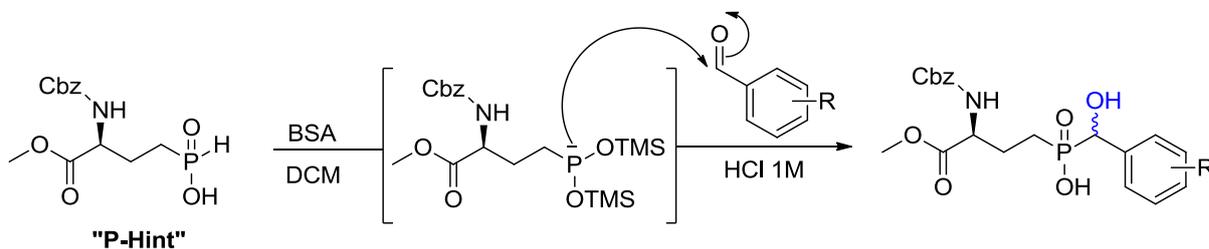
Détermination de la configuration spécifique du carbinol benzylique par rayon X

A partir des résultats obtenus précédemment et plus particulièrement de la séparation des deux isomères du **LSP1-2093**, notre laboratoire a tout d'abord cherché à déterminer la configuration absolue du carbinol stéréogène benzylique de chaque isomère. Cette identification pourrait nous permettre d'analyser plus précisément les interactions mises en jeu entre le ligand et le récepteur à l'aide de modèles moléculaires.

Des essais de cristallisation ont alors été tentés sur les composés **LSP1-2093-I** et **LSP1-2093-II** dans le but d'obtenir des monocristaux analysables par rayon X. La synthèse du **LSP1-2093** et la séparation de ces deux diastéréomères étant assez rapides, nous avons choisi de travailler sur ces deux composés. Plusieurs essais de cristallisation ont été réalisés en utilisant plusieurs mélanges de solvant, mais malheureusement, aucun cristal n'a été obtenu. Des essais de cristallisation sur le composé **LSP1-2111** ont également été tentés en utilisant la cinchonine comme auxiliaire chiral. Une nouvelle fois, aucun cristal ne fut obtenu. Bien que ces essais de cristallisation n'aient pas été beaucoup approfondis, les difficultés rencontrées nous ont poussés à changer de stratégie.

Addition stéréocontrôlée de l'acide phosphonique "**P-H_{int}**" sur la fonction aldéhyde

La configuration du carbinol benzylique pourrait être contrôlée durant la synthèse de ces composés. Comme nous l'avons déjà évoqué lors de l'introduction de ce chapitre, les composés sont obtenus par addition du "**P-H_{int}**" intermédiaire sur des aldéhydes aromatiques. L'addition du phosphore P^{III} intermédiaire se fait équitablement sur les deux faces, d'où le mélange de diastéréomères obtenu (Schéma **III-3**).

Schéma **III-3** Obtention d'un mélange de diastéréomères

L'objectif est donc de contrôler l'étape d'addition du "**P-H_{int}**" sur l'aldéhyde aromatique afin d'obtenir un seul diastéréomère. Cette étude sera réalisée sur la synthèse du **LSP1-2093**. Pour

contrôler l'addition de l'acide phosphinique, l'idée fut de synthétiser les phosphinates de menthyle (**III-1** et **III-2**) à partir du composé "P-H_{int}" et des deux composés (-)-menthol et (+)-néomenthol afin de rendre l'atome de phosphore chiral. Ces composés ont été obtenus en utilisant les conditions classiques de Mitsunobu (Schéma **III-4**).⁴⁰⁴⁻⁴⁰⁶

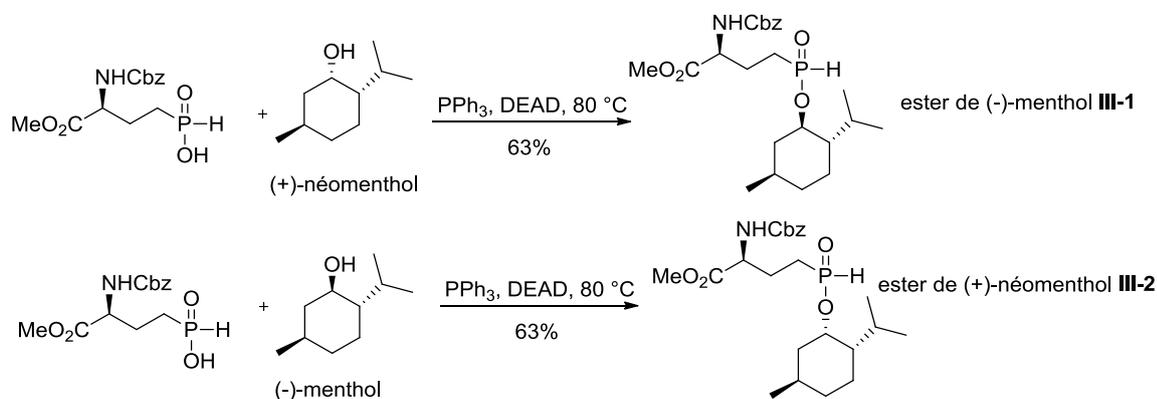


Schéma **III-4** Synthèses des esters de (-)-menthol **III-1** et de (+)-néomenthol **III-2**

L'étape suivante consistait à additionner ces deux phosphinates de menthyle sur le 3-nitrobenzaldéhyde en espérant obtenir un diastéréomère majoritaire comme l'a déjà décrit Cai *et al.*⁴⁰⁷ La plupart des essais ont été menés sur l'ester (+)-néomenthol **III-2** (Schéma **III-5**). Plusieurs conditions réactionnelles ont été tentées en utilisant les deux modes d'activation du phosphore (silylation avec la BSA ou déprotonation avec une base forte) mais les excès diastéréomériques observés n'ont jamais dépassés 11% en faveur de l'un des diastéréomères du **LSP1-2093**.

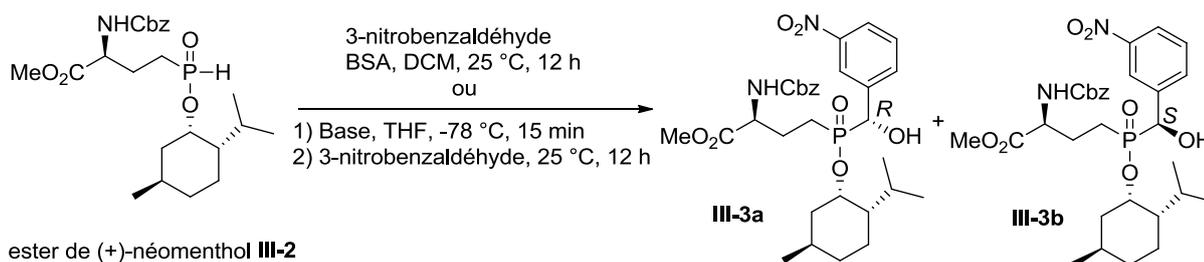


Schéma **III-5** Addition du phosphinate de (+)-néomenthol sur l'aldéhyde

Contrôle du carbinol benzylique avant la seconde alkylation du phosphore

La configuration du carbone benzylique n'ayant pas pu être contrôlée lors de l'addition du "P-H_{int}" sur l'aldéhyde, notre laboratoire a alors décidé de contrôler cette configuration avant d'introduire la partie acide aminée. Cette étude sera également réalisée sur le **LSP1-2093** (Schéma **III-6**).

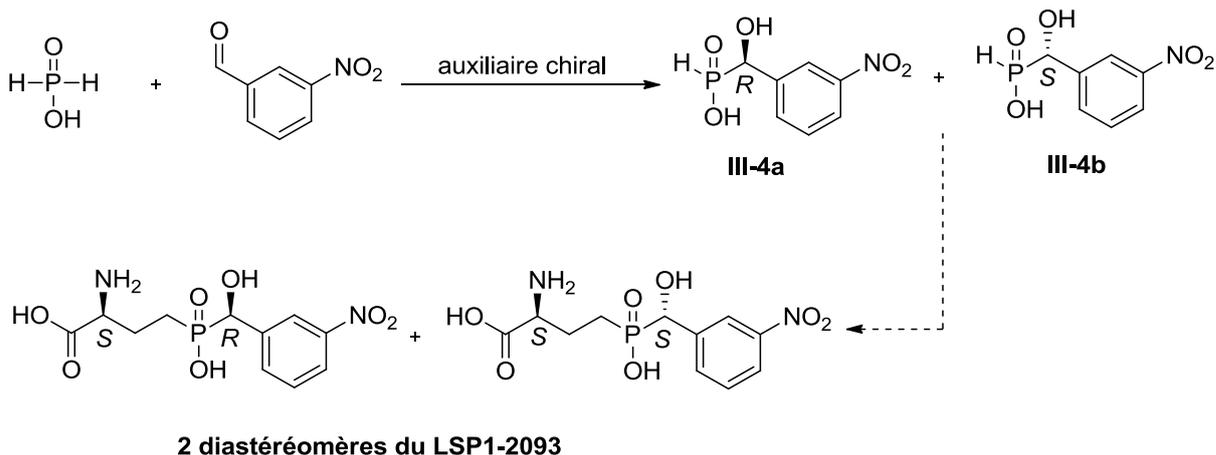


Schéma **III-6** Contrôle du carbinol benzylique avant l'introduction de la partie acide aminée

Ce changement de voie de synthèse est surtout étudié afin de pouvoir attribuer la configuration du carbone benzylique des deux diastéréomères du **LSP1-2093** ce qui permettra la corrélation par le biais de l'HPLC chirale CR(+) avec les pics des deux isomères **LSP1-2093-I** et **II**.

Cette nouvelle stratégie est inspirée des travaux de Yamagishi *et al.*⁴⁰⁸ (Schéma **III-7**) dans lesquels ils décrivent l'obtention d' α -hydroxy-phosphinates en présence de Al-Li-BINOL (ALB). Ces α -hydroxy-phosphinates sont ensuite oxydés en α -hydroxy-phosphonates dont la configuration absolue avait déjà été rapportée.⁴⁰⁹⁻⁴¹¹ Toutes ces études ont mis en évidence la corrélation qui existe entre le pouvoir rotatoire et la configuration absolue des alcools formés. En effet, les α -hydroxy-phosphonates qui possèdent un pouvoir rotatoire négatif sont de configuration (*S*).

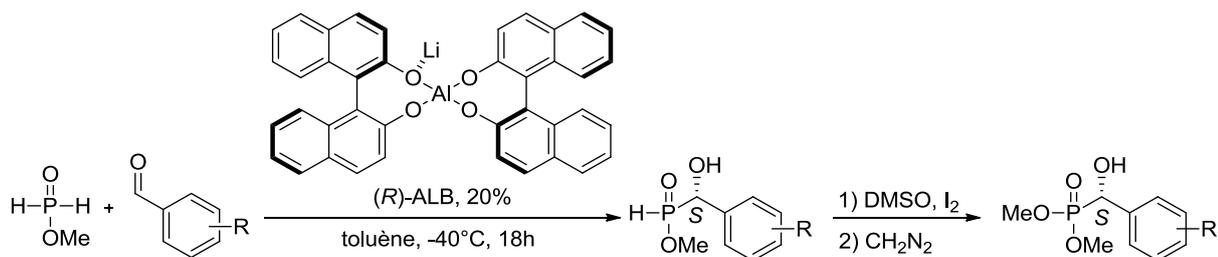


Schéma III-7 Synthèse asymétrique d'α-hydroxy-phosphinates catalysée au ALB

Isabelle Lemasson et Delphine Rigault ont alors utilisé les conditions de Yamagishi afin d'obtenir le phosphinate porteur du carbinol stéréogène (*S*). Une solution 0,1 M de catalyseur (*R*)-ALB dans le THF a tout d'abord été synthétisé en suivant le protocole d' Arai *et al.*⁴¹¹ Cette solution est alors ajoutée à -40 °C sur le phosphinate de méthyle (obtenu in situ à partir d'H₃PO₂ et de triméthyle orthoformate) dans le THF puis le 3-nitrobenzaldéhyde en solution dans le THF est additionné sur ce mélange réactionnel. L'analyse RMN ³¹P et ¹H du composé brut fait apparaître la présence de nombreux sous-produits. Des essais de purification ont alors été menés afin d'isoler le composé souhaité. Cependant, malgré de nombreuses tentatives, de réaction et de purification, l'alcool énantiopur n'a pu être obtenu.

2.4. Bilan des résultats préliminaires

Les premiers résultats obtenus par Isabelle Lemasson ont constitué une très bonne base de travail sur laquelle je me suis appuyé pour poursuivre les travaux de détermination de la configuration absolue du carbinol stéréogène.

L'HPLC chirale munie de la colonne Crownpak CR(+) est un outil de choix pour la séparation des diastéréomères et sera utilisée dans la suite de mes travaux afin d'établir une corrélation entre les diastéréomères appelés dia-I et dia-II et la configuration absolue du carbinol benzylique.

III.3. Attribution de la configuration absolue du carbinol benzylique

En se basant sur les résultats préliminaires obtenus par Isabelle Lemasson, nous avons réfléchi à de nouvelles stratégies permettant de contrôler la configuration du carbinol benzylique. Le motif aminoacide chiral sera couplé dans un deuxième temps (Voir Schéma III-6).

3.1. Données bibliographiques

Avant de vous présenter mes travaux de recherche sur ce sujet, intéressons-nous aux différentes méthodes d'accès aux dérivés du phosphore porteur d'un carbinol stéréogène en α décrites dans la littérature. La majorité des exemples est décrite sur des phosphonates. Or, il est important de signaler que la réactivité entre le motif phosphonate et phosphinate est vraiment différente.

Réduction stéréosélective d'acides α -céto-phosphiniques

Le carbinol stéréogène benzylique serait introduit par réduction stéréosélective d'acides α -céto-phosphiniques (Schéma III-8).

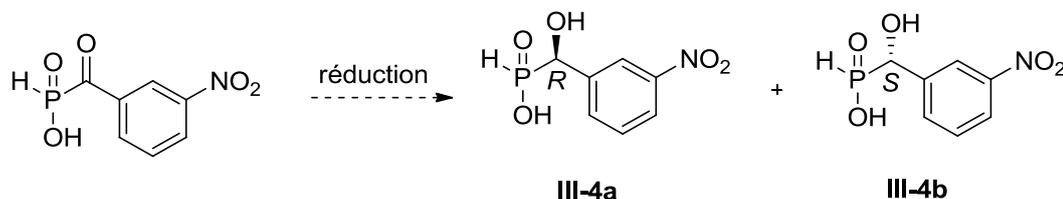


Schéma III-8 Réduction stéréosélective de l'acide (3-nitrobenzoyl)phosphinique

Quelques exemples de réduction stéréosélective sont recensés sur des phosphonates en utilisant soit différents agents de réduction chiraux tels que des boronates tartriques chiraux⁴¹² ou un complexe proline- NaBH_4 ,⁴¹³ soit des réducteurs non chiraux en présence de ligands chiraux comme des complexes de ruthénium avec des dérivés éthylènediamine⁴¹⁴ ou par hydrogénation pallado-catalysée en présence de (*R*)-BINAP (Tableau III-3).⁴¹⁵

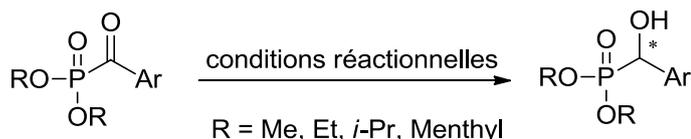
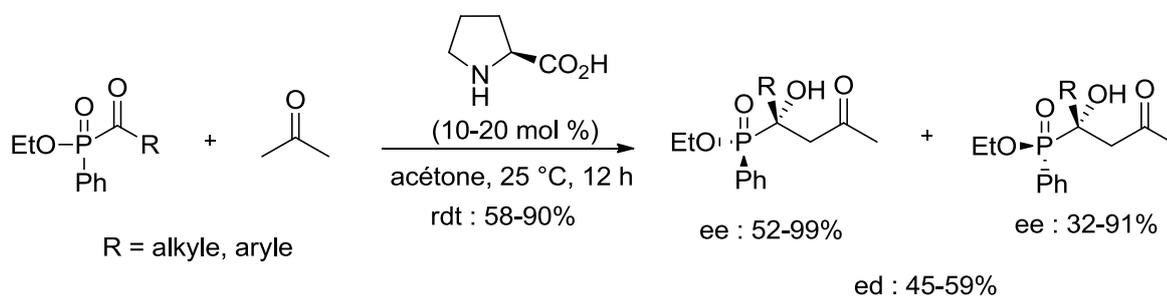


Schéma III-9 Réduction stéréosélective de benzylphosphonates dans la littérature

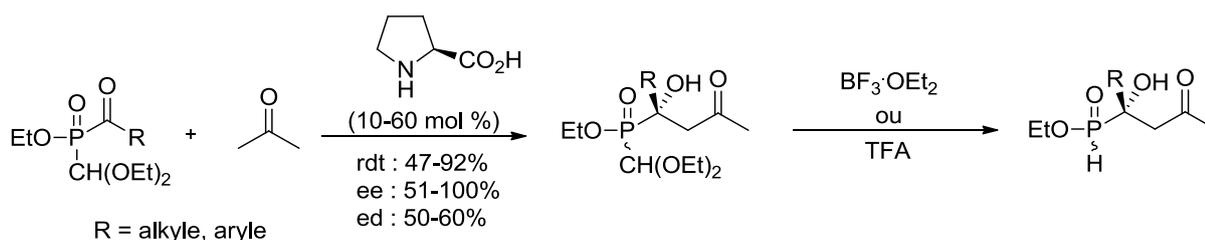
Tableau III-3 Conditions réactionnelles et sélectivité de réduction stéréosélective de phosphonates

conditions réactionnelles	rendement (%)	excès énantiomérique ee (%)
boronates chiraux	> 80	46-96
proline-NaBH ₄	70-74	75-80
complexes ruthénium + dérivés éthylènediamines	> 95	> 99
H ₂ /Pd, (<i>R</i>)-BINAP, 50 bars, 20 °C	99	22

Malheureusement, toutes ces conditions sont très efficaces avec, dans certains cas, de très bonnes sélectivités sur des phosphonates mais aucun exemple n'est décrit sur l'obtention d' α -hydroxy-H-phosphinates. Une seule méthode donnant accès à un motif phosphinate α -hydroxylé a été rapportée. Il s'agit de l'addition de l'acétone sur un α -acyl-phosphinate organocatalysée par la proline afin d'obtenir le motif α -hydroxy-phosphinate substitué (Schéma III-10).⁴¹⁶

Schéma III-10 Addition nucléophile stéréocontrôlée de l'acétone sur un α -acyl-phosphinate

Cette méthode a aussi été utilisée pour obtenir des H-phosphinates, ce qui aurait pu être très intéressant dans notre cas.⁴¹⁷ Pour cela, il suffit d'utiliser un phosphinate comportant un groupement diéthoxyméthyle facilement hydrolysé en milieu acide ou avec du BF₃·OEt₂ (Schéma III-11).

Schéma III-11 Synthèse de motif H-phosphinate de Yao *et al.*⁴¹⁷

Le problème de cette méthode est que l'on obtient un carbinol benzylique tertiaire donc pas applicable pour l'obtention de notre substrat.

Utilisation d'enzyme

La résolution enzymatique d' α -acétoxy-phosphinates racémiques a également été rapportée.^{418,419} La lipase ne va reconnaître qu'un seul diastéréomère et hydrolyser l'acétate pour obtenir un seul α -hydroxyphosphinate. Le second sera obtenu après hydrolyse acide de l'acétate du diastéréomère non reconnu par la lipase (Schéma **III-12**).

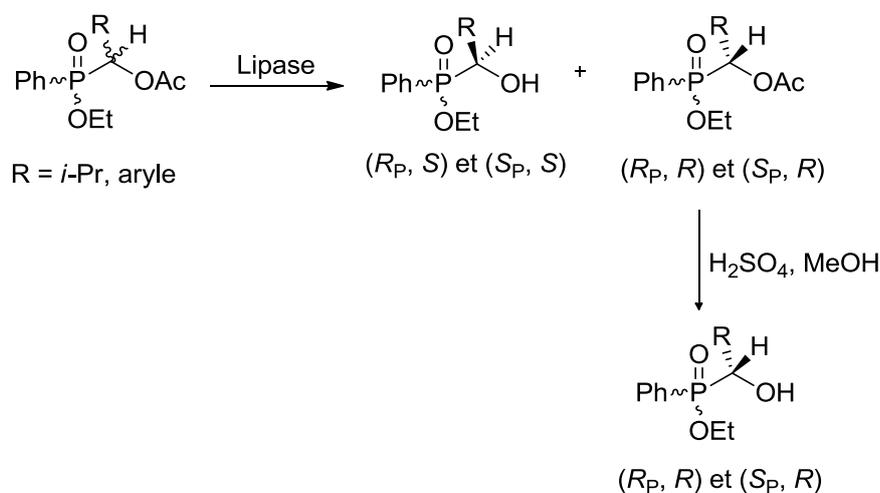


Schéma **III-12** Résolution enzymatique d' α -acétoxy-phosphinates

Cette méthode est limitée à certains substrats et la détermination de la configuration absolue du centre hydroxylé est difficile du fait de la présence de plusieurs diastéréomères ; le phosphore étant chiral. Shioji *et al.* ont alors utilisé la méthode de Mosher pour attribuer la configuration absolue du centre hydroxylé.^{420,421}

Nous pouvons conclure de ces données bibliographiques qu'il existe plusieurs méthodes de synthèse d' α -hydroxy-phosphonates énantiopurs de stéréochimie connue. Cependant, toutes ces méthodes ne sont pas forcément applicables aux phosphinates. Par ailleurs toutes ces méthodes utilisent des phosphonates ou phosphinates d'alkyles ou aryles. La voie de synthèse généralement utilisée pour l'obtention de nos composés biologiques de référence conserve la fonction acide phosphinique libre évitant ainsi des étapes d'estérification et d'hydrolyse. C'est une notion importante qu'il faut retenir pour nos futurs essais. Afin d'obtenir les acides α -hydroxy-phosphiniques chiraux, nous nous sommes alors tournés vers des méthodes de résolution en présence d'un agent de résolution chiral. Notre idée était d'obtenir des cristaux

énantiopurs pour un des diastéréomères formés et de déterminer la configuration du carbinol stéréogène benzylique par diffraction des rayons X.

3.2. Attribution de la configuration absolue du carbinol benzylique de l'acide α -hydroxyle - H-phosphinique **III-4a** par cristallographie aux rayons X

Tout d'abord, nous avons synthétisé l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique racémique **III-4** à partir de l'acide hypophosphoreux et du 3-nitrobenzaldéhyde. En présence de 5 équivalents de BSA, le composé racémique est obtenu après 12 h d'agitation dans le DCM à 25 °C avec 54% de rendement (Schéma **III-13**).

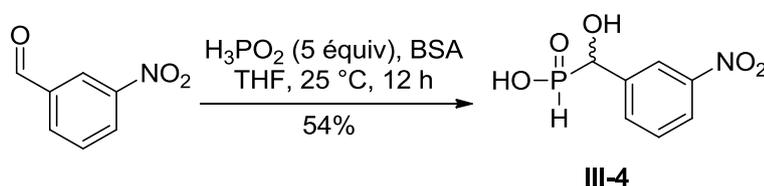


Schéma **III-13** Synthèse de l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique racémique **III-4**

Nous nous sommes inspirés des travaux de Vitharana *et al.*⁴²² et de Kaboudin *et al.*⁴²³ dans lesquels ils décrivent la résolution d' α -hydroxy-phosphinates avec la (*R*)-1-phenylethylamine. Le composé racémique **III-4** est alors additionné à la (*S*)-1-phenylethylamine dans un mélange MeOH/MeCN (1 :1). Après 24 heures, le solide obtenu est filtré et traité dans le MeOH en présence de résine Dowex conduisant à l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique énantiomériquement pur. La procédure est reconduite avec la (*R*)-1-phenylethylamine pour obtenir l'autre énantiomère (Schéma **III-14**).

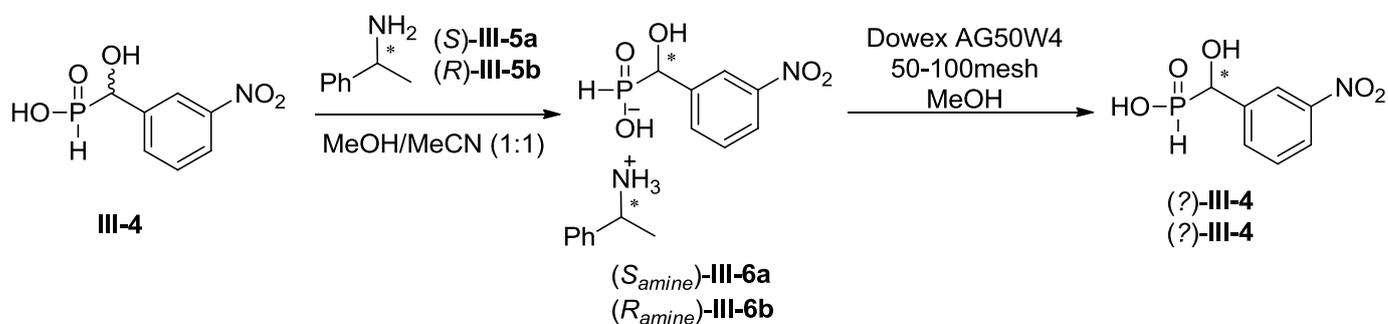


Schéma **III-14** Résolution de l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique racémique **III-4** avec la (*S*)-1-phenylethylamine et la (*R*)-1-phenylethylamine

Les spectres RMN (^1H , ^{13}C et ^{31}P) et de masse de ces deux énantiomères sont identiques. La seule différence est observée au niveau du pouvoir rotatoire. Effectivement, le composé obtenu avec l'amine (*S*) possède un pouvoir rotatoire de $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -27,4$ ($c = 2,0$, MeOH) alors que celui issu de l'amine (*R*) est de $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +27,1$ ($c = 2,0$, MeOH). Nous obtenons bien deux énantiomères. Leur pureté énantiomérique sera déterminée ultérieurement.

La détermination de la configuration absolue du centre hydroxylé a été réalisée par analyse de la structure aux rayons X du sel d'ammonium avant traitement par la résine Dowex. En effet en prenant comme référence la stéréochimie de l'amine utilisée, nous pourrions déduire celle du carbinol benzylique. L'obtention de monocristaux a nécessité une forte mise au point des conditions de cristallisation menées sur le sel obtenu avec l'amine (*S*). Plusieurs solvants (*i*-PrOH, EtOH, DMF, eau, éther, hexane) et mélanges de solvant (MeOH/MeCN et MeOH/pentane) ont été testés afin de trouver le meilleur compromis entre vitesse de cristallisation et qualité des cristaux. Finalement, l'utilisation d'éthanol seul conduit après dissolution de 7 mg du sel dans 2 mL de ce solvant à reflux puis placement au réfrigérateur à des monocristaux qui ont été analysés par rayon X en collaboration avec le Pr. Alain Tomas et le Dr. Patrick Deschamps du laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques à l'Université Paris Descartes et le Dr. Pascal Roussel de l'ENSC à Lille. Nous avons pu obtenir le cliché suivant (Figure III-14).

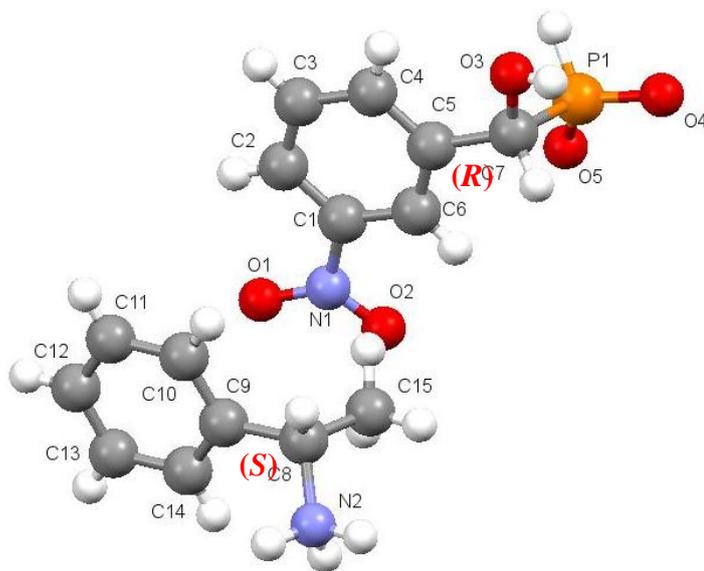


Figure III-14 Structure obtenue par rayon X de l'acide (*S*)-1-phenylethanaminium (*R*)-[α -hydroxy-(*m*-nitrophenyl) methyl]phosphinique III-6a

L'estérification avec le (-)-menthol rend le phosphore chiral. Nous sommes donc en présence de 4 stéréomères avec en RMN ^{31}P la présence de 4 pics à 27,24, 30,53, 32,13 et 35,13 ppm (Figure **III-15**). Au niveau des intégrations, on remarque que l'on obtient à peu près 25% de chaque isomère.

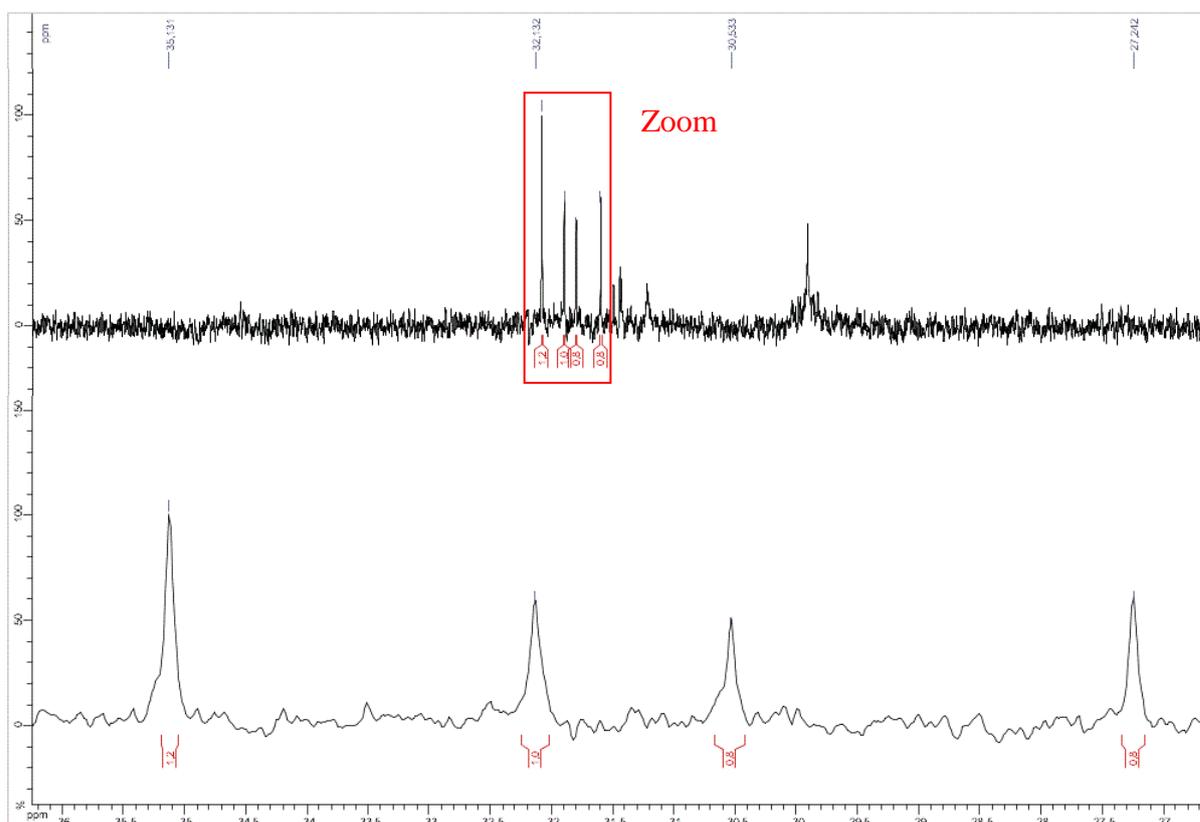


Figure **III-15** Spectre RMN ^{31}P des quatre stéréomères **III-7a**, **III-7a'**, **III-7b** et **III-7b'**

Les mêmes conditions d'estérification ont alors été reproduites sur l'énantiomère **III-4a** de configuration (*R*), obtenu par cristallisation avec la (*S*)-1-phenylethylamine (Schéma **III-16**).

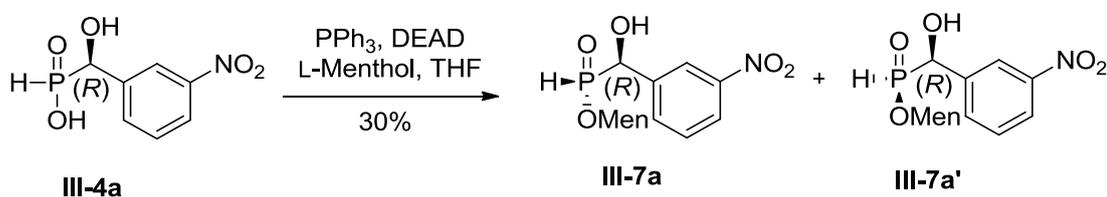


Schéma **III-16** Synthèse des phosphinates de menthyl à partir de l'énantiomère (*R*)-**III-4a**

A partir de l'énantiomère (*R*)-**III-4a** le spectre RMN ^{31}P montre deux isomères majoritaires **III-7a** et **III-7a'** à 30,36 et 33,18 ppm. Les deux pics à 28,41 et 34,85 ppm correspondent aux deux composés minoritaires (10%) **III-7b** et **III-7b'**. La résolution de **III-4** en présence de (*S*)-1-

phenylethylamine conduit par conséquent à l'obtention d'un composé énantiomériquement enrichi (ee 80%)(Figure III-16).

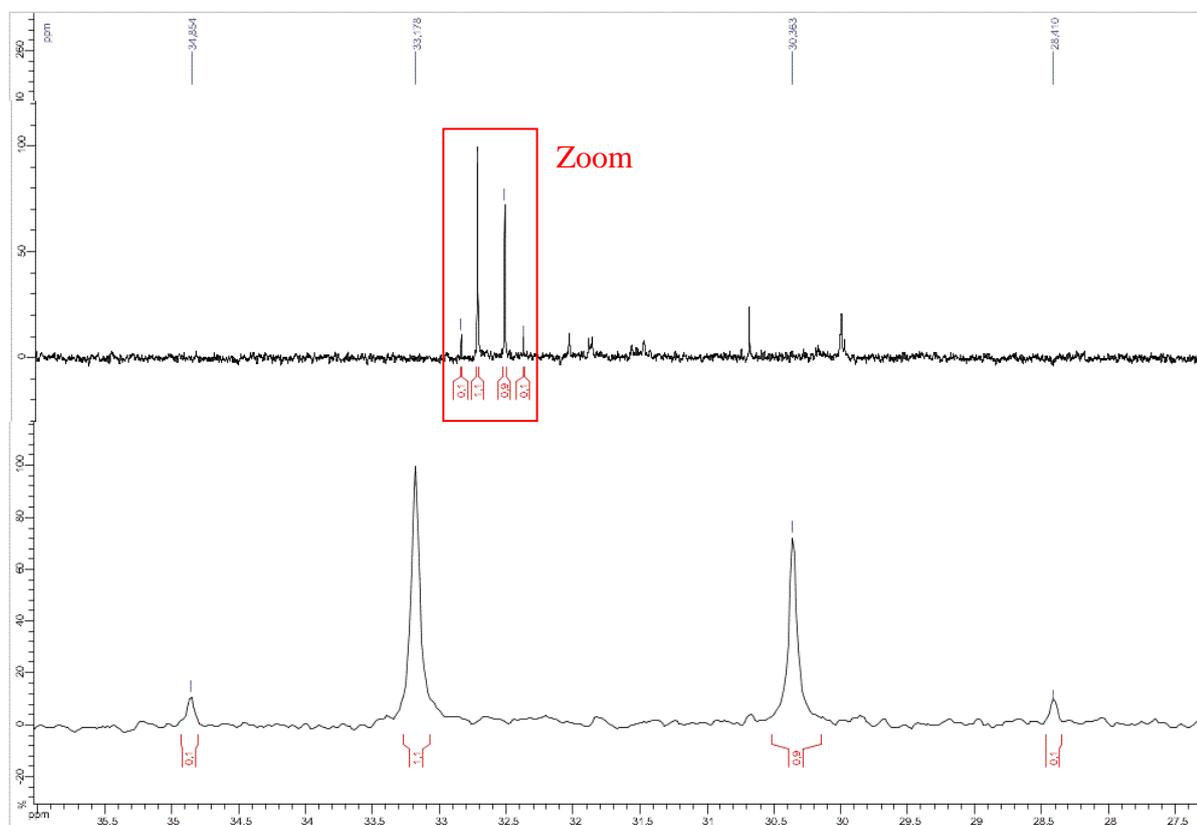


Figure III-16 Spectre RMN ^{31}P des isomères **III-7a**, **III-7a'**(90%) et **III-7b** et **III-7b'** (10%) et zoom entre 26 et 36 ppm.

La même démarche réalisée avec l'autre énantiomère, le composé (*S*)-**III-4b**, montre également un enrichissement énantiomérique (ee = 80%) (Figure III-17).

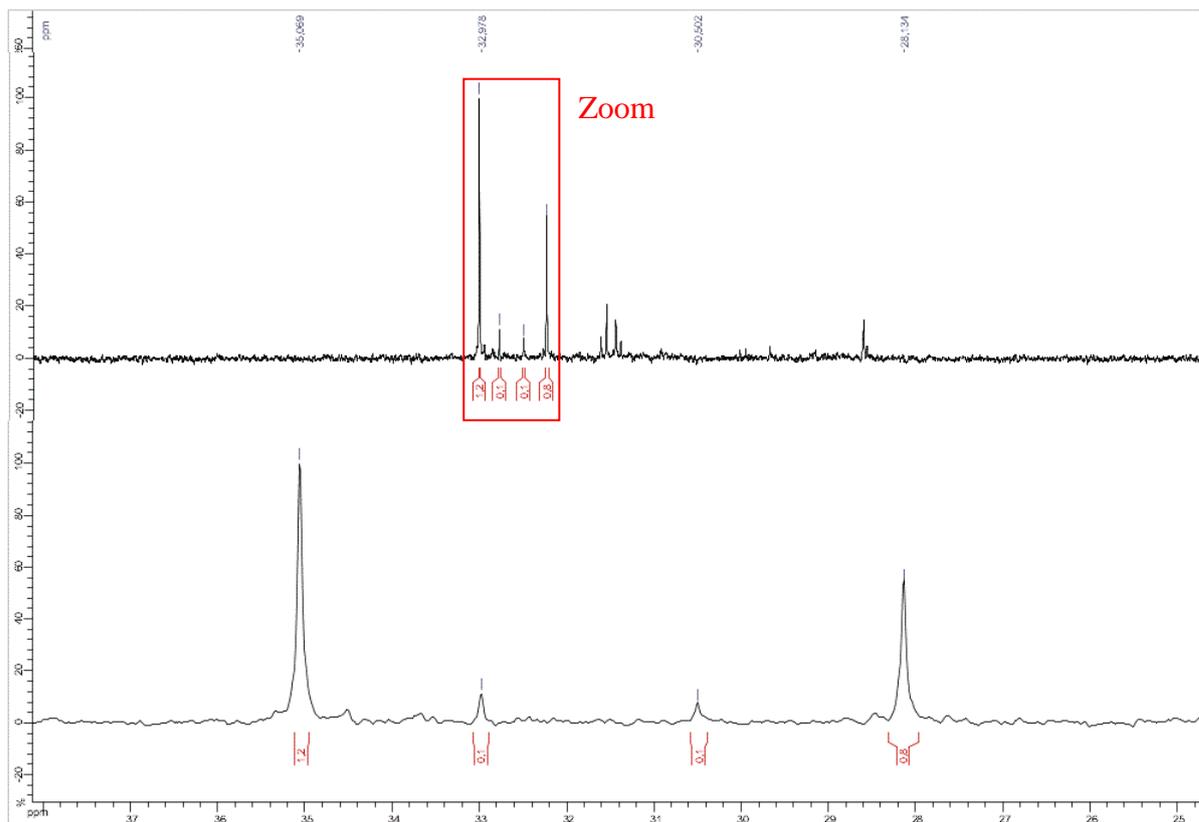


Figure III-17 Spectre RMN ^{31}P des isomères **III-7b** et **III-7b'** et zoom entre 26 et 36 ppm.

Cette étude RMN nous confirme que la résolution de **III-4** effectuée avec la 1-phenylethylamine chirale permet d'obtenir les énantiomères **III-4a** et **III-4b** énantiomériquement enrichis (ee = 80%).

3.4. Corrélation des configurations absolues trouvées avec la littérature

Les acides α -hydroxyle-H-phosphiniques **III-4a** et **III-4b** ont été obtenus sous forme énantiomériquement enrichie (ee = 80%). Les valeurs de pouvoir rotatoire obtenues ne peuvent être corrélées avec celles de la littérature car les données publiées concernent les phosphonates correspondants. Nous avons alors synthétisé les phosphonates diméthylés respectifs des composés **III-4a** et **III-4b** (Schéma III-17).

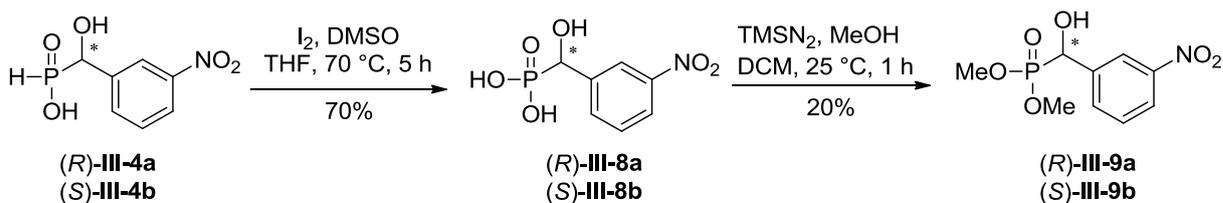


Schéma III-17 Synthèse des phosphonates diméthylés **III-9a** et **III-9b**

Ces phosphonates peuvent-être obtenus en deux étapes. La première consiste à oxyder l'acide phosphinique énantiométrique à l'aide d'iode et de DMSO^{424,425} pour obtenir l'acide phosphonique correspondant avec un bon rendement de 70%. La seconde étape est tout simplement l'estérification des acides phosphoniques en esters diméthylés en présence de triméthylsilyldiazométhane. Ces composés sont beaucoup moins polaires et facilement purifiables par chromatographie sur gel de silice (phase normale).

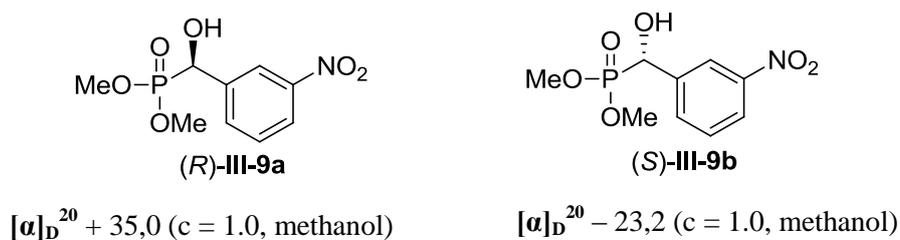


Figure **III-18** Structures des phosphonates **III-9a** et **III-9b**

Le pouvoir rotatoire des deux phosphonates est alors mesuré et une valeur de $[\alpha]_D^{20} = +35$ (c = 1.0, MeOH) est obtenue pour le composé (*R*) et $[\alpha]_D^{20} = -23,2$ (c = 1.0, MeOH) pour le composé (*S*). Ces valeurs de pouvoir rotatoire corroborent les résultats de la littérature à savoir que les α -hydroxy-phosphonates possédant un pouvoir rotatoire négatif, sont de configuration (*S*) et positif, de configuration (*R*).⁴⁰⁸⁻⁴¹¹

Nous pouvons conclure de cette étude que la configuration absolue des acides α -hydroxyle-H-phosphiniques **III-4a** et **III-4b** a pu être déterminée grâce à l'obtention d'une structure aux rayons X du sel ammonium/ phosphinate **III-4**. Ce résultat très important dans notre étude a pu être confirmé par comparaison avec les valeurs de pouvoirs rotatoires décrits dans la littérature pour les phosphonates correspondants. Par ailleurs la mesure de la pureté énantiométrique de nos composés **III-4a** et **III-4b** a pu être réalisée par des études RMN ³¹P des esters de menthyl. Nous pouvons maintenant poursuivre la synthèse par le couplage avec le synthon porteur de l'acide aminé en vue de l'obtention des deux diastéréomères du **LSP1-2093** avec cette fois-ci la connaissance de la configuration absolue du carbinol stéréogène.

III.4. Introduction du synthon « acide aminé »

4.1. Seconde alkylation du phosphore par voie radicalaire

La première idée fut d'utiliser les conditions radicalaires utilisées pour l'obtention de l'intermédiaire acide H-phosphinique clé "**P-H_{int}**" de la voie de synthèse générale mise au point par le stagiaire post-doctoral Chelliah Selvam (Schéma **III-18**).

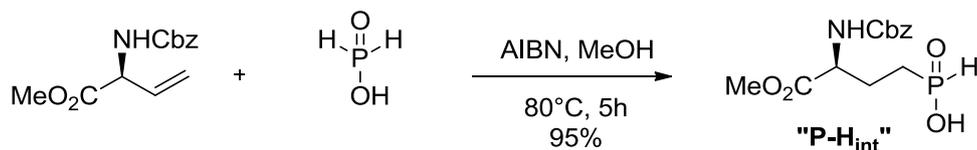


Schéma **III-18** Synthèse de l'acide H-phosphinique clé "**P-H_{int}**" porteur de l'acide aminé

Ces conditions appliquées au composé **III-4** permettrait d'obtenir directement le **LSP1-2093** (Schéma **III-19**).

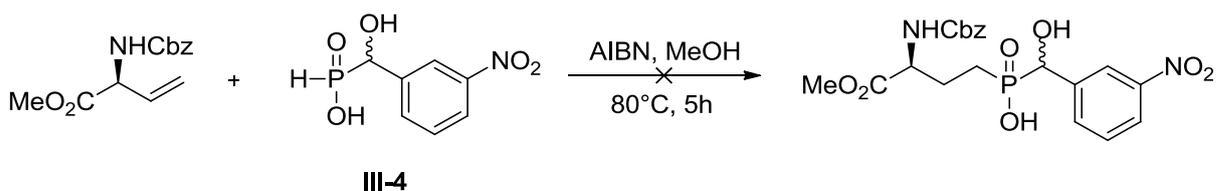
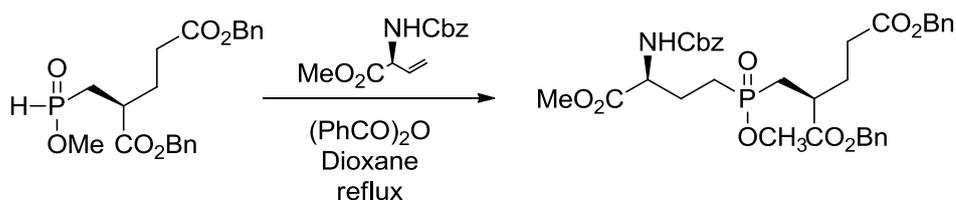
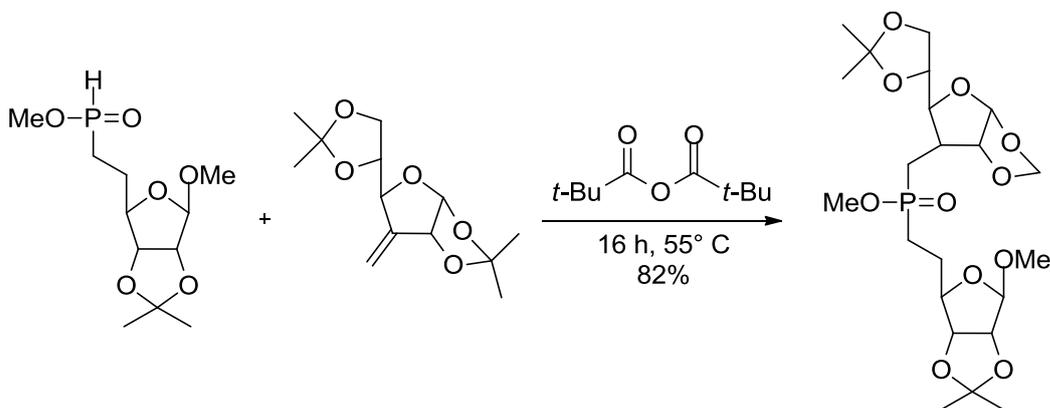
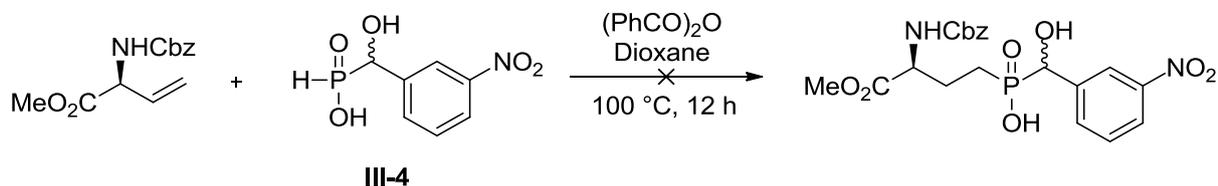


Schéma **III-19** Introduction du synthon porteur de l'acide aminé par voie radicalaire

Malheureusement à l'issue de la réaction, aucun phosphore dialkylé n'est visible en RMN ^{31}P bien que toutes les précautions nécessaires pour effectuer cette réaction (distillation du MeOH, introduction de l'AIBN à 80°C) aient été respectées. Comme nous l'avons fait remarquer dans le Chapitre **I.2.3.2**, la seconde alkylation du phosphore est plus difficile que la première. En effet dans la littérature, cette seconde alkylation par voie radicalaire est décrite dans des conditions plus drastiques en particulier en présence de peroxydes.^{231,426,427} Effectivement, l'équipe de Lubkowski (Schéma **III-20**) a décrit cette seconde alkylation radicalaire sur la vinylglycine protégée en utilisant le peroxyde de benzoyle comme source de radicaux alors que l'équipe de Piettre (Schéma **III-21**) a réalisé le même type de réaction en utilisant le *tert*-butyl peroxyvalate comme initiateur radicalaire.


 Schéma III-20 Seconde alkylation du phosphore sur la vinylglycine protégée⁴²⁶

 Schéma III-21 Seconde alkylation du phosphore utilisant du *t*-butyl peroxyphosphate⁴²⁷

Nous avons alors essayé d'utiliser le peroxyde de benzoyle dans le dioxane pendant 12 h à 100 °C (Schéma III-22).



III-4

Schéma III-22 Introduction du synthon porteur de l'acide aminé avec le peroxyde de benzoyle

Malheureusement, ces conditions n'ont pas permis d'obtenir le phosphore dialcylé. Les réactions faisant intervenir des radicaux sont très délicates ; nous nous sommes alors tournés vers une autre stratégie faisant intervenir une réaction de substitution nucléophile par le composé III-4 sur un halogénure portant la partie acide aminée : l'iodure de l'homosérine.

4.2. Substitution nucléophile de l'iodure de l'homosérine par l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique **III-4**

Cette seconde stratégie consiste à additionner le composé **III-4** sur l'iodure de l'homosérine protégée énantiopure afin d'obtenir directement le **LSP1-2093** protégé. Il faut bien évidemment former l'intermédiaire P^{III} silylé afin d'obtenir un phosphore nucléophile capable de substituer l'halogène (Schéma **III-23**).

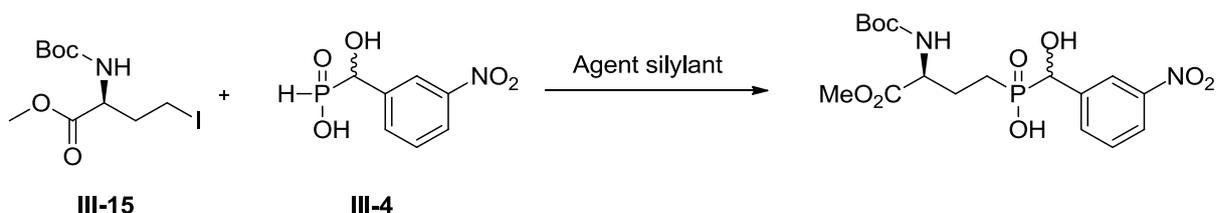


Schéma **III-23** Seconde alkylation du phosphore par substitution nucléophile

Avant d'essayer cette substitution nucléophile, il faut d'abord préparer l'électrophile en question.

4.2.1. Synthèse de l'électrophile dérivé de l'homosérine

L'iodure de l'homosérine protégée est obtenu d'après la voie de synthèse décrite par Le Chevalier *et al.*⁴²⁸ Nous avons d'abord effectué la synthèse du dérivé racémique qui sera utilisé pour tester la réaction de substitution nucléophile (Schéma **III-24**). La première étape consiste à échanger la fonction hydroxyle distale de l'homosérine racémique par un brome en présence d'une solution d'HBr dans l'acide acétique (33%). Les deux étapes suivantes sont des étapes de protection de l'acide aminé ; une estérification de l'acide carboxylique en ester de méthyle puis une protection de l'amine avec un groupement Boc pour obtenir le dérivé bromé de l'homosérine protégée après purification par chromatographie sur gel de silice. L'analogue iodé est très facilement obtenu par simple substitution du brome par l'iode (NaI, acétone, 25°C, 1h30). Aucune purification n'est nécessaire à cette étape. On vérifie l'échange Br/I par spectrométrie de masse et par RMN ^{13}C ; le carbone portant l'iode étant plus blindé ; 1,1 ppm alors qu'avec le brome, il se situe à 30,2 ppm.

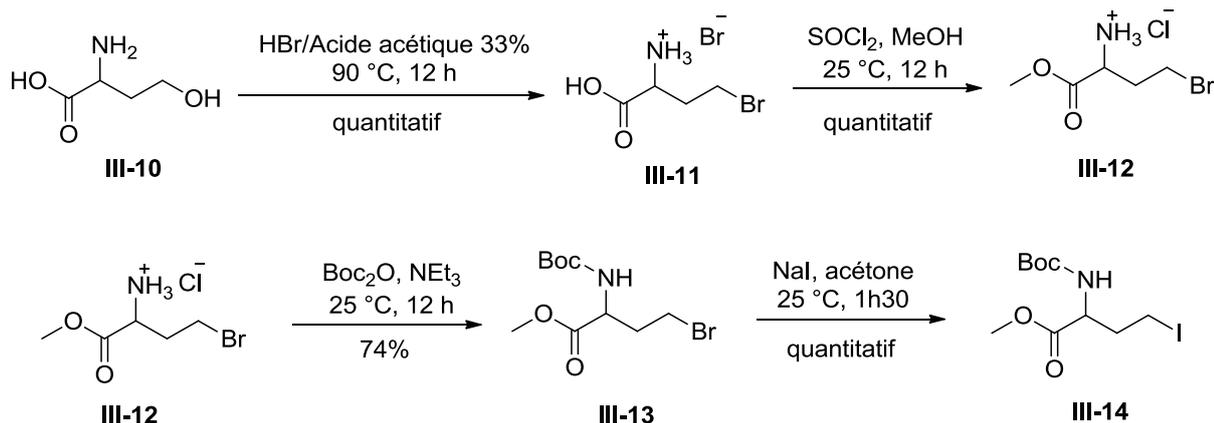


Schéma III-24 Synthèse des dérivés halogénés de l'homosérine racémique

Cette voie de synthèse est totalement applicable à la synthèse du dérivé (S)-III-15 énantiomériquement pur (Figure III-19).

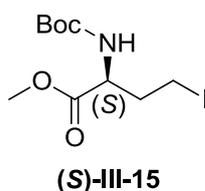


Figure III-19 Structure du (S)-méthyl 4-iodo-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)butanoate

4.2.2. Substitution nucléophile de III-14

L'électrophile III-14 étant synthétisé, la prochaine étape consiste à substituer l'iode de cet électrophile par l'acide phosphinique III-4. La fonction acide phosphinique étant libre, l'unique solution pour rendre le phosphore nucléophile est d'ajouter un agent silylant. Une fois le P^{III} obtenu, il pourra s'ajouter sur l'iodure de l'homosérine (Schéma III-25).

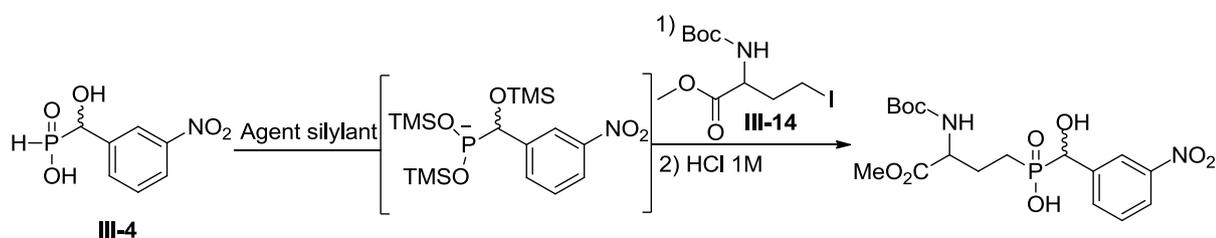


Schéma III-25 Substitution nucléophile sur l'iodure de l'homosérine

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre I.2.3.2., il existe trois types d'agents silylants, l'HMDS, le TMSX (X = Br, Cl ou I) en présence d'une base aminée ou encore la BSA.

Tableau III-4 Conditions opératoires utilisées lors de la substitution nucléophile

Entrée	Agent silylant	conditions	résultats
1	HMDS ²¹⁷	1) III-4 +HMDS 2 h 110 °C 2) III-14 , DCM, 25 °C 12 h	III-4 + III-14 + traces de phosphonates
2	BSA ²²⁰	III-4 + III-14 + BSA, 25 °C, 12 h	III-4 + III-14 + traces de phosphonates
3	NEt ₃ puis BSA	1) III-4 + NEt ₃ + BSA, 25 °C, 2 h 2) III-14 , 25 °C, 12 h	III-4 + III-14 + traces de phosphonates
4	TMSBr puis NEt ₃	1) III-4 + TMSBr + NEt ₃ , 25 °C, 2 h 2) III-14 , 25 °C, 12 h	III-4 + III-14 + traces de phosphonates
5	TMSBr and NEt ₃	1) III-4 + mélange TMSBr/NEt ₃ , 25 °C, 2 h 2) III-14 , 25 °C, 12 h	III-4 + III-14 + traces de phosphonates
6	NEt ₃ puis TMSBr ⁴²⁹	1) III-4 + NEt ₃ + TMSBr, 25 °C, 2 h 2) III-14 , 25 °C, 12 h	III-4 + III-14 + traces de phosphonates
7	DIEA and TMSBr	1) III-4 + mélange TMSBr/DIEA, 25 °C, 2 h 2) III-14 , 25 °C, 48 h	III-4 + III-14 + traces de phosphonates
8	NEt ₃ puis TMSI	1) III-4 + NEt ₃ + TMSI, 25 °C, 2 h 2) III-14 , DCM, 25 °C, 12 h	III-4 + III-14 + traces de phosphonates

Plusieurs conditions, regroupées dans le tableau III-4, ont été tentées. Tous les essais sont traités en fin de réaction par une solution d'HCl 1 M afin d'hydrolyser les groupements silylés. Tout d'abord, nous avons utilisé l'HMDS pour former l'intermédiaire silylé comme décrits par Berlicki *et al.*²¹⁷ également avec des α -hydroxy-phosphinates mais leurs rendements sont très faibles (8 à 18%). Dans notre cas, le produit de couplage n'est pas observé. Nous retrouvons les réactifs de départ, ainsi que du **III-4** oxydé en phosphonate. L'augmentation du temps de réaction n'a rien changé au résultat. Nous avons alors utilisé la BSA en reproduisant les conditions de Chelliah Selvam décrites lors de la seconde alkylation d'acides phosphiniques.²²⁰ Malheureusement, aucun signe de phosphore dialkylé n'est visible. Nous avons alors utilisé le TMSBr (et TMSI) comme agent silylant en présence de NEt₃ ou de DIEA. Différents essais ont été menés en faisant varier l'ordre d'addition des réactifs mais nous retrouvons toujours le même résultat. Lorsqu'on utilise le TMSBr, le dérivé brut isolé contient également le dérivé bromé de l'homosérine **II-13**. Le composé brut isolé contient toujours dans les différents essais l'acide phosphinique de départ **III-4**. Nous pouvons penser que le P^{III} nucléophile ne se forme pas et aucune addition nucléophile n'est alors possible. Afin de s'assurer de la formation in situ de l'intermédiaire P^{III}, nous avons additionné de l'iodopropane au lieu de l'iodure de l'homosérine (Schéma III-26). L'activation de l'acide phosphinique est réalisée en présence de TMSI/NEt₃ ou NEt₃/BSA et on obtient bien le produit de couplage **III-16** avec un rendement de

28% ; un signal en RMN ^{31}P à 48 ppm, soit dans la zone des acides phosphiniques reliés à deux atomes de carbone, est observé.

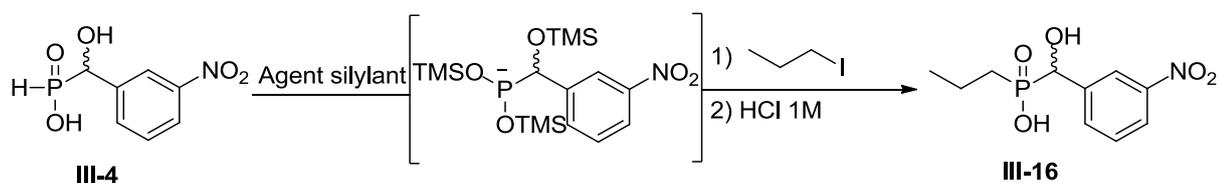


Schéma **III-26** Substitution nucléophile de l'iodopropane par l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique **III-4**

Au vu de ce résultat, nous pensons donc que le problème n'est pas l'activation de la fonction acide phosphinique mais plus probablement l'électrophile utilisé, l'iodure de l'homosérine. Dans le chapitre **I.2.3.2.**, nous avons répertorié les principaux électrophiles utilisés pour la seconde alkylation d'un acide phosphinique. Il s'agit d'aldéhydes²⁵⁸, d'imines^{261,262}, d'acrylates^{263,429}, d'époxydes^{231,430} ou encore d'halogénures d'alkyle^{234,431,432} (Schéma **III-27**). Il est bon de rappeler que pour les halogénures d'alkyle non activés, la réaction demande des conditions opératoires généralement plus dures avec des températures de réaction plus élevées et des temps de réaction beaucoup plus longs.^{260,432}

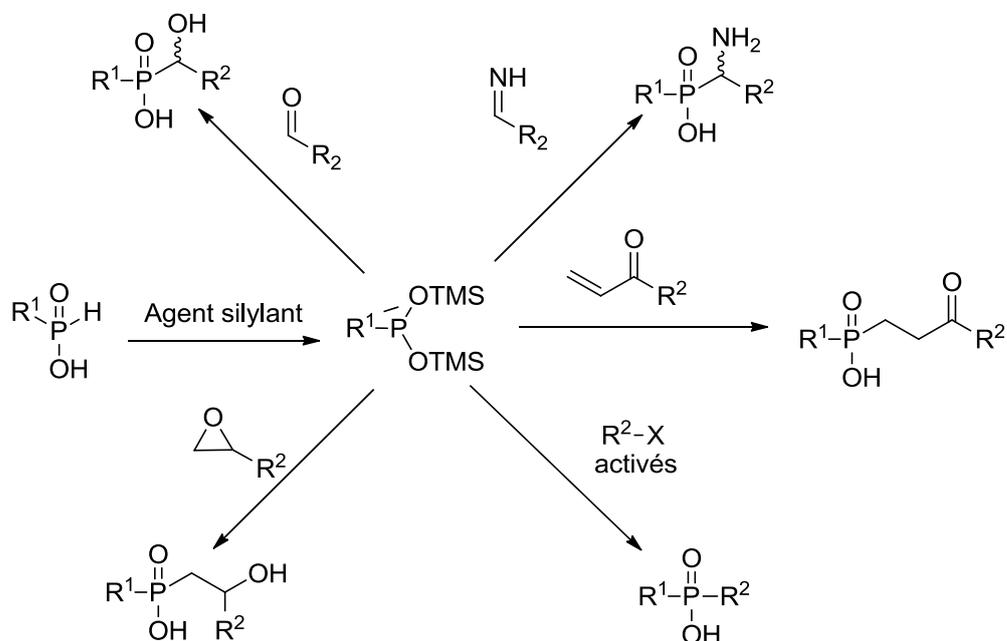


Schéma **III-27** Seconde alkylation d'un acide phosphinique

Nous avons alors décidé de continuer cette étude en utilisant un électrophile plus réactif et modulable afin de pouvoir introduire la partie acide aminée.

4.3. Utilisation de la copule de Schöllkopf

Une autre stratégie pour introduire la partie acide aminée est d'utiliser une copule chirale précurseur d'acide aminé. Un des exemples le plus connu est la copule de Schöllkopf.²⁶⁷ Bartley et Coward ont par exemple couplé cette copule avec un bromophosphonate (Schéma III-28).²⁴⁰

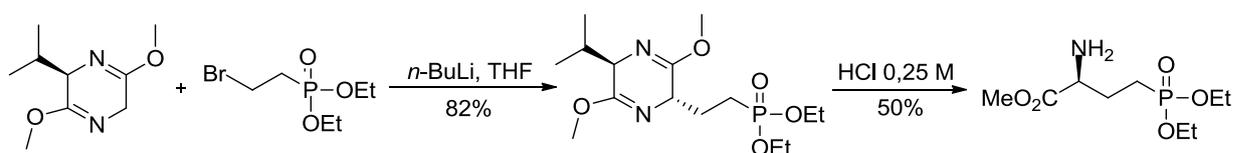


Schéma III-28 Synthèse du (S)-methyl-2-amino-4-(diéthoxyphosphoryl)butanoate par Bartley et Coward²⁴⁰

Notre idée était d'introduire cette copule sur le composé III-4 ayant préalablement été fonctionnalisé par le dibromoéthane (Schéma III-29).

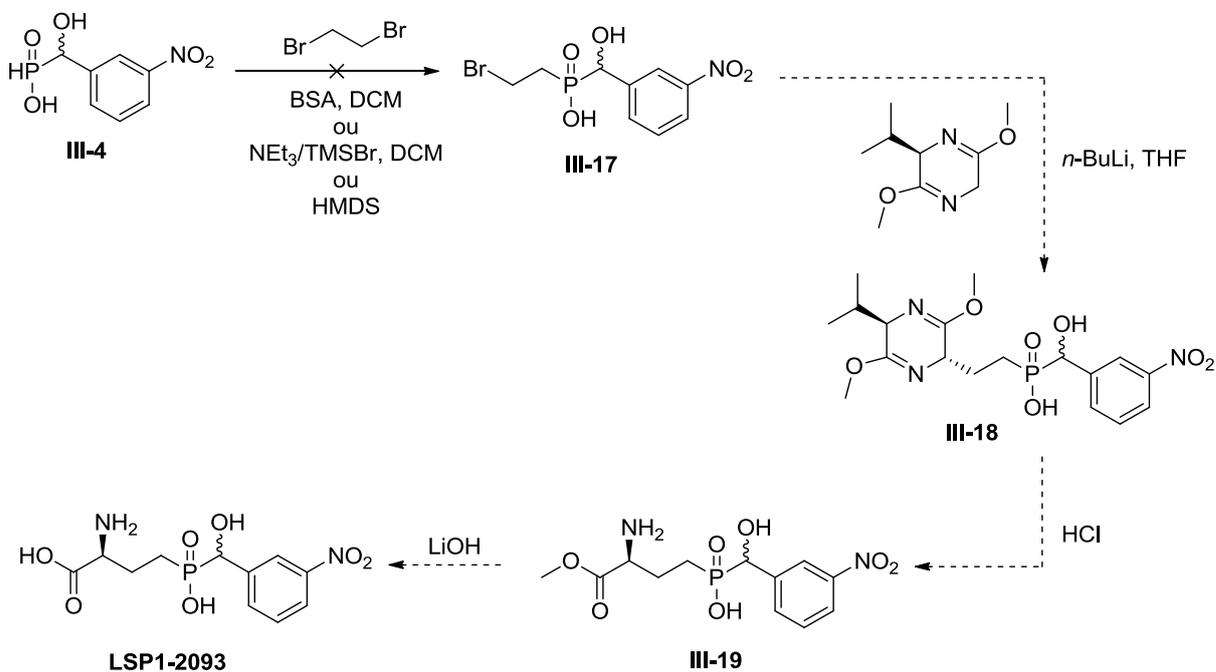


Schéma III-29 Voie de synthèse utilisant la copule de Schöllkopf

Cette copule déprotonée par le butyllithium s'ajouterait alors sur le composé III-17 par substitution nucléophile du brome. Malheureusement l'addition de l'acide α -hydroxyle-H-

phosphinique **III-4** sur le dibrométhane n'a pas conduit au produit **III-17** et ceci en utilisant les conditions précédemment rapportées telles que BSA, $\text{NEt}_3/\text{TMSBr}$ ou HMDS. Ce résultat nous a surpris étant donné que la réaction de couplage de **III-4** avec l'iodopropane conduit au produit attendu mais avec un rendement faible de 28%. La présence de la fonction hydroxyle en position α de l'acide phosphinique pourrait être mise en cause d'autant plus que celui-ci est probablement silylé durant la réaction.

Suite à ces résultats nous avons choisi de changer la nature de l'électrophile. Au lieu des halogénures d'alkyles, nous avons pensé aux acrylates qui sont de très bons électrophiles et aussi de bons précurseurs pour l'introduction d'une fonction acide aminée. Comme nous l'avons évoqué précédemment, il existe plusieurs exemples de seconde alkylation d'un acide phosphinique par un acrylate dans la littérature.^{244,245,263,265,429}

4.4. Addition de l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique **III-4** sur un acrylate et réduction en aldéhyde

Les substitutions nucléophiles sur les halogénures d'alkyle n'ayant pas fonctionné comme nous l'aurions souhaité, une autre démarche a été développée. Nous souhaitons d'abord additionner la fonction acide phosphinique sur un acrylate puis par réduction obtenir l'aldéhyde correspondant. Une réaction de Strecker asymétrique permettrait d'introduire la fonction acide aminée et d'obtenir le **LSP1-2093** (Schéma **III-30**).

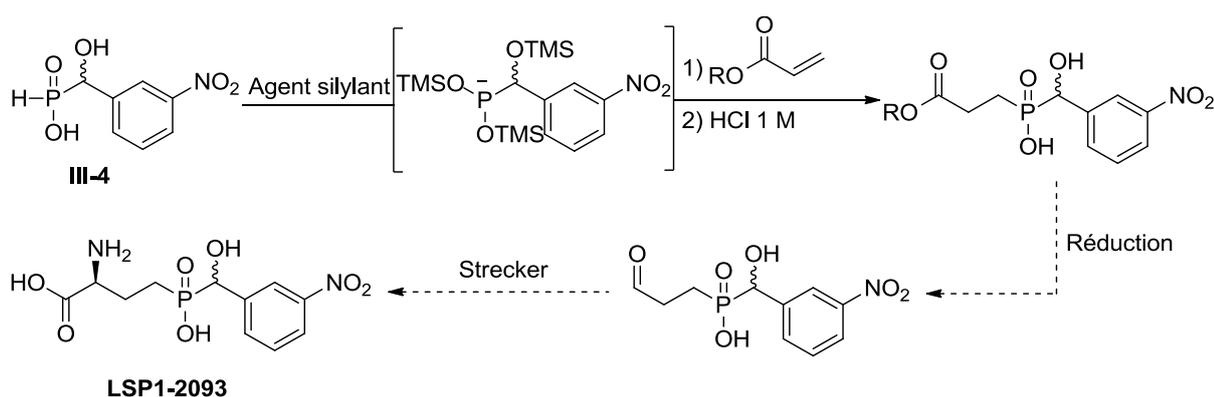
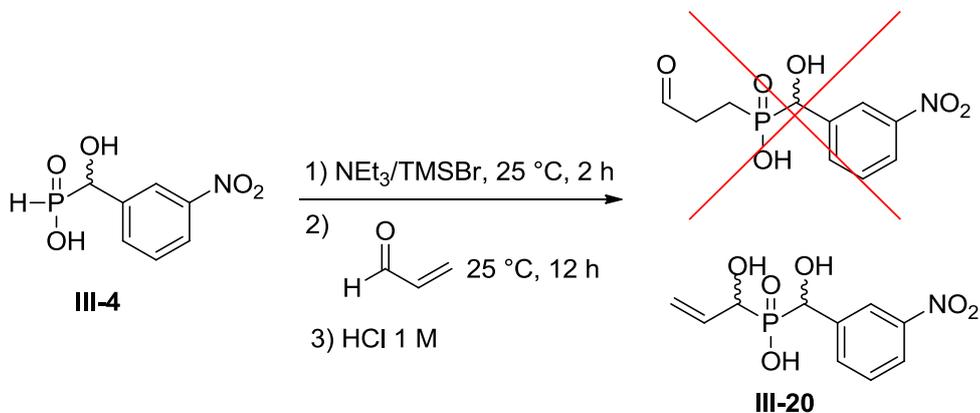
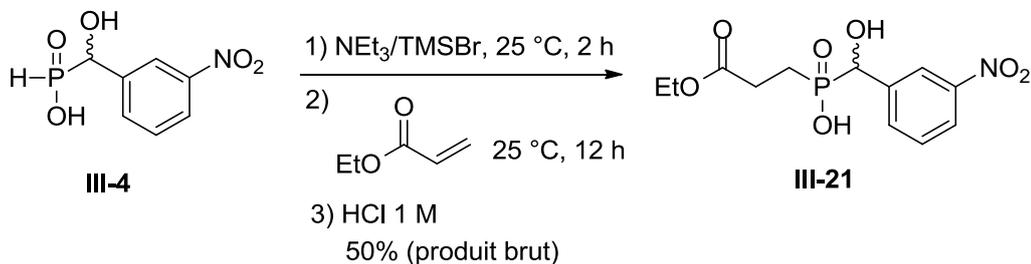


Schéma **III-30** Synthèse du **LSP1-2093** par addition de **III-4** sur un acrylate

Dans un premier temps nous avons tenté l'addition directement sur l'acroléine, afin d'éviter l'étape de réduction (Schéma **III-31**). Comme nous nous en doutions, l'addition s'est exclusivement faite sur la fonction aldéhyde.

Schéma **III-31** Addition de **III-4** sur l'acroléine

Afin de savoir si l'addition de type Michael fonctionne bien, nous avons alors essayé la même réaction non plus sur l'acroléine mais sur l'acrylate d'éthyle (Schéma **III-32**).

Schéma **III-32** Addition de **III-4** sur l'acrylate d'éthyle

En utilisant les conditions classiques, $\text{NEt}_3/\text{TMSBr}$, nous pouvons observer 30% de produit de couplage et 70% d'acide phosphinique de départ. Effectivement, nous observons bien les signaux des protons méthyléniques entre l'ester et l'acide phosphinique entre 1 et 2 ppm en RMN^1H et 2 signaux en RMN^{31}P à 29,4 ppm correspondant au substrat de départ et à 46,2 ppm correspondant au produit souhaité.

Deux voies sont possibles à partir de ce résultat. La première consiste à optimiser cette addition afin d'obtenir un meilleur rendement. Ensuite, il faudra réduire l'ester en aldéhyde soit directement en une seule étape ce qui n'est pas toujours facile soit en 2 étapes, réduction en alcool puis oxydation. La réduction en alcool ne devrait pas poser de problèmes, par contre,

l'oxydation régiosélective de l'alcool primaire par rapport à l'alcool secondaire benzylique pourrait s'avérer plus délicate. Quelques exemples d'oxydation d'alcool primaire régiosélective par rapport à un alcool secondaire ont été décrits dans la littérature utilisant soit des complexes de ruthénium,⁴³³ de rhodium⁴³⁴ ou de l'iode hypervalent.^{435,436}

L'autre voie consisterait à coupler l'acide phosphinique **III-4** avec un précurseur pouvant être réduit directement en aldéhyde comme l'acrylonitrile.^{231,437,438}

4.5. Addition de l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique **III-4** sur l'acrylonitrile et réduction en aldéhyde

Le couplage de l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique **III-4** avec l'acrylonitrile est réalisé en utilisant les mêmes conditions réactionnelles que celles utilisées dans le couplage avec l'acrylate d'éthyle (Schéma **III-33**).

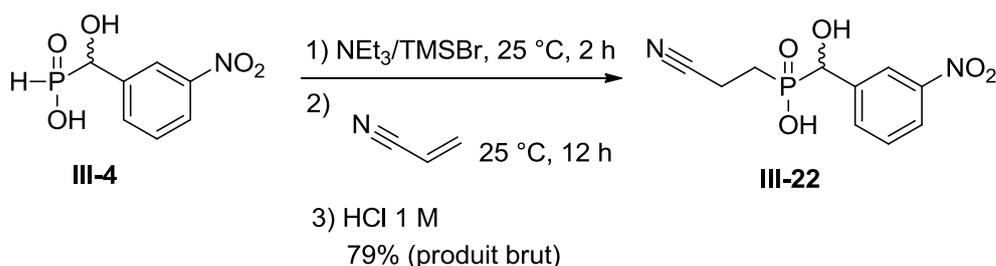


Schéma **III-33** Addition de **III-4** sur l'acrylonitrile

Le composé souhaité est obtenu avec un rendement brut de 79%. On observe très bien les signaux des protons méthyléniques entre la fonction nitrile et l'acide phosphinique en RMN ^1H et un seul signal à 40,3 ppm en RMN ^{31}P . Ce composé ne peut-être purifié efficacement que sur une résine échangeuse d'ions. Or, les essais sont menés sur des quantités inférieures à 100 mg, il est donc inenvisageable d'utiliser ce moyen de purification. Pour s'assurer de la structure du composé obtenu, nous avons alors choisi d'estérifier l'acide phosphinique en ester de méthyle afin de pouvoir le purifier par chromatographie sur gel de silice (Schéma **III-34**).

Tableau **III-5** Conditions de réduction de la fonction nitrile en aldéhyde

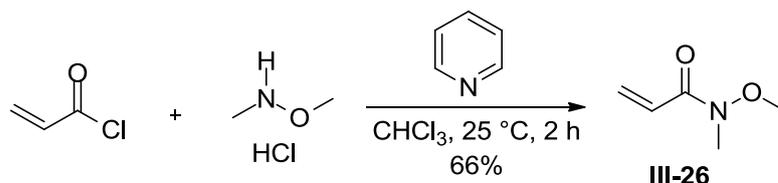
Entrée	Substrat de départ	Conditions	Solvant	Résultats
1	III-23	DIBAL (1 M, DCM) 3 équiv -78 °C, 2 h → 25 °C, 1 h	DCM	III-23
2	III-22	DIBAL (1 M, DCM) 3 équiv -78 °C, 1 h → 25 °C, 2 h	DCM	III-22
2	III-22	DIBAL (1 M, DCM) 3 équiv -78 °C, 1 h → 25 °C, 2 h	THF	III-22
3	III-22	DIBAL (1 M, DCM) 1,1 équiv -78 °C 30 min	THF	III-22
4	III-22	DIBAL (1 M, THF) 5 équiv -78 °C → 25 °C, 12 h	THF	RMN ¹ H : traces d'aldéhyde RMN ³¹ P : pas de signal
5	III-22	DIBAL (1 M, THF) 3 équiv -78 °C → 25 °C, 12 h	THF	RMN ¹ H : traces d'aldéhyde RMN ³¹ P : pas de signal

Nous avons d'abord utilisé le DCM comme solvant mais aucune conversion n'est observée que ce soit à partir de l'acide phosphinique ou de son ester méthylique. Nous avons ensuite réalisé la réduction dans le THF. Aucune conversion n'est observée avec 1,1 équivalents de DIBAL-H alors qu'avec 3 et 5 équivalents, on observe en RMN ¹H un signal caractéristique d'une fonction aldéhyde mais curieusement aucun signal en RMN ³¹P. Par ailleurs malgré le traitement des réactions par du tartrate de potassium afin d'éliminer les complexes d'aluminium, les spectres RMN sont extrêmement difficiles à interpréter. Nous sommes également conscients que le DIBAL-H pourrait se coordonner soit avec l'oxygène de l'acide phosphinique ou celui de la fonction hydroxyle perturbant ainsi la réaction de réduction du nitrile.

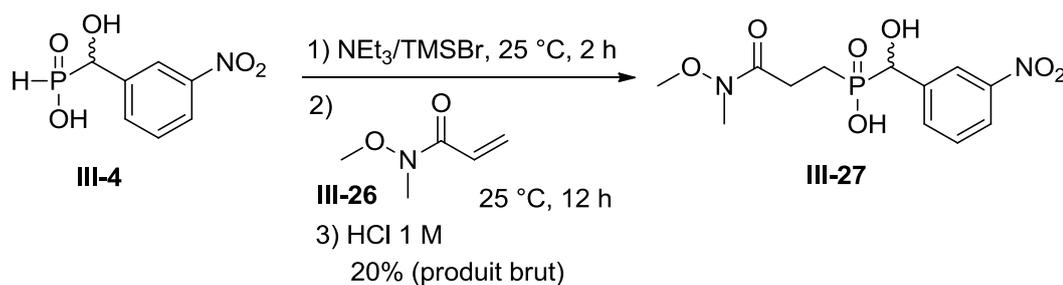
Compte tenu de la difficulté à réduire la fonction nitrile en aldéhyde, nous nous sommes alors tournés vers le couplage de l'acide phosphinique **III-4** avec l'acrylamide de Weinreb dont l'amide de Weinreb est connu pour se réduire aisément en aldéhyde.

4.6. Addition de l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique **III-4** sur l'acrylamide de Weinreb et réduction en aldéhyde

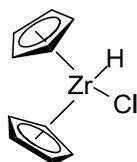
Nous avons donc choisi d'utiliser l'amide de Weinreb en tant que précurseur d'aldéhyde. De nombreux exemples récents de réduction de l'amide de Weinreb utilisent soit du LiAlH₄^{443,444} du DIBAL-H⁴⁴⁵⁻⁴⁴⁷ ou le réactif de Schwartz⁴⁴⁸⁻⁴⁵⁰. La première étape fut de synthétiser l'acrylamide de Weinreb **III-26**.^{451,452} Ce composé est obtenu simplement à partir du chlorure d'acryloyle et de la *N,O*-diméthylhydroxylamine en présence de pyridine (Schéma **III-36**).

Schéma **III-36** Synthèse de l'acrylamide de Weinreb **III-26**

L'addition de l'acide phosphinique **III-4** sur l'acrylamide de Weinreb **III-26** s'effectue dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le couplage avec l'acrylate et l'acrylonitrile et le composé **III-27** est isolé avec 20% de rendement (Schéma **III-37**). La conversion n'est pas totale et il reste de l'acrylamide de Weinreb. Pour purifier le produit, un lavage basique est effectué afin d'extraire en phase aqueuse le phosphinate chargé négativement alors que l'acrylamide de Weinreb reste en phase organique. Puis on réacidifie la phase aqueuse pour extraire notre composé dans l'EtOAc. Ce lavage suffit pour obtenir un produit pratiquement pur.

Schéma **III-37** Addition du composé **III-4** sur l'acrylamide de Weinreb **III-26**

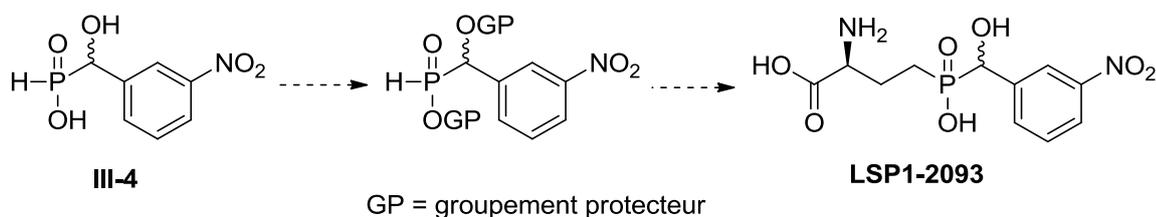
A ce stade nous avons alors essayé de réduire l'amide de Weinreb en aldéhyde en présence de LiAlH_4 ou DIBAL-H mais aucune tentative ne fut concluante. La coordination possible de l'agent réducteur avec les oxygènes de l'acide phosphinique ou de la fonction hydroxyle pourrait être responsable de cette non réactivité. Ne disposant pas du réactif de Schwartz au laboratoire, aucun essai fut tenté avec ce complexe au zirconium (Figure **III-20**).

Figure **III-20** Réactif de Schwartz

4.7. Bilan et choix d'une nouvelle stratégie

L'introduction de la partie acide aminée a été tentée soit par addition de l'acide phosphinique **III-4** sur l'iodure de l'homosérine ou par le biais d'une fonctionnalité type nitrile ou amide de Weinreb.

Cependant, aucune de ces deux fonctions n'a pu être réduite en aldéhyde malgré de nombreux essais tentés. Lors de ces réductions, nous avons pu remarquer que les données analytiques et plus particulièrement les spectres RMN étaient difficiles à interpréter. De plus, les fonctions acide phosphinique et hydroxyle libres ne semblent pas favorables à cette réduction. Il semble donc inévitable de travailler sur des molécules contenant des fonctions protégées (Schéma **III-38**) afin de rendre plus simple les suivis de réactions, les analyses des produits synthétisés et surtout les purifications.

Schéma **III-38** Nouvelle stratégie – protection des fonctions libres

4.8. Protection des fonctions acide phosphinique et hydroxyle

Les avantages d'introduire des protections sur ces deux fonctions sont multiples. Le suivi des réactions sera de toute évidence beaucoup plus simple et les composés obtenus pourront être purifiés par des méthodes classiques. L'autre avantage de ces protections est que le P^{III} nucléophile pourra être obtenu par silylation comme précédemment mais aussi par déprotonation de l'hydrogène lié au phosphore. Il existe deux exemples de protection des acides α -hydroxyle-H-phosphiniques. Dans les deux cas référencés, seul l'acide phosphinique est protégé par estérification utilisant du diazométhane dans le méthanol⁴⁵³ ou alors des orthosilicates.⁴⁵⁴ Pour notre part nous avons également estérifié l' α -hydroxy-H-acide phosphinique **III-4** en présence d'un agent de couplage comme l'EDC ou le DCC (Schéma **III-39**). Cependant, la protection de la fonction hydroxyle est plus difficile. Tous les premiers essais de protection vont s'effectuer sur le composé racémique **III-4**.

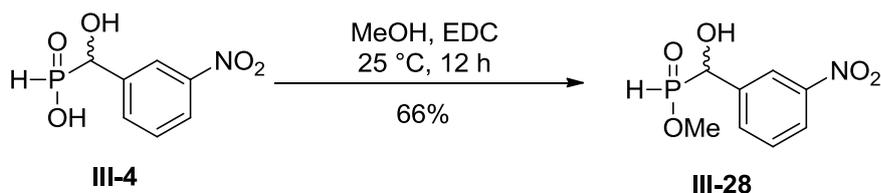
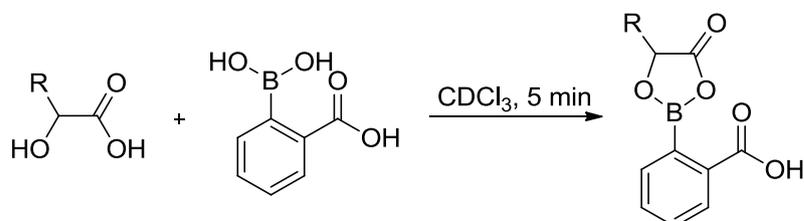
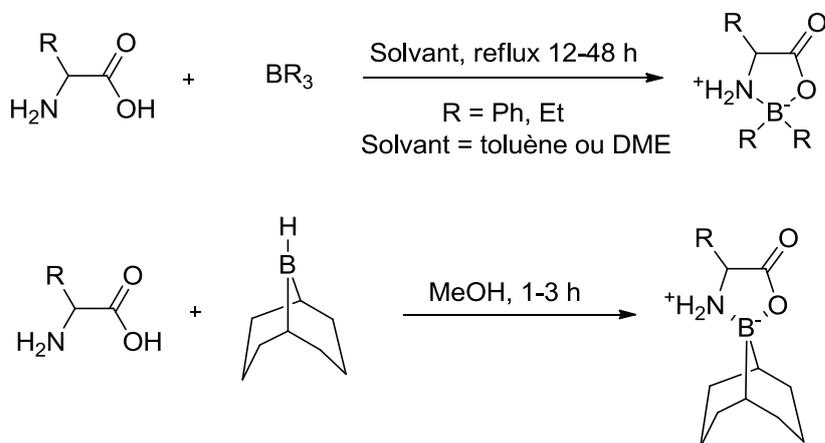


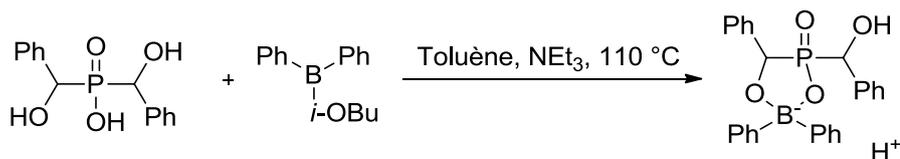
Schéma III-39 Estérification de l'acide phosphinique en phosphinate de méthyle

Protection cyclique des fonctions acide phosphinique et hydroxyle avec des complexes de bore

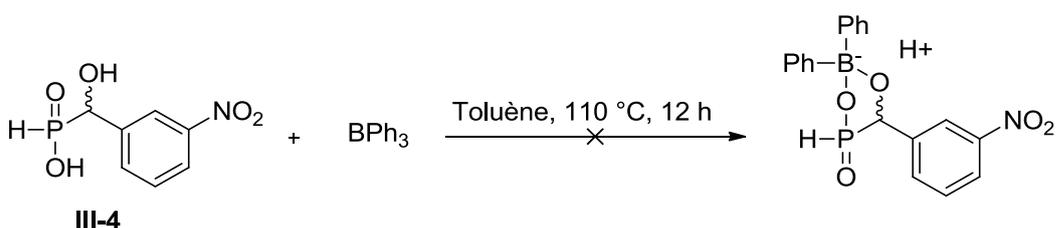
Cette idée est basée sur des travaux antérieurs de la littérature dans lesquels des dérivés du bore ont été utilisés pour protéger deux fonctionnalités. Par exemple, des acides α -hydroxy-carboxyliques⁴⁵⁵ ont pu être protégés avec l'acide 2-formylphénylboronique (Schéma III-40) et des acides α aminés avec le 9-BBN⁴⁵⁶⁻⁴⁵⁸, le triphénylborane⁴⁵⁹ ou encore le triéthylborane⁴⁶⁰ (Schéma III-41).

Schéma III-41 Protection d'acides α -hydroxy-carboxyliques par un acide boroniqueSchéma III-41 Protection d'acides α aminés par des complexes cycliques de bore

On retrouve également un exemple de ce type de protection appliqué à un acide α -bishydroxy-phosphinique (Schéma III-42).⁴⁶¹


 Schéma III-42 Protection d'acide α -bishydroxy-phosphinique par du *i*-BuOBPh₂

Nous avons alors essayé de protéger **III-4** avec le triphénylborane (Schéma III-43) en utilisant les conditions décrites dans la littérature (toluène, 110 °C, 12 h). Malheureusement, aucune trace du produit protégé n'a été observée.


 Schéma III-43 Essai de protection de l'acide phosphinique **III-4**

Nous avons également essayé mais sans succès d'obtenir un acétal par transestérification avec le 2,2-diméthoxypropane catalysée par l'APTS (Schéma III-44). Une dernière tentative de protection avec le di-*tert*-butylsilyltriflate (*t*-Bu)₂Si(OTf)₂ a été tentée afin de former un pont silylé (Schéma III-45). Mais une nouvelle fois les analyses faites sur le composé brut obtenu ne sont pas concluantes.

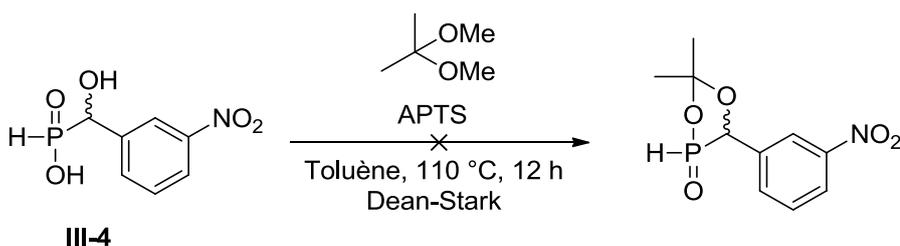
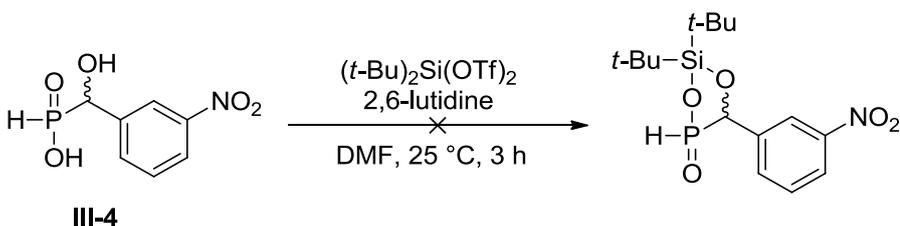

 Schéma III-44 Essai de protection de l'acide phosphinique **III-4** par transestérification avec le 2,2-diméthoxypropane


Schéma **III-45** Essai de protection de l'acide phosphinique **III-4** avec le $(t\text{-Bu})_2\text{Si}(\text{OTf})_2$

Aucune tentative de protection cyclique des fonctions acide phosphinique et hydroxyle n'a été concluante. Nous avons alors décidé d'essayer de protéger d'abord la fonction hydroxyle et ensuite l'acide phosphinique.

Protection de la fonction hydroxyle avant la fonction acide phosphinique

Hohlfeld et Meier⁴⁶² ont montré, en 2003, qu'il pouvaient protéger d'abord la fonction hydroxyle puis dans un second temps estérifier l'acide phosphinique en ester (Schéma **III-46**).

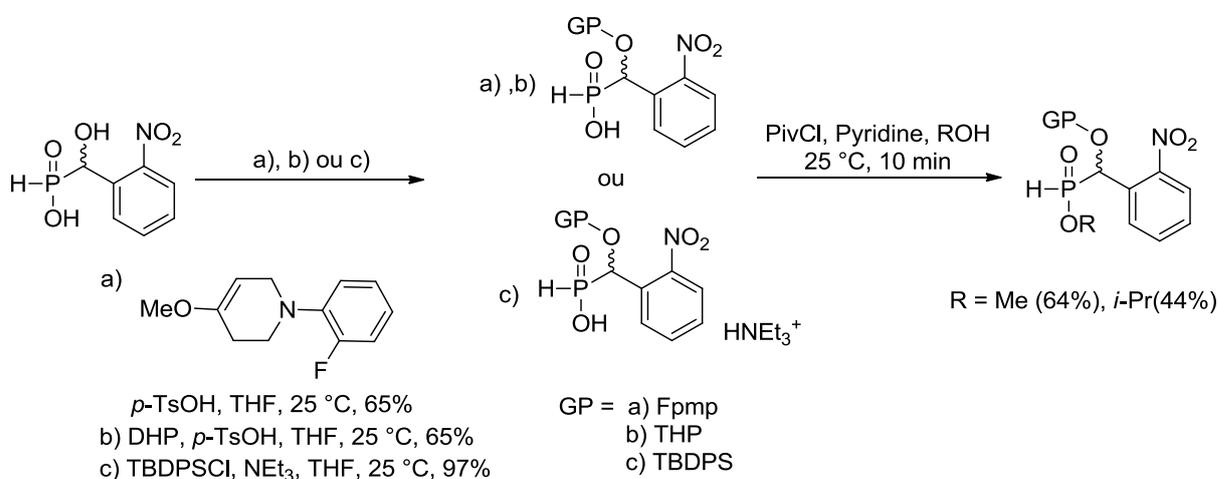


Schéma **III-46** Travaux de Hohlfeld et Meier⁴⁶²

Nous nous sommes basés sur ces travaux car ils travaillent sur un substrat quasi similaire au notre, seul le groupement nitro est en position *ortho* sur le cycle aromatique. Nous avons alors choisi de protéger la fonction α -hydroxyle sous forme d'éther de *t*-butyldiphénylsilyle puis d'estérifier l'acide phosphinique en ester méthylique. Le composé protégé **III-30** est obtenu avec un rendement de 50% sur les deux étapes (Schéma **III-47**).

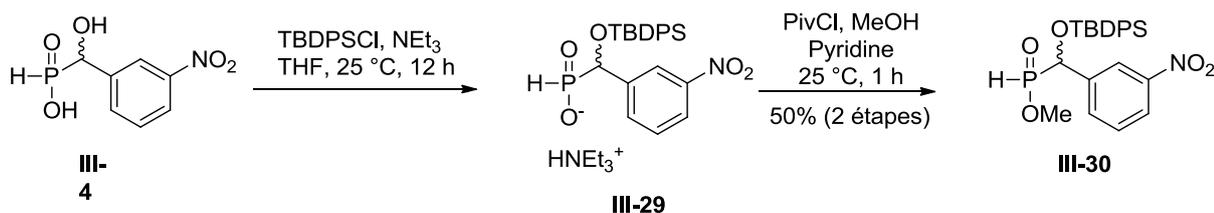


Schéma III-47 Protection des deux fonctions acide phosphinique et hydroxyle de III-4

Nous avons également synthétisé les esters éthylique III-31 et butanoïque III-32 obtenus avec 66% et 33% de rendement sur deux étapes (Schéma III-48).

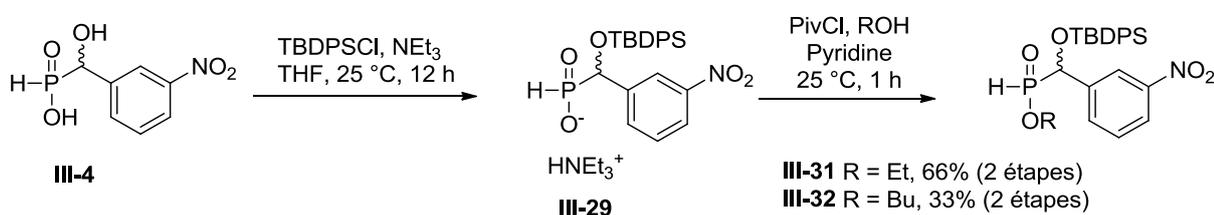


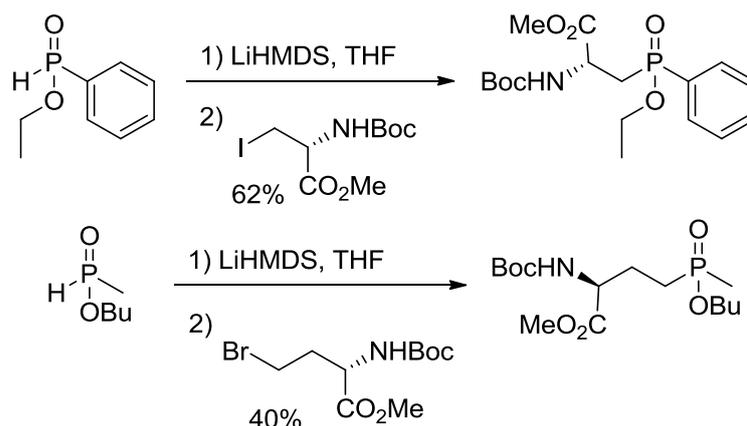
Schéma III-48 Synthèse des ester éthylique et butanoïque

Les produits sont très caractéristiques en RMN ^{31}P où l'on observe bien deux signaux car l'atome de phosphore est chiral. Grâce aux travaux de Hohlfeld et Meier, nous avons réussi à protéger les fonctions acide phosphinique et α -hydroxyle du composé III-4. Nous allons alors développer une nouvelle voie de synthèse à partir de ce composé protégé avec toujours l'objectif d'obtenir les diastéréomères de configuration absolue connue du LSP1-2093 séparément.

III.5. Synthèse du LSP1-2093 à partir du III-4 protégé

5.1. Seconde alkylation de l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique protégé sur l'iodure de l'homosérine

Comme nous l'avons dit précédemment, les protections introduites sur l'acide α -hydroxyle-H-phosphinique vont nous permettre d'introduire le synthon porteur de l'acide aminé en utilisant des conditions basiques comme l'ont très bien décrit Abrunhosa-Thomas *et al.*⁴⁶³ Effectivement, les auteurs ont montré la seconde alkylation d'un H-phosphinate, en condition basique par deux halogénures porteurs de fonction acide aminé ce qui est notre objectif (Schéma III-49).

Schéma III-49 Travaux de Abruñosa-Thomas *et al.*⁴⁶³

Avant de tenter le couplage avec l'iodure de l'homosérine, nous avons testé la réaction avec l'iodopropane afin d'optimiser les conditions. Nous avons tout d'abord utilisé comme base le LiHMDS dans le THF comme décrit dans la littérature (Schéma III-50).

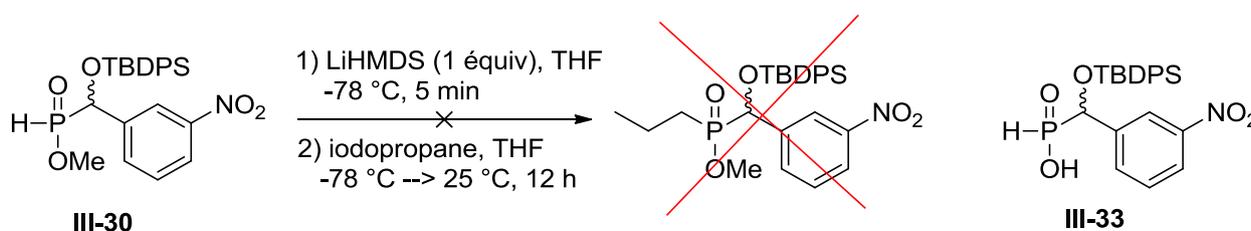
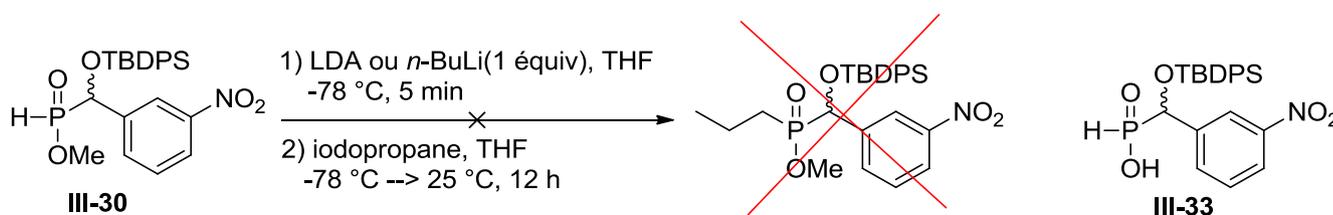


Schéma III-50 Seconde alkylation du phosphore avec l'iodopropane en présence de LiHMDS

Malheureusement, dans ces conditions, le seul produit isolé a été le composé III-33 correspondant à l'hydrolyse de l'ester phosphinique. Il est connu que les esters phosphiniques peuvent être hydrolysés en présence d'agents silylés.⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁶ Nous avons alors essayé d'autres bases comme la LDA et le *n*-BuLi (Schéma III-51). Une fois encore, l'ester méthylique phosphinique est hydrolysé pour redonner l'acide phosphinique III-33.

Schéma III-51 Seconde alkylation du phosphore sur l'iodopropane en présence de LDA ou *n*-BuLi

Pour vérifier cette hydrolyse, les composés bruts de ces trois essais ont été réestérifiés dans les mêmes conditions que précédemment (PivCl, pyridine, MeOH) et nous avons bien récupéré le phosphonate de méthyle correspondant **III-30**.

Nous avons alors choisi de travailler avec le phosphonate d'éthyle qui est plus difficile à hydrolyser. De plus Abrunhosa-Thomas *et al.* travaillaient également avec des esters éthyliques ou butanoïques (Schéma **III-52**).

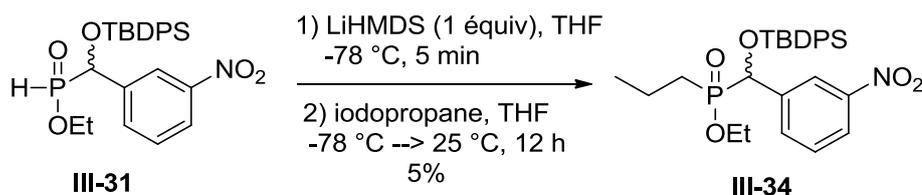


Schéma **III-52** Seconde alkylation du phosphore à partir du phosphonate d'éthyle **III-31**

En utilisant le LiHMDS comme base, nous avons isolé, après purification par chromatographie sur gel de silice, le produit dialkylé avec un rendement de 5%. Le rendement est faible mais ce résultat est encourageant, c'est le premier composé dialkylé qu'on arrive à purifier par chromatographie sur gel de silice.

Nous avons alors essayé d'optimiser les conditions en jouant sur la nature de la base (NaH, tBuOK, NaHMDS), sur le nombre d'équivalents d'électrophile et de base introduit et sur la température de la réaction (reflux du THF) mais de très faibles améliorations ont été observées (12 % de rendement avec 2 eq de LiHMDS, 36 h, 25°C). En parallèle, nous avons essayé la même réaction mais en passant par un P^{III} silylé soit avec la BSA ou avec TMSBr/NEt₃ mais sans succès. Ces résultats prouvent que le phosphore nucléophile obtenu par déprotonation est légèrement plus réactif que celui silylé. Pour vérifier la réactivité du nucléophile, nous avons tenté la substitution nucléophile non plus sur l'iodopropane mais sur l'iodométhane (Schéma **III-53**).

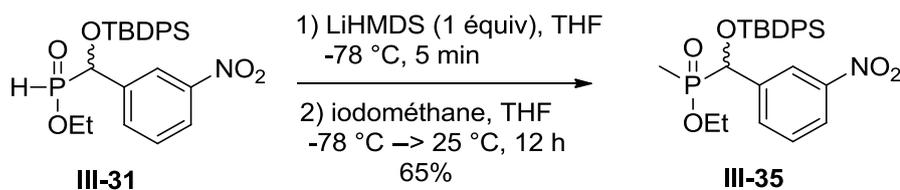


Schéma **III-53** Seconde alkylation du phosphore sur l'iodométhane

Le composé dialkylé **III-35** est obtenu avec un rendement de 65% après purification sur gel de silice. Cette expérience prouve que l'on forme bien un phosphore nucléophile par déprotonation et que la réactivité de l'électrophile est très importante. Nous avons alors essayé la substitution sur l'iodure de l'homosérine racémique avec très peu d'espoir vu l'importance de la nature de l'électrophile utilisé (Schéma **III-54**).

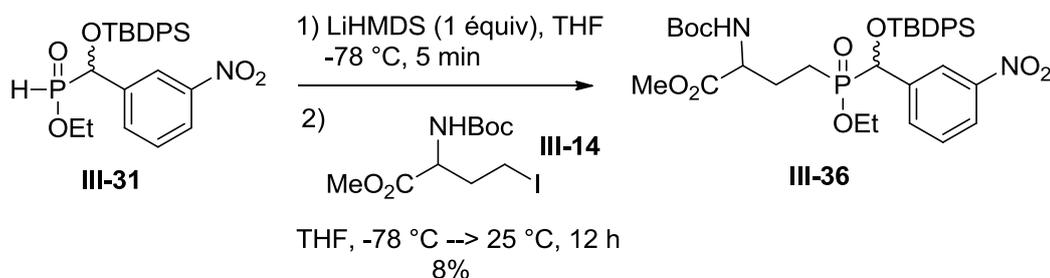


Schéma **III-54** Substitution nucléophile avec l'iodure de l'homosérine racémique **III-14**

Après traitement de la réaction, le composé brut est analysé par RMN. En RMN ^{31}P , trois signaux sont observés entre 48 et 49 ppm. Après deux purifications par chromatographie sur gel de silice, le composé pur est obtenu avec un rendement de 8%. On retrouve toujours trois signaux en RMN ^{31}P . En RMN ^1H , le produit souhaité semble présent mais les intégrations ne correspondent pas totalement avec la structure de la molécule et il reste quelques impuretés. De plus, en travaillant sur des substrats racémiques, 8 isomères sont potentiellement observables. Ce résultat est encourageant mais il semble difficile de continuer dans cette voie vu les faibles rendements observés.

5.2. Couplage avec l'acrylamide de Weinreb puis réduction en aldéhyde

La stratégie d'introduction d'une fonctionnalité type amide de Weinreb suivie de la réduction en aldéhyde afin d'introduire la partie acide aminée a donc été revisitée cette fois-ci à partir du phosphinate d'éthyle **III-31** (Schéma **III-55**).

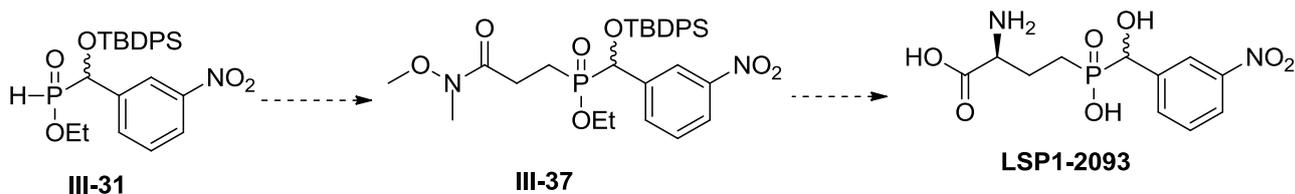


Schéma **III-55** Addition de **III-31** sur l'acrylamide de Weinreb **III-26**

En utilisant les mêmes conditions de déprotonation (LiHMDS, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$), nous avons additionné le phosphinate **III-31** sur l'acrylamide de Weinreb **III-26** (Schéma **III-56**).

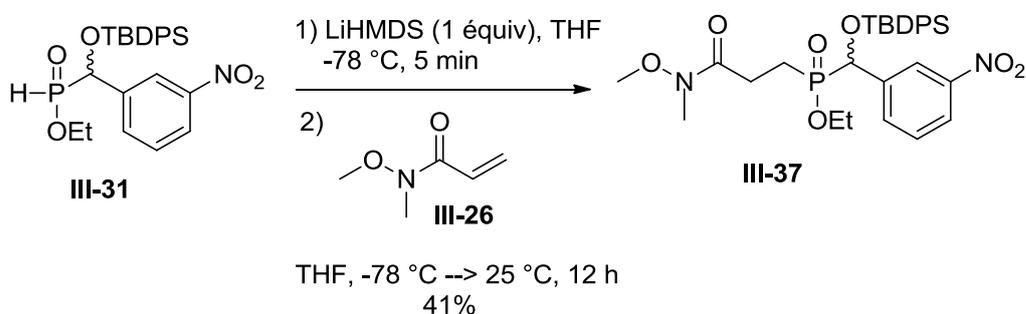


Schéma **III-56** Addition de Michael de **III-30** sur l'acrylamide de Weinreb **III-26**

Le composé **III-37** dialkylé est obtenu avec un rendement de 41% après purification sur colonne chromatographique. La structure du composé est cohérente avec les analyses effectuées (RMN et masse). Cette réaction a été menée en parallèle en passant par un P^{III} silylé (TMSBr/ NEt_3) mais le résultat est totalement différent. Le spectre RMN ^1H est difficilement interprétable alors qu'en RMN ^{31}P , on observe une multitude de pics. Cela prouve une nouvelle fois qu'il est plus intéressant d'utiliser les conditions basiques pour alkyler le phosphore.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la réduction de cet amide de Weinreb pour obtenir directement une fonction aldéhyde. Nous avons voulu utiliser tout d'abord le réactif de Schwartz que nous nous étions procurés (Schéma **III-57**).

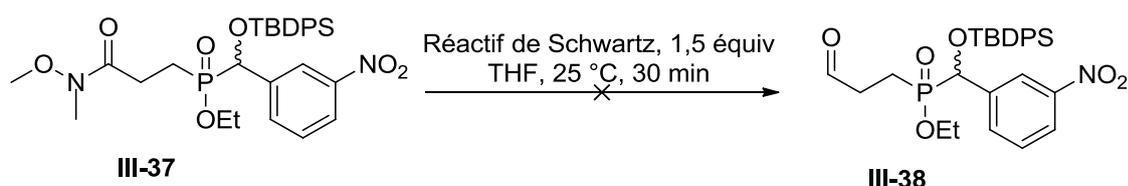


Schéma **III-57** Réduction du composé **III-37** par hydrozirconation

Après traitement de la réaction par addition de silice pour piéger le zirconium, aucun pic d'aldéhyde n'est visible en RMN ^1H et les deux signaux caractéristiques des méthyles de l'amide de Weinreb sont présents. Nous avons alors augmenté le nombre d'équivalents de réactif de Schwartz jusqu'à 2 et 5 équivalents. Avec deux équivalents, on observe le même résultat et avec 5, on ne retrouve plus du tout notre molécule.

Pour résoudre le problème, nous avons alors utilisé 2 eq de DIBAL-H (1M dans le toluène) que l'on additionne sur l'amide de Weinreb **III-37** solubilisé dans le DCM (Schéma **III-58**).⁴⁴⁷

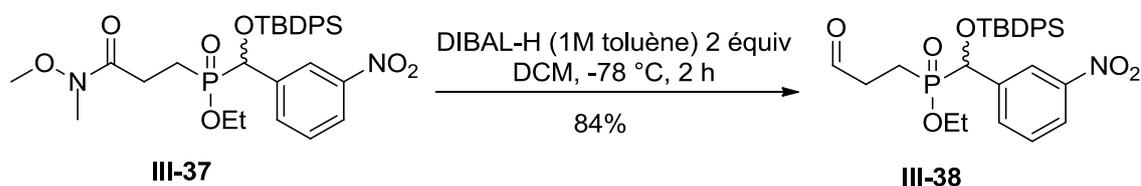


Schéma **III-58** Réduction du composé **III-37** avec le DIBAL-H

Un point important est à signaler lors de l'interprétation des analyses RMN de cet aldéhyde. La RMN ^1H (dans le MeOD) du composé brut fait apparaître la présence de 2 composés, l'aldéhyde **III-38** souhaité ainsi qu'un autre composé minoritaire possédant une structure assez proche. Après purification, sur colonne chromatographique, l'analyse RMN ^1H (dans le MeOD) du composé majoritaire ne montrait aucune présence du proton de l'aldéhyde (Figure **III-21**). En revanche, on pouvait observer un multiplet à 4.4 ppm représentant le proton en alpha des deux groupements hydroxyles du composé **III-39** (Schéma **III-59**). La même analyse RMN ^1H mais cette fois dans le CDCl_3 a été effectuée. Dans ce solvant qui est beaucoup plus anhydre, on retrouve seulement la forme aldéhydique. C'est donc l'eau présente dans le MeOD qui déplace l'équilibre vers la formation de la forme hydrate. En se penchant sur la réduction avec le réactif de Schwartz, nous pouvons nous apercevoir que la réduction a été réalisée mais qu'en RMN ^1H (dans le MeOD), on ne voyait pas l'aldéhyde mais la forme hydratée. Avec un rendement de 84%, les conditions de réduction avec le DIBAL-H sont toutefois conservées.

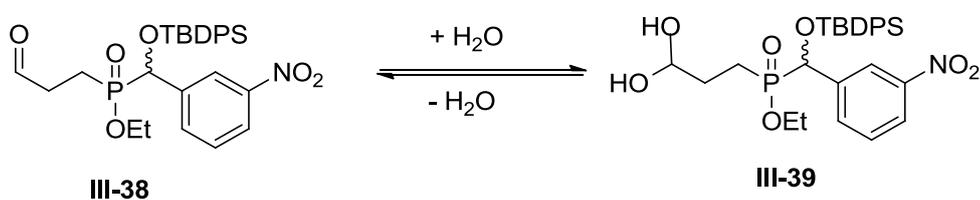


Schéma **III-59** Equilibre aldéhyde – hydrate d'aldéhyde

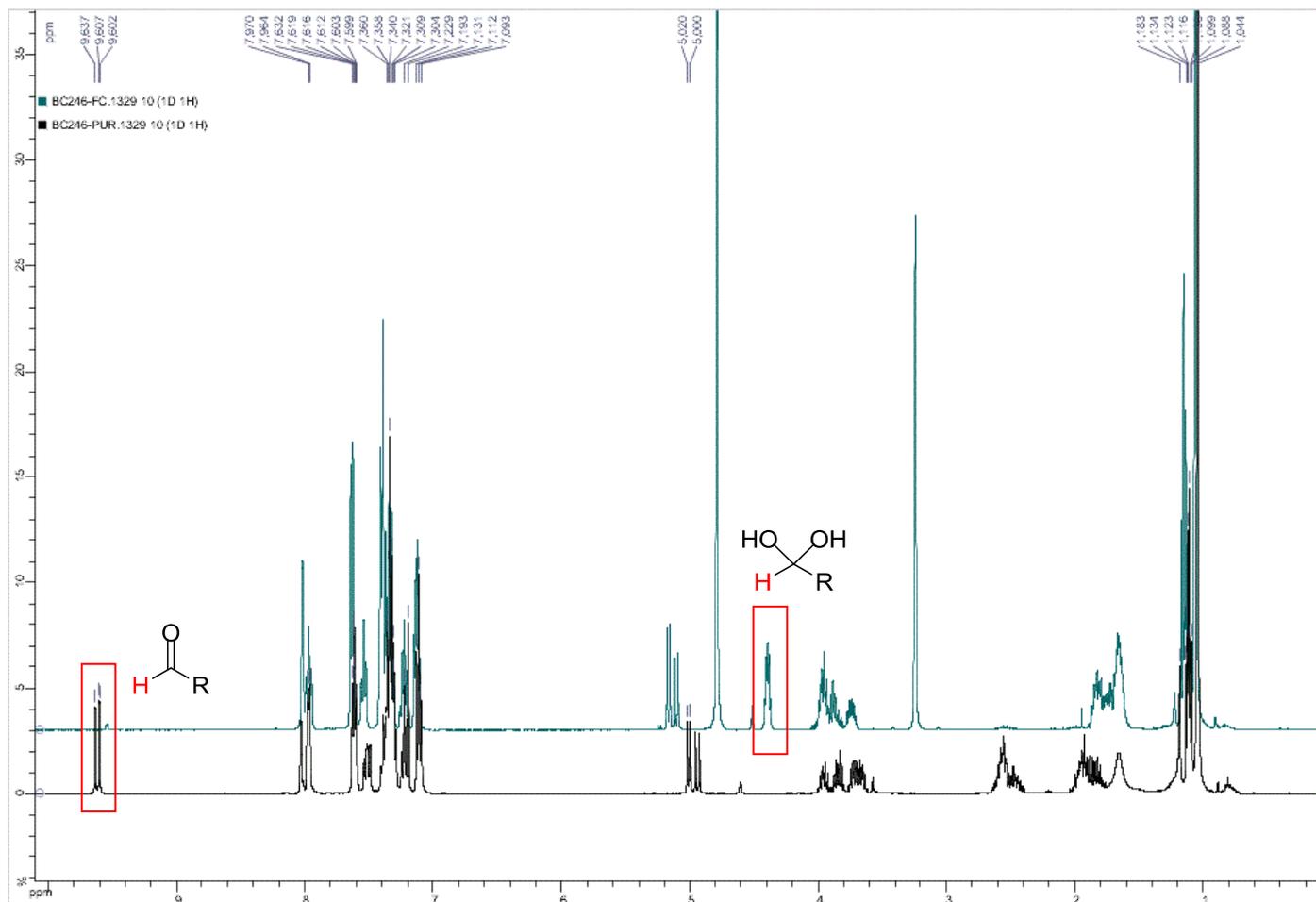


Figure **III-21** Spectre de l'aldéhyde **III-38** dans le CDCl_3 (noir) et dans le MeOD (vert)

L'obtention de l'acide α -hydroxyle-phosphinique **III-38** porteur de la fonction aldéhyde est cruciale car à partir de l'aldéhyde nous pouvons obtenir l'acide aminé en utilisant la réaction de Strecker.

5.3. Réaction de Strecker

5.3.1. Données bibliographiques

En 1850, Strecker⁴⁶⁷ avait comme objectif de synthétiser l'acide lactique en traitant l'acétaldéhyde avec respectivement une solution aqueuse d'ammoniaque et du cyanure d'hydrogène. Puis, après hydrolyse acide de l'intermédiaire aminonitrile, il pensait obtenir l'acide lactique (Schéma **III-60**). A sa grande surprise, il n'a pas obtenu l'acide lactique mais l'alanine. Cette synthèse est considérée comme la première synthèse d' α -amino acide.

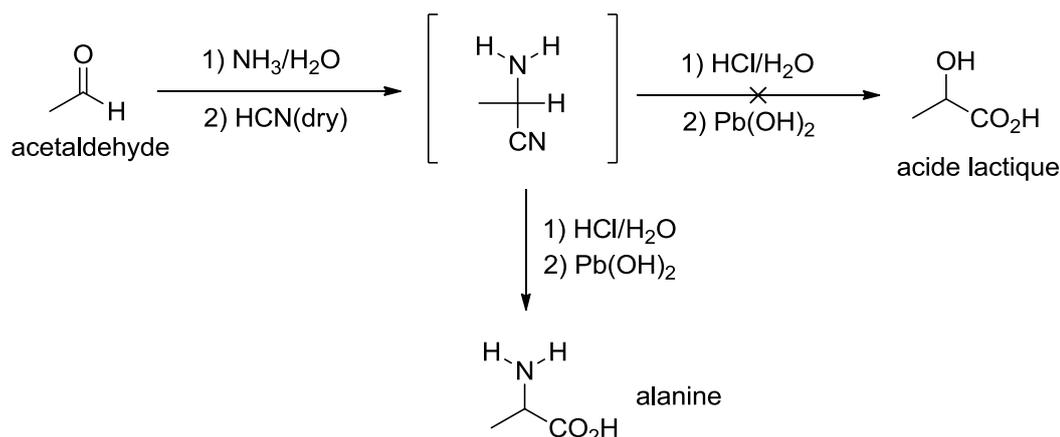
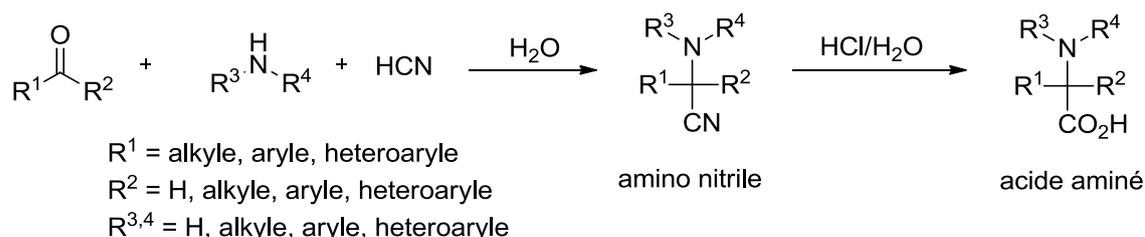
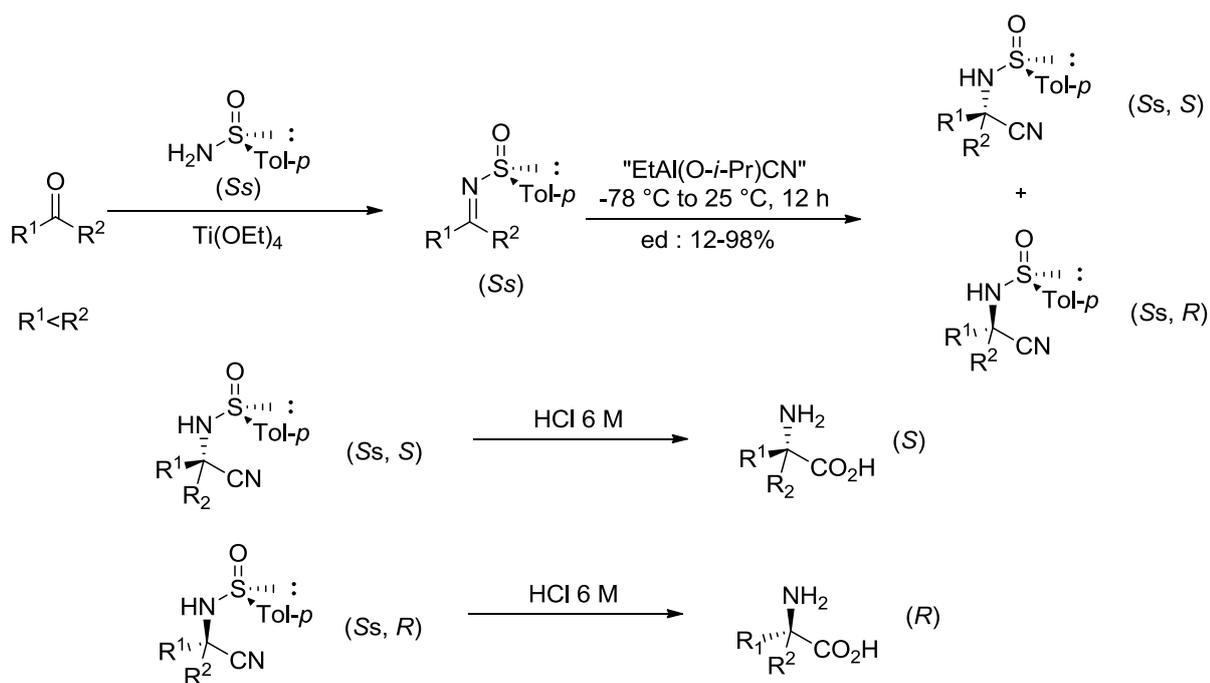


Schéma III-60 Réaction de Strecker (1850)

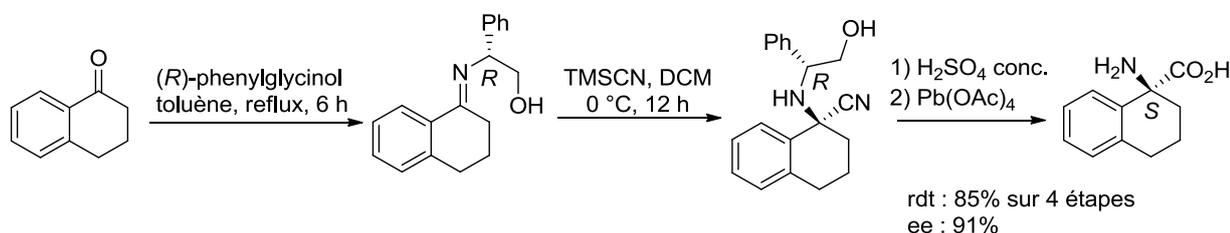
Puis, cette synthèse fut généralisée en condensant un aldéhyde (ou une cétone) avec une amine primaire (ou secondaire) en présence de cyanure d'hydrogène pour obtenir l'amino nitrile. L'acide aminé correspondant est obtenu après hydrolyse acide (Schéma III-61).

Schéma III-61 Réaction de Strecker – obtention d' α -amino acide⁴⁶⁸

Le cyanure d'hydrogène étant très toxique, il fut remplacé très rapidement par différents sels de cyanures alcalins (NaCN, KCN) ou d'autres sources d'ion cyanure (TMSCN, Et₂AlCN,...). Puis, le principal progrès de cette réaction a été la première synthèse énantiosélective de Strecker (Schéma III-62) réalisée par Davis *et al.*⁴⁶⁹⁻⁴⁷⁴. En effet, en utilisant une amine chirale et plus particulièrement le (*S*)-(+)-*p*-toluensulfinamide, Davis a pu contrôler l'addition du nitrile sur l'imine chirale obtenue avec de très bons excès diastéréomériques et obtenir l'amino acide énantiomériquement pur après hydrolyse acide. En parallèle, Ellman *et al.* ont développé le même type de réaction en synthétisant des amines chirales avec le (*S*)-(+)-*tert*-butanesulfinamide.⁴⁷⁵⁻⁴⁷⁷


 Schéma III-62 Synthèse asymétrique de Strecker rapportée par Davis *et al.*

D'autres équipes ont travaillé sur la réaction de Strecker en version asymétrique en utilisant différentes amines chirales pour générer l'imine chirale. Le groupe de recherche de Jablonkai⁴⁷⁸ a expérimenté cette réaction one-pot en utilisant la (*S*)-(-)-1-phenylethylamine. Cependant, l'amine chirale la plus utilisée est le (*R*)-(-)-phenylglycinol rapporté par différents groupes de recherche tels que Chakraborty^{479,480}, Kim⁴⁸¹, ou encore Beatty⁴⁸². Ce dernier a décrit la première synthèse asymétrique d' α -aryl- α -alkyl-amino acide cyclique par l'intermédiaire de la réaction de Strecker. Le plus grand avantage du (*R*)-phenylglycinol est sa déprotection qui se fait très facilement en présence d'acétate de plomb Pb(OAc)₄ (Schéma III-63).^{481,483}


 Schéma III-63 Synthèse d' α -aryl- α -alkyl-amino acide cyclique de Beatty *et al.*

La chiralité nécessaire pour la version asymétrique de la réaction de Strecker peut être aussi amenée par un catalyseur organique ou un complexe métallique chiral.⁴⁸⁴

Réaction de Strecker asymétrique organocatalysée

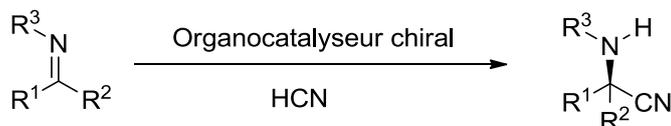


Schéma III-64 Synthèse énantiosélective organocatalysée de Strecker

Plusieurs équipes ont travaillé sur cette version organocatalysée en synthétisant différents catalyseurs (Schéma III-64). Parmi eux, nous pouvons citer la diketopipérazine de Lipton⁴⁸⁵, la guanidine de Corey⁴⁸⁶ ou encore l'urée et la thiourée de Jacobsen⁴⁸⁷⁻⁴⁸⁹ dont les structures sont représentées ci-dessous (Figure III-22).

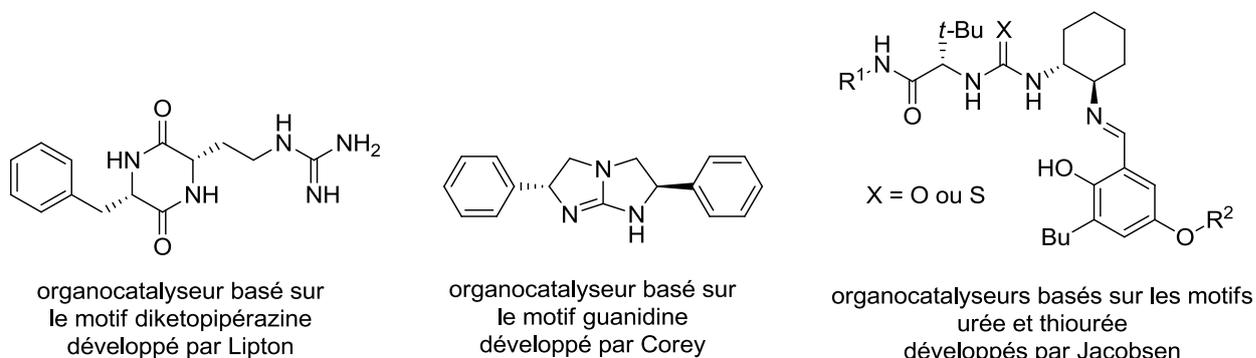


Figure III-22 Organocatalyseurs utilisés en réaction de Strecker asymétrique

Corey propose un mécanisme réactionnel en présence de guanidine (Schéma III-65).

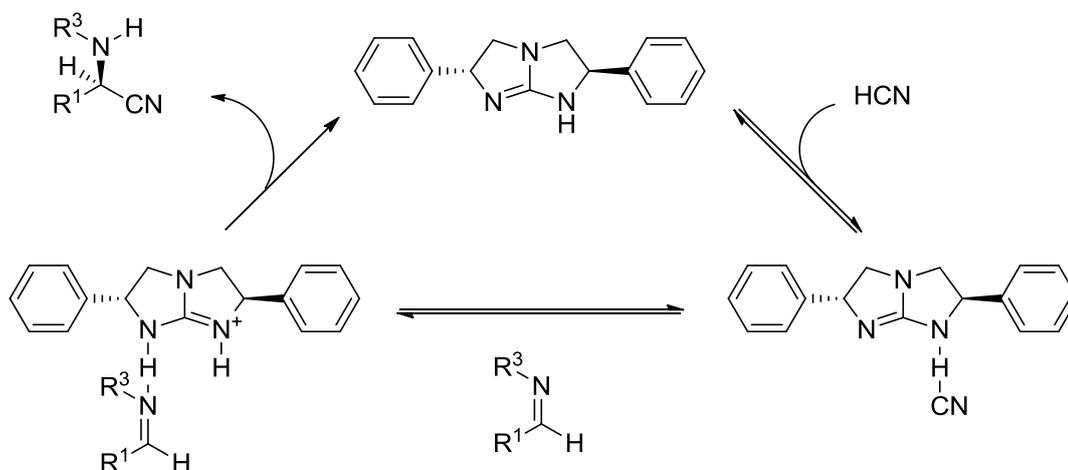
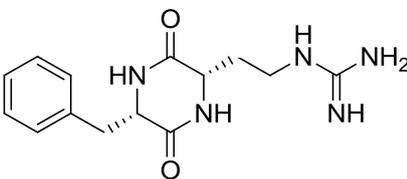
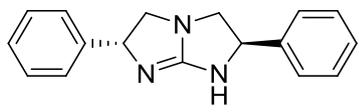
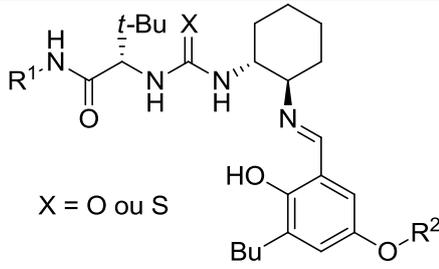


Schéma III-65 Mécanisme de la réaction de Strecker asymétrique en présence de guanidine

En conclusion, différents types d'organocatalyseurs ont été développés et ont montré une grande efficacité dans la réaction énantiosélective de Strecker à partir d'une grande gamme de substrats (Tableau III-6). Ces réactions permettent également un accès efficace et pratique aux acides aminés de stéréochimie (*S*) et les organocatalyseurs sont recyclables.

Tableau III-6 Résumé des méthodes de Strecker asymétrique organocatalysée⁴⁸⁴

structure du catalyseur	substrats	quantité catalytique	rendement (%)	excès énantiomérique ee (%)
	aldimines aromatiques (pas de substituant nitro et pas d'hétéroatome)	2 mol%	82-97	80-99
	aldimines aromatiques et aliphatiques	10 mol%	80-99	50-88
 <p>X = O ou S</p>	aldimines aromatiques et aliphatiques et cétimines	1-2 mol%	65-98 45-100	77-99 42-95

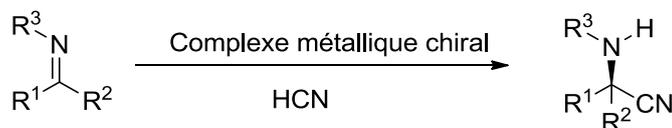
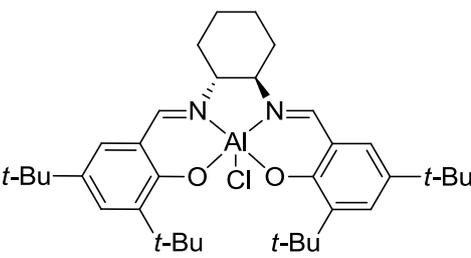
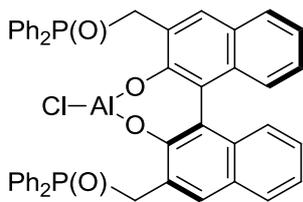
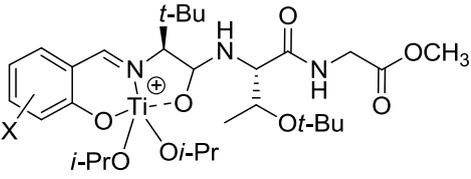
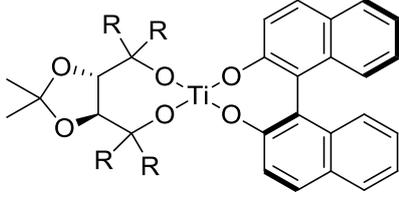
Réaction de Strecker asymétrique catalysée par des ligands métalliques chiraux

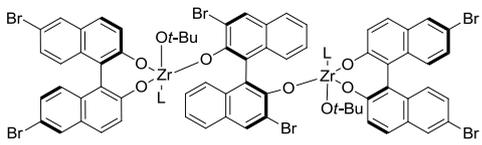
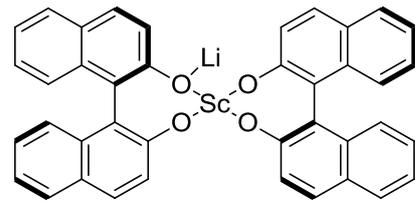
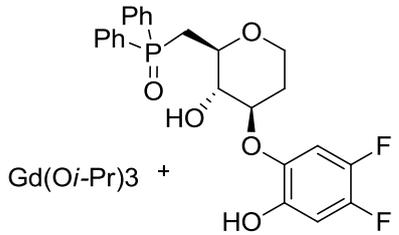
Schéma **III-66** Synthèse énantiosélective de Strecker catalysée par des complexes métalliques

Plusieurs équipes ont travaillé sur cette version catalysée par différents complexes métalliques chiraux. Parmi eux, nous retrouvons les catalyseurs à base de sels d'aluminium de Jacobsen⁴⁹⁰, les binaphtols d'aluminium de Shibasaki^{491,492}, les peptides à base de titane développés par Hoveyda⁴⁹³, les dérivés de titane synthétisés par le groupe de Vallée⁴⁹⁴, les binaphtols de zirconium de Kobayashi⁴⁹⁵ et les catalyseurs basés sur des lanthanides (sels de scandium de Vallée⁴⁹⁶ ou de gadolinium de Shibasaki⁴⁹⁷). Toutes ces structures sont représentées dans le tableau **III-7**.

En général les imines aromatiques donnent les meilleurs résultats. En moyenne, 5 à 15% molaire de catalyseur sont utilisés et pour les meilleurs catalyseurs, cette quantité peut descendre jusqu'à 1%. Ainsi, les complexes métalliques chiraux représentent un groupe important de catalyseurs pour la réaction de Strecker asymétrique (Tableau **III-7**). Cette méthodologie a été beaucoup utilisée en particulier pour la synthèse de nombreux produits naturels comme la (-)-Hemiasterlin⁴⁹⁸ ou encore l'amcilenomycin.⁴⁹⁹

Tableau III-7 Résumé des méthodes de Strecker asymétrique catalysée par des ligands métalliques⁴⁸⁴

structure du catalyseur	substrats	quantité catalytique	rendement (%)	excès énantiomérique ee (%)
	aldimines aromatiques (ee moyen pour les aldimines aliphatiques)	5 mol%	91-99	79-95
	aldimines aromatiques, hétéroaromatiques, α,β -insaturées et aliphatiques	9 mol%	66-97	70-96
	aldimines aromatiques, α,β -insaturées, doublement insaturées et aliphatiques	2,5-15 mol%	93-00 (conversion)	76-97
	cétimine (1 seul exemple)	10 mol%	80-95 maximum	45-59 maximum

	aldimines aromatiques, hétéroaromat iques et aliphathiques Réaction one-pot à partir d'aldéhyde et d'amine	5-10 mol% 1-5 mol%	55-98 76-100	74-92 84-94
	aldimines aromatiques, cétimine (1 seul exemple)	10 mol%	80-95 maximum 70 maximum	86-95 45-55
	aldimines aromatiques, α,β - insaturées et aliphathiques	2,5-10 mol%	67-99	51-98

5.3.2. Réaction de Strecker asymétrique sur l'aldéhyde **III-38**

Au vu de toutes ces données bibliographiques, plusieurs méthodes semblent efficaces pour effectuer la réaction de Strecker asymétrique à partir d'un aldéhyde. Dans notre cas, nous nous sommes basés sur les travaux de Midura *et al.*⁵⁰⁰ qui ont développé une réaction de Strecker asymétrique (ee = 42%) sur des phosphonates cyclopropaniques en utilisant comme amine chirale le (*S*)-(+)-*p*-toluensulfonamide (Schéma **III-67**). Ils ont choisi cette amine car les rendements et les excès énantiomériques observés sont bons.⁵⁰¹ L'équipe de Pellicciari a

également synthétisé des analogues cycliques de L-AP4 mais en utilisant le (*R*)-(-) phenylglycinol pour la réaction de Strecker asymétrique.^{483,502}

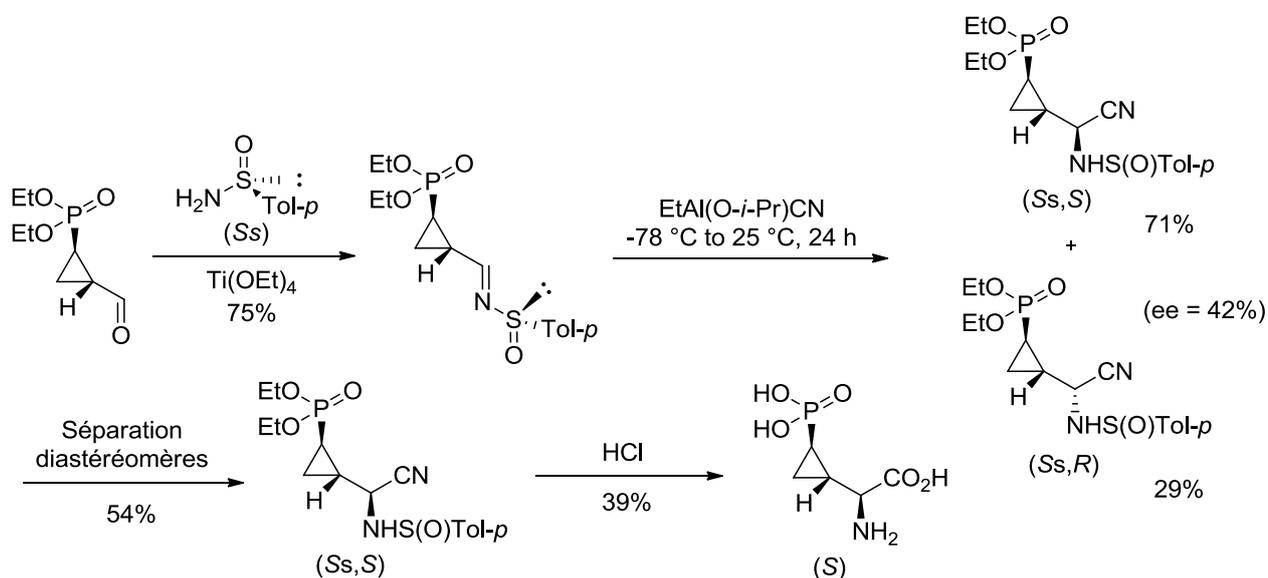


Schéma III-67 Synthèse énantiosélective d'analogue cyclique du L-AP4

Sur la base des résultats de Midura nous avons tout d'abord synthétisé la sulfinylimine III-40 par condensation de l'aldéhyde III-38 avec le (*S*)-(+)-*p*-toluènesulfonamide en présence de tétraéthoxytitanane dans le DCM (Schéma III-68).

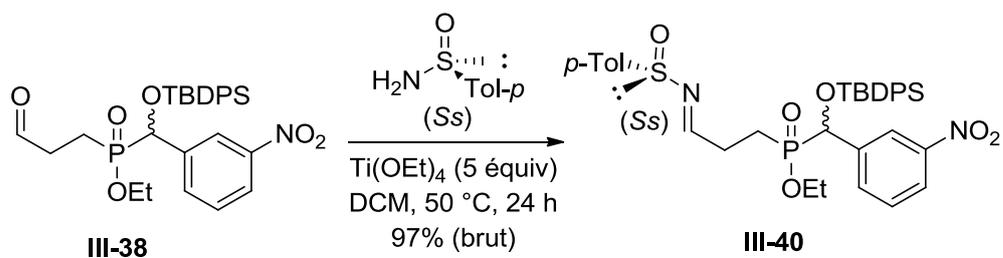
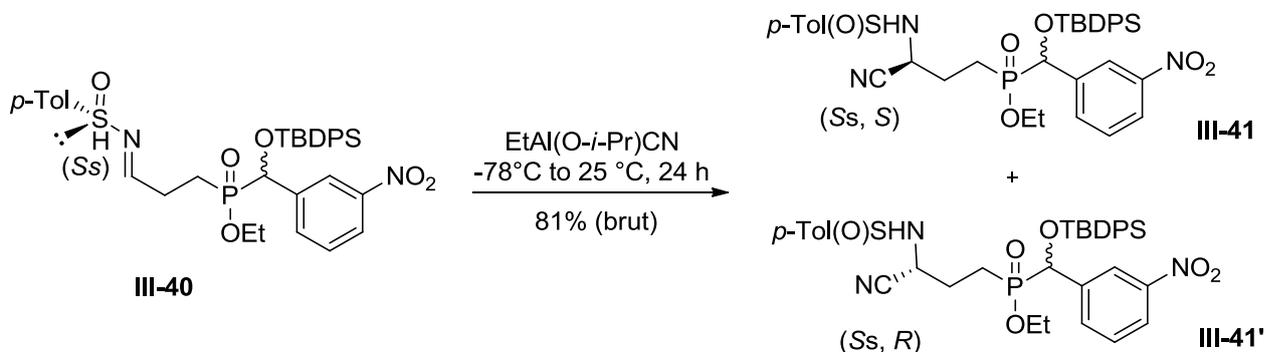


Schéma III-68 Synthèse de la sulfinylimine chirale III-40

Après 24 heures de reflux, une hydrolyse aqueuse permet de neutraliser le réactif de titane très hygroscopique. Après filtration sur célite, le composé brut est obtenu avec 97% de rendement. Les spectres RMN sont cohérents avec la structure désirée ; on n'observe plus le signal caractéristique de l'aldéhyde et on observe 4 signaux en RMN ^{31}P correspondant aux 4 diastèreomères. Il est difficile de suivre les réactions par CCM, on utilise alors la LC-MS qui indique bien l'absence d'aldéhyde (pic à 2,53 min $[\text{M}+\text{H}]^+ = 540,00$) et la présence de l'imine (pic à 2,75 min $[\text{M}]^+ = 676,91$). Nous n'avons pas purifié ce composé car les imines sont assez sensibles sur silice et on risque de l'hydrolyser.

Ensuite, nous avons additionné le groupement nitrile sur l'imine pour obtenir le précurseur final de l'acide aminé (Schéma **III-69**). On utilise pour cela le $\text{EtAl(O-}i\text{-Pr)CN}$ formé *in situ* entre le cyanure de diéthylaluminium (Et_2AlCN , 2 équiv) et de l'*i*PrOH (1 équiv).



L'addition du nitrile devrait se faire préférentiellement sur la face Ré de l'imine ; la face Si étant encombrée par le groupement *p*-tolyle (Figure **III-23**).⁵⁰³

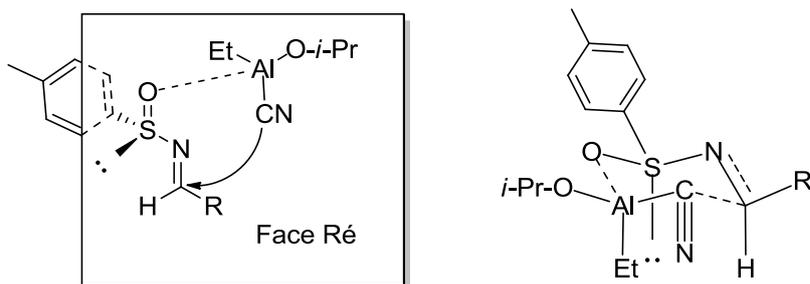
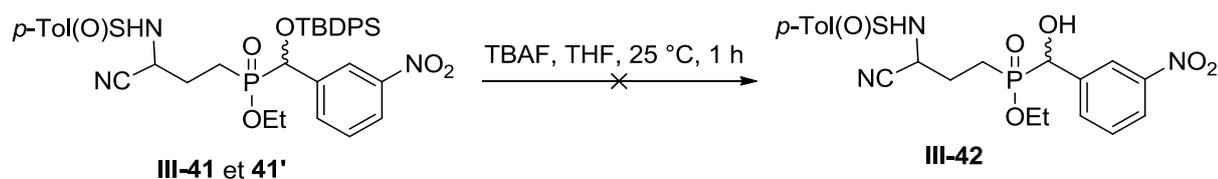


Figure **III-23** Contrôle de la sélectivité lors de la réaction de Strecker⁵⁰³

Cependant, en présence de 8 isomères possible, il est difficile de mesurer l'induction par l'amine chirale. Par LC-MS, nous avons pu suivre la bonne formation de l'adduit de Strecker avec un pic à 2,65 min correspondant à une masse de $[\text{M}]^+ = 703,89$. Nous avons essayé de purifier le composé brut obtenu. Trois fractions ont été collectées mais les données analytiques sont identiques. Après plusieurs tentatives de purification, nous avons continué la voie de synthèse avec le mélange d'isomères. L'objectif pour le moment est d'optimiser les conditions réactionnelles afin d'obtenir le **LSP1-2093** racémique sans contrôle des centres asymétriques.

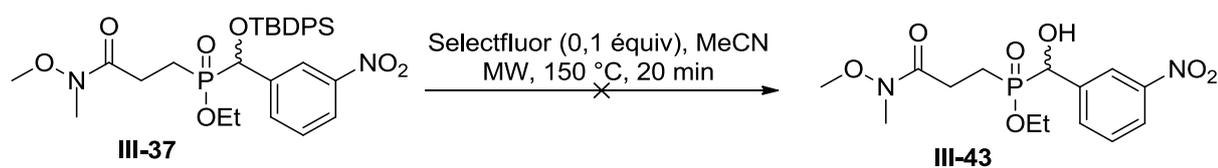
5.4. Déprotection et hydrolyse de l'adduit de Strecker **III-41**

La voie de synthèse a donc été poursuivie par les deux dernières étapes : une déprotection du groupement silylé puis l'hydrolyse du nitrile pour obtenir l'acide aminé. Les éthers silylés sont généralement déprotégés par des ions fluorures F^- et la déprotection par le TBAF dans le THF à 25 °C est la plus utilisée.^{504,505} Nous avons testé ces conditions sur notre substrat (Schéma **III-70**).

Schéma **III-70** Déprotection de l'éther silylé **III-41** avec du TBAF

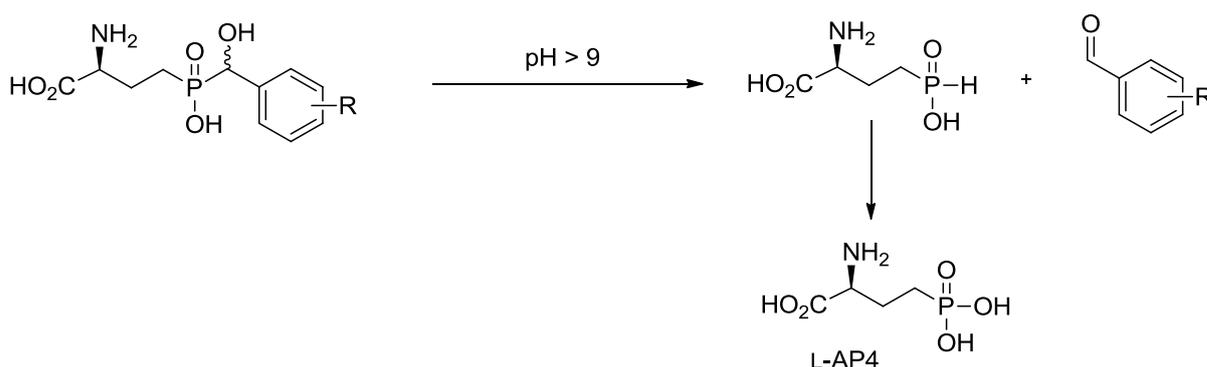
Le groupement silylé a bien été déprotégé mais l'analyse RMN du produit obtenu n'est pas cohérente avec la structure du composé attendu. En effet, en RMN du phosphore, on observe un pic à 29,8 ppm qui correspondrait plus à un phosphinate monoalkylé. Nous avons alors mis au point les conditions de déprotection de l'éther silylé sur l'amide de Weinreb **III-37**. Un essai a alors été réalisé avec du Selectfluor en se référant aux travaux de Shah *et al.* (Schéma **III-71**).

506

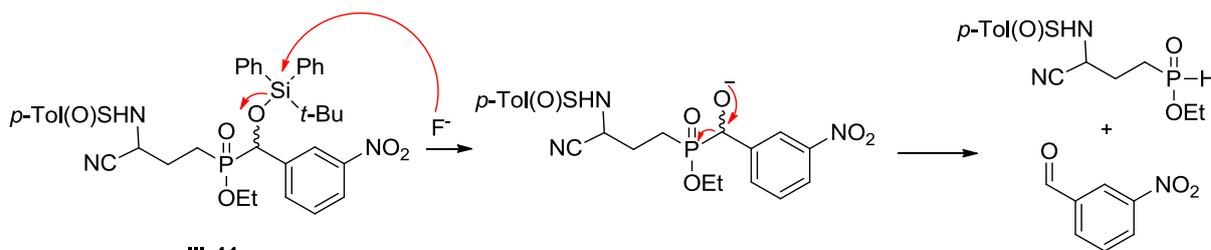
Schéma **III-71** Déprotection de l'éther silylé avec du Selectfluor

Le produit brut de cette réaction ne présente aucun signal en RMN ^{31}P . Par CCM, deux composés sont visibles que l'on sépare par chromatographie sur gel de silice. Le premier produit élué correspond au TBDPSOH et le deuxième est le 3-nitrobenzaldéhyde.

Lors de ces deux expériences de déprotection sur les substrats **III-37** et **III-41**, on retrouve un substrat H-phosphinate et le 3-nitrobenzaldéhyde séparément comme si une coupure de la liaison phosphore-carbone se produisait. Cet évènement a déjà été observé sur nos composés finaux lors de purification sur résine échangeuse d'anion. Sur ce type de résine, le dépôt du composé brut se fait habituellement à pH 7-8. Lorsque le dépôt est réalisé à un pH supérieur, on a pu observer la coupure de la liaison phosphore-carbone conduisant ainsi au benzaldéhyde et au L-AP4 (issu de l'oxydation de l'acide H-phosphinique) (Schéma **III-72**).

Schéma **III-72** Coupure de la liaison P-C en milieu basique

Nous pouvons penser que l'attaque de l'ion fluorure sur le groupement silylé génère l'alcoolate qui peut provoquer la coupure de la liaison carbone-phosphore donnant ainsi l'aldéhyde et le H-phosphinate (Schéma **III-73**).

**III-41**Schéma **III-73** Coupure de la liaison phosphore-carbone en présence d'ions fluorures

Ce problème a été résolu en ajoutant dans le milieu réactionnel de l'acide acétique avant l'introduction de TBAF. Evidemment, les quantités de TBAF et d'AcOH sont équimolaires.⁵⁰⁷ Le milieu acide permet de protoner *in situ* l'alcoolate formé et ainsi éviter la coupure de la liaison phosphore-carbone. Les conditions ont d'abord été testées sur l'amide de Weinreb **III-36** (Schéma **III-79**) et après purification par chromatographie, le composé **III-42** a pu être isolé et caractérisé avec un rendement de 76%.

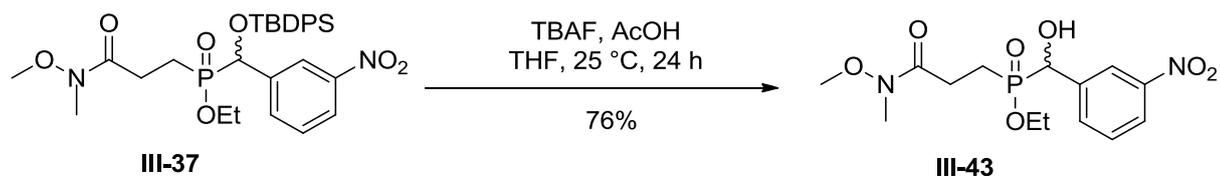
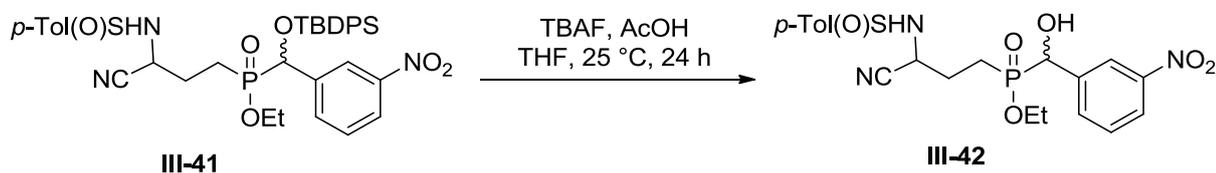
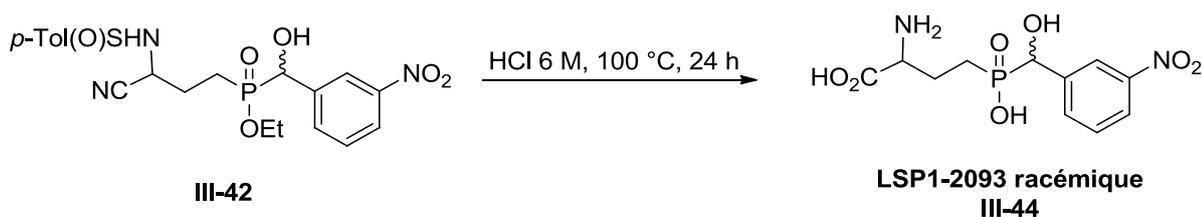


Schéma III-74 Optimisation des conditions de déprotection TBAF/AcOH

Les mêmes conditions testées sur le composé **III-41** (Schéma III-75) conduisent au produit déprotégé avec un rendement de 30% sans purification. Par LC-MS, on observe bien la disparition complète du pic du composé **III-41** protégé et l'apparition d'un pic correspondant à un produit plus polaire.


 Schéma III-75 Déprotection de l'éther silylé du composé **III-40** avec TBAF/AcOH

La dernière étape consiste à hydrolyser le sulfynamide et le nitrile afin d'obtenir la fonction acide aminé libre. Cette hydrolyse s'effectue dans HCl 6 M à reflux (100 °C) pendant 24 heures (Schéma III-76).


 Schéma III-76 Obtention du **LSP1-2093** racémique brut par hydrolyse acide

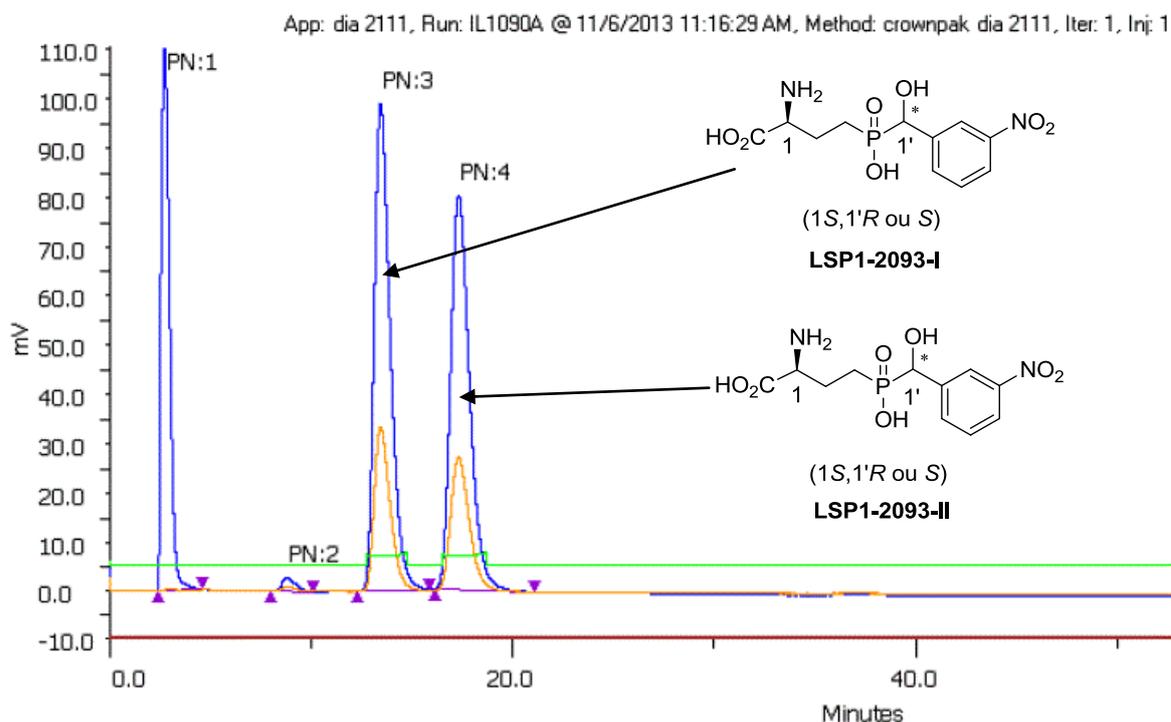
Alors que l'on observait plusieurs signaux en RMN du phosphore pour tous les produits précédents depuis la formation de la sulfinylimine **III-40**, ceux-ci correspondant aux différents isomères et également à des sous-produits de réaction ; le spectre RMN ^{31}P du composé brut isolé **III-44** est composé d'un seul pic à 46,0 ppm, soit la zone de déplacement chimique des composés finaux de ce type. 300 mg de produit brut ont été purifiés par résine échangeuse d'ions. Une première purification sur une résine échangeuse de cations a permis d'obtenir le composé mélangé à du L-AP4. Une seconde purification sur une résine échangeuse d'anions a

donc été effectuée pour obtenir le composé pur (+ quelques traces de L-AP4). Les données analytiques de ce composé sont similaires à celles du **LSP1-2093** précédemment synthétisé par la voie classique reportée au paragraphe **I.2.6.3**.

Une nouvelle voie de synthèse du **LSP1-2093** permettant d'accéder aux deux diastéréomères a donc été développée. Avant d'appliquer ce procédé de synthèse pour l'obtention des deux diastéréomères permettant d'établir la configuration absolue du centre hydroxylé des dia-I et II, nous avons analysé le composé racémique synthétisé **III-44** par HPLC chirale avec la CR(+).

5.5. Analyse par HPLC chirale Crownpak CR(+) du composé **III-44**

Afin de comparer les profils HPLC (colonne Crownpak CR(+)) des dérivés du **LPS1-2093** obtenus soit par la voie précédemment décrite (Figure **III-25**), soit par la voie de synthèse générale développée par Chelliah Selvam (Chapitre **I.2.6.3**) (Figure **III-24**), nous avons injecté les deux échantillons l'un juste après l'autre afin de travailler dans les mêmes conditions ; cette colonne étant très sensible aux légères différences de température.

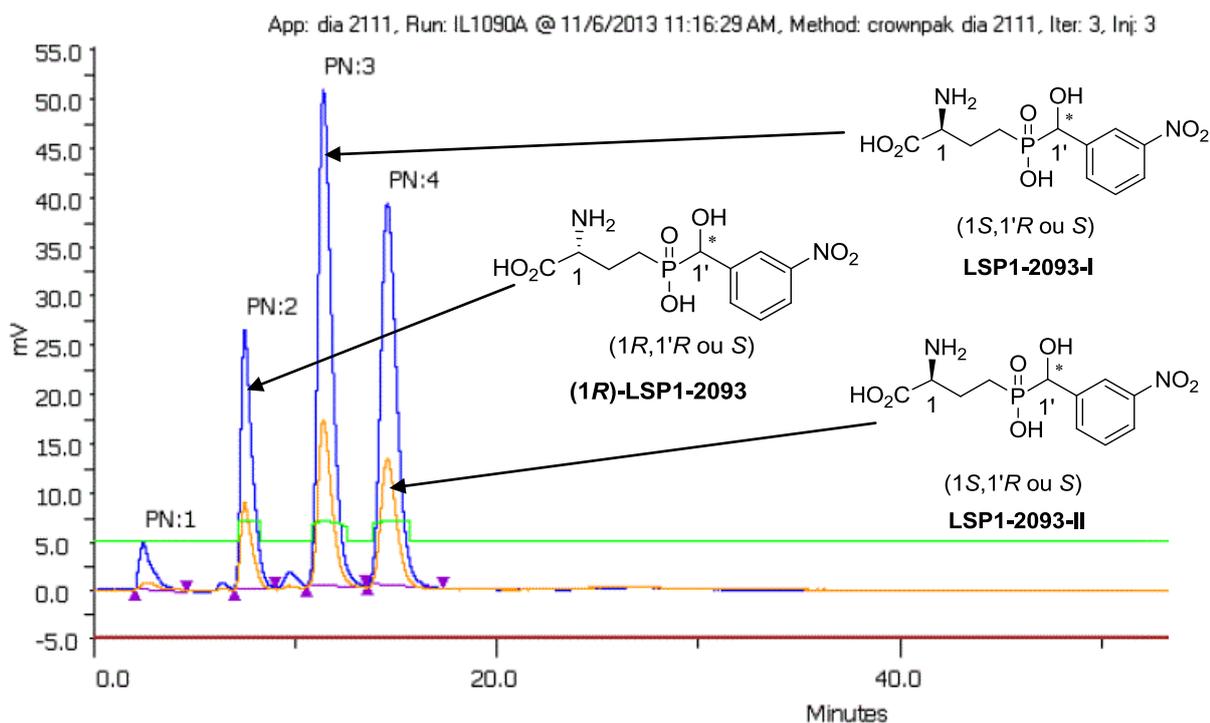


Colonne Crownpak CR(+) 150 x 4 mm, éluant HClO₄, pH 2, débit 0.4 mL.min⁻¹, T = 21°C,

bleu : $\lambda = 210$ nm ; orange : $\lambda = 254$ nm

Figure **III-24** Spectre du **LSP1-2093** obtenu par la méthode de Chelliah Selvam

La colonne Crownpak CR(+) permet de séparer les acides aminés (*S*) car ces derniers sont plus retenus par la phase stationnaire que les acides aminés (*R*). Le pic 1 correspond au pic d'injection et les autres deux pics correspondent donc aux deux diastéréoisomères du **LSP1-2093-I** et **II**



Colonne Crownpak CR(+) 150 x 4 mm, éluant HClO₄, pH 2, débit 0.4 mL.min⁻¹, T = 21°C,
bleu : λ = 210 nm ; orange : λ = 254 nm

Figure **III-25** Spectre du **LSP1-2093** racémique **III-44**

Sur le chromatogramme HPLC du composé **III-44**, nous pouvons observer 4 pics. Le premier pic correspond au pic d'injection. Puis, étant donné que la réaction de Strecker n'est pas totalement diastéréosélective, le second pic correspond aux isomères dont l'acide aminé est de configuration (*R*), le troisième au **LSP1-2093-I** et le quatrième au **LSP1-2093-II** encore appelé **III-44-I** et **II** (Figure **III-26**).

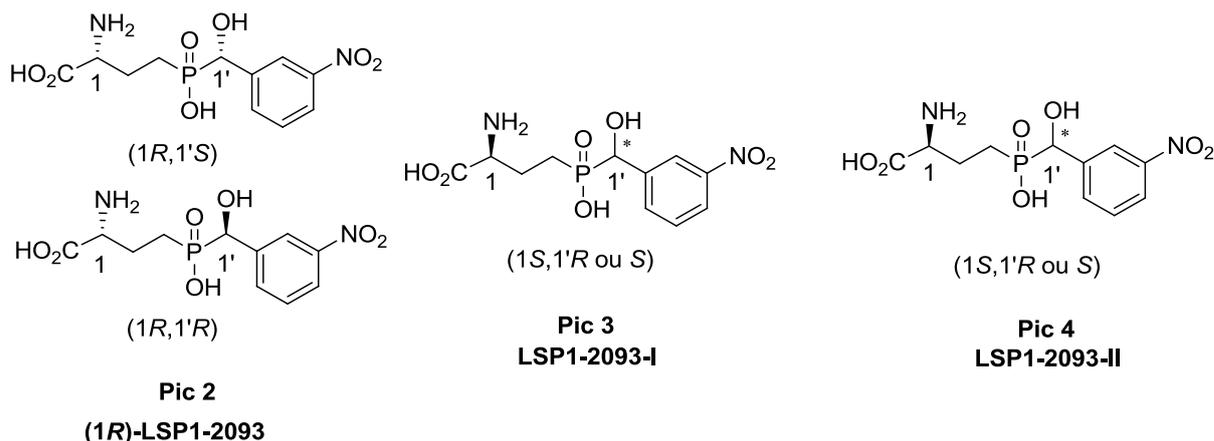


Figure III-26 Structure des composés correspondant aux pics du profil HPLC obtenus avec la CR(+)

En comparant les deux spectres, nous pouvons remarquer que le composé synthétisé **III-44** correspondant bien au **LSP1-2093** racémique avec aucun des deux centres stéréogènes contrôlé. L'induction asymétrique de la réaction de Strecker est assez faible car on retrouve environ 20% d'isomère (1*R*) et 80% d'isomère (1*S*) (ed 60%). Cependant, la nouvelle voie de synthèse développée optimisée sur le composé racémique va pouvoir être appliquée aux deux acides H-phosphiniques **III-4a** et **III-4b** énantiomériquement enrichis.

III.6. Application de la voie de synthèse développée aux deux énantiomères III-4a et III-4b

6.1. Protection des deux énantiomères III-4a et III-4b

La première étape consiste à protéger les deux fonctions libres (Schéma III-77).

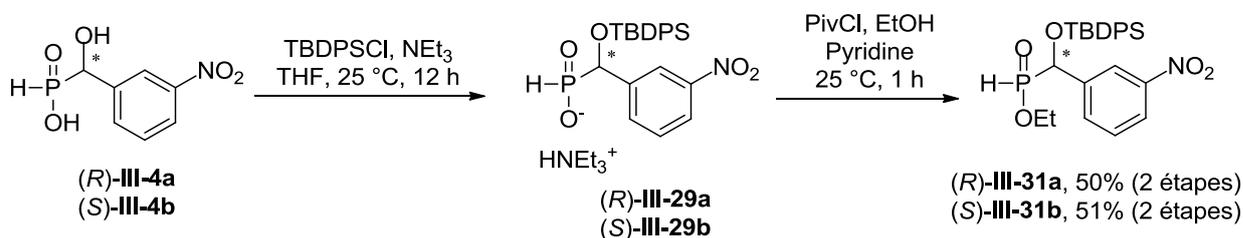


Schéma III-77 Protection des deux énantiomères (R)-III-4a et (S)-III-4b

Les conditions utilisées pour le composé racémique fonctionnent également très bien sur les deux composés enrichis et on obtient les deux produits protégés avec des rendements respectifs de 50 % pour le (R)-**III-4a** et 51 % pour le (S)-**III-4b**. Lors de cette étape, pour les deux séries (R) et (S), nous pensions pouvoir séparer les deux diastéréomères formés grâce à la chiralité du

phosphore une fois estérifié mais cela n'a pas été possible quel que soient les solvants utilisés. Cette séparation nous aurait permis par la suite d'observer plus facilement l'induction asymétrique lors de la réaction de Strecker car seuls 2 diastéréomères auraient été obtenus.

6.2. Obtention de l'aldéhyde, précurseur d'acide aminé

Les deux fonctions acide phosphinique et α -hydroxyle protégées, la seconde alkylation du phosphore a donc été effectuée sur l'acrylamide de Weinreb. Ensuite, la fonction aldéhyde est obtenue par réduction de l'amide de Weinreb avec du DIBAL-H (Schéma III-78).

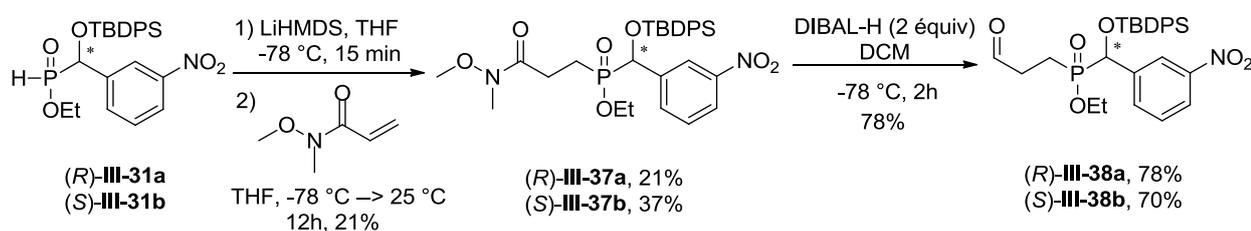


Schéma III-78 Synthèse des deux composés aldéhydiques (R)-III-38a et (S)-III-38b

Les rendements de l'addition de Michael et l'étape de réduction sont légèrement inférieurs à ceux observés avec le composé racémique III-38.

6.3. Réaction de Strecker

La première étape de la réaction de Strecker consiste à synthétiser l'imine par réaction entre la fonction aldéhyde et le (*S*)-(+)-*p*-toluènesulfinamide (Schéma III-79). Dans les mêmes conditions que pour le composé racémique en utilisant le $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ comme piègeur de l'eau formée, les deux sulfinylimines sont obtenues avec des rendements bruts de 86% pour le (R)-III-40a et 90% pour le (S)-III-40b.

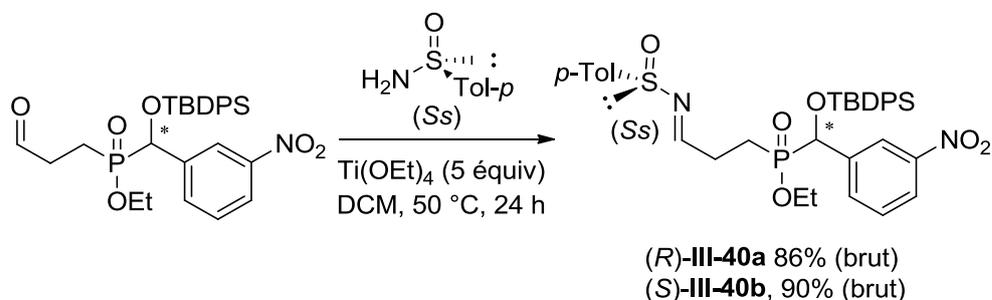


Schéma III-79 Synthèse des imines (R)-III-40a et (S)-III-40b

Le groupement nitrile du $\text{EtAl}(\text{O-}i\text{-Pr})\text{CN}$ peut ensuite être additionné sur ces deux imines (Schéma **III-80**) Lors de cette étape, nous espérons obtenir l'acide aminé de configuration (*S*) majoritairement avec l'addition du nitrile sur la face de devant. Cependant, il est très difficile de mesurer l'excès diastéréomérique par RMN avec la présence de quatre isomères ; les substrats de départ (*R*)-**III-4a** et (*S*)-**III-4b** étant énantiomériques à 80%. En RMN ^{31}P , nous avons 3 signaux majoritaires et 4 mineurs et en RMN ^1H , il est difficile de déterminer combien de produits sont présents. Les carbones sont numérotés « 1 » pour celui de l'acide aminé et « 1' » pour le carbinol benzylique en α de la fonction acide phosphinique.

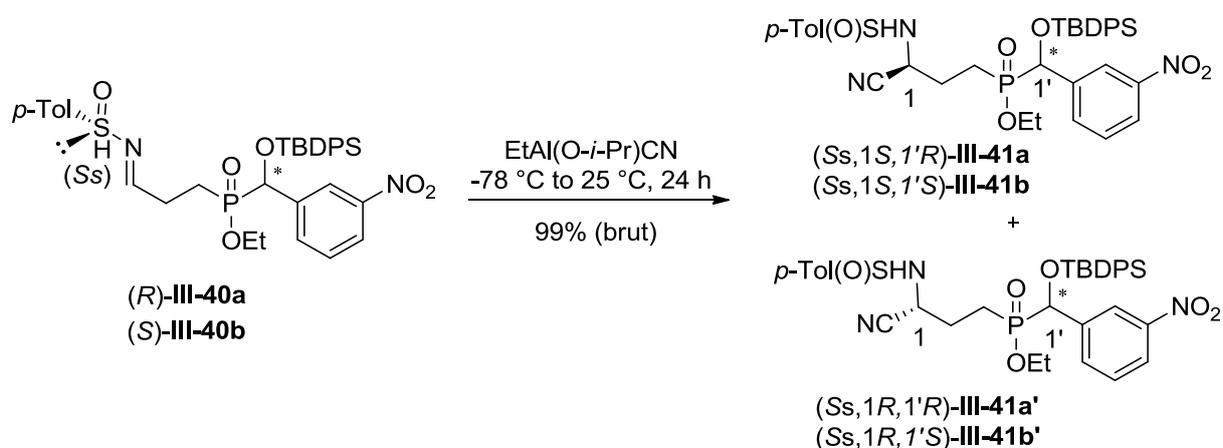


Schéma **III-80** Addition du nitrile sur les deux sulfonilimines (*R*)-**III-40a** et (*S*)-**III-40b**

Pour les deux séries (*R*) et (*S*), nous avons essayé de séparer les différents isomères par chromatographie mais sans succès. Nous avons alors continué la voie de synthèse dans chaque série. En revanche, cette étude pourra nous permettre d'attribuer les configurations absolues des carbinols stéréogènes benzyliques des deux isomères **LSP1-2093-I** et **II**.

6.4. Obtention des deux composés finaux **III-44a** et **III-44b**

Les deux composés finaux sont obtenus après déprotection du groupement silylé et hydrolyse acide. La première étape effectuée sur le mélange d'isomères se réalise en présence de TBAF et d'AcOH à température ambiante pendant 24 heures (Schéma **III-81**).

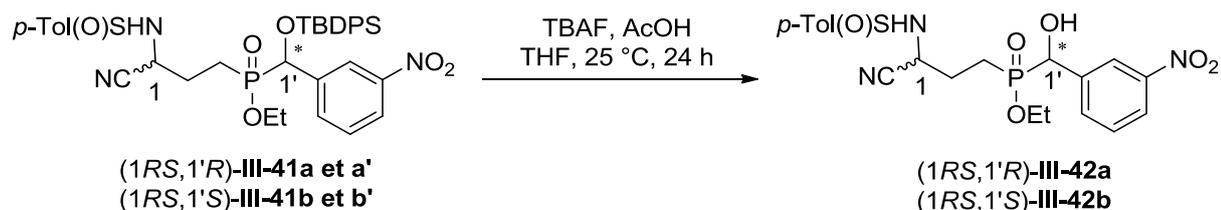
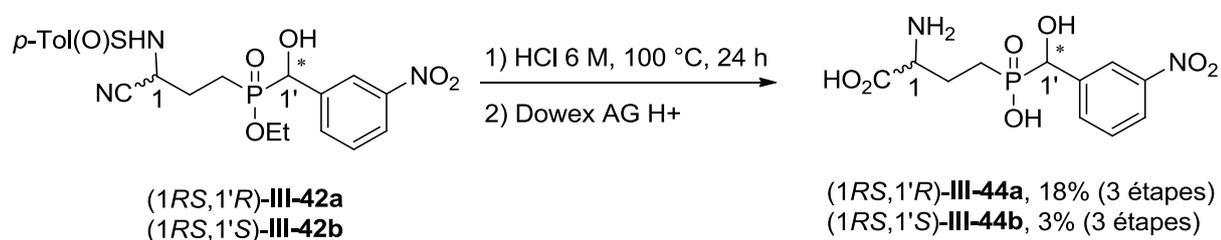


Schéma III-81 Déprotection du groupement silylé

Enfin, l'étape d'hydrolyse acide nous permet d'obtenir les produits finaux bruts qui sont purifiés à l'aide d'une résine échangeuse de cations. Les deux composés purs sont collectés avec des rendements respectifs de 18% pour le (1*R*,1'*R*)-III-44a et 3 % pour le (1*R*,1'*S*)- III-44b sur les trois dernières étapes à partir des imines III-40a et b (Schéma III-82).

Schéma III-82 Obtention des deux composés (1*R*,1'*R*)- III-44a et (1*R*,1'*S*)- III-44b

Les deux composés (1*R*,1'*R*)-III-44a et (1*R*,1'*S*)-III-44b sont ensuite analysés par HPLC chirale avec la colonne Crownpak CR(+).

6.5. Analyse de III-44a et b par HPLC Crownpak CR(+)

L'analyse de ces deux composés III-44a et b par HPLC Crownpak va nous permettre de déterminer les configurations absolues des carbinols stéréogènes benzyliques des deux diastéromères LSP1-2093-I et II. (Figure III-27 et III-28).

Le profil HPLC Crownpak CR(+) du (1*R*, 1'*R*)-III-44a (Figure III-26) fait apparaître une aire d'intégration de 53% pour le composé présentant l'acide aminé (1*R*) (pic 1) et de 47 % pour le composé présentant l'acide aminé (1*S*) (pics 2+3). L'induction asymétrique lors de la réaction de Strecker est généralement très bonne même si on peut voir que Midura *et al.* n'obtiennent que 42% d'excès énantiomérique.⁵⁰⁰ Lors de la séquence à partir du composé racémique III-4, nous avons mesuré un excès diastéréomérique de 60% pour la réaction de Strecker c'est à dire que le composé final III-44 montre par HPLC chirale CR(+) environ 20% d'isomère (1*R*) et 80% d'isomère (1*S*). (paragraphe 5.5). Le profil HPLC Crownpak CR(+) de III-44a est donc

très surprenant puisqu'il fait apparaître la présence quasi-égale des acides aminés (*S*) et (*R*); il y aurait eu racémisation du carbone 1 lors de l'hydrolyse de l'adduit de Strecker en aminoacide. D'autres groupes de recherche ont rapporté ce même phénomène lors de l'utilisation de milieu acide concentré pour l'hydrolyse.⁵⁰⁸⁻⁵¹⁰

Par ailleurs, pour les deux composés (1*S*), nous observons bien un produit majoritaire (82 %) correspondant au pic 3. Ce pic correspond alors au composé (1*S*,1'*R*)-**III-44a**. Cela signifie que le diastéréomère **LSP1-2093-II** élué en deuxième position aurait pour configuration (1*S*,1'*R*). 82% de composé majoritaire (1*S*,1'*R*)- **III-44a** est cohérent avec l'analyse RMN des esters de menthol **III-7** (paragraphe **III.3.3**) où on pouvait observer deux isomères majoritaires à 90% environ (l'intégration des pics en RMN est beaucoup moins précise que l'aire des pics des spectres HPLC).

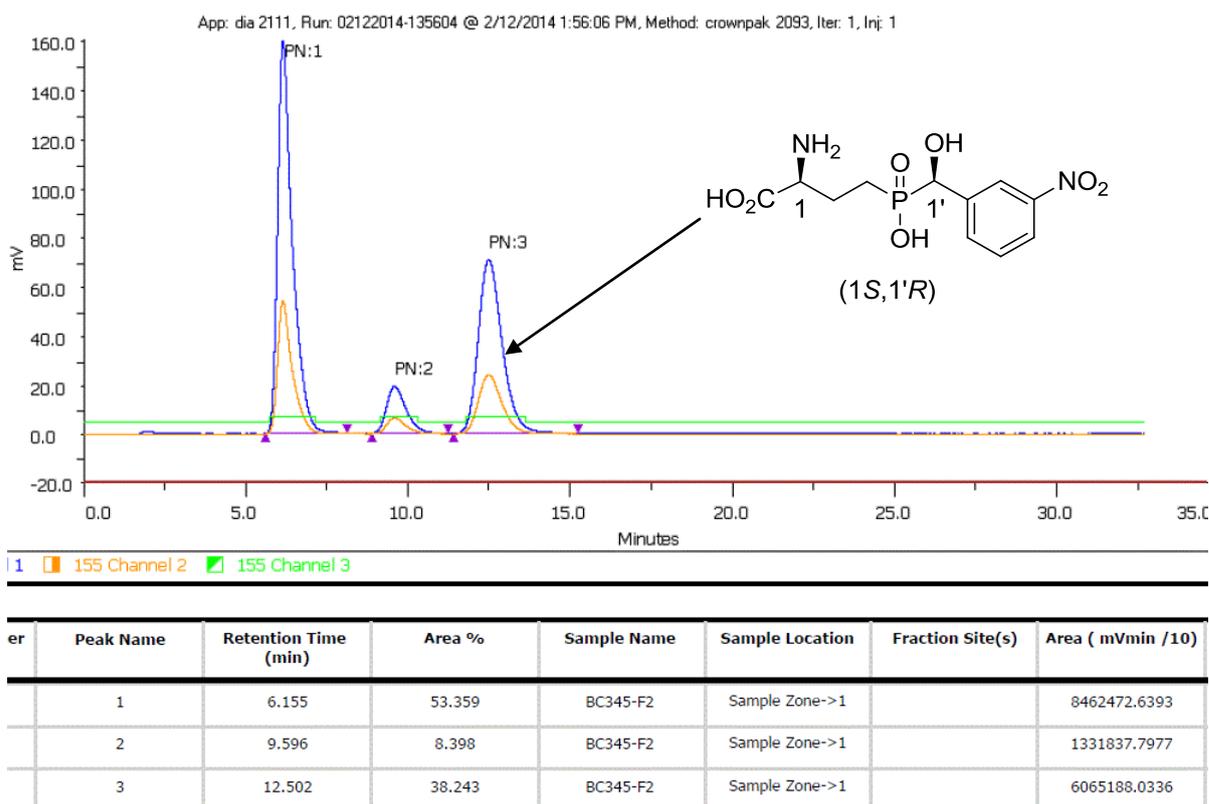


Figure **III-27** Spectre HPLC Crownpak CR(+) du composé (1*S*,1'*R*)-**III-44a**

Pour vérifier cette hypothèse, le second composé synthétisé, (1*R*,1'*S*)- **III-44b** a lui aussi été analysé par HPLC Crownpak (Figure **III-28**).

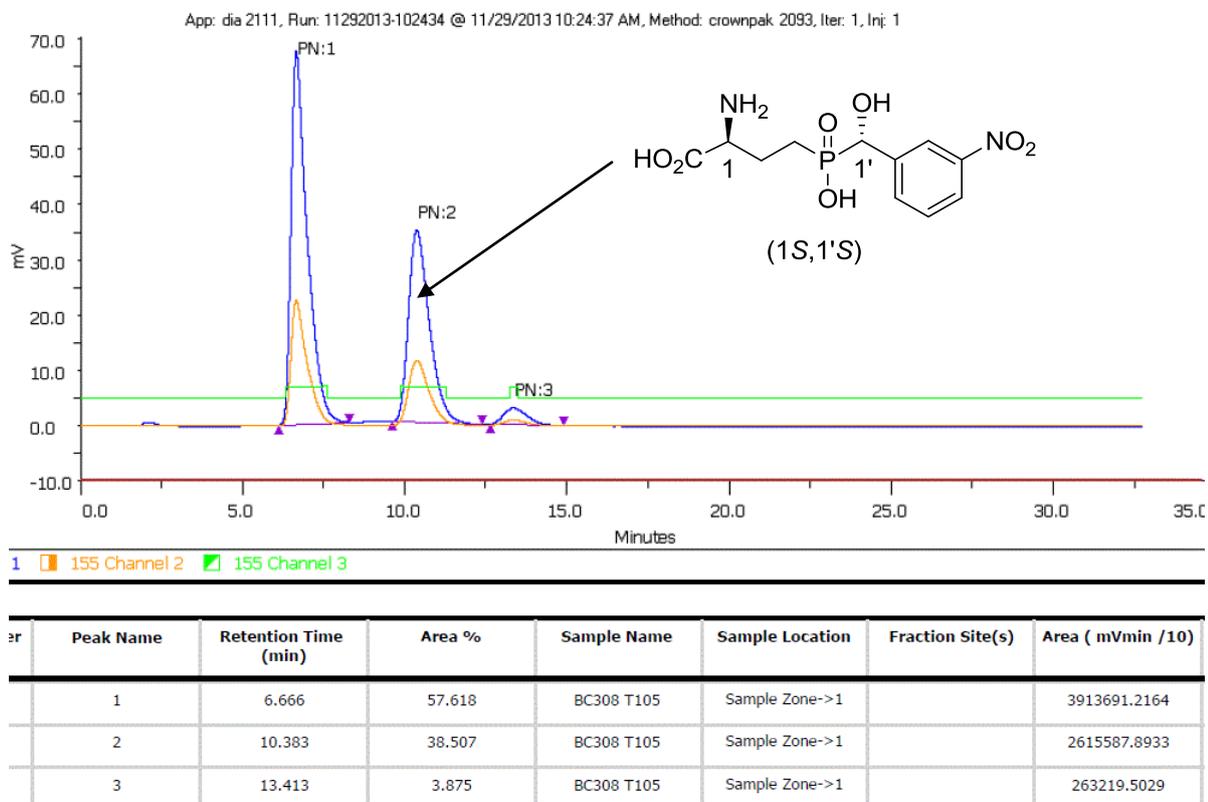


Figure **III-28** Spectre HPLC Crownpak CR(+) du composé (1*R*,1'*S*)-**III-44b**

Une observation rapide de ce second spectre permet déjà de vérifier notre hypothèse. Effectivement, cette fois-ci, c'est bien le pic 2 qui est majoritaire correspondant au composé (1*S*,1'*S*)-**III-44b**. Ce qui signifie que le pic 2, correspondant au premier diastéréomère **LSP1-2093-I** élué possède la configuration (1*S*,1'*S*). Comme précédemment on a 58% d'acide aminé (1*R*) (pic 1) et 42 % d'acide aminé (1*S*) (pics 2+3). Le composé (1*S*,1'*S*)-**III-44b** est majoritaire à 91%, ce qui est aussi cohérent avec l'analyse RMN des esters de menthol **III-7**.

III.7. Conclusion et perspectives

Plusieurs informations importantes ressortent de cette étude. Tout d'abord, nous avons réussi à déterminer la configuration absolue du carbone benzylique des deux acides α -hydroxyle-phosphiniques **III-4a** et **III-4b**, obtenus par résolution de **III-4** avec une amine chirale, la (*S*) ou (*R*)-1-phenylethylamine. Cette configuration fut déterminée grâce à l'obtention d'une structure RX du sel d'ammonium/phosphinate et confirmée par comparaison avec le signe des pouvoirs rotatoires des phosphonates correspondants. De plus, la mesure de la pureté énantiomérique de nos composés **III-4a** et **III-4b** a pu être réalisée par des études RMN ^{31}P des esters de menthyle.

Ayant en main ces deux acides phosphiniques **III-4a** et **III-4b**, une nouvelle voie de synthèse a pu être développée avec pour objectif initial de synthétiser les deux diastéréomères du **LSP1-2093** séparément. Nous avons rencontré beaucoup de difficultés et de nombreuses stratégies ont été utilisées. La chimie développée tout au long de cette étude était très dépendante des substrats et de leur réactivité.

Cette nouvelle voie de synthèse nous a tout de même permis d'attribuer la configuration absolue du carbinol benzylique des diastéréomères de **LSP1-2093** grâce à leur séparation sur la colonne Crownpak semi-préparative. Nous avons ainsi pu attribuer la configuration (*1S,1'S*) au diastéréomère I du **LSP1-2093** élué le plus rapidement et la configuration (*1S,1'R*) au **LSP1-2093 dia II** (Figure **III-29**). Nous pouvons alors extrapoler les résultats obtenus avec le **LSP1-2093** aux autres composés de la même famille structurale et notamment au **LSP1-2111**. Cela signifie que l'isomère qui est élué en premier par HPLC chirale sur colonne Crownpak CR(+) sera toujours de configuration (*1S,1'S*) et le second de configuration (*1S,1'R*). Cette extrapolation va nous être très utile pour la suite de ce projet. En effet, l'attribution des configurations absolues des centres stéréogènes des composés biologiquement actifs va nous permettre d'affiner la relation structure-activité.

Finalement, la perspective de ce projet serait de pouvoir remplir l'objectif initial, c'est-à-dire la synthèse diastéréosélective des deux isomères du **LSP1-2093**. La voie de synthèse développée semble efficace jusqu'à l'obtention de la fonction aldéhyde. C'est au niveau de la réaction de Strecker asymétrique que des efforts supplémentaires doivent être réalisés afin d'observer une meilleure induction et ainsi obtenir les deux diastéréomères séparément. Ces résultats ont été obtenus à la fin de mon doctorat, je n'ai donc pas eu le temps de pouvoir approfondir cette

réaction de Strecker asymétrique. Cependant, au vu des résultats de la littérature sur la réaction de Strecker asymétrique, je pense qu'il est judicieux de poursuivre ce travail et que l'objectif initial pourra être rempli.

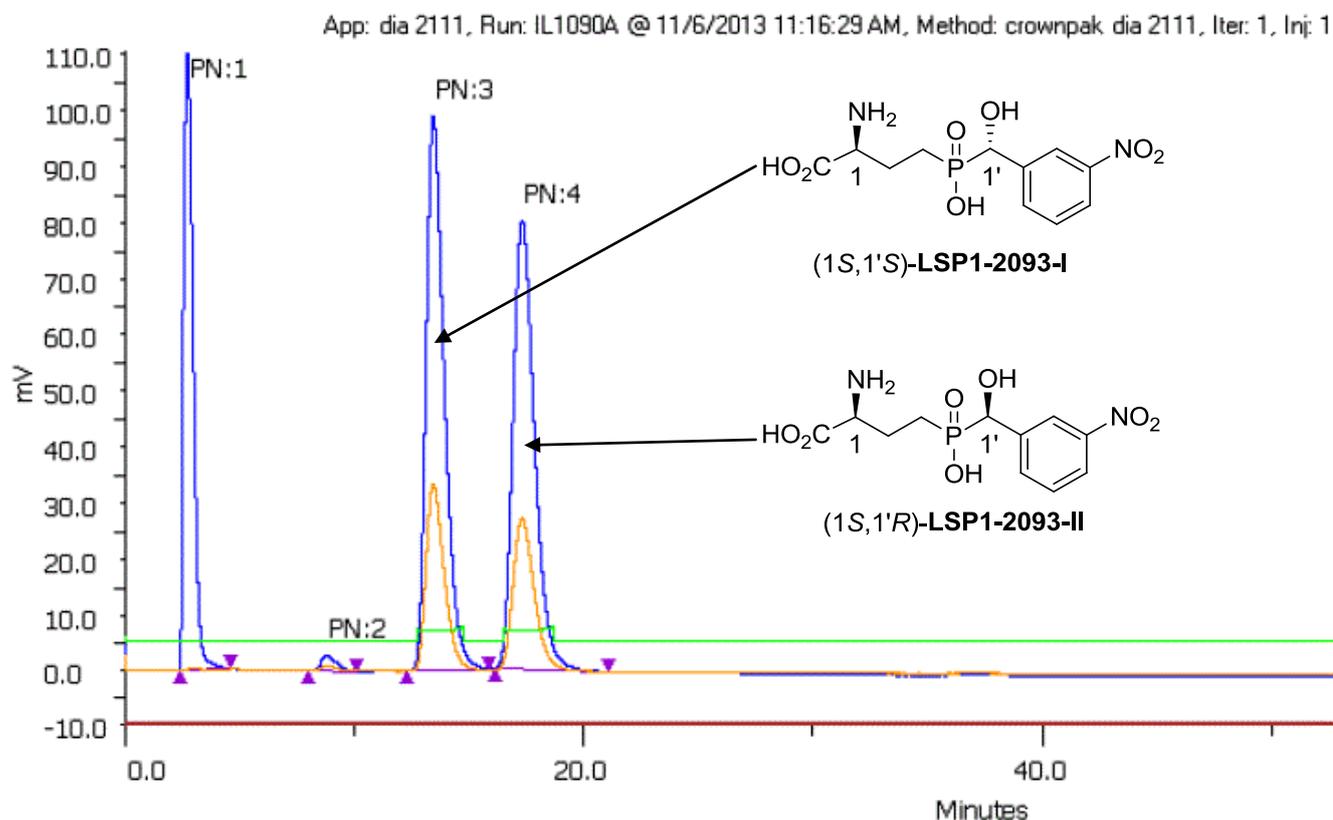


Figure III-29 Configuration des deux diastéréomères du LSP1-2093

Toute cette étude autour de la configuration du carbinol stéréogène fait l'objet d'une publication intitulée "Determination of the Absolute Configuration of Phosphinic Analogues of Glutamate" qui a été soumise journal Organic & Biomolecular Chemistry dont les auteurs sont : Bruno Commare, Delphine Rigault, Isabelle A. Lemasson, Patrick Deschamps, Alain Tomas, Pascal Roussel, Frédéric R. Leroux, Françoise Colobert et Francine C. Acher.

III.8. Références bibliographiques

217. Berlicki, L., *et al.* Design, Synthesis, and Activity of Analogues of Phosphinothricin as Inhibitors of Glutamine Synthetase. *J Med Chem* **2005**, 48, 6340.
220. Selvam, C., *et al.* A Virtual Screening Hit Reveals New Possibilities for Developing Group III Metabotropic Glutamate Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2797.
231. Froestl, W., *et al.* Phosphinic Acid Analogs of GABA. 2. Selective, Orally Active GABAB Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, 38, 3313.
234. Boyd, E. A., *et al.* Facile synthesis of phosphorus-containing heterocycles. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, 5425.
240. Bartley, D. M.; Coward, J. K. A Stereoselective Synthesis of Phosphinic Acid Phosphopeptides Corresponding to Glutamyl- γ -glutamate and Incorporation into Potent Inhibitors of Folylpoly- γ -glutamyl Synthetase. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70, 6757.
244. Boyd, E. A., *et al.* A Versatile Route to Substituted Phosphinic Acids. *Tetrahedron Letters* **1990**, 31, 2933.
245. Boyd, E. A., *et al.* Synthesis of Gamma-Keto-Substituted Phosphinic Acids from Bis(Trimethylsilyl)Phosphonite and Alpha,Beta-Unsaturated Ketones. *Tetrahedron Lett* **1992**, 33, 813.
258. Kehler, J., *et al.* Syntheses and GABA receptor binding properties of 4-amino-1-, 2-, and 3-hydroxybutylphosphinic acids. *Tetrahedron* **1999**, 55, 771.
260. Valiaeva, N., *et al.* Phosphinic Acid Pseudopeptides Analogous to Glutamyl- γ -glutamate: Synthesis and Coupling to Pteroyl Azides Leads to Potent Inhibitors of Folylpoly- γ -glutamate Synthetase†. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 5146.
261. Chen, S.; Coward, J. K. Investigations on New Strategies for the Facile Synthesis of Polyfunctionalized Phosphinates: Phosphinopeptide Analogues of Glutathionylspermidine. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 502.
262. Ravaschino, E. L., *et al.* Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Phosphinopeptides against *Trypanosoma cruzi* Targeting Trypanothione Biosynthesis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 49, 426.
263. Zeng, B., *et al.* A Phosphinate Inhibitor of the meso-Diaminopimelic Acid-Adding Enzyme (MurE) of Peptidoglycan Biosynthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 10081.
265. Thottathil, J. K., *et al.* Mild Arbuzov reactions of phosphonous acids. *Tet. Lett.* **1984**, 25, 4737.
267. Schöllkopf, U., *et al.* Asymmetric syntheses via heterocyclic intermediates, XXXI. Asymmetric synthesis of various non-proteinogenic amino acid methyl esters (functionalized in the carbon chain) and amino acids by the bislactim ether method. *Liebigs Annalen der Chemie* **1986**, 1986, 2150.
306. Eriksson, T., *et al.* Stereospecific Determination, Chiral Inversion in-Vitro and Pharmacokinetics in Humans of the Enantiomers of Thalidomide. *Chirality* **1995**, 7, 44.
380. Gal, J. When did Louis Pasteur present his memoir on the discovery of molecular chirality to the Academie des sciences? Analysis of a discrepancy. *Chirality* **2008**, 20, 1072.
381. Gal, J. The discovery of biological enantioselectivity: Louis Pasteur and the fermentation of tartaric acid, 1857--a review and analysis 150 yr later. *Chirality* **2008**, 20, 5.
382. Gal, J. The Discovery of Stereoselectivity at Biological Receptors: Arnaldo Piutti and the Taste of the Asparagine Enantiomers—History and Analysis on the 125th Anniversary. *Chirality* **2012**, 24, 959.
383. Kagan, H. Asymmetric synthesis of biologically active compounds. *Actualité Chimique* **2003**, 10.
384. Philbin, C. S.; Schwartz, S. J. Resolution of diastereomeric flavonoid (1S)-(-)-camphanic acid esters via reversed-phase HPLC. *Phytochemistry* **2007**, 68, 1206.
385. Shinbo, T., *et al.* Chromatographic separation of racemic amino acids by use of chiral crown ether-coated reversed-phase packings. *J. Chromatograph. A* **1987**, 405, 145.
386. Machida, Y., *et al.* Enantiomer separation of hydrophobic amino compounds by high-performance liquid chromatography using crown ether dynamically coated chiral stationary phase. *J. Chromatograph. A* **1999**, 830, 311.

387. Daicel Co. Ltd. Technical brochure (attached description manual).
388. Hyun, M. H. Characterization of liquid chromatographic chiral separation on chiral crown ether stationary phases. *J. Separation Sci.* **2003**, 26, 242.
389. Lehn, J.-M. Supramolecular chemistry — Scope and perspectives: Molecules - Supermolecules - Molecular devices. *J. Inclusion Phenomena* **1988**, 6, 351.
390. Kuhn, R., *et al.* Enantiomeric separations in capillary zone electrophoresis using a chiral crown ether. *J. Chromatograph. A* **1994**, 666, 367.
391. Lin, J. M., *et al.* Combined chiral crown ether and β -cyclodextrin for the separation of o-, m-, and p-fluoro-D,L-phenylalanine by capillary gel electrophoresis. *Chromatographia* **1996**, 42, 559.
392. Machida, Y., *et al.* Nuclear magnetic resonance studies for the chiral recognition of the novel chiral stationary phase derived from 18-crown-6 tetracarboxylic acid. *J. Chromatograph. A* **1998**, 810, 33.
393. Bang, E., *et al.* Chiral recognition of (18-crown-6)-tetracarboxylic acid as a chiral selector determined by NMR spectroscopy. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 1685.
394. Machida, Y., *et al.* Crystallographic studies for the chiral recognition of the novel chiral stationary phase derived from (+)-(R)-18-crown-6 tetracarboxylic acid. *Chirality* **1999**, 11, 173.
395. Péter, A., *et al.* High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of unusual α -amino acid analogues. *J. Chromatograph. A* **2000**, 871, 105.
396. Bräuner-Osborne, H., *et al.* Molecular pharmacology of 4-substituted glutamic acid analogues at ionotropic and metabotropic excitatory amino acid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, 335, R1.
397. Van Dort, M. E. Direct chromatographic resolution and isolation of the four stereoisomers of meta-hydroxyphenylpropanolamine. *Chirality* **1999**, 11, 684.
398. Hyun, M. H., *et al.* Liquid chromatographic resolution of racemic amines, amino alcohols and related compounds on a chiral crown ether stationary phase. *J. Chromatograph. A* **2002**, 959, 75.
399. Péter, A., *et al.* High-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -amino acids. *J. Chromatograph. A* **2001**, 926, 229.
400. Winkler, M.; Klempier, N. Enantioseparation of nonproteinogenic amino acids. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393, 1789.
401. Nishi, H., *et al.* Separation of enantiomers and isomers of amino compounds by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography utilizing crown ethers. *J. Chromatograph. A* **1997**, 757, 225.
402. Goda, R., *et al.* Simple and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of the S(+)- and R(–)-enantiomers of baclofen in human plasma and cerebrospinal fluid. *J. Chromatograph. B* **2004**, 801, 257.
403. Lee, W.; Yong Hong, C. Direct liquid chromatographic enantiomer separation of new fluoroquinolones including gemifloxacin. *J. Chromatograph. A* **2000**, 879, 113.
404. Kay, P. B.; Trippett, S. New methods for probing the chirality of 18O-labelled phosphinic acids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 1813.
405. Afarinkia, K.; Yu, H.-w. Hewitt reaction revisited. *Tet. Lett.* **2003**, 44, 781.
406. Campbell, D. A.; Bermak, J. C. Phosphonate Ester Synthesis Using a Modified Mitsunobu Condensation. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 658.
407. Cai, J., *et al.* Convenient synthesis of optically active α -hydroxyphosphinic acids. *Heteroatom Chem.* **2003**, 14, 312.
408. Yamagishi, T., *et al.* Enantioselective synthesis of α -hydroxyphosphinic acid derivatives through hydrophosphinylation of aldehydes catalyzed by Al-Li-BINOL complex. *Tetrahedron* **1999**, 55, 12125.
409. Smaardijk, A. A., *et al.* The absolute configuration of α -hydroxyphosphonates. *Tet. Lett.* **1985**, 26, 493.
410. Pogatchnik, D. M.; Wiemer, D. F. Enantioselective synthesis of α -hydroxy phosphonates via oxidation with (camphorsulfonyl)oxaziridines. *Tet. Lett.* **1997**, 38, 3495.
411. Arai, T., *et al.* Catalytic Asymmetric Synthesis of α -Hydroxy Phosphonates Using the Al-Li-BINOL Complex. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2926.
412. Nesterov, V. V.; Kolodiazhnyi, O. I. Efficient method for the asymmetric reduction of α - and β -ketophosphonates. *Tetrahedron* **2007**, 63, 6720.

413. Guliako, I., *et al.* Synthesis of optically active hydroxyphosphonates. *Heteroatom Chem.* **2008**, *19*, 133.
414. Corbett, M. T.; Johnson, J. S. Diametric Stereocontrol in Dynamic Catalytic Reduction of Racemic Acyl Phosphonates: Divergence from α -Keto Ester Congeners. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 594.
415. Goulioukina, N. S., *et al.* Asymmetric Hydrogenation of α -Keto Phosphonates with Chiral Palladium Catalysts. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 510.
416. Samanta, S., *et al.* Organocatalytic Enantioselective Synthesis of Both Diastereomers of α -Hydroxyphosphinates. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1101.
417. Yao, Q.; Yuan, C. A Synthetic Study of Chiral α -Hydroxy-H-Phosphinates Based on Proline Catalysis. *Chem-Eur. J.* **2013**, *19*, 6080.
418. Majewska, P., *et al.* Enzymatic resolution of α -hydroxyphosphinates with two stereogenic centres and determination of absolute configuration of stereoisomers obtained. *Tetrahedron-Asymmetry* **2009**, *20*, 1568.
419. Yamagishi, T., *et al.* Lipase-catalyzed kinetic resolution of α -hydroxy-H-phosphinates. *Tet. Lett.* **2004**, *45*, 6713.
420. Dale, J. A.; Mosher, H. S. Nuclear magnetic resonance enantiomer reagents. Configurational correlations via nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelate, O-methylmandelate, and α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512.
421. Shioji, K., *et al.* Synthesis of bifunctional P-chiral hydroxy phosphinates; lipase-catalyzed stereoselective acylation of ethyl (1-hydroxyalkyl)phenylphosphinates. *Tet. Lett.* **2003**, *44*, 1103.
422. Vitharana, D., *et al.* Synthesis and biological evaluation of (R)- and (S)-2-(phosphonomethyl)pentanedioic acids as inhibitors of glutamate carboxypeptidase II. *Tetrahedron-Asymmetry* **2002**, *13*, 1609.
423. Kaboudin, B., *et al.* Resolution of enantiomers of [α -hydroxy-(o-chlorophenyl)methyl]phosphinic acid via diastereomeric salt formation with enantiopure 1-phenylethylamines. *Tetrahedron-Asymmetry* **2011**, *22*, 1813.
424. Albouy, D., *et al.* New (α -Hydroxyalkyl)phosphorus Amphiphiles: Synthesis and Dissociation Constants. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7223.
425. Zhukov, Y. N., *et al.* Synthesis of phosphinic analogs of sulfur-containing amino acids. *Russ. Chem. Bull.* **1999**, *48*, 1348.
426. Barinka, C., *et al.* Structural basis of interactions between human glutamate carboxypeptidase II and its substrate analogs. *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 1438.
427. Gautier, A., *et al.* The preparation of new phosphorus-centered functional groups for modified oligonucleotides and other natural phosphates. *Molecules* **2005**, *10*, 1048.
428. Le Chevalier Isaad, A., *et al.* $N\alpha$ -Fmoc-Protected ω -Azido- and ω -Alkynyl-L-amino Acids as Building Blocks for the Synthesis of "Clickable" Peptides. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008, 5308.
429. Boyd, E. A., *et al.* Facile synthesis of functionalised phenylphosphinic acid derivatives. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 1651.
430. Belley, M., *et al.* Synthesis of the nanomolar photoaffinity GABA(B) receptor ligand CGP 71872 reveals diversity in the tissue distribution of GABA(B) receptor forms. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *7*, 2697.
431. Bartley, D. M.; Coward, J. K. A stereoselective synthesis of phosphinic acid phosphopeptides corresponding to glutamyl-gamma-glutamate and incorporation into potent inhibitors of folylpoly-gamma-glutamyl synthetase. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6757.
432. Fougere, C., *et al.* Rapid and Efficient Synthesis of Unsymmetrical Phosphinic Acids R'P(O)OHR ". *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 6048.
433. Mizoguchi, H., *et al.* Ru(PPh₃)(OH)-salen complex: a designer catalyst for chemoselective aerobic oxidation of primary alcohols. *Tet. Lett.* **2009**, *50*, 3432.
434. Tandon, P., *et al.* Oxidation of butane-1,3-, butane-1,4-, 2-methyl pentane-2,4- and 3-methyl pentane-2,4-diols by cerium(IV) in aqueous acidic medium catalyzed by rhodium(III). *Transition. Met. Chem.* **2011**, *36*, 739.
435. Raghavan, S.; Rathore, K. Asymmetric synthesis of (-)-tetrahydrolipstatin. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 10083.

436. Reddipalli, G., *et al.* Chemo-enzymatic synthesis of both enantiomers of rugulactone. *Tetrahedron-Asymmetry* **2010**, 21, 320.
437. Markoulides, M. S.; Regan, A. C. Synthesis of phosphinate analogues of the phospholipid anti-tumour agent hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Tet. Lett.* **2011**, 52, 2954.
438. Gavara, L., *et al.* DBU-promoted alkylation of alkyl phosphinates and H-phosphonates. *Tet. Lett.* **2012**, 53, 5000.
439. Crimmins, M. T., *et al.* Synthetic studies on the ginkgolides: total synthesis of (+-)-bilobalide. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3146.
440. Nicolaou, K. C., *et al.* Total Synthesis of Echinopines A and B. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 3815.
441. Scrimin, P., *et al.* Zinc(II) as an Allosteric Regulator of Liposomal Membrane Permeability Induced by Synthetic Template-Assembled Tripodal Polypeptides. *Chem-Eur. J.* **2002**, 8, 2753.
442. Moss, N., *et al.* An enantioselective synthesis of cyclopentyl-L-aspartic acid amenable to large scale. *Synthesis-Stuttgart* **1997**, 32.
443. The, C. P., *et al.* Synthesis of new simplified hemiasterlin derivatives with α,β -unsaturated carbonyl moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 2244.
444. Duncan, K. K., *et al.* α -Ketoheterocycle inhibitors of fatty acid amide hydrolase: Exploration of conformational constraints in the acyl side chain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 22, 2763.
445. Gieseler, M. T.; Kalesse, M. Synthesis of Angiolam A. *Org. Lett.* **2013**, 16, 548.
446. Yokosaka, T., *et al.* Synthesis of fused-tricyclic indole derivatives through an acid-promoted skeletal rearrangement. *Tetrahedron* **2014**, 70, 2151.
447. Brown, M. K.; Hoveyda, A. H. Enantioselective Total Synthesis of Clavirolide C. Applications of Cu-Catalyzed Asymmetric Conjugate Additions and Ru-Catalyzed Ring-Closing Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 12904.
448. Spletstoser, J. T., *et al.* One-step facile synthesis of deuterium labeled aldehydes from tertiary amides using Cp₂Zr(D)Cl. *Tet. Lett.* **2004**, 45, 2787.
449. White, J. M., *et al.* A Novel and Expedient Reduction of Tertiary Amides to Aldehydes Using Cp₂Zr(H)Cl. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11995.
450. Spletstoser, J. T., *et al.* Mild and Selective Hydrozirconation of Amides to Aldehydes Using Cp₂Zr(H)Cl: Scope and Mechanistic Insight. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3408.
451. Corminboeuf, O.; Renaud, P. N-Alkoxyacrylamides as Substrates for Enantioselective Diels–Alder Reactions. *Org. Lett.* **2002**, 4, 1735.
452. Yun, J. I., *et al.* Cross-metathesis of allyl halides with olefins bearing amide and ester groups. *Tetrahedron* **2012**, 68, 1177.
453. Sasaki, M. Optical Resolution of 1-Hydroxyethylphosphinic Acid and Its Esters. *Agric. and Biol. Chem.* **1986**, 50, 741.
454. Dumond, Y. R., *et al.* Orthosilicate-Mediated Esterification of Monosubstituted Phosphinic Acids. *Org. Lett.* **2000**, 2, 3341.
455. Chaudhari, S. R.; Suryaprakash, N. Three-Component Chiral Derivatizing Protocols for NMR Spectroscopic Enantiodiscrimination of Hydroxy Acids and Primary Amines. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 648.
456. Schade, D., *et al.* Synthetic approaches to N-delta-methylated L-arginine, N-omega-hydroxy-L-arginine, L-citrulline, and N-delta-cyano-L-ornithine. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1025.
457. Dent, W. H., *et al.* 9-BBN: An amino acid protecting group for functionalization of amino acid side chains in organic solvents. *Org. Lett.* **2002**, 4, 1249.
458. Sanchez, A., *et al.* Using the 9-BBN Group as a Transient Protective Group for the Functionalization of Reactive Chains of alpha-Amino Acids. *Synthesis-Stuttgart* **2013**, 45, 1364.
459. Arbaoui, A., *et al.* Arylboron complexes of the acids Ph₂C(XH)CO₂H (X = O, NH). *Inorg. Chim. Acta.* **2009**, 362, 509.
460. Garcia, M., *et al.* Efficient method for the preparation of (S)-5-hydroxynorvaline. *Tetrahedron-Asymmetry* **2000**, 11, 991.
461. Revenko, G. P., *et al.* Boron-Containing Derivatives of Alpha-Hydroxybenzylphosphinic Acids. *Zhurnal Obshchei Khimii* **1993**, 63, 857.
462. Hohlfeld, A.; Meier, C. alpha-hydroxybenzylphosphonate modified oligonucleotides: Synthesis, properties, and a novel route via monomer building blocks. *Nucleos Nucleot Nucl* **2003**, 22, 1123.

463. Abrunhosa-Thomas, I., *et al.* Alkylation of H-phosphinate esters under basic conditions. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2851.
464. McClard, R. W., *et al.* Novel Phosphonylphosphinyl (P-C-P-C-) Analogs of Biochemically Interesting Diphosphates - Syntheses and Properties of P-C-P-C- Analogs of Isopentenyl Diphosphate and Dimethylallyl Diphosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5544.
465. Vassiliou, S., *et al.* Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Organophosphorus Inhibitors of Bacterial Ureasases. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5736.
466. González-Juárez, E., *et al.* NMR and X-ray crystallographic studies of linear and cyclic aminomethanephosphinates. *Heteroatom Chem.* **2006**, *17*, 81.
467. Strecker, A. Ueber die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocoll homologen Körper. *Liebigs Ann.* **1850**, *75*, 27.
468. Strecker, A. Ueber einen neuen aus Aldehyd - Ammoniak und Blausäure entstehenden Körper. *Liebigs Ann.* **1854**, *91*, 349.
469. Davis, F. A., *et al.* Asymmetric strecker synthesis using enantiopure sulfinimines: A convenient synthesis of α -amino acids. *Tet. Lett.* **1994**, *35*, 9351.
470. Davis, F. A., *et al.* Asymmetric Strecker Synthesis Using Enantiopure Sulfinimines and Diethylaluminum Cyanide: The Alcohol Effect. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 440.
471. Davis, F. A., *et al.* Asymmetric Synthesis and Properties of Sulfinimines (Thiooxime S-Oxides). *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2555.
472. Davis, F. A.; Fanelli, D. L. Sulfinimine-Mediated Asymmetric Synthesis of (R)-(4-Methoxy-3,5-dihydroxyphenyl)glycine: The Central Amino Acid of Vancomycin and Related Agents. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1981.
473. Davis, F. A., *et al.* Improved Synthesis of Enantiopure Sulfinimines (Thiooxime S-Oxides) from p-Toluenesulfinamide and Aldehydes and Ketones. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1403.
474. Davis, F. A., *et al.* Applications of the Sulfinimine-Mediated Asymmetric Strecker Synthesis to the Synthesis of α -Alkyl α -Amino Acids. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8704.
475. Liu, G., *et al.* Catalytic Asymmetric Synthesis of tert-Butanesulfinamide. Application to the Asymmetric Synthesis of Amines. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9913.
476. Evans, J. W.; Ellman, J. A. Stereoselective Synthesis of 1,2-Disubstituted β -Amino Alcohols by Nucleophilic Addition to N-tert-Butanesulfinyl α -Alkoxyaldimines. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9948.
477. Peltier, H. M.; Ellman, J. A. N-Sulfinyl Metalloenamine Conjugate Additions: Asymmetric Synthesis of Piperidines. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7342.
478. Sipos, S.; Jablonkai, I. One-pot synthesis of alpha-aminonitriles from alkyl and aryl cyanides: a Strecker reaction via aldimine alanes. *Tet. Lett.* **2009**, *50*, 1844.
479. Chakraborty, T. K., *et al.* Diastereoselective strecker synthesis using α -phenylglycinol as chiral auxiliary. *Tet. Lett.* **1991**, *32*, 7597.
480. Chakraborty, T. K., *et al.* α -phenylglycinol as chiral auxiliary in diastereoselective strecker synthesis of α -amino acids. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9179.
481. Baek, D. J., *et al.* Synthesis of nonclassical quinazolinone antifolates as thymidylate synthase inhibitors and their antitumor activity in vitro. *B Kor Chem Soc* **2004**, *25*, 1898.
482. Warmuth, R., *et al.* Enantioselective synthesis of benzocyclic alpha,alpha-dialkyl-amino acids: new insight into the solvent dependent stereoselectivity of the TMSCN addition to phenylglycinol derived imines. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6383.
483. Marinozzi, M., *et al.* Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of the four stereoisomers of (2S)-2-(2'-phosphono-3'-phenylcyclopropyl)glycine, the first class of 3'-substituted trans(C1'-2')-2-(2'-phosphonocyclopropyl)glycines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *15*, 3161.
484. Gröger, H. Catalytic Enantioselective Strecker Reactions and Analogous Syntheses. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2795.
485. Iyer, M. S., *et al.* Asymmetric Catalysis of the Strecker Amino Acid Synthesis by a Cyclic Dipeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4910.
486. Corey, E. J.; Grogan, M. J. Enantioselective Synthesis of α -Amino Nitriles from N-Benzhydryl Imines and HCN with a Chiral Bicyclic Guanidine as Catalyst. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 157.

487. Sigman, M. S.; Jacobsen, E. N. Schiff Base Catalysts for the Asymmetric Strecker Reaction Identified and Optimized from Parallel Synthetic Libraries. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 4901.
488. Sigman, M. S., *et al.* A General Catalyst for the Asymmetric Strecker Reaction. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2000**, 39, 1279.
489. Su, J. T., *et al.* Practical Synthesis of a Soluble Schiff Base Catalyst for the Asymmetric Strecker Reaction. *Adv. Synthesis & Catalysis* **2001**, 343, 197.
490. Sigman, M. S.; Jacobsen, E. N. Enantioselective Addition of Hydrogen Cyanide to Imines Catalyzed by a Chiral (Salen)Al(III) Complex. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 5315.
491. Hamashima, Y., *et al.* A New Bifunctional Asymmetric Catalysis: An Efficient Catalytic Asymmetric Cyanosilylation of Aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2641.
492. Gröger, H. The Development of New Monometallic Bifunctional Catalysts with Lewis acid and Lewis Base Properties, and their Application in Asymmetric Cyanation Reactions. *Chem-Eur. J.* **2001**, 7, 5246.
493. Krueger, C. A., *et al.* Ti-Catalyzed Enantioselective Addition of Cyanide to Imines. A Practical Synthesis of Optically Pure α -Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4284.
494. Byrne, J. J., *et al.* Asymmetric Strecker reactions of ketimines catalysed by titanium-based complexes. *Tet. Lett.* **2000**, 41, 873.
495. Ishitani, H., *et al.* Catalytic, Enantioselective Synthesis of α -Aminonitriles with a Novel Zirconium Catalyst. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1998**, 37, 3186.
496. Chavarot, M., *et al.* Sc(BINOL)₂Li: a new heterobimetallic catalyst for the asymmetric Strecker reaction. *Tetrahedron-Asymmetry* **2001**, 12, 1147.
497. Masumoto, S., *et al.* Catalytic Enantioselective Strecker Reaction of Ketoimines. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5634.
498. Vedejs, E.; Kongkittigam, C. A Total Synthesis of (-)-Hemiasterlin Using N-Bts Methodology. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 7355.
499. Mann, S., *et al.* Total Synthesis of Amiclenomycin, an Inhibitor of Biotin Biosynthesis. *Chem-Eur. J.* **2002**, 8, 439.
500. Midura, W. H., *et al.* Asymmetric synthesis of conformationally constrained L-AP4 analogues using chiral sulfinyl auxiliary. *Tetrahedron* **2013**, 69, 730.
501. Lyzwa, P.; Mikolajczyk, M. A General Approach to Enantiomeric gamma-Aminophosphonic Acids Using Chiral Sulfinimine Methodology. *Heteroatom Chem.* **2011**, 22, 594.
502. Amori, L., *et al.* Synthesis and preliminary biological evaluation of (2S,1'R,2'S)- and (2S,1S,2'R)-2-(2'-phosphonocyclopropyl)glycines, two novel conformationally constrained L-AP4 analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 196.
503. Morton, D.; Stockman, R. A. Chiral non-racemic sulfinimines: versatile reagents for asymmetric synthesis. *Tetrahedron* **2006**, 62, 8869.
504. Jana, N., *et al.* Chemo-enzymatic asymmetric total synthesis of stagonolide-C. *Tetrahedron-Asymmetry* **2009**, 20, 2622.
505. Venkatesham, A.; Nagaiah, K. Stereoselective total synthesis of stagonolide-C. *Tetrahedron-Asymmetry* **2012**, 23, 1186.
506. Shah, S. T. A., *et al.* A Novel, Chemoselective and Efficient Microwave-Assisted Deprotection of Silyl Ethers with Selectfluor. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 2179.
507. Kwan, A., *et al.* A catalytic asymmetric entry to enantioenriched tertiary naphthoquinols via a facile tandem oxidation/ring-opening sequence. *Tet. Lett.* **2011**, 52, 3426.
508. Schlosser, M., *et al.* β,β -Difluoro analogs of α -oxo- β -phenylpropionic acid and phenylalanine. *Tetrahedron* **2004**, 60, 7731.
509. Wang, X.-J., *et al.* Asymmetric synthesis of β,β -difluoroamino acids via cross-coupling and Strecker reactions. *Tetrahedron* **2008**, 64, 1731.
510. Banphavichit, V., *et al.* A practical synthesis of optically active arylglycines via catalytic asymmetric Strecker reaction. *Tetrahedron* **2009**, 65, 5849.

Conclusion générale

Conclusion générale

Depuis la naissance de ce projet il y a plus de quinze ans, nous avons pu nous rendre compte que les récepteurs métabotropiques du glutamate étaient des cibles thérapeutiques prometteuses. Plusieurs études en cours montrent que la modulation de ces récepteurs permet de traiter les symptômes observés dans de nombreuses neuropathologies. Effectivement, de nombreuses molécules sont actuellement en tests cliniques de phase II/III et seront probablement sur le marché dans les années à venir. L'importance de ces récepteurs n'est donc plus à prouver et cela est dû à toutes les entreprises pharmaceutiques (Addex, Lilly, Roche, Novartis... etc) qui ont beaucoup investi sur ces cibles biologiques. Il est impossible de comparer ces sociétés à certains laboratoires universitaires comme le notre, mais l'apport de ces petites structures n'est évidemment pas à négliger. Le développement de collaboration entre les laboratoires universitaires entre eux et avec les grandes structures de recherche semblent primordial afin d'élaborer au plus vite des futurs médicaments. Notre laboratoire s'est donc spécialisé dans l'étude des récepteurs mGlu du groupe III et notamment le sous-type 4.

Tout d'abord, un gros travail de modélisation essentiellement effectué en parallèle par Francine Acher, Thomas Blarre et Hugues-Olivier Bertrand, nous a permis d'identifier plus précisément les interactions entre les différents récepteurs métabotropiques du glutamate et les ligands synthétisés et testés. La découverte des nouvelles molécules bioactives va permettre de continuer ce travail de modélisation et de peaufiner les résultats préliminaires. Cet outil est aujourd'hui indispensable pour tout projet visant des cibles biologiques plus ou moins complexes.

Ensuite, nous avons poursuivi la relation structure-activité autour du composé référence avant le début de ces trois années de doctorat, le **LSP4-2022**. En fonction des structures et des données pharmacologiques des composés obtenus par mes prédécesseurs, nous nous sommes focalisés sur la synthèse d'analogues fluorés du **LSP4-2022**. Nous avons remarqué qu'il était indispensable de synthétiser des composés dissymétriques avec deux substituants sur le noyau aromatique et surtout deux groupements de taille différente. Effectivement, il est important d'insérer un substituant assez encombré afin qu'il puisse occuper la grande poche d'interaction et un substituant plus petit capable de s'insérer dans la petite poche. L'insertion de groupement fluoré fut payante car nous avons réussi à obtenir l'analogue agoniste le plus puissant sur mGlu4R avec une EC_{50} de 0,04 μ M. Il s'agit du **LSP14-1086** contenant un atome de fluor ainsi qu'un groupement trifluorométhoxyle sur le cycle aromatique. Ce composé remplissait

totalemment le contrat en étant très actif sur le sous-type 4 et sélectif par rapport au sous-type 8. Cependant, ce composé n'est pas du tout sélectif par rapport au sous-type 7 avec une EC_{50} de $0,3 \mu\text{M}$. Depuis le début de ce projet, c'est le premier composé qui est sous-micromolaire sur le récepteur mGlu7. Pour résoudre ce problème et être totalement sélectif du récepteur mGlu4, nous avons envisagé de travailler autour de l'interaction cation- π existante entre l'ammonium de la lysine 74 et le noyau aromatique de nos molécules. Des premières études ont été menées en remplaçant le phényle par un hétérocycle mais les premiers résultats enregistrés ne sont pas satisfaisants. D'autres études seront effectuées à l'avenir.

Ce projet alimentaire s'est déroulé en parallèle du projet principal de cette thèse : la synthèse stéréosélective des deux diastéréomères composants tous les produits testés à ce jour. L'utilisation d'une méthode analytique (HPLC chirale Crownpak CR(+)) a permis à Isabelle Lemasson de séparer les deux isomères constituant les produits finaux. Cependant, cette méthode n'est pas applicable ni sur le **LSP4-2022**, ni sur ses dérivés. De plus, elle ne permet pas d'identifier les configurations des deux isomères. Nous avons donc élaboré une nouvelle voie de synthèse afin d'obtenir et de tester les deux diastéréoisomères séparément. Pour cela, nous nous sommes basés sur un exemple, le **LSP1-2093**, qui a pu être séparé par la colonne CR(+) pour donner les deux diastéréoisomères **LSP1-2093-I** et **LSP1-2093-II**. Cette voie synthétique consistait d'abord à contrôler la configuration du carbone benzylique puis d'introduire la partie acide aminée. Nous avons réussi à obtenir les deux acides H-phosphiniques **III-4a** et **III-4b** en contrôlant leur configuration. Cette dernière fut vérifiée par l'obtention d'une structure RX du composé **III-6a** cristallisé. A partir de ces deux synthons initiaux, nous avons appliqué le protocole optimisé sur le composé racémique. Malheureusement, nous avons rencontré des problèmes au niveau de la réaction de Strecker avec une faible induction asymétrique. Nous avons tout de même obtenu deux composés finaux qui correspondent aux deux isomères du **LSP1-2093** où le carbone en α de l'acide aminé est racémique. Grâce à la méthode analytique développée par Isabelle Lemasson, nous avons pu tout de même attribuer l'attribution des deux diastéréoisomères du **LSP1-2093**. L'isomère élué en premier sur la colonne Crownpak est donc de configuration (*S*) et le second est de configuration (*R*). En associant ce résultat avec les données de la littérature, nous pouvons supposer qu'il est possible d'extrapoler cette attribution à tous les analogues du **LSP4-2022** synthétisés. Cette avancée majeure va nous permettre par la suite d'affiner encore plus précisément la relation structure-activité et d'identifier un moyen de gagner en sélectivité entre le deux sous-types 4 et 7.

Ce projet est encore loin d'être fini et de nombreuses options sont encore à explorer afin d'obtenir des futurs candidat-médicaments pour traiter les symptômes de certaines maladies qui affectent des millions de personnes. Par exemple, il serait évidemment très intéressant d'appliquer le protocole expliqué dans le chapitre **III** au **LSP4-2022** afin d'obtenir les deux diastéréoisomères. Il est fort probable qu'un des deux isomères soit plus actif que l'autre. Une autre perspective serait de modifier le cœur de la molécule, c'est-à-dire de substituer la fonction phosphinique par une autre fonction (diol, sulfone, sulfoxyde... etc) capable de conserver les interactions avec la récepteur tout en créant de nouveaux points de liaison afin d'augmenter la sélectivité de nos molécules. Une dernière modification pourrait-être réalisée au niveau de la fonction acide aminée. Pourquoi ne pas s'éloigner de cette série acide aminée et synthétiser de nouveaux ligands tout en conservant de bonnes activités sur les cibles visées ?

Experimental part

Experimental Part

General remarks

Chemicals and solvents

All chemicals and solvents were purchased from commercial suppliers (Acros, Aldrich, Alpha Aesar, Chembridge etc) and used as received. Z-L-Vinyl glycine methyl ester was purchased from Ascent Scientific Ltd (North Somerset, UK). Most solvents were purchased from Carlo Erba-SDS. Prior to use, tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium-benzophenone and dichloromethane (CH_2Cl_2) from CaH_2 . Solid Lewis acids were flame-dried in the reaction flask under vacuum and under argon before use.

All reactions were carried out under argon atmosphere, and were monitored by thinlayer chromatography with Merck 60F-254 precoated silica (0.2 mm) on aluminium. Column chromatography was performed with Merck Kieselgel 60 (200–500 mm); the solvent systems were given (s/s v:v)

NMR

^1H (250.13, 400.14 or 500.16 MHz), ^{13}C (62.9, 100.62 or 125.78 MHz), ^{31}P ($^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ meaning ^{31}P spectrum without $J_{\text{H-P}}$ coupling, 101.25, 161.98 or 202.47 MHz) and ^{19}F (376.46 MHz) NMR spectra were recorded on an ARX250, Avance II 400 Bruker or an Avance II 500 Bruker spectrometers. Chemical shifts (δ , ppm) are given with reference to residual ^1H or ^{13}C of deuterated solvents (CD_3OD 3.31, 49.0; D_2O 4.80 ; CDCl_3 7.27, 77.00 ; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ 2.05, 29.84 and 206.26, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ 2.50, 39.52) or external reference (H_3PO_4 95%). Signal multiplicity is described as follows: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet). Broad singlets, for instance, are described as bs. Coupling constants (J) are given in Hz. Atom numbering of molecules in this experimental section is arbitrary and does not necessarily correspond to IUPAC numbering. Several signals could not be attributed will be represented by H_{Ar} (aromatic hydrogen), CH_{Ar} (aromatic sp^2 carbon), Cq_{Ar} (aromatic quaternary carbon) and CH_{Arp} (aromatic sp^2 carbon in *para* position).

Optical rotations

Optical rotations were measured at the sodium D line (589 nm) at 20 °C with a Perkin-Elmer 341 polarimeter using a 1 dm path length cell. Specific optical rotation $[\alpha]_{\text{D}}$ is defined by $[\alpha]_{\text{D}} = (\alpha_{\text{obs}} \times 100)/(l \times c)$, where α_{obs} is the observed optical rotation in degrees, l is the path length in dm, and c is the sample concentration in grams of product per 100 mL of solution. $[\alpha]_{\text{D}}$ is given without units, although it should be expressed in $^\circ \times \text{mL} \times \text{dm}^{-1} \times \text{g}^{-1}$.

Mass spectra

Mass spectra (MS) were recorded with a LCQ-advantage (ThermoFinnigan) mass spectrometer with positive (ESI⁺) or negative (ESI⁻) electrospray ionization (ionization tension 4.5 kV, injection temperature 240 °C).

HPLC-MS

HPLC-MS analyses were performed on a Thermo Finnigan LCQ Advantage Instrument as described above, equipped for HPLC with a Phenomenex RP Polar column (250 mm × 4.6 mm, 4 μm).

Products were eluted with the following gradient using:

- solvent A (water / acetonitrile / formic acid 950 : 50 : 1)
- solvent B (water / acetonitrile / formic acid 900 : 100 : 1):
- 100% A for 10 min, linear increase from 0 to 100% B between 10 and 20 min, 100% B from 20 to 30 min.

HPLC

HPLC analyses were carried out on a Gilson analytical instrument with a 321 pump, column temperature of Crownpak columns was controlled with an Igloo-CIL Peltier effect thermostat, eluted peaks were detected by a UV-vis 156 detector and retention times are reported in minutes. A Daicel Crownpak CR(+) column (150 mm × 4 mm), further designed as “Crownpak”, eluted with pH 2.0 perchloric acid (hydrochloric acid for semi-preparative) at a 0.4 mL.min⁻¹ flow rate and at 4 °C was used.

Purifications on ion exchange resins

A Gilson peristaltic pump coupled with a Gilson automatic collector were used for elution. The resins were purchased from Biorad:

- Cation exchange resin: Dowex AG 50W-X4, H⁺, 50-100 mesh, water elution. The deposit was carried out in aqueous solution at pH 1-2.
- Anion exchange resin: Dowex AG 1-X4, AcO⁻, 200-400 mesh, water, hydrochloric acid, acetic acid or formic acid aqueous solution elution. The deposit was carried out in boiled aqueous solution at pH 8-9. The pure water used for anion exchange resins was previously boiled to be degazed. Product visualization was achieved using TLC plates (Silica gel Merck 60 F₂₅₄, aluminium sheets) with 2% (w/v) ninhydrin in ethanol.

Infrared spectra

Infrared (IR) spectra were recorded on a diamond ATR spectrometer using neat samples. Infrared frequencies are reported in wavenumbers (cm^{-1}), and intensities were determined qualitatively and are reported as strong, medium or weak.

Melting point

Melting points were determined with a Büchi 530 apparatus.

Crystallographic data of III-6a (CCDC 1016374)

Data were collected with a Bruker SMART APEX CCD diffractometer (Mo-K α radiation graphite-monochromated radiation, $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) controlled by APEX2 software package.¹ Data integration and global cell refinement were performed with the program SAINT.² Data were corrected for absorption by the multiscan semiempirical method implemented in SADABS.³ The structure was solved by direct methods using SHELXS 97.⁴ Refinement, based on F², was carried out by full matrix least squares with SHELXL-97 software.⁵ Non hydrogen atoms were refined anisotropic thermal parameters. The hydrogen atoms were placed in their geometrically generated positions and allowed to ride on their parent atoms with an isotropic thermal parameter 20 % higher to that of the atom of attachment or located in difference Fourier maps, and their positions and isotropic thermal parameters were refined.

(1) *APEX2. Data Collection Software*, Bruker AXS Inc.: Madison, Wisconsin, USA, 2007.

(2) Bruker *SAINTE*, Bruker AXS Inc: Madison, Wisconsin, USA, 2007.

(3) *SADABS.2008/1*, Bruker AXS Inc.: Madison, Wisconsin, USA, 2007.

(4) Sheldrick, G. M. *SHELXS-97, Program for crystal structure solution*, University of Gottingen, Germany, 1997.

(5) Sheldrick, G. M. *SHELXL-97, Program for crystal structure refinement*, University of Gottingen, Germany, 1997.

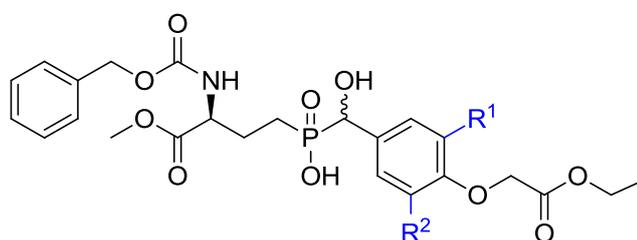
General procedures

General procedure A: Alkylation of phenol

K_2CO_3 (1.3-2.0 eq) and ethyl 2-bromoacetate (1.5 eq) were added to a solution of substituted 4-hydroxy-benzaldehyde (1 eq) in acetone (0.05-0.15 M). The reaction mixture was refluxed for (1-3 h). After cooling to 25 °C, the solvent was evaporated under vacuum. The residue was diluted in DCM and washed with a saturated solution of NaCl (3x20 mL). The combined organic layers were dried under Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The oily crude compound was purified by column chromatography on silica gel to afford desired compound.

General procedure B: Addition of “P-H_{int}” on aromatic aldehyde

To a stirring solution of aromatic phenoxyaldehyde (1 eq) and “P-H_{int}” (1 eq) in DCM (0.1 M) at 0°C was added dropwise BSA (4 eq). The mixture was allowed to warm up to 25 °C within 12 h. After cooling to 0 °C, 1 M HCl (20 mL) was added to the mixture and the compound was extracted with EtOAc (3x20 mL). The combined organic layers were washed with 1 M HCl (20 mL) and a saturated solution of NaCl (20 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum to afford desired crude compound **II-B** which was used without further purification.



II-B1(II-3) : $R^1 = OCF_3$, $R^2 = H$

II-B2 : $R^1 = F$, $R^2 = H$

II-B3 : $R^1 = F$, $R^2 = F$

II-B4 : $R^1 = CF_3$, $R^2 = H$

II-B5 : $R^1 = OMe$, $R^2 = I$

II-B6 : $R^1 = OMe$, $R^2 = Cl$

II-B7 : $R^1 = OMe$, $R^2 = F$

II-B8 : $R^1 = OCF_3$, $R^2 = F$

II-B9 : $R^1 = F$, $R^2 = NO_2$

General procedure C: Acid hydrolysis of protecting groups

A solution of phosphinic acid compound obtained from *general procedure B* was dissolved in 6 M HCl (0.02-0.03 M) and the mixture was refluxed for 5 h. After cooling to 25 °C, the solvent was evaporated under vacuum. The residue was diluted in EtOAc (30 mL) and extracted with 1 M HCl (3x40 mL). The combined aqueous layers were washed with EtOAc (2x20 mL) and evaporated under vacuum, using a dry ice-equipped rotary evaporator, to afford the crude product which was purified by cation exchange resin chromatography (Dowex AG 50W-X4, H^+ ,

50-100 mesh). Anion exchange resin chromatography was carried out when necessary (Dowex AG 1-X4, AcO⁻, 200-400 mesh).

General procedure D: Synthesis of azido substrates

To a stirring solution of sodium azide (1 eq) in DMF (0.1-0.5 M) was added dropwise bromide compound (1 eq) and the mixture was stirred at 25 °C for 12 h. Cold water was added to the reaction mixture and the aqueous layer was extracted with Et₂O (3x20 mL). The combined organic layers were washed with water (6x15 mL) to remove DMF, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. When necessary, the residue was purified by column chromatography on silica gel to afford the desired product.

General procedure E: Click chemistry – Huisgen reaction

To a round-bottom flask containing A-21 catalyst **II-18** (0.08 eq) was added dropwise a solution of azido substrate (1 eq), obtained from *general procedure D*, in DCM (0.5 M). The reaction mixture was slowly stirred for 15 min and 3,3-diethoxyprop-1-yne (1 eq) was added and stirred at 25 °C for 12 h. The catalyst was removed by filtration, washed with DCM (3x20 mL), dried under vacuum and stored under argon. The solvent was evaporated in vacuum to afford crude compound.

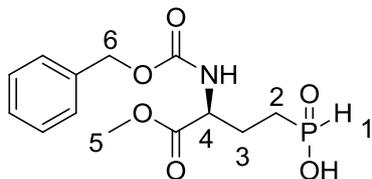
General procedure F: Acetal hydrolysis to triazole aldehyde

To a stirring solution of acetal derivatives, obtained from the *general procedure F*, in CHCl₃ (0.1 M) was added dropwise an aqueous solution of TFA (5 mL, 1:1). The mixture was maintained at 25 °C for 12 h. An aqueous solution NaOH (1 M, 10 mL) was added to the reaction mixture and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3x20 mL). The combined organic layers were washed with a saturated solution of NaCl (3x20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum using a dry ice-equipped rotary evaporator. The residue was purified when necessary by column chromatography on silica gel to afford the desired product.

Experimental Part

Chapter II : Structure-activity relationship of LSP4-2022

[[*(S)*-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl]phosphinic acid] “P-*H_{int}”*



$C_{13}H_{18}NO_6P$
 $M=315.26$ g/mol
 White solid

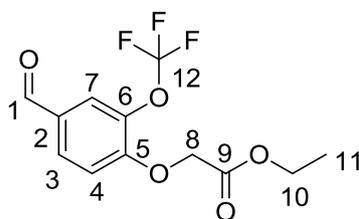
A mixture of hypophosphorous acid (1.44 g, 21.8 mmol, 10.9 eq), *N*-benzyloxycarbonyl-L- α -vinylglycine methyl ester (507 mg, 2 mmol, 1 eq) and AIBN (8 mg, 0.05 mmol, 0.025 eq) in MeOH (20 mL) was refluxed at 80 °C for 5 h. MeOH was evaporated under vacuum and the residue was treated with water (20 mL) and extracted with EtOAc (3x30 mL). The organic layers were washed with water (3x10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum to afford “P-*H_{int}”* (610 mg, 1.9 mmol, 95% yield).

NMR 1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ : 7.33 (m, 5H, H_{Ar}) ; 7.12 (d, $J_{H-P} = 555.0$ Hz, 1H, H_1) ; 4.41 (m, 1H, H_4) ; 5.09 (s, 2H, H_6) ; 3.74 (s, 3H, H_5) ; 1.92 (m, 4H, H_1 and H_2)

NMR ^{31}P (202 MHz; $CDCl_3$) δ : 36.9 (d, $J_{P-H} = 551$ Hz)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (202 MHz; $CDCl_3$) δ : 36,9

Ethyl 2-(4-formyl-2-(trifluoromethoxy)phenoxy)acetate II-2



$C_{12}H_{11}F_3O_5$
 $M=292.21$ g/mol
 colorless oil

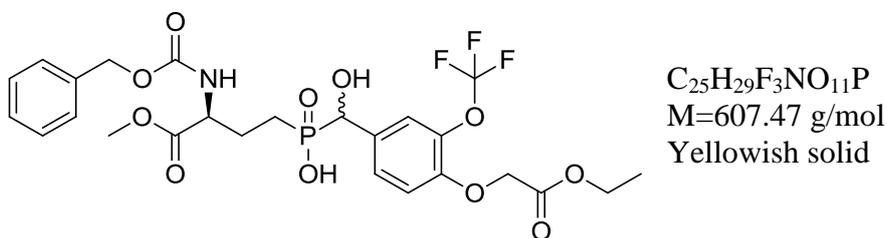
The *general procedure A* was followed using K_2CO_3 (262 mg, 1.89 mmol, 1.3 eq), ethyl 2-bromoacetate (0.24 mL, 2.19 mmol, 1.5 eq) and 4-hydroxy-3-(trifluoromethoxy)benzaldehyde **II-1** (0.3 g, 1.46 mmol, 1 eq) in acetone (20 mL). The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/DCM 1:1) to afford **II-2** (310 mg, 1.06 mmol, 73% yield).

R_f = 0.60 (SiO_2 ; DCM; UV)

NMR 1H (300 MHz; $CDCl_3$) δ : 9.80 (s, 1H, H_1) ; 7.71 (m, 2H, H_3 and H_7) ; 6.97 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H_4) ; 4.74 (s, 2H, H_8) ; 4.18 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H_{10}) ; 1.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H_{11})

NMR ^{13}C (100 MHz; $CDCl_3$) δ : 189.5 (C_1) ; 167.4 (C_9) ; 155.2 (C_5) ; 138.5 (q, $J_{C-F} = 1.9$ Hz, C_6) ; 130.6 (C_2) ; 130.3 (C_3) ; 123.3 (d, $J_{C-F} = 0.9$ Hz, C_7) ; 120.5 (q, $J_{C-F} = 258.6$ Hz, C_{12}) ; 113.6 (C_4) ; 65.7 (C_8) ; 61.6 (C_{10}) ; 13.8 (C_{11})

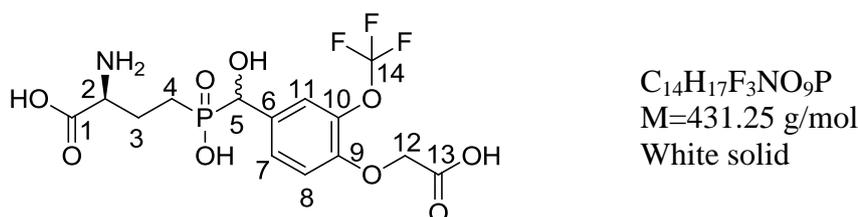
((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-3-(trifluoromethoxy)phenyl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid **II-B1 (II-3)**



The *general procedure B* was followed using compound **II-2** (310 mg, 1.06 mmol, 1 eq), “**P-H_{int}**” (334 mg, 1.06 mmol, 1 eq) and BSA (1.05 mL, 4.24 mmol, 4 eq) in DCM (10 mL) to afford crude residue **II-B1** (684 mg, 1.13 mmol).

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; $CDCl_3$) δ : 47.3

(2S)-2-Amino-4-(((4-(carboxymethoxy)-3-(trifluoromethoxy)phenyl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid **LSP3-9166**



The *general procedure C* was followed using compound **II-B1** (684 mg, 1.13 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (50 mL). The crude compound (480 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford **LSP3-9166** (127 mg, 0.29 mmol, 28% yield over 2 steps).

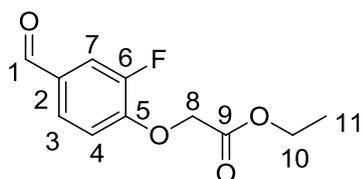
NMR 1H (500 MHz; D_2O) δ : 7.31 (s, 1H, H_{11}) ; 7.21 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, H_7) ; 6.95 (d, 1H, $J_{H-F} = 8.5$ Hz, H_8) ; 4.86 (d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, 1H, H_5) ; 4.66 (s, 2H, H_{12}) ; 3.98 (m, 1H, H_2) ; 2.01 (m, 2H, H_3) ; 1.80 (m, 2H, H_4)

NMR ^{13}C (125 MHz; D_2O) δ : 172.4 (C_{13}) ; 171.0 (C_2) ; 149.2 (C_{10}) ; 137.5 (C_9) ; 130.6 (C_6) ; 126.7 (C_7) ; 121.5 (C_{11}) ; 120.4 (q, $J_{C-F} = 258.1$ Hz, C_{14}) ; 114.6 (C_8) ; 70.8 (d, $J_{C-P} = 110.6$ Hz, C_5) ; 65.5 (C_{12}) ; 52.9 (d, $J_{C-P} = 14.8$ Hz, C_2) ; 22.5 (C_3) ; 21.2 (d, $J_{C-P} = 89.5$ Hz, C_4)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (202 MHz; D_2O) δ : 44.8

NMR ^{19}F (470 MHz ; D_2O) δ (ppm) : -58.6

HPLC-MS (ESI) m/z ; ($\lambda=235$ nm): $R_t = 12.7$ min ; 431.94 $[M+H]^+$; 430.0 $[M-H]^-$

Ethyl 2-(2-fluoro-4-formylphenoxy)acetate II-5

$C_{11}H_{11}FO_4$
 $M=226.20$ g/mol
 Yellowish oil

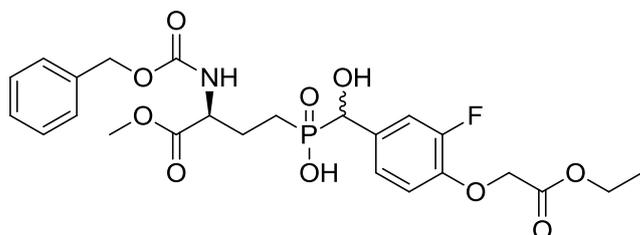
The *general procedure A* was followed using K_2CO_3 (473 mg, 3.40 mmol, 1.2 eq), ethyl 2-bromoacetate (0.49 mL, 4.30 mmol, 1.5 eq) and 3-fluoro-4-hydroxy-benzaldehyde **II-4** (0.4 g, 2.86 mmol, 1 eq) in acetone (20 mL). The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (DCM) to afford **II-5** (450 mg, 2.0 mmol, 70% yield).

$R_f = 0.33$ (SiO_2 ; DCM; UV)

NMR 1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ : 9.85 (d, $J_{H-F} = 2.2$ Hz, 1H, H_1) ; 7.61 (m, 2H, H_3 and H_4) ; 7.00 (t, $J_{H-F} = 8.4$ Hz, 1H, H_7) ; 4.78 (s, 2H, H_8) ; 4.27 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_{10}) ; 1.28 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H_{11})

NMR ^{13}C (125 MHz; $CDCl_3$) δ : 189.8 (C_1) ; 167.8 (C_9) ; 152.8 (d, $J_{C-F} = 249.5$ Hz, C_6) ; 151.3 (d, $J_{C-F} = 10.9$ Hz, C_5) ; 131.3 (d, $J_{C-F} = 3.7$ Hz, C_2) ; 127.7 (d, $J_{C-F} = 2.9$ Hz, C_4) ; 116.6 (d, $J_{C-F} = 19.0$ Hz, C_7) ; 114.9 (C_3) ; 66.3 (C_8) ; 61.9 (C_{10}) ; 14.2 (C_{11})

((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-3-fluorophenyl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid II-B2

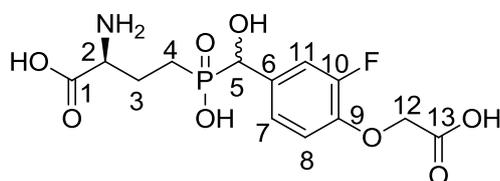


$C_{26}H_{31}F_4NO_9P$
 $M=539.49$ g/mol
 Yellowish solid

The *general procedure B* was followed using compound **II-5** (363 mg, 1.60 mmol, 1 eq), “**P-H_{int}**” (504 mg, 1.60 mmol, 1 eq) and BSA (1.58 mL, 6.40 mmol, 4 eq) in DCM (25 mL) to afford crude residue **II-B2** (837 mg, 1.55 mmol).

NMR ^{31}P (202 MHz; $CDCl_3$) δ : 47.3

(2S)-2-Amino-4-(((4-(carboxymethoxy)-3-fluorophenyl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid LSP16-3040



$C_{13}H_{17}FNO_8P$
 $M=365.25$ g/mol
 White solid

The *general procedure C* was followed using compound **II-B2** (837 mg, 1.55 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (50 mL). The crude compound (480 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford **LSP16-3040** (115 mg, 0.31 mmol, 16% yield over 2 steps).

NMR 1H (500 MHz; D_2O) δ : 7.18 (d, $J_{H-F} = 12$ Hz, 1H, H_{11}) ; 7.08 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_7) ; 6.97 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_8) ; 4.76 (d, $J_{H-P} = 8.8$ Hz, 1H, H_5) ; 4.72 (s, 2H, H_{12}) ; 3.96 (m, 1H, H_2) ; 2.05 (m, 2H, H_3) ; 1.72 (m, 2H, H_4)

NMR ^{13}C (125 MHz; D_2O) δ : 174.5 (C_{13}) ; 173.3 (C_1) ; 153.2 (d, $J_{C-F} = 244.5$ Hz, C_{10}) ; 146.0 (d, $J_{C-F} = 10.4$ Hz, C_9) ; 133.5 (d, $J_{C-F} = 4.9$ Hz, C_6) ; 124.6 (C_8) ; 116.42 (d, $J_{C-F} = 18.5$ Hz, C_{11}) ; 116.41 (C_7) ; 73.2 (d, $J_{C-P} = 109.2$ Hz, C_{15}) ; 67.3 (C_{12}) ; 55.0 (d, $J_{C-P} = 11.0$ Hz, C_2) ; 24.5 (C_3) ; 23.5 (d, $J_{C-P} = 89.2$ Hz, C_4)

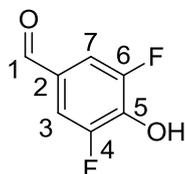
NMR $^{31}P_{epd}$ (202 MHz; D_2O) δ : 40.2

NMR ^{19}F (470 MHz; D_2O) δ : -134.7

HRMS (ESI $^+$) m/z : Calculated for $C_{13}H_{18}FNO_8P$ [$M+H$] $^+$: 366.0754. Found 384.0745.

HPLC-MS (ESI) m/z ; ($\lambda=235$ nm): $R_t = 7.4$ min ; 366.06 [$M+H$] $^+$; 363.96 [$M-H$] $^-$

3,5-Difluoro-4-hydroxybenzaldehyde II-7



$C_7H_4F_2O_2$
 $M=158.10$ g/mol
 White solid

A stirring solution of 2,6-difluorophenol **II-6** (2 g, 15.4 mmol, 1 eq) and hexamethylenetetramine (2.16 g, 15.4 mmol, 1 eq) in TFA (16 mL) was heated at reflux for 12 h. After cooling to 25 °C, the solvent was evaporated under vacuum and the crude residue was dissolved in DCM (35 mL). The solution was washed with a saturated solution of $NaHCO_3$ then the aqueous layer was acidified to pH 1 with concentrated HCl and extracted with DCM (2x25 mL). The combined organic fractions were dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum to afford **II-7** (1.76 g, 11.1 mmol, 73% yield).

Rf = 0.39 (SiO₂; cyclohexane/EtOAc 6:4; UV)

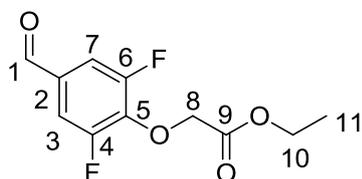
NMR ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ : 9.82 (s, 1H, H₁) ; 7.50 (d, *J*_{H-F} = 6.6 Hz, 2H, H₃ and H₇) ; 6.38 (bs, 1H, OH)

NMR ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ : 189.1 (C₁) ; 151.9 (dd, *J*_{C-F} = 246.9 Hz, *J* = 5.3 Hz, C₄ and C₆) ; 139.0 (t, *J*_{C-F} = 16.1 Hz, C₅) ; 128.2 (t, *J*_{C-F} = 6.0 Hz, C₂) ; 113.2 (dd, *J*_{C-F} = 13.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, C₃ and C₇)

NMR ¹⁹F (282 MHz; CDCl₃) δ : -52.2

HRMS (ESI⁻) m/z : Calculated for C₇H₃F₂O₂ [M-H]⁻: 157.0107. Found 157.0110.

Ethyl 2-(2,6-difluoro-4-formylphenoxy)acetate **II-8**



C₁₁H₁₀F₂O₄
 M=244.19 g/mol
 Yellow oil

The *general procedure A* was followed using K₂CO₃ (656 mg, 4.74 mmol, 1.5 eq), ethyl 2-bromoacetate (0.44 mL, 3.95 mmol, 1.25 eq) and 3,5-difluoro-4-hydroxybenzaldehyde **II-7** (0.5 g, 3.16 mmol, 1 eq) in acetone (40 mL). The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/DCM 4:1) to afford **II-8** (580 mg, 2.38 mmol, 75% yield).

Rf = 0.23 (SiO₂; cyclohexane/DCM 1:1; UV)

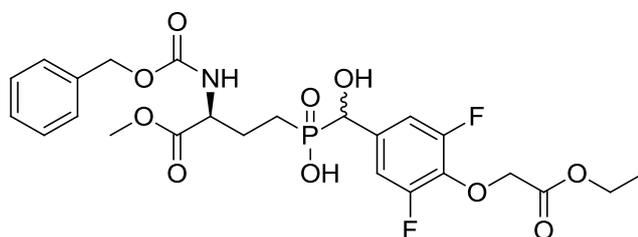
NMR ¹H (250 MHz; CDCl₃) δ : 9.86 (s, 1H, H₁) ; 7.48 (d, *J*_{H-F} = 8.8 Hz, 2H, H₃ and H₇) ; 4.92 (s, 2H, H₈) ; 4.28 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₁₀) ; 1.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, H₁₁)

NMR ¹³C (126 MHz; CDCl₃) δ : 190.1 (C₁) ; 169.4 (C₉) ; 156.3 (dd, *J*_{C-F} = 251.1 Hz, *J*_{C-F} = 5.6 Hz, C₄ and C₆) ; 141.3 (t, *J*_{C-F} = 13.6 Hz, C₅) ; 132.1 (t, *J*_{C-F} = 7.0 Hz, C₂) ; 114.9 (dd, *J*_{C-F} = 17.6 Hz, *J*_{C-F} = 6.0 Hz, C₃ and C₇) ; 70.6 (C₈) ; 63.1 (C₁₀) ; 15.5 (C₁₁)

NMR ¹⁹F (282 MHz; CDCl₃) δ : -50.9

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for C₁₁H₁₀F₂O₄Na [M+Na]⁺: 267.0445. Found 267.0440.

((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-3,5-difluorophenyl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid **II-B3**

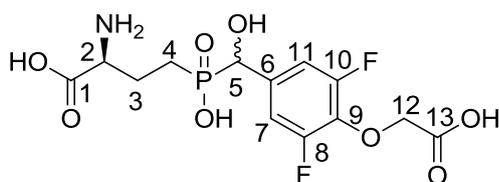


$C_{24}H_{28}F_2NO_{10}P$
 $M=315.26$ g/mol
 Yellowish solid

The *general procedure B* was followed using compound **II-8** (241 mg, 0.99 mmol, 1 eq), “**P-H_{int}**” (311 mg, 0.99 mmol, 1 eq) and BSA (1.00 mL, 3.96 mmol, 4 eq) in DCM (12 mL) to afford crude compound **II-B3** (552 mg, 1.75 mmol).

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; $CDCl_3$) δ : 41.2

(2S)-2-Amino-4-(((4-(carboxymethoxy)-3,5-difluorophenyl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid **LSP14-1019**



$C_{13}H_{16}F_2NO_8P$
 $M=383.26$ g/mol
 White solid

The *general procedure C* was followed using compound **II-B3** (552 mg, 0.99 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (50 mL). The crude compound (238 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford desired compound but not pure. An anion exchange resin chromatography was carried out (elution with boiled water and 2 M formic acid) to afford **LSP14-1019** (27 mg, 0.07 mmol, 7% yield over 2 steps).

NMR 1H (250 MHz; D_2O) δ : 7.13 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H_7 and H_{11}) ; 4.94 (d, $J_{H-P} = 9.4$ Hz, 1H, H_5) ; 4.87 (s, 2H, H_{12}) ; 4.13 (m, 1H, 2) ; 2.17 (m, 2H, H_3) ; 1.87 (m, 2H, H_4)

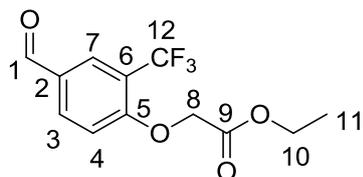
NMR ^{13}C (63 MHz; D_2O) δ : 172.9 (C_{13}) ; 171.4 (C_1) ; 154.7 (dd, $J_{C-F} = 247$ Hz, $J = 5.4$ Hz, C_8 and C_{10}) ; 134.0 (t, $J_{C-F} = 8.1$ Hz, C_6) ; 133.2 (t, $J_{C-F} = 14.0$ Hz, C_9) ; 110.8 (dd, $J_{C-F} = 23.3$ Hz, $J_{C-F} = 4.0$ Hz, C_7 and C_{11}) ; 71.3 (d, $J_{C-P} = 109.5$ Hz, C_5) ; 69.8 (C_{12}) ; 53.1 (d, $J_{C-P} = 14.8$ Hz, C_2) ; 22.8 (C_3) ; 21.7 (d, $J_{C-P} = 91.0$ Hz, C_4)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (202 MHz; D_2O) δ : 41,5

NMR ^{19}F (376 MHz; D_2O) δ : -129.0

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for $C_{13}H_{17}F_2NO_8P$ $[M+H]^+$: 384.0660. Found 384.0651.

HPLC-MS (ESI) m/z ; ($\lambda=235$ nm): $R_t = 9.99$ min ; 383.9 $[M+H]^+$; 382.1 $[M-H]^-$

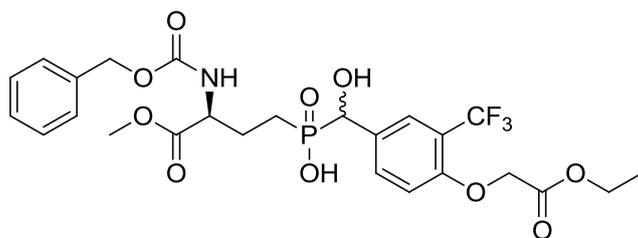
Ethyl 2-(4-formyl-2-(trifluoromethyl)phenoxy)acetate II-10

$C_{12}H_{11}F_3O_4$
 $M=276.21$ g/mol
 Colorless oil

The *general procedure A* was followed using K_2CO_3 (234 mg, 1.70 mmol, 1.3 eq), ethyl 2-bromoacetate (0.24 mL, 2.20 mmol, 1.7 eq) and 4-hydroxy-3-(trifluoromethyl)benzaldehyde **II-9** (247 mg, 1.30 mmol, 1 eq) in acetone (20 mL). The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (DCM) to afford **II-10** (215 mg, 0.78 mmol, 60% yield).

NMR 1H (250 MHz; $CDCl_3$) δ : 9.95 (s, 1H, H_1) ; 8.16 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H_7) ; 8.04 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.0$, 1H, H_3) ; 7.02 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H_4) ; 4.85 (s, 2H, H_8) ; 4.26 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H_{10}) ; 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H_{11})

NMR ^{13}C (100 MHz; $CDCl_3$) δ : 189.6 (C_1) ; 167.2 (C_9) ; 160.2 (C_5) ; 134.8 (C_3) ; 129.8 (C_7) ; 129.4 (C_6) ; 124.9 (C_2) ; 120.4 (q, $J_{C-F} = 273$ Hz, C_{12}) ; 112.9 (C_4) ; 65.6 (C_8) ; 61.8 (C_{10}) ; 13.8 (C_{11})

((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-3-(trifluoromethyl)phenyl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid II-B4

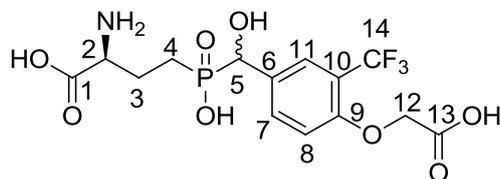
$C_{25}H_{29}F_3NO_{10}P$
 $M=591.47$ g/mol
 Yellowish solid

The *general procedure B* was followed using compound **II-10** (211 mg, 0.80 mmol, 1 eq), “**P-H_{int}**” (252 mg, 0.80 mmol, 1 eq) and BSA (0.78 mL, 3.20 mmol, 4 eq) in DCM (12 mL) to afford crude compound **II-B5** (219 mg, 0.37 mmol).

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; MeOD) δ : 45.9

MS (ESI⁺) m/z ; 593.1 $[M+H]^+$

(2S)-2-Amino-4-(((4-(carboxymethoxy)-3-(trifluoromethyl)phenyl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid
LSP4-1024



$C_{14}H_{17}F_3NO_8P$
M=415.26 g/mol
White solid

The *general procedure C* was followed using compound **II-B4** (219 mg, 0.37 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (30 mL). The crude compound (120 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford desired compound but not pure. An anion exchange resin chromatography was carried out (elution with boiled water and 2M formic acid) to afford **LSP4-1024** (16 mg, 0.04 mmol, 5% yield over 2 steps).

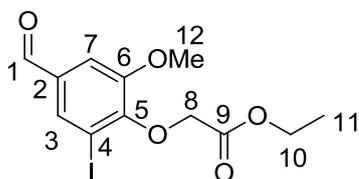
NMR 1H (250 MHz; D_2O) δ : 7.68 (s, 1H, H_{11}) ; 7.57 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_7) ; 7.07 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_8) ; 4.84 (d, $J_{H-P} = 8.0$ Hz, 1H, H_5) ; 4.82 (s, 2H, H_{12}) ; 3.99 (m, 1H, H_2) ; 2.08 (m, 2H, H_3) ; 1.73 (m, 2H, H_4)

NMR ^{13}C (125 MHz; D_2O) δ : 174.5 (C_{13}) ; 173.5 (C_1) ; 156.3 (C_9) ; 133.7 (C_7) ; 132.4 (C_6) ; 127.3 (C_{11}) ; 125.0 (q, $J_{C-F} = 273$ Hz, C_{14}) ; 119.5 (q, $J_{C-F} = 31$ Hz, C_{10}) ; 115.1 (C_8) ; 73.3 (d, $J_{C-P} = 106.6$ Hz, C_5) ; 67.3 (C_{12}) ; 55.3 (C_2) ; 24.6 (C_3) ; 23.7 (d, $J_{C-P} = 86.8$ Hz, C_4)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; D_2O) δ : 39.1

HPLC-MS (ESI $^+$) m/z ; ($\lambda=235$ nm): Rt = 12.7 min ; 415.9 [M+H] $^+$

Ethyl 2-(4-formyl-2-iodo-6-methoxyphenoxy)acetate II-14



$C_{12}H_{13}IO_5$
M=364.13 g/mol
Colorless oil

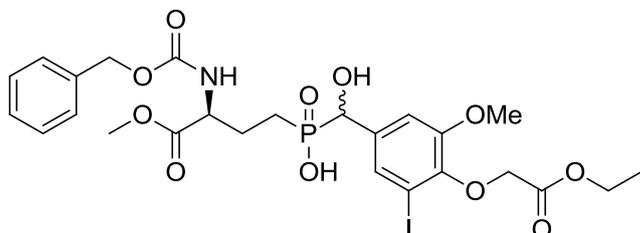
The *general procedure A* was followed using K_2CO_3 (332 mg, 2.40 mmol, 1.3 eq), ethyl 2-bromoacetate (0.30 mL, 2.70 mmol, 1.7 eq) and 4-hydroxy-3-iodo-5-methoxybenzaldehyde **II-13** (0.5 g, 1.80 mmol, 1 eq) in acetone (20 mL). The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (DCM) to afford **II-14** (320 mg, 0.88 mmol, 49% yield).

NMR 1H (500 MHz; Acetone) δ : 9.87 (s, 1H, H_1) ; 7.92 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz, H_3) ; 7.53 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H_7) ; 4.83 (s, 2H, H_8) ; 4.24 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, H_{10}) ; 3.95 (s, 3H, H_9) ; 1.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H_{11})

NMR ^{13}C (126 MHz; Acetone) δ : 191.0 (C₁) ; 169.4 (C₉) ; 153.2 (C₅) ; 153.1 (C₆) ; 135.5 (C₂) ; 135.1 (C₃) ; 113.9 (C₇) ; 92.4 (C₄) ; 70.5 (C₈) ; 62.1 (C₁₀) ; 57.4 (C₁₂) ; 15.2 (C₁₁)

MS (ESI⁺) m/z ; 364.9 [M+H]⁺

((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-3-iodo-5-methoxyphenyl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid **II-B5**



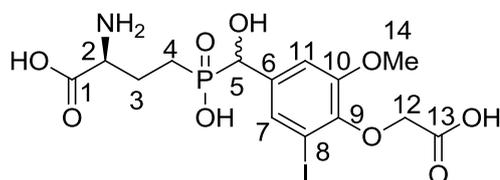
C₂₅H₃₁INO₁₁P
M=679.39 g/mol
Yellowish solid

The *general procedure B* was followed using compound **II-14** (328 mg, 0.90 mmol, 1 eq), “**P-H_{int}**” (284 mg, 0.90 mmol, 1 eq) and BSA (0.86 mL, 3.50 mmol, 3.9 eq) in DCM (12 mL) to afford crude compound **II-B5** (516 mg, 0.76 mmol).

NMR ^{31}P _{cpd} (101 MHz; Acetone) δ : 48.0

MS (ESI⁻) m/z ; 677.9 [M-H]⁻

(2S)-2-Amino-4-(((4-(carboxymethoxy)-3-iodo-5-methoxyphenyl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid **LSP2-8149**



C₁₄H₁₉INO₉P
M=503.18 g/mol
White solid

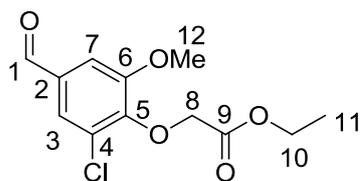
The *general procedure C* was followed using compound **II-B5** (516 mg, 0.76 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (50 mL). The crude compound (450 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford **LSP2-8149** (107 mg, 0.21 mmol, 24% yield over 2 steps).

NMR ^1H (500 MHz; D₂O) δ : 7.40 (s, 1H, H₇) ; 7.07 (s, 1H, H₁₁) ; 4.78 (d, $J_{\text{H-P}}$ = 8.0 Hz, 1H, H₅) ; 4.56 (s, 2H, H₁₂) ; 4.01 (m, 1H, H₂) ; 3.81 (s, 2H, H₁₄) ; 2.07 (m, 2H, H₃) ; 1.75 (m, 2H, H₄)

NMR ^{13}C (125 MHz; D₂O) δ : 174.5 (C₁₃) ; 173.2 (C₁) ; 152.9 (C₁₀) ; 147.1 (C₉) ; 138.2 (C₆) ; 130.1 (C₇) ; 113.6 (C₁₁) ; 92.2 (C₈) ; 73.2 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 108.0 Hz, C₅) ; 70.6 (C₁₂) ; 57.5 (C₁₄) ; 54.9 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 14.0 Hz, C₂) ; 24.5 (C₃) ; 23.5 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 89.2 Hz, C₄)

NMR ^{31}P _{cpd} (202 MHz; D₂O) δ : 40.4

HPLC-MS (ESI⁺) m/z ; (λ =235 nm): Rt = 12.2 min ; 503.94 [M+H]⁺

Ethyl 2-(2-chloro-4-formyl-6-methoxyphenoxy)acetate) II-16

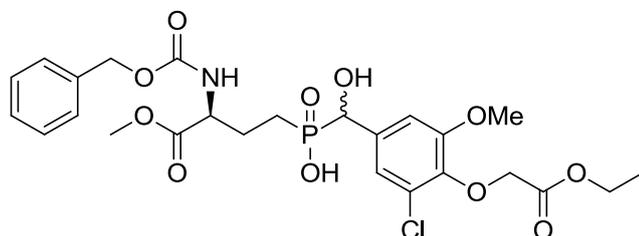
$C_{12}H_{13}ClO_5$
 $M=272.68$ g/mol
 Colorless oil

The *general procedure A* was followed using K_2CO_3 (484 mg, 3.50 mmol, 1.3 eq), ethyl 2-bromoacetate (0.45 mL, 4.05 mmol, 1.5 eq) and 3-chloro-4-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde **II-15** (504 mg, 2.70 mmol, 1 eq) in 20 mL of acetone. The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (DCM) to afford **II-16** (330 mg, 1.21 mmol, 45% yield).

NMR 1H (500 MHz; Acetone) δ : 9.87 (s, 1H, H_1) ; 7.54 (s, H_3) ; 7.46 (s, 1H, H_7) ; 4.85 (s, 2H, H_8) ; 4.22 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H_{10}) ; 3.97 (s, 3H, H_{12}) ; 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H_{11})

NMR ^{13}C (126 MHz; Acetone) δ : 191.2 (C_1) ; 169.5 (C_9) ; 154.5 (C_5) ; 149.7 (C_6) ; 134.0 (C_2) ; 128.9 (C_4) ; 125.8 (C_3) ; 112.3 (C_7) ; 70.5 (C_8) ; 62.1 (C_{10}) ; 57.5 (C_{12}) ; 15.1 (C_{11})

MS (ESI $^+$) m/z ; 273.0 [$M+H$] $^+$

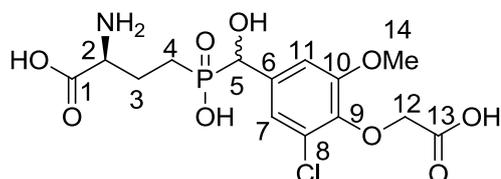
((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((3-chloro-4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-5-methoxyphenyl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid II-B6

$C_{25}H_{31}ClNO_{11}P$
 $M=587.94$ g/mol
 Yellowish solid

The *general procedure B* was followed using compound **II-16** (327 mg, 1.20 mmol, 1 eq), “**P-H_{int}**” (378 mg, 1.20 mmol, 1 eq) and BSA (1.17 mL, 4.80 mmol, 4 eq) in DCM (12 mL) to afford crude compound **II-B6** (819 mg, 1.39 mmol).

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; Acetone) δ : 48.2

MS (ESI) m/z ; 586.0 [$M-H$] $^-$

(2S)-2-Amino-4-(((4-(carboxymethoxy)-3-chloro-5-methoxyphenyl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid LSP2-8147

C₁₄H₁₉ClNO₉P
 M=411.73 g/mol
 White solid

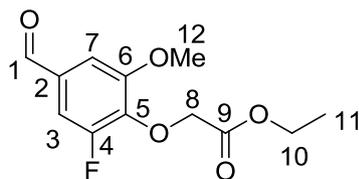
The *general procedure C* was followed using compound **II-B6** (819 mg, 1.39 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (50 mL). The crude compound (520 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford **LSP2-8147** (11 mg, 0.29 mmol, 24% yield over 2 steps).

NMR ¹H (500 MHz; D₂O) δ : 7.02 (s, 1H, H₇) ; 6.98 (s, 1H, H₁₁) ; 4.85 (d, *J*_{H-P} = 9.0 Hz, 1H, H₅) ; 4.57 (s, 2H, H₁₂) ; 4.04 (m, 1H, H₂) ; 3.78 (s, 2H, H₁₄) ; 2.10 (m, 2H, H₃) ; 1.83 (m, 2H, H₄)

NMR ¹³C (125 MHz; D₂O) δ : 174.4 (C₁₂) ; 172.7 (C₁) ; 154.0 (C₁₀) ; 143.5 (C₉) ; 136.0 (C₆) ; 128.4 (C₈) ; 121.5 (C₇) ; 111.8 (C₁₁) ; 72.9 (d, *J*_{C-P} = 108.9 Hz, C₅) ; 70.6 (C₁₂) ; 57.6 (C₁₄) ; 54.5 (d, *J*_{C-P} = 14.6 Hz, C₂) ; 24.1 (C₃) ; 22.9 (d, *J*_{C-P} = 88.3 Hz, C₄)

NMR ³¹P_{cpd} (202 MHz; D₂O) δ : 43.4

HPLC-MS (ESI⁺) m/z ; (λ=235 nm): Rt = 9.0 min ; 411.98 [M]⁺

Ethyl 2-(2-fluoro-4-formyl-6-methoxyphenoxy)acetate II-18

C₁₂H₁₃FO₅
 M=256.23 g/mol
 Colorless oil

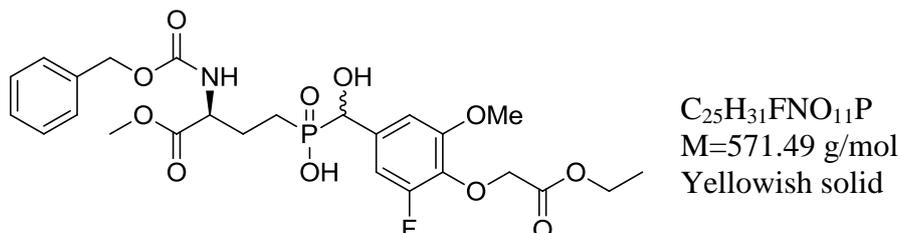
The *general procedure A* was followed using K₂CO₃ (324 mg, 2.40 mmol, 1.3 eq), ethyl 2-bromoacetate (0.30 mL, 2.70 mmol, 1.5 eq) and 3-fluoro-4-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde **II-17** (306 mg, 1.80 mmol, 1 eq) in acetone (20 mL). The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (DCM) to afford **II-18** (361 mg, 1.41 mmol, 78% yield).

NMR ¹H (500 MHz; Acetone) δ : 9.88 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H₁) ; 7.40 (t, 1H, *J* = 1.60 Hz, H₇) ; 7.34 (dd, *J*_{H-F} = 10.3 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, H₃) ; 4.89 (s, 2H, H₈) ; 4.21 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, H₁₀) ; 3.98 (s, 3H, H₁₂) ; 1.25 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H₁₁)

NMR ^{13}C (126 MHz; Acetone) δ : 191.3 (C_1) ; 169.7 (C_9) ; 156.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 256$ Hz, C_4) ; 155.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 4.5$ Hz, C_6) ; 141.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 12.7$ Hz, C_5) ; 133.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 7.2$ Hz, C_2) ; 111.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 20.6$ Hz, C_3) ; 110.0 (C_7) ; 70.3 (C_8) ; 62.1 (C_{10}) ; 57.6 (C_{12}) ; 15.0 (C_{11})

MS (ESI $^+$) m/z ; 257.1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-3-fluoro-5-methoxyphenyl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid **II-B7**

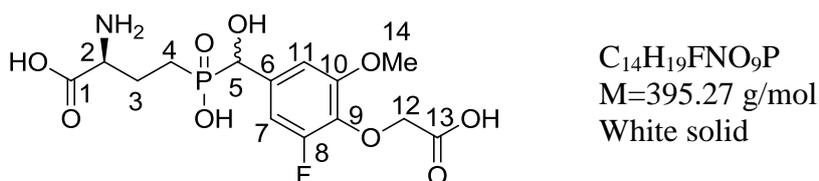


The *general procedure B* was followed using compound **II-18** (359 mg, 1.40 mmol, 1 eq), ‘**P-H_{int}**’ (441 mg, 1.40 mmol, 1 eq) and BSA (1.27 mL, 5.20 mmol, 3.7 eq) in DCM (12 mL) to afford crude compound **II-B7** (1.3 g, 2.27 mmol).

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (101 MHz; Acetone) δ : 47.6

MS (ESI $^-$) m/z ; 570.1 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$

(2S)-2-Amino-4-(((4-(carboxymethoxy)-3-fluoro-5-methoxyphenyl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid **LSP2-9015**



The *general procedure C* was followed using compound **II-B7** (1.3 g, 2.27 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (50 mL). The crude compound (770 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford **LSP2-9015** (115 mg, 0.29 mmol, 21% yield over 2 steps).

NMR ^1H (500 MHz; D_2O) δ : 6.83 (s, 1H, H_{11}) ; 6.77 (d, $J_{\text{H-F}} = 11.3$ Hz, 1H, H_7) ; 4.74 (d, $J_{\text{H-P}} = 9.5$ Hz, 1H, H_5) ; 4.60 (s, 2H, H_{12}) ; 3.96 (m, 1H, H_2) ; 3.77 (s, 2H, H_{14}) ; 2.06 (m, 2H, H_3) ; 1.68 (m, 2H, H_4)

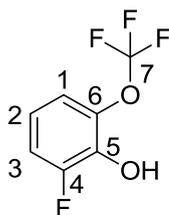
NMR ^{13}C (125 MHz; D_2O) δ : 174.6 (C_{12}) ; 173.1 (C_1) ; 156.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 244$ Hz, C_8) ; 153.7 (C_{10}) ; 135.7 (d, $J_{\text{C-F}} = 9.0$ Hz, 6) ; 135.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 14.0$ Hz, C_9) ; 108.9 (C_{11}) ; 108.6 (d, $J_{\text{C-F}} =$

21.0 Hz, C₇) ; 73.5 (d, J_{C-P} = 108.0 Hz, C₅) ; 71.0 (C₁₂) ; 57.7 (C₁₄) ; 54.8 (d, J_{C-P} = 14.0 Hz, C₂) ; 24.4 (C₃) ; 23.4 (d, J_{C-P} = 89.1 Hz, C₄)

NMR ³¹P_{cpd} (202 MHz; D₂O) δ : 40.2

HPLC-MS (ESI) m/z ; (λ=235 nm): Rt = 7.9 min ; 396. [M+H]⁺

2-Fluoro-6-(trifluoromethoxy)phenol **II-20**



C₇H₄F₄O₂
M=196.10 g/mol
Colorless oil

Fluorodimethoxyborane diethyl ether was prepared by adding BF₃.OEt₂ (21.1 mL, 166.6 mmol, 5 eq) into a solution of trimethyl borate (37.8 mL, 333 mmol, 10 eq) in Et₂O (34.5 mL, 10 eq). *N*-Butyllithium (1.6 M in hexane, 22.9 mL, 36.7 mmol, 1.1 eq) was added dropwise at -78 °C to a solution of 1-fluoro-3-(trifluoromethoxy)benzene **II-19** (6 g, 33.3 mmol, 1 eq) in THF (60 mL). The reaction mixture was stirred for 2 h at -78 °C, treated with freshly prepared fluorodimethoxyborane diethyl ether (5 eq) and allowed to warm up to 25 °C. At 0 °C, oxone (22.53 g, 36.65 mmol, 1.1 eq) and a saturated solution of NaHCO₃ (50 mL) were added. The reaction mixture was stirred for 30 min at 0 °C, and allowed to reach 25 °C over 1 h. An aqueous sodium thiosulfate solution (1 M, 150 mL) was added dropwise and the aqueous layer was extracted with Et₂O (3x100 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified by distillation under vacuum to afford **II-20** (4.35 g, 22.1 mmol, 67% yield).

Rf = 0.56 (SiO₂; cyclohexane/EtOAc 8:2; UV)

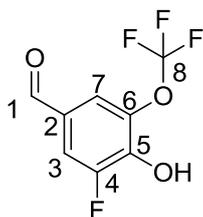
NMR ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ : 7.07 (m, 2H, H₁ and H₃) ; 6.88 (m, 1H, H₂) ; 5.64 (bs, 1H, OH)

NMR ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ : 151.9 (d, J_{C-F} = 242.5 Hz, C₄) ; 137.8 (C₆) ; 137.5 (d, J_{C-F} = 15.8 Hz, C₅) ; 120.8 (q, J_{C-F} = 259.1 Hz, C₇) ; 119.6 (d, J_{C-F} = 8.2 Hz, C₂) ; 117.8 (C₁) ; 114.7 (d, J_{C-F} = 18.1 Hz, C₃)

NMR ¹⁹F (282 MHz; CDCl₃) δ : -59.4 (OCF₃) ; -136.3

HRMS (ESI) m/z : Calculated for C₇H₃F₄O₂ [M-H]⁻: 267.0445. Found 267.0440.

b.p. : 57 °C/ 17 mbar)

3-Fluoro-4-hydroxy-5-(trifluoromethoxy)benzaldehyde II-21

$C_8H_4F_4O_3$
 $M=224.11$ g/mol
 White crystals

A stirring solution of compound **II-20** (2.46 g, 12.5 mmol, 1 eq) and hexamethylenetetramine (1.93 g, 13.8 mmol, 1.1 eq) in TFA (15 mL) was refluxed for 12 h. After cooling to 25 °C, the solvent was evaporated under vacuum and the crude residue was dissolved in DCM (35 mL). The solution was washed with a saturated solution of $NaHCO_3$ then the aqueous layer was acidified to pH 1 with concentrated HCl and extracted with DCM (2x25 mL). The combined organic fractions were dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. Recrystallization in a mixture Et_2O /pentane afforded **II-21** (2.5 g, 11.16 mmol 89% yield).

Rf = 0.28 (SiO_2 ; cyclohexane/ $EtOAc$ 8:2; UV)

NMR 1H (300 MHz; DMSO) δ : 9.84 (d, $J_{H-F} = 1.9$ Hz, 1H, H_1) ; 7.78 (dd, $J_{H-F} = 10.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H_3) ; 7.74 (s, 1H, H_7)

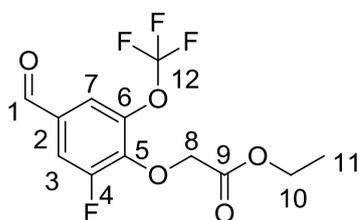
NMR ^{13}C (100 MHz; DMSO) δ : 189.9 (C_1) ; 152.2 (d, $J_{C-F} = 246$ Hz, C_4) ; 144.8 (d, $J_{C-F} = 16.4$ Hz, C_5) ; 137.7 (d, $J_{C-F} = 4.8$ Hz, C_6) ; 126.9 (d, $J_{C-F} = 5.9$ Hz, C_2) ; 120.4 (C_6) ; 120.2 (q, $J_{C-F} = 257.5$ Hz, C_8) ; 115.5 (d, $J_{C-F} = 19.4$ Hz, C_3)

NMR ^{19}F (376 MHz; DMSO) δ : -57.5 (OCF_3) ; -130.0

HRMS (ESI) m/z : Calculated for $C_8H_3F_4O_3$ $[M-H]^-$: 223.0024. Found 223.0025.

IR ν_{max}/cm^{-1} : 3358, 1685, 1590, 1520, 1328, 1267, 1175, 1126, 1030, 868

m.p. : 110°C

Ethyl 2-(2-fluoro-4-formyl-6-(trifluoromethoxy)phenoxy)acetate II-22

$C_{12}H_{10}F_4O_5$
 $M=310.2$ g/mol
 colorless oil

The *general procedure A* was followed using K_2CO_3 (925 mg, 6.70 mmol, 1.5 eq), ethyl 2-bromoacetate (0.62 mL, 5.60 mmol, 1.25 eq) and 3-fluoro-4-hydroxy-5-(trifluoromethoxy)benzaldehyde **III-21** (0.5 g, 3.16 mmol, 1 eq) in acetone (70 mL). The crude

compound was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1) to afford **III-22** (638 mg, 2.10 mmol, 46% yield).

Rf = 0.42 (SiO₂; cyclohexane/EtOAc 8:2; UV)

NMR ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ : 9.85 (d, *J*_{H-F} = 1.9 Hz, 1H, H₁) ; 7.59 (m, 2H, H₃ and H₇) ; 4.89 (d, *J*_{H-F} = 2.1 Hz, 2H, H₈) ; 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₁₀) ; 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H₁₁)

NMR ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ : 188.5 (C₁) ; 167.8 (C₉) ; 154.8 (d, *J*_{C-F} = 251.2 Hz, C₄) ; 144.1 (d, *J*_{C-F} = 11.8 Hz, C₅) ; 141.8 (d, *J*_{C-F} = 5.2 Hz, C₆) ; 130.9 (d, *J*_{C-F} = 6.6 Hz, C₂) ; 120.5 (q, *J*_{C-F} = 260.3 Hz, C₁₂) ; 119.6 (C₇) ; 116.3 (d, *J*_{C-F} = 20.6 Hz, C₃) ; 69.4 (d, *J*_{C-F} = 7.2 Hz, C₈) ; 61.7 (C₁₀) ; 14.1 (C₁₁)

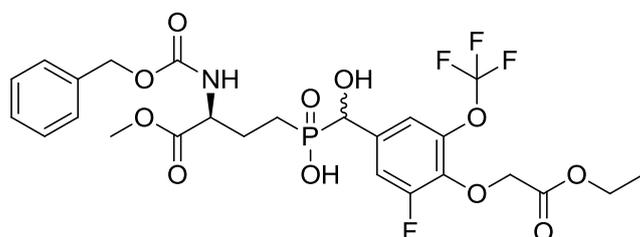
NMR ¹⁹F (282 MHz; CDCl₃) δ : -59.1 (OCF₃) ; -126.7

HRMS (ESI⁺) *m/z* : Calculated for C₁₂H₁₀F₄O₅Na [M+H]⁺: 333.0362. Found 333.0355.

IR *v*_{max}/cm⁻¹ : 1758, 1701, 1505, 1328, 1257, 1190, 1168, 1120, 1049, 865

Elemental Analysis : Calculated for C₁₂H₁₀F₄O₅ : C; 46.46%, H; 3.25%. Found C; 46.24%, H; 3.46%

((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-3-fluoro-5-(trifluoromethoxy)phenyl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid
II-B8

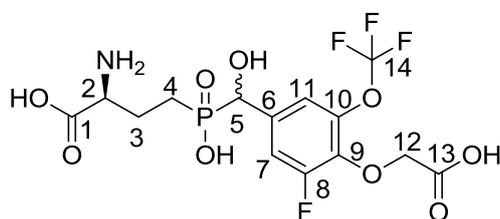


C₂₅H₂₈F₄NO₁₁P
M=625.46 g/mol
Yellowish solid

The *general procedure B* was followed using compound **II-22** (400 mg, 1.30 mmol, 1 eq), “**P-H_{int}**” (407 mg, 1.40 mmol, 1 eq) and BSA (1.27 mL, 5.16 mmol, 4 eq) in DCM (12 mL) to afford crude compound **II-B8** (945 mg, 1.51 mmol).

NMR ³¹P (100 MHz; CDCl₃) δ : 41.9

(2S)-2-Amino-4-(((4-(carboxymethoxy)-3-fluoro-5-(trifluoromethoxy)phenyl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid
LSP14-1086



$C_{14}H_{16}F_4NO_9P$
M=449.25 g/mol
White solid

The *general procedure C* was followed using compound **II-B8** (945 mg, 1.51 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (50 mL). The crude compound (480 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford **LSP14-1086** (41 mg, 0.09 mmol, 7% yield over 2 steps).

NMR 1H (250 MHz; D_2O) δ : 7.27 (m, 2H, H_7 and H_{11}) ; 4.85 (d, J_{H-P} = 10.0 Hz, 1H, H_5) ; 4.80 (s, 2H, H_{12}) ; 4.04 (m, 1H, H_2) ; 2.12 (m, 2H, H_3) ; 1.76 (m, 2H, H_4)

NMR ^{13}C (63 MHz; D_2O) δ : 172.8 (C_{13}) ; 171.9 (C_1) ; 154.8 (d, J_{C-F} = 246.1 Hz, C_8) ; 141.2 (C_{10}) ; 137.3 (d, J_{C-F} = 13.8 Hz, C_9) ; 135.1 (d, J_{C-F} = 7.8 Hz, C_6) ; 120.2 (q, J_{C-F} = 258.4 Hz, C_{14}) ; 116.4 (C_{11}) ; 113.4 (d, J_{C-F} = 21.1 Hz, C_7) ; 71.7 (d, J_{C-P} = 107.9 Hz, C_5) ; 70.0 (C_{12}) ; 53.5 (d, J_{C-P} = 13.7 Hz, C_2) ; 23.1 (C_3) ; 22.1 (d, J_{C-P} = 93.3 Hz, C_4)

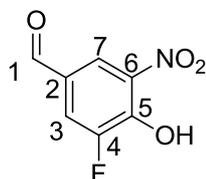
NMR $^{31}P_{cpd}$ (202 MHz; D_2O) δ : 38.3

NMR ^{19}F (376 MHz; D_2O) δ : -58.6 (OCF_3) ; -128.2

HRMS (ESI) m/z : Calculated for $C_{14}H_{15}F_4NO_9P$ [M-H] $^-$: 448.0426. Found 448.0430.

HPLC-MS (ESI) m/z ; ($\lambda=235$ nm): R_t = 12.6 min ; 450.0 [M+H] $^+$; 448.5 [M-H] $^-$

3-Fluoro-4-hydroxy-5-nitrobenzaldehyde II-23



$C_8H_7FNO_4$
M=154.14 g/mol
Yellow solid

A stirring solution of 2-fluoro-6-nitrophenol (835 mg, 3.7 mmol, 1 eq) and hexamethylenetetramine (31.5 g, 225 mmol, 60 eq) in TFA (80 mL) was refluxed for 96 h. After cooling to 25 °C, the the solvent was evaporated under vacuum and the crude residue was dissolved in DCM (120 mL). The solution was washed with a saturated solution of $NaHCO_3$ then the aqueous layer was acidified to pH 1 with concentrated HCl and extracted with DCM (2x50 mL). The combined organic fractions were dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated

under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH 9:1) to afford **II-23** (455 mg, 1.82 mmol 48% yield).

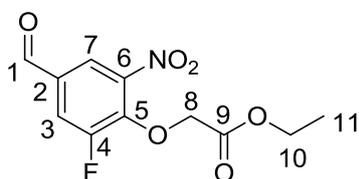
Rf = 0.28 (SiO₂; EtOAc/MeOH 8:2; UV)

NMR ¹H (400 MHz; MeOD) δ : 9.56 (d, $J_{\text{H-F}} = 2.9$ Hz, 1H, H₁) ; 8.29 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H₇) ; 7.46 (dd, $J_{\text{H-F}} = 10.9$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H₃)

NMR ¹³C (100 MHz; MeOD) δ : 190.7 (C₁) ; 163.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 17.7$ Hz, C₆) ; 159.4 (d, $J_{\text{C-F}} = 246.7$ Hz, C₄) ; 138.8 (C₅) ; 130.6 (C₇) ; 119.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 6.0$ Hz, C₂) ; 114.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 20.1$ Hz, C₃)

NMR ¹⁹F (376 MHz; MeOD) δ : -132.2

Ethyl 2-(2-fluoro-4-formyl-6-nitrophenoxy)acetate **II-24**



C₁₁H₁₀FNO₆
M=271.19 g/mol
Yellow oil

To a solution of compound **II-23** (573 mg, 3.10 mmol, 1 eq) and PPh₃ (1.01 g, 4.27 mmol, 1.25 eq) in THF (30 mL) were added at 0°C ethyl glycolate (0.36 mL, 3.72 mmol, 1.2 eq) and DEAD (0.37 mL, 4.27 mmol, 1.38 eq). The mixture was stirred at 25 °C for 12 h. The solvent was evaporated under vacuum and the residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 1:4) to afford **III-24** (531 mg, 1.96 mmol, 63% yield).

Rf = 0.36 (SiO₂; EtOAc/cyclohexane 1:4; UV)

NMR ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ : 9.93 (d, $J_{\text{H-F}} = 1.9$ Hz, 1H, H₁) ; 8.15 (s, 1H, H₇) ; 7.85 (dd, $J_{\text{H-F}} = 11.3$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, H₃) ; 4.96 (d, $J_{\text{H-F}} = 1.8$ Hz, 2H, H₈) ; 4.25 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H₁₀) ; 1.28 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H₁₁)

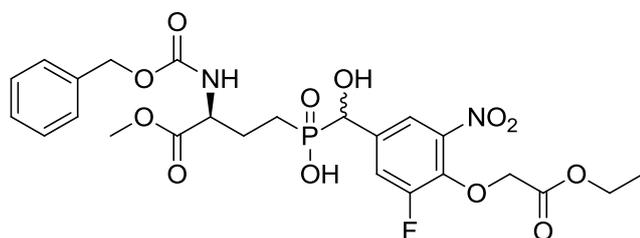
NMR ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ : 187.6 (C₁) ; 167.3 (C₉) ; 155.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 253.7$ Hz, C₄) ; 144.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 13.2$ Hz, C₅) ; 144.3 (C₆) ; 131.0 (d, $J_{\text{C-F}} = 5.9$ Hz, C₂) ; 122.5 (C₇) ; 120.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 20.8$ Hz, C₃) ; 69.0 (d, $J_{\text{C-F}} = 9.0$ Hz, C₈) ; 62.0 (C₁₀) ; 14.1 (C₁₁)

NMR ¹⁹F (376 MHz; CDCl₃) δ : -127.03

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for C₁₁H₁₀FNO₆Na [M+Na]⁺: 294.0390. Found 294.0380.

IR ν_{max} /cm⁻¹ : 1751, 1703, 1539, 1356, 1300, 1205, 1117, 1049, 786

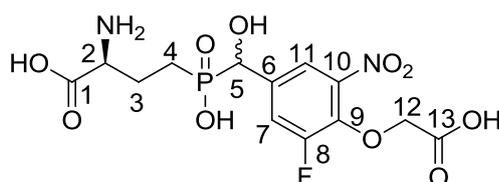
Elemental Analysis : Calculated for C₁₁H₁₀FO₆ : C; 48.72%, H; 3.72%, N; 5.16%. Found C; 48.86%, H; 3.90%, N; 5.04%.

((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((4-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-3-fluoro-5-nitrophenyl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid II-B9

C₂₄H₂₈FN₂O₁₂P
M=586.46 g/mol
Yellowish solid

The *general procedure B* was followed using compound **II-24** (450 mg, 1.66 mmol, 1 eq), “**P-H_{int}**” (523 mg, 1.66 mmol, 1 eq) and BSA (2.47 mL, 9.96 mmol, 6 eq) in DCM (12 mL) to afford crude compound **II-B9** (1.53 g, 2.61 mmol).

NMR ³¹P_{cpd} (202 MHz; CDCl₃) δ : 48.3

(2S)-2-Amino-4-(((4-(carboxymethoxy)-3-fluoro-5-nitrophenyl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid LSP14-3048

C₁₃H₁₆FN₂O₁₀P
M=410.24 g/mol
White solid

The *general procedure C* was followed using compound **II-B9** (1.53 g, 2.61 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (70 mL). The crude compound (260 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford desired compound but not pure. An anion exchange resin chromatography was carried out (elution with boiled water and 3.5 M formic acid) to afford **LSP14-3048** (102 mg, 0.25 mmol, 15% yield over 2 steps)

NMR ¹H (500 MHz; D₂O) δ : 7.83 (s, 1H, H₁₁) ; 7.61 (d, J_{H-F} = 11.8 Hz, 1H, H₇) ; 5.00 (d, J_{H-P} = 9.5 Hz, 1H, H₅) ; 4.90 (s, 2H, H₁₂) ; 4.14 (m, 1H, H₂) ; 2.19 (m, 2H, H₃) ; 1.87 (m, 2H, H₄)

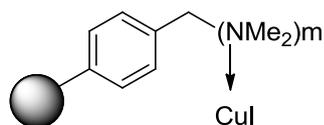
NMR ¹³C (125 MHz; D₂O) δ : 172.3 (C₁₃) ; 171.4 (C₁) ; 155.1 (d, J_{C-F} = 250 Hz, C₈) ; 143.3 (C₁₀) ; 138.8 (d, J_{C-F} = 14.9 Hz, C₉) ; 135.3 (d, J_{C-F} = 6.8 Hz, C₆) ; 120.3 (d, J_{C-F} = 21.4 Hz, C₇) ; 118.9 (C₁₁) ; 71.0 (d, J_{C-P} = 107.6 Hz, C₅) ; 70.4 (d, J_{C-F} = 4.5 Hz, C₁₂) ; 53.2 (d, J_{C-P} = 14.6 Hz, C₂) ; 22.9 (C₃) ; 22.0 and 21.9 (d, J_{C-P} = 90.6 Hz, C₄)

NMR ³¹P_{cpd} (202 MHz; D₂O) δ : 40.1

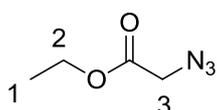
NMR ¹⁹F (470 MHz; D₂O) δ : -126.1

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for C₁₃H₁₇FN₂O₁₀P [M+Na]⁺: 411.0599. Found 411.0609.

HPLC-MS (ESI) m/z ; (λ=254 nm): Rt = 2.7 min ; 411.06 [M+H]⁺ ; 409.05 [M-H]⁻

Catalyst A-21 (Cu) II-27

A-21 resin (50 g) was washed with a stirring solution of MeOH during 30 min and filtrated. The operation was carried out 3 times. Then the resin was washed with a stirring solution of DCM during 30 min and filtrated. The operation was carried out 3 times, and the resin was dried overnight over P_4O_{10} . A-21 resin (5 g) was added to a slowly stirring solution of CuI (1.905 g, 10 mmol) in dry MeCN (75 mL) under argon for 12 h at 25 °C. The solvent was evaporated under vacuum to afford the A-21(Cu) **II-27** catalyst, which was stored under argon.

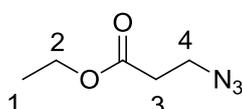
Ethyl 2-azidoacetate II-28

$C_4H_7N_3O_2$
 $M=129.12$ g/mol
 Yellow oil

The *general procedure D* was followed using sodium azide (4 g, 61.5 mmol, 1 eq), ethyl bromoacetate (6.8 mL, 61.5 mmol, 1 eq) in DMF (100 mL) to afford **II-28** (7.7 g, 59.7 mmol, 97% yield) which was used without further purification.

NMR 1H (250 MHz; $CDCl_3$) δ : 4.26 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H_2) ; 3.86 (s, 2H, H_3) ; 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H_1)

IR ν_{max}/cm^{-1} : 2100 (strong, N_3)

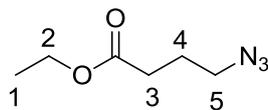
Ethyl 3-azidopropionate II-29

$C_5H_9N_3O_2$
 $M=143.14$ g/mol
 Yellow oil

The *general procedure D* was followed using sodium azide (1 g, 15.8 mmol, 1 eq), ethyl bromopropionate (2 mL, 15.6 mmol, 1 eq) in DMF (30 mL). The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane to remove ethyl acrylate and EtOAc to collect desired product) to afford **II-29** (1 g, 7.11 mmol, 45% yield) which was used without further purification.

NMR 1H (250 MHz; $CDCl_3$) δ : 4.20 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H_2) ; 3.58 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H_3) ; 2.58 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, H_4) ; 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H_1)

R ν_{max}/cm^{-1} : 2100 (strong, N_3)

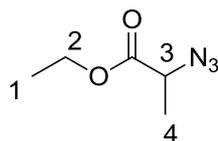
Ethyl 4-azidobutyrate II-30

$C_6H_{11}N_3O_2$
 $M=157.17$ g/mol
 Yellow oil

The *general procedure D* was followed using sodium azide (144 mg, 2.22 mmol, 1.34 eq), ethyl bromoacetate (0.24 mL, 1.66 mmol, 1 eq) in DMF (20 mL) to afford **II-30** (253 mg, 1.61 mmol, 97% yield) which was used without further purification.

NMR 1H (250 MHz; $CDCl_3$) δ : 4.14 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H_2) ; 3.35 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H_3) ; 2.40 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H_5) ; 1.91 (m, $J = 7$ Hz, 2H, H_4) ; 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H_1)

IR ν_{max}/cm^{-1} : 2100 (strong, N_3)

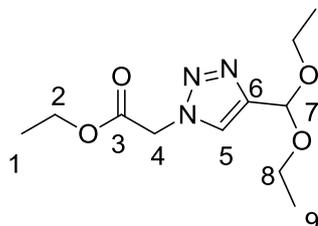
Ethyl 2-azidopropionate II-31

$C_5H_9N_3O_2$
 $M=143.14$ g/mol
 Yellow oil

The *general procedure D* was followed using sodium azide (216 mg, 3.32 mmol, 2 eq), ethyl bromoacetate (0.22 mL, 1.66 mmol, 1 eq) to afford **II-31** (230 mg, 1.61 mmol, 97% yield) which was used without further purification.

NMR 1H (250 MHz; $CDCl_3$) δ : 4.26 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, H_2) ; 3.93 (q, 1H, $J = 7.1$ Hz, H_3) ; 1.48 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz, H_4) ; 1.32 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, H_1)

IR ν_{max}/cm^{-1} : 2100 (strong, N_3)

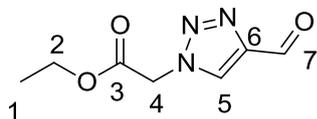
Ethyl 2-(4-(diethoxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetate II-32

$C_{11}H_{19}N_3O_4$
 $M=257.29$ g/mol
 Yellow oil

The *general procedure E* was followed using A-21 catalyst **II-27** (253 mg, 0.31 mmol, 8% eq), **II-28** (500 mg, 3.88 mmol, 1 eq) and 3,3-diethoxyprop-1-yne (0.55 mL, 3.88 mmol, 1 eq) in DCM (3 mL) to afford crude compound **II-32** which used without further purification in the next step.

NMR ^1H (250 MHz; CDCl_3) δ : 7.79 (s, 1H, H₅) ; 5.75 (s, 1H, H₇) ; 5.15 (s, 2H, H₄) ; 4.27 (q, J = 7.2 Hz, 2H, H₂) ; 3.67 (m, 4H, H₈) ; 1.30 (t, J = 7.0 Hz, 3H, H₁) ; 1.25 (t, J = 6.8 Hz, 6H, H₉)

Ethyl 2-(4-formyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetate **II-33**



$\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$
 $M=143.16$ g/mol
 Red oil

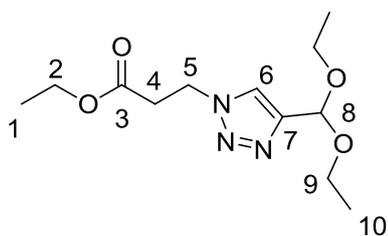
The *general procedure F* was followed using compound **II-32**, CHCl_3 (15 mL) and 50 % aqueous solution of TFA (5 mL) to afford **II-33** (361 mg, 2.52 mmol, 65% yield over 2 steps) which was used without further purification.

NMR ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ : 10.17 (s, 1H, H₇) ; 8.29 (s, 1H, H₅) ; 5.25 (s, 2H, H₄) ; 4.31 (q, J = 7.2 Hz, 2H, H₂) ; 1.33 (t, J = 7.2 Hz, 3H, H₁)

NMR ^{13}C (126 MHz; CDCl_3) δ : 185.0 (C₇) ; 165.5 (C₃) ; 148.2 (C₆) ; 126.9 (C₅) ; 63.1 (C₂) ; 51.2 (C₄) ; 14.2 (C₁)

MS (ESI⁺) m/z : 184.1 [M+H]⁺

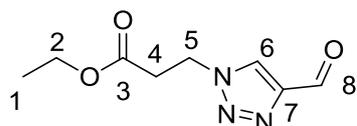
Ethyl 3-(4-(diethoxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate **II-34**



$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$
 $M=271.31$ g/mol
 Yellow oil

The *general procedure E* was followed using A-21 catalyst **II-27** (91 mg, 0.11 mmol, 8% eq), **II-29** (200 mg, 1.4 mmol, 1 eq) and 3,3-diethoxyprop-1-yne (0.22 mL, 1.4 mmol, 1 eq) in DCM (3 mL) to afford crude compound **II-34** which used without further purification in the next step.

NMR ^1H (250 MHz; CDCl_3) δ : 7.68 (s, 1H, H₆) ; 5.71 (s, 1H, H₈) ; 4.65 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H₅) ; 4.16 (q, J = 7.0 Hz, 2H, H₂) ; 3.65 (m, 4H, H₉) ; 2.96 (t, J = 6.3 Hz, 2H, H₄) ; 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H₁) ; 1.24 (t, J = 6.9 Hz, 6H, H₁₀)

Ethyl 3-(4-formyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate II-35

$C_8H_{11}N_3O_3$
 $M=197.19$ g/mol
 Yellow oil

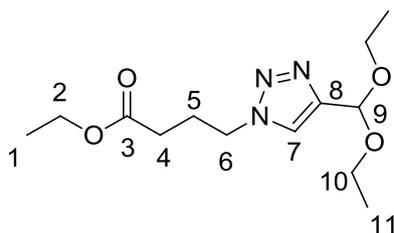
The *general procedure F* was followed using compound **II-34**, $CHCl_3$ (15 mL) and a 50 % aqueous solution of TFA (5 mL). The residue was purified by column chromatography (EtOAc/cyclohexane 1:1) to afford **II-35** (124 mg, 0.63 mmol, 45% yield over 2 steps).

Rf = 0.34 (SiO_2 ; cyclohexane/EtOAc : 1/1; UV)

NMR 1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ : 10.13 (s, 1H, H₈) ; 8.23 (s, 1H, H₆) ; 4.72 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, H₅) ; 4.16 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H₂) ; 3.00 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, H₄) ; 1.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H₁)

NMR ^{13}C (126 MHz; $CDCl_3$) δ : 185.1 (C₈) ; 170.3 (C₃) ; 147.8 (C₇) ; 126.2 (C₆) ; 61.6 (C₂) ; 46.2 (C₅) ; 34.5 (C₄) ; 14.2 (C₁)

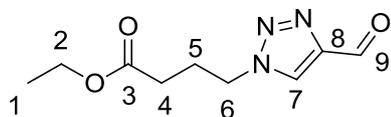
MS (ESI⁺) m/z : 198.08 [M+H]⁺

Ethyl 4-(4-(diethoxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanoate II-36

$C_{13}H_{23}N_3O_4$
 $M=285.34$ g/mol
 Yellow oil

The *general procedure E* was followed using A-21 catalyst **II-27** (101 mg, 0.12 mmol, 8% eq), **II-30** (240 mg, 1.55 mmol, 1 eq) and 3,3-diethoxyprop-1-yne (0.22 mL, 1.55 mmol, 1 eq) in DCM (3 mL) to afford crude compound **II-36** which used without further purification in the next step.

NMR 1H (250 MHz; $CDCl_3$) δ : 7.69 (s, 1H, H₇) ; 5.71 (s, 1H, H₉) ; 4.44 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, H₆) ; 4.15 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H, H₂) ; 3.68 (m, 4H, H₁₀) ; 2.35 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, H₄) ; 2.26 (m, 2H, H₅) ; 1.26 (m, 9H, H₁ and H₁₁)

Ethyl 4-(4-formyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butanoate II-37

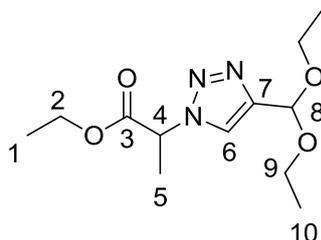
$C_9H_{13}N_3O_3$
 $M=211.22$ g/mol
 Orange oil

The *general procedure F* was followed using compound **II-36**, $CHCl_3$ (15 mL) and a 50 % aqueous solution of TFA (5 mL) to afford **II-37** (249 mg, 1.17 mmol, 76% yield over 2 steps) which was used without further purification.

NMR 1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ : 10.11 (s, 1H, H₉) ; 8.16 (s, 1H, H₇) ; 4.52 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H₆) ; 4.12 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H₂) ; 2.35 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H₄) ; 2.26 (m, 2H, H₅) ; 1.23 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H₁)

NMR ^{13}C (126 MHz; $CDCl_3$) δ : 185.1 (C₉) ; 172.1 (C₃) ; 147.8 (C₈) ; 125.6 (C₇) ; 60.9 (C₂) ; 49.8 (C₆) ; 30.6 (C₄) ; 25.4 (C₅) ; 14.2 (C₁)

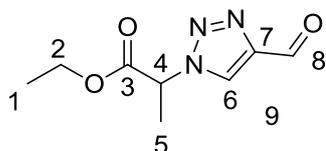
MS (ESI⁺) m/z : 212.1 [M+H]⁺

Ethyl 2-(4-(diethoxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate II-38

$C_{12}H_{21}N_3O_4$
 $M=271.31$ g/mol
 Yellow oil

The *general procedure E* was followed using A-21 catalyst **II-27** (95 mg, 0.12 mmol, 8% eq), **II-31** (208 mg, 1.45 mmol, 1 eq) and 3,3-diethoxyprop-1-yne (0.21 mL, 1.45 mmol, 1 eq) in DCM (3 mL) to afford crude compound **II-38** which used without further purification in the next step.

NMR 1H (250 MHz; $CDCl_3$) δ : 7.85 (s, 1H, H₆) ; 5.74 (s, 1H, H₈) ; 5.46 (q, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₄) ; 4.23 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H₂) ; 3.68 (m, 4H, H₉) ; 1.84 (d, $J = 7.4$ Hz, 3H, H₅) ; 1.25 (m, 9H, H₁ and H₁₀)

Ethyl 2-(4-formyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate II-39

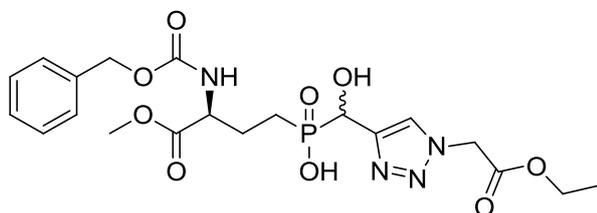
$C_8H_{11}N_3O_3$
 M=197.19 g/mol
 Orange oil

The *general procedure F* was followed using **II-38**, $CHCl_3$ (15 mL) and a 50 % aqueous solution of TFA (5 mL) to afford **II-39** (266 mg, 1.35 mmol, 93% yield over 2 steps) which was used without further purification.

NMR 1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ : 10.13 (s, 1H, H₈) ; 8.34 (s, 1H, H₆) ; 5.52 (q, $J = 7.4$ Hz, 1H, H₄) ; 4.24 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H₂) ; 1.87 (d, $J = 7.7$ Hz, 3H, H₅) ; 1.27 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H₁)

NMR ^{13}C (126 MHz; $CDCl_3$) δ : 184.9 (C₈) ; 168.6 (C₃) ; 147.8 (C₇) ; 125.2 (C₆) ; 62.9 (C₂) ; 58.7 (C₄) ; 18.3 (C₅) ; 14.1 (C₁)

MS (ESI⁺) m/z : 198.1 [M+H]⁺

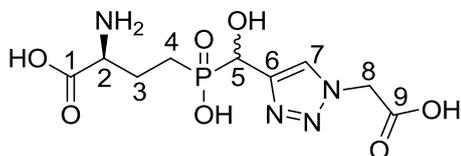
((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((1-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid II-40

$C_{20}H_{27}N_4O_9P$
 M=498.42 g/mol
 Red oil

The *general procedure B* was followed using **II-36** (290 mg, 1.59 mmol, 1 eq), “**P-H_{int}**” (500 mg, 1.59 mmol, 1 eq) and BSA (1.56 mL, 6.36 mmol, 4 eq) in DCM (25 mL) to afford crude compound **II-40** (720 mg, 1.44 mmol).

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; MeOD) δ : 46.51

(2S)-2-Amino-4-(((1-(carboxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid LSP16-1022



$C_9H_{15}N_4O_7P$
 $M=322.21$ g/mol
 White solid

The *general procedure C* was followed using compound **II-40** (720 mg, 1.44 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (60 mL). The crude compound (240 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford desired compound but not pure. An anion exchange resin chromatography was carried out (elution with boiled water and formic acid 4 M) to afford **LSP16-1022** (30 mg, 0.09 mmol, 7% yield over 2 steps)

NMR 1H (500 MHz; D_2O) δ : 8.12 (s, 1H, H₇) ; 5.40 (s, 2H, H₈) ; 5.14 (d, J_{H-P} = 9.2 Hz, 1H, H₅) ; 4.17 (t, J = 12.5 Hz, 1H, H₂) ; 2.34 (m, 2H, H₃) ; 1.94 (m, 2H, H₄)

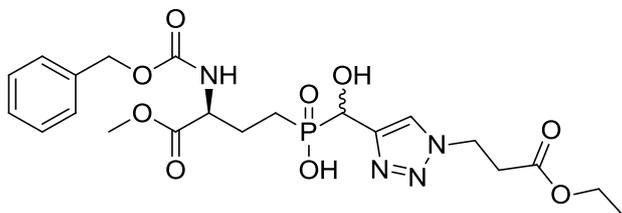
NMR ^{13}C (126 MHz; D_2O) δ : 171.5 (C₁) ; 170.5 (C₉) ; 144.7 (C₆) ; 125.7 (C₇) ; 65.2 (d, J_{C-P} = 111.4 Hz, C₅) ; 53.2 (d, J_{C-P} = 15.2 Hz, C₂) ; 51.8 (C₁₈) ; 22.8 (C₃) ; 22.0 (d, J_{C-P} = 92.0 Hz, C₄)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (202 MHz; D_2O) δ : 40.2

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for $C_9H_{16}FN_4O_7P$ $[M+H]^+$: 323.0757. Found 323.0749.

HPLC-MS (ESI) m/z ; ($\lambda=254$ nm): R_t = 2.35 min ; 323.07 $[M+H]^+$; 321.06 $[M-H]^-$

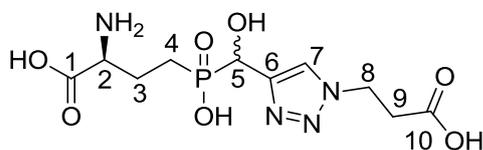
((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((1-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid II-41



$C_{10}H_{17}N_4O_7P$
 $M=336.24$ g/mol
 White solid

The *general procedure B* was followed using **II-37** (120 mg, 0.61 mmol, 1 eq), "**P-H_{int}**" (192 mg, 0.61 mmol, 1 eq) and BSA (0.61 mL, 2.44 mmol, 4 eq) in DCM (25 mL) to afford crude compound **II-41** (280 mg, 0.83 mmol).

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; MeOD) δ : 45.8

(2S)-2-Amino-4-(((1-(2-carboxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid LSP16-1028

C₁₀H₁₇N₄O₇P
M=336.24 g/mol
White solid

The *general procedure C* was followed using compound **II-41** (280 mg, 0.83 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (30 mL). The crude compound (180 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford **LSP16-1028** (30 mg, 0.09 mmol, 14% yield over 2 steps)

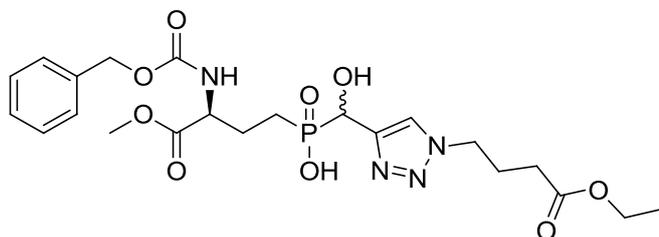
NMR ¹H (500 MHz; D₂O) δ : 8.05 (s, 1H, H₇) ; 5.01 (d, *J*_{H-P} = 8.6 Hz, 1H, H₅) ; 4.72 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H, H₈) ; 4.08 (t, *J*_{H-P} = 6.1 Hz, 1H, H₂) ; 3.05 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H₉) ; 2.18 (m, 2H, H₃) ; 1.83 (m, 2H, H₄)

NMR ¹³C (126 MHz; D₂O) δ : 174.7 (C₁₀) ; 171.9 (C₁) ; 144.7 (C₆) ; 124.5 (C₇) ; 65.5 (d, *J*_{C-P} = 110.2 Hz, C₅) ; 53.6 (d, *J*_{C-P} = 13.5 Hz, C₂) ; 51.2 (C₁₈) ; 46.1 (C₈) ; 34.0 (C₉) ; 23.1 (C₃) ; 22.4 (d, *J*_{C-P} = 91.0 Hz, C₄)

NMR ³¹P_{cpd} (202 MHz; D₂O) δ : 37.90

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for C₁₀H₁₈FN₄O₇P [M+H]⁺: 337.0916. Found 337.0898.

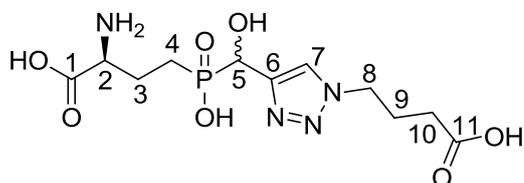
HPLC-MS (ESI) m/z ; (λ=254 nm): Rt = 2.81 min ; 337.09 [M+H]⁺ ; 335.08 [M-H]⁻

((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((1-(4-ethoxy-4-oxobutyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid II-42

C₂₂H₃₁N₄O₉P
M=526.48 g/mol
Yellow solid

The *general procedure B* was followed using **II-38** (200 mg, 0.95 mmol, 1 eq), “**P-H_{int}**” (300 mg, 0.95 mmol, 1 eq) and BSA (0.96 mL, 3.8 mmol, 4 eq) in DCM (25 mL) to afford crude compound **II-42** (570 mg, 1.08 mmol).

NMR ³¹P_{cpd} (101 MHz; MeOD) δ : 46.5

(2S)-2-Amino-4-(((1-(3-carboxypropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid LSP16-1034

$C_{11}H_{19}N_4O_7P$
 $M=350.26$ g/mol
 Orange oil

The *general procedure C* was followed using compound **II-42** (570 mg, 1.08 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (50 mL). The crude compound (267 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford **LSP16-1034** (30 mg, 0.09 mmol, 9% yield over 2 steps)

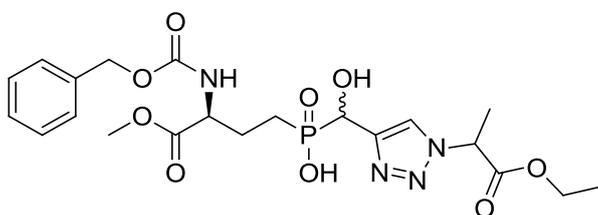
NMR 1H (500 MHz; D_2O) δ : 8.08 (s, 1H, H₇) ; 5.07 (d, J_{H-P} = 9.0 Hz, 1H, H₅) ; 4.54 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H₈) ; 4.15 (t, J_{H-P} = 6.2 Hz, 1H, H₂) ; 2.43 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H₁₀) ; 2.24 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H₉) ; 2.22 (m, 2H, H₃) ; 1.90 (m, 2H, H₄)

NMR ^{13}C (126 MHz; D_2O) δ : 177.1 (C₁₁) ; 171.9 (C₁) ; 144.6 (C₆) ; 124.4 (C₇) ; 65.4 (d, J_{C-P} = 110.5, C₅) ; 53.4 (d, J_{C-P} = 14.1 Hz, C₂) ; 49.9 (C₈) ; 30.5 (C₁₀) ; 24.7 (C₉) ; 22.9 (C₃) ; 22.2 (d, J_{C-P} = 92.5 Hz, C₄)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (202 MHz; D_2O) δ : 38.8

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for $C_{11}H_{20}FN_4O_7P$ [M+H]⁺: 351.1070. Found 351.1063.

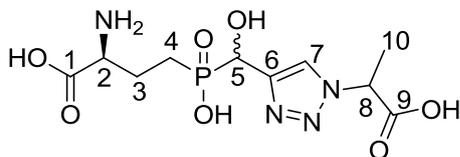
HPLC-MS (ESI) m/z ; ($\lambda=254$ nm): Rt = 2.82 min ; 351.11 [M+H]⁺ ; 349.09 [M-H]⁻

((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((1-(1-ethoxy-1-oxopropan-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid II-43

$C_{21}H_{29}N_4O_9P$
 $M=512.45$ g/mol
 White solid

The *general procedure B* was followed using **II-39** (238 mg, 1.21 mmol, 1 eq), "**P-H_{int}**" (381 mg, 1.21 mmol, 1 eq) and BSA (1.22 mL, 4.84 mmol, 4 eq) in DCM (25 mL) to afford crude compound **II-43** (456 mg, 0.89 mmol).

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; MeOD) δ : 46.5

(2S)-2-Amino-4-(((1-(1-carboxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid LSP16-1035

$C_{10}H_{17}N_4O_7P$
 M=336.24 g/mol
 White solid

The *general procedure C* was followed using compound **II-43** (456 mg, 0.89 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (40 mL). The crude compound (293 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford desired compound but not pure. An anion exchange resin chromatography was carried out (elution with boiled water and formic acid 4 M) to afford **LSP16-1035** (20 mg, 0.06 mmol, 7% yield over 2 steps).

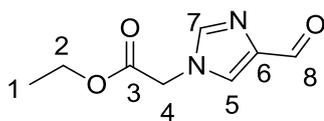
NMR 1H (500 MHz; D_2O) δ : 8.13 (s, 1H, H₇) ; 5.55 (q, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₈) ; 5.05 (d, $J_{H-P} = 9.4$ Hz, 1H, H₅) ; 4.08 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, H₂) ; 2.20 (m, 2H, H₃) ; 1.89 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H, H₁₀) ; 1.86 (m, 2H, H₄)

NMR ^{13}C (126 MHz; D_2O) δ : 173.7 (C₉) ; 172.1 (C₁) ; 144.9 (C₆) ; 123.7 (C₇) ; 65.7 (d, $J_{C-P} = 110.2$ Hz, C₅) ; 59.3 (C₈) ; 53.7 (d, $J_{C-P} = 13.6$ Hz, C₂) ; 46.1 (C₁₈) ; 23.1 (C₃) ; 22.46 and 22.37 (d, $J_{C-P} = 90.7$ Hz, C₄) ; 16.7 (C₁₀)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (202 MHz; D_2O) δ : 37.6

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for $C_{10}H_{18}FN_4O_7P$ $[M+H]^+$: 337.0913. Found 337.0900.

HPLC-MS (ESI) m/z ; ($\lambda=254$ nm): Rt = 2.79 min ; 337.09 $[M+H]^+$; 335.08 $[M-H]^-$

Ethyl 2-(4-formyl-1H-imidazol-1-yl)acetate II-44

$C_8H_{10}N_2O_3$
 M=182.18 g/mol
 Yellow oil

To a round-bottom flask containing NaH 60% w/w (166.5 mg, 4.16 mmol, 1 eq) and 4-imidazolecarboxaldehyde (400 mg, 4.16 mmol, 1 eq) was added dropwise THF (15 mL). A solution of ethyl bromoacetate (0.46 mL, 4.16 mmol, 1 eq) in THF (3 mL) was then added dropwise to the reaction mixture which was stirred at 25 °C for 12 h. Water (20 mL) was carefully added to destroy NaH and few drops of 1 M NaOH were added to reach pH 10. The compound was extracted with EtOAc (3x30 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and solvent was evaporated under vacuum. The crude compound was purified by chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH 9:1) to afford **II-44** (406 mg, 2.23 mmol, 54% yield).

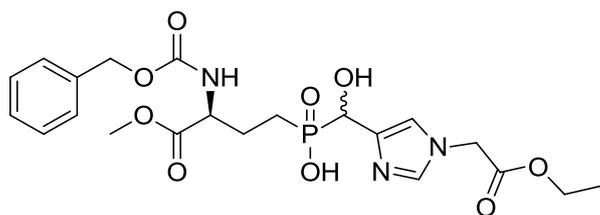
Rf = 0.40 (SiO_2 ; MeOH/EtOAc 1:9; UV)

NMR ^1H (500 MHz; MeOD) δ : 9.75 (s, 1H, H₈) ; 7.97 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H₅) ; 7.84 (s, 1H, H₇) ; 5.03 (s, 2H, H₄) ; 4.24 (q, J = 7.2 Hz, 2H, H₂) ; 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 3H, H₁)

NMR ^{13}C (126 MHz; MeOD) δ : 186.0 (C₈) ; 169.1 (C₃) ; 142.6 (C₆) ; 142.2 (C₇) ; 130.5 (C₅) ; 63.1 (C₂) ; 49.1 (C₄) ; 14.4 (C₁)

MS (ESI⁺) m/z : 183.1 [M+H]⁺

((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)((1-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1H-imidazol-4-yl)(hydroxy)methyl)phosphinic acid **II-45**

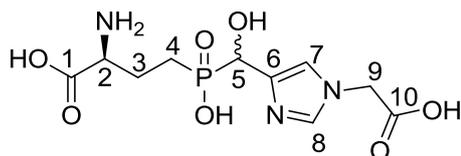


C₂₁H₂₈N₃O₉P
M=497.44 g/mol
White solid

The *general procedure B* was followed using compound **II-44** (350 mg, 1.92 mmol, 1.1 eq), “**P-H_{int}**” (540 mg, 1.71 mmol, 1 eq) and BSA (2 mL, 7.97 mmol, 4.7 eq) in DCM (25 mL) to afford crude compound **II-45** (480 mg, 0.96 mmol).

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (101 MHz; MeOD) δ : 45.2

(2S)-2-Amino-4-(((1-(carboxymethyl)-1H-imidazol-4-yl)(hydroxy)methyl)(hydroxy)phosphoryl)butanoic acid **LSP16-1045**



C₁₀H₁₆N₃O₇P
M=321.22 g/mol
White solid

The *general procedure C* was followed using compound **II-45** (480 mg, 0.96 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (40 mL). The crude compound (770 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford desired compound but not pure. An anion exchange resin chromatography was carried out (elution with boiled water and 1M acetic acid) to afford **LSP16-1045** (20 mg, 0.06 mmol, 3% yield on 2 steps)

NMR ^1H (500 MHz; D₂O) δ : 8.76 (s, J = 1.3 Hz, 1H, H₈) ; 7.46 (s, 1H, H₇) ; 5.01 (d, $J_{\text{H-P}}$ = 9.6 Hz, 1H, H₅) ; 4.93 (s, 2H, H₉) ; 3.90 (q, J = 6.5 Hz, 1H, H₂) ; 2.17 (m, 2H, H₃) ; 1.82 (m, 2H, H₄)

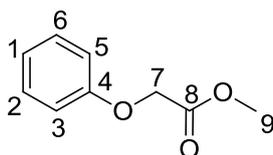
NMR ^{13}C (126 MHz; D₂O) δ : 173.5 (C₁) ; 172.0 (C₁₀) ; 135.6 (C₈) ; 131.5 (C₆) ; 120.1 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 5.0 Hz, C₇) ; 64.5 (dd, $J_{\text{C-P}}$ = 107.8 Hz, C₅) ; 54.7 (t, $J_{\text{C-P}}$ = 13.2 Hz, C₂) ; 51.6 (C₉) ; 23.5 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 7.9 Hz, C₃) ; 22.80 and 22.57 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 93.5 Hz, C₄)

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (202 MHz; D_2O) δ : 35.2

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 322.0804. Found 322.0797.

HPLC-MS (ESI) m/z ; ($\lambda=254$ nm): $R_t = 2.68$ min ; 322.08 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 320.07 $[\text{M}-\text{H}]^-$

Methyl 2-phenoxyacetate **II-47**



$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_3$
 $M=166.17$ g/mol
 Colorless oil

The *general procedure A* was followed using K_2CO_3 (2.94 g, 21.25 mmol, 2 eq), methylbromoacetate (1.51 mL, 15.9 mmol, 1.5 eq) and phenol (1 g, 10.6 mmol, 1 eq) in acetone (40 mL). The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (DCM/cyclohexane 1:1) to afford **II-47** (1.66 g, 10 mmol, 94% yield).

$R_f = 0.35$ (SiO_2 ; DCM/cyclohexane 3:2; UV)

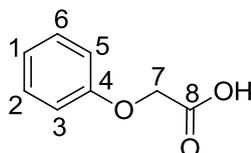
NMR ^1H (400 MHz; CDCl_3) δ : 7.31 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_2 and H_6) ; 7.01 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H_1) ; 6.92 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_3 and H_5) ; 4.65 (s, 2H, H_7) ; 3.82 (s, 3H, H_9)

NMR ^{13}C (100 MHz; CDCl_3) δ : 169.6 (C_8) ; 157.9 (C_4) ; 129.7 (C_2 and C_6) ; 121.9 (C_1) ; 114.8 (C_3 and C_5) ; 65.5 (C_7) ; 52.4 (C_9)

LC-MS (ESI⁺) m/z : $R_t = 1.75$ min ; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 189.97$

IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1760, 1199, 1177, 1090, 752

2-Phenoxyacetic acid **BC 288**



$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$
 $M=152.15$ g/mol
 White crystals

At 35 °C, KOH (1.09 g, 19.4 mmol, 2 eq) was added to a solution of methyl 2-phenoxyacetate **II-47** (1.61 g, 9.7 mmol, 1 eq) in MeOH (10 mL). After 1 h, the reaction was quenched by addition of water (10 mL). Unreacted ester, if any, was removed with Et_2O extraction (2 x 10 mL). The aqueous portion was acidified to pH = 1 with 5 M HCl and the acid compound was extracted with Et_2O (3x10 mL). The combined organic layers were washed with a saturated solution of NaCl, dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified by crystallization in ether/pentane to afford **BC 288** (1.41 g, 9.3 mmol, 96% yield).

NMR ^1H (400 MHz ; CDCl_3) δ : 7.32 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_2 and H_6) ; 7.03 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H_1) ; 6.94 (t, $J = 8.41$ Hz, 2H, H_3 and H_5) ; 4.71 (s, 2H, H_7)

NMR ^{13}C (100 MHz ; CDCl_3) δ : 173.6 (C_8) ; 157.5 (C_4) ; 129.9 (C_2 and C_6) ; 122.3 (C_1) ; 114.8 (C_3 and C_5) ; 65.0 (C_7)

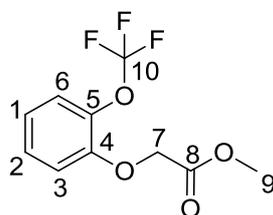
LC-MS (ESI $^-$) m/z : $R_t = 1.41$ min ; $[\text{M}-\text{H}]^- = 151.08$

IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 2971, 1696, 1224, 1093, 752, 685

m.p. : 99 °C

Elemental Analysis : Calculated for $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$: C; 63.15%, H; 5.30%. Found C; 63.12%, H; 5.24%

Methyl 2-(2-(trifluoromethoxy)phenoxy)acetate **II-48**



$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{F}_3\text{O}_4$
 $M=250.17$ g/mol
 Colorless oil

The *general procedure A* was followed using K_2CO_3 (1.55 g, 11.2 mmol, 2 eq), methylbromoacetate (0.80 mL, 8.42 mmol, 1.5 eq) and 2-(trifluoromethoxy)phenol (1 g, 5.6 mmol, 1 eq) in acetone (40 mL). The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (DCM/cyclohexane 1:1) to afford **II-48** (1.18 g, 4.7 mmol, 44% yield).

R $_f$ = 0.48 (SiO_2 ; DCM/cyclohexane 3:2; UV)

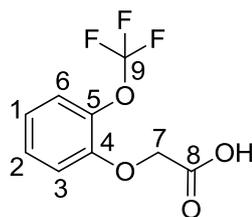
NMR ^1H (400 MHz; CDCl_3) δ : 7.28 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_6) ; 7.24 (td, $J = 7.8$ Hz and $J = 1.5$ Hz, 1H, H_2) ; 7.02 (td, $J = 7.9$ Hz and $J = 1.3$ Hz, 1H, H_1) ; 6.92 (dd, $J = 8.3$ Hz and $J = 1.3$ Hz, 1H, H_3) ; 4.71 (s, 2H, H_7) ; 3.81 (s, 3H, H_9)

NMR ^{13}C (100 MHz; CDCl_3) δ : 169.0 (C_8) ; 150.5 (C_5) ; 138.7 (C_4) ; 127.9 (CH_{Ar}) ; 123.3 (CH_{Ar}) ; 122.3 (CH_{Ar}) ; 120.8 (q, $J_{\text{C-F}} = 257.4$ Hz, C_{10}) ; 114.8 (CH_{Ar}) ; 63.3 (C_7) ; 52.4 (C_{19})

NMR ^{19}F (376 MHz; CDCl_3) δ : -58.2

LC-MS (ESI $^+$) m/z : $R_t = 2.05$ min ; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 251.08$

IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1756, 1252, 1208, 1160, 1120 1086, 749

2-(2-(Trifluoromethoxy)phenoxy)acetic acid BC 289

$C_9H_7F_3O_4$
 $M=236.14$ g/mol
 White crystals

At 35 °C, KOH (493 mg, 8.8 mmol, 2 eq) was added to a solution of **II-48** (1.1 g, 4.4 mmol, 1 eq) in MeOH (10 mL). After 1 h, the reaction was quenched by addition of water (10 mL). Unreacted ester, if any, was removed with Et₂O extraction (2 x 10 mL). The aqueous portion was acidified to pH = 1 with 5 M HCl and the acid compound was extracted with Et₂O (3x10 mL). The combined organic layers were washed with a saturated solution of NaCl, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified by crystallization in Et₂O/pentane to afford **BC 289** (932 mg, 3.95 mmol, 90% yield).

NMR ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ : 7.27 (m, 2H, H₂ and H₆) ; 7.05 (t, J = 8.0, 1H, H₁) ; 6.96 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H₃) ; 4.76 (s, 2H, H₇)

NMR ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ : 173.5 (C₈) ; 150.0 (C₅) ; 138.7 (C₄) ; 128.0 (CH_{Af}) ; 123.4 (CH_{Af}) ; 122.7 (CH_{Af}) ; 120.7 (q, J_{C-F} = 257.7 Hz, C₉) ; 114.9 (CH_{Af}) ; 65.8 (C₇)

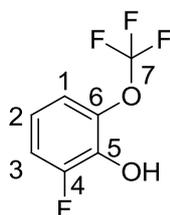
NMR ¹⁹F (376 MHz; CDCl₃) δ : -58.2

LC-MS (ESI) m/z : Rt = 1.81 min ; [M-H]⁻ = 234.86

IR ν_{max}/cm^{-1} : 2951, 1717, 1220, 1161, 1127, 757

m.p. : 109 °C

Elemental Analysis : Calculated for C₉H₇F₃O₄ : C; 45.78%, H; 2.99%. Found C; 46.04%, H; 3.02%

2-Fluoro-6-(trifluoromethoxy)phenol II-20

$C_7H_4F_4O_2$
 $M=196.10$ g/mol
 Colorless oil

Fluorodimethoxyborane diethyl ether was prepared by addition of BF₃.OEt₂ (21.1 mL, 166.6 mmol, 5 eq) on a solution of trimethyl borate (37.8 mL, 333 mmol, 10 eq) in Et₂O (34.5 mL, 10 eq). *N*-butyllithium (1.6 M in hexane, 22.9 mL, 36.7 mmol, 1.1 eq) was added dropwise at -78°C to a solution of 1-fluoro-3-(trifluoromethoxy)benzene **II-19** (6 g, 33.3 mmol, 1 eq) in THF (60 mL). The reaction mixture was stirred for 2 h at -78 °C, treated with freshly prepared

fluorodimethoxyborane diethyl ether (5 eq) and allowed to warm up to 25 °C. At 0 °C, oxone (22.53 g, 36.65 mmol, 1.1 eq) and a saturated solution of NaHCO₃ (50 mL) was added. The reaction mixture was stirred for 30 min at 0 °C, and allowed to reach 25 °C over 1 h. An aqueous solution of sodium thiosulfate (1 M, 150 mL) was added dropwise and the aqueous layer was extracted with Et₂O (3x100 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified by distillation under vacuum to afford **II-20** (4.35 g, 22.1 mmol, 67% yield).

Rf = 0.56 (SiO₂; cyclohexane/EtOAc 8:2; UV)

NMR ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ : 7.07 (m, 2H, H₁ and H₃) ; 6.88 (m, 1H, H₂) ; 5.64 (bs, 1H, OH)

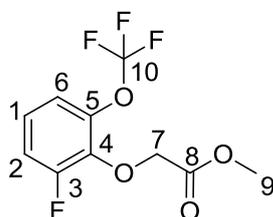
NMR ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ : 151.9 (d, J_{C-F} = 242.5 Hz, C₄) ; 137.8 (C₆) ; 137.5 (d, J_{C-F} = 15.8 Hz, C₅) ; 120.8 (q, J_{C-F} = 259.1 Hz, C₇) ; 119.6 (d, J_{C-F} = 8.2 Hz, C₂) ; 117.8 (C₁) ; 114.7 (d, J_{C-F} = 18.1 Hz, C₃)

NMR ¹⁹F (282 MHz; CDCl₃) δ : -59.4 (OCF₃) ; -136.3

HRMS (ESI) m/z : Calculated for C₇H₃F₄O₂ [M-H]⁻: 267.0445. Found 267.0440.

Eb : 57 °C under 17 mbar

Methyl 2-(2-fluoro-6-(trifluoromethoxy)phenoxy)acetate **II-49**



C₁₀H₄F₄O₄
M=268.16 g/mol
Colorless oil

The *general procedure A* was followed using K₂CO₃ (1.18 g, 8.52 mmol, 2 eq), methylbromoacetate (0.60 mL, 6.4 mmol, 1.5 eq) and compound **II-20** (0.84 g, 4.3 mmol, 1 eq) in acetone (40 mL). The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (DCM/cyclohexane 1:1) to afford **II-49** (855 mg, 3.2 mmol, 75% yield).

Rf = 0.30 (SiO₂; DCM/cyclohexane 3:7; UV)

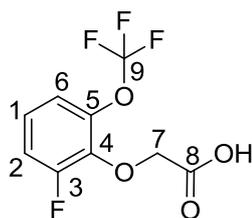
NMR ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ : 7.07 (m, 3H, H_{Ar}) ; 4.75 (s, 2H, H₇) ; 3.81 (s, 3H, H₉)

NMR ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ : 168.8 (C₈) ; 155.6 (d, J_{C-F} = 249.0 Hz, C₃) ; 142.2 (C₅) ; 139.2 (d, J_{C-F} = 12.6 Hz, C₄) ; 123.4 (d, J_{C-F} = 8.8 Hz, C₁) ; 120.6 (q, J_{C-F} = 257.8 Hz, C₁₀) ; 118.2 (C₆) ; 115.7 (d, J_{C-F} = 19.4 Hz, C₂) ; 70.0 (d, J_{C-F} = 5.2 Hz, C₇) ; 52.3 (C₉)

NMR ¹⁹F (376 MHz; CDCl₃) δ : -58.1 (OCF₃) ; -127.3

LC-MS (ESI⁺) m/z : Rt = 2.06 min ; [M+H]⁺ = 269.04

IR ν_{max}/cm⁻¹ : 1768, 1249, 1200, 1166, 1075, 878, 742

2-(2-Fluoro-6-(trifluoromethoxy)phenoxy)acetic acid BC 292

$C_9H_6F_4O_4$
 $M=254.14$ g/mol
 White crystals

At 35 °C, KOH (320 mg, 5.7 mmol, 2 eq) was added to a solution of **II-49** (763 mg, 2.9 mmol, 1 eq) in MeOH (10 mL). After 1 h, the reaction was quenched by addition of water (10 mL). Unreacted ester, if any, was removed with Et₂O extraction (2 x 10 mL). The aqueous portion was acidified to pH = 1 with 5 M HCl and the acid compound was extracted with Et₂O (3x10 mL). The combined organic layers were washed with a saturated solution of NaCl, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified by crystallization in Et₂O/pentane to afford **BC 292** (620 mg, 2.44 mmol, 86% yield).

NMR ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ : 7.10 (m, 3H, H_{Ar}) ; 4.80 (s, 2H, H₇)

NMR ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ : 173.1 (C₈) ; 155.5 (d, J_{C-F} = 248.3 Hz, C₃) ; 142.1 (C₅) ; 138.9 (d, J_{C-F} = 13.0 Hz, C₄) ; 124.0 (d, J_{C-F} = 9.3 Hz, C₁) ; 120.6 (q, J_{C-F} = 258.4 Hz, C₉) ; 118.2 (C₆) ; 115.7 (d, J_{C-F} = 19.3 Hz, C₂) ; 69.5 (d, J_{C-F} = 4.9 Hz, C₇)

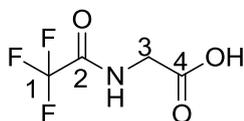
NMR ¹⁹F (376 MHz; CDCl₃) δ : -58.1 (OCF₃) ; -127.3

LC-MS (ESI) m/z : Rt = 1.80 min ; [M-H]⁻ = 253.27

m.p. : 54 °C

IR ν_{max}/cm^{-1} : 2962, 1743, 1254, 1203, 1152, 1071, 1050, 871, 744

Elemental Analysis : Calculated for C₉H₆F₄O₄ : C; 42.53%, H; 2.38%. Found C; 42.30%, H; 2.45%

2-(2,2,2-Trifluoroacetamido)acetic acid II-51

$C_4H_4F_3NO_3$
 $M=171.07$ g/mol
 White powder

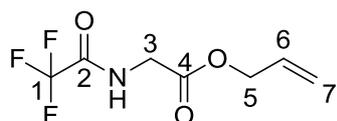
To a stirring solution of glycine **II-50** (9 g, 0.12 mol, 1 eq) in THF (225 mL) was added dropwise TFAA (29.6 mL, 0.21 mmol, 1.75 eq) at 0°C over 30 min. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 1 h then concentrated under vacuum. The residue was recrystallized in mixture of chloroform and petroleum ether (180 mL, 1:1) for 15 min, and then cooled to 25 °C to afford **II-51** (9.9 g, 58 mmol, 44% yield).

NMR ^1H (300 MHz; DMSO) δ : 12.93 (s, 1H, OH) ; 9.79 (bs, 1H, NH) ; 3.88 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, H₃)

NMR ^{13}C (75 MHz; CDCl₃) δ : 169.5 (C₄) ; 156.7 (q, $J_{\text{C-F}} = 36.4$ Hz, C₁) ; 115.8 (q, $J_{\text{C-F}} = 289.4$ Hz, C₁) ; 41.5 (C₃)

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for C₄H₃F₃NO₃ [M-H]⁺ : 170.0071. Found 170.0085

Allyl 2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetate **II-52**



C₇H₈F₃NO₃
M=211.14 g/mol
White powder

To a stirring solution of **II-51** (9.9 g, 57.7 mmol, 1 eq) in allylic alcohol (87 mL) was added at 0 °C thionyl chloride (3 g, 86.6 mmol, 1.5 eq). The reaction mixture was stirred at 25 °C for 12 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum then the residue was diluted in EtOAc and washed with a saturated solution of NaHCO₃ and a saturated solution of NaCl. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1) to afford **II-52** (10.4 g, 49 mmol, 85% yield).

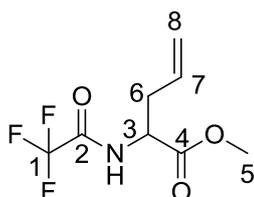
R_f = 0.30 (SiO₂; cyclohexane/EtOAc 8:2; KMnO₄)

NMR ^1H (300 MHz; CDCl₃) δ : 7.06 (bs, 1H, NH) ; 5.91 (m, 1H, H₆) ; 5.35 (dd, $J = 17.3$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H, H₇) ; 5.30 (dd, $J = 10.4$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H, H₇) ; 4.69 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, H₅) ; 4.15 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H, H₃)

NMR ^{13}C (75 MHz; CDCl₃) δ : 168.1 (C₄) ; 157.4 (q, $J_{\text{C-F}} = 37.1$ Hz, C₂) ; 131.1 (C₆) ; 119.7 (C₇) ; 115.7 (q, $J_{\text{C-F}} = 286.3$ Hz, C₁) ; 66.8 (C₅) ; 41.4 (C₃)

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for C₇H₈F₃NO₃Na [M+Na]⁺ : 234.0354. Found 234.0350.

Methyl 2-(2,2,2-trifluoroacetamido)pent-4-enoate **II-53**



C₈H₁₀F₃NO₃
M=225.17 g/mol
Yellow oil

A LiHMDS solution was prepared by adding *n*-BuLi (1.6 M in hexane, 103 mL, 164 mmol, 5.5 eq) at -78 °C to HMDS (236.8 mL, 173 mmol, 5.8 eq) in THF (100 mL) and stirred for 10 min at -78 °C then 30 min at 25 °C. To a solution of **II-52** (6.3 g, 29.8 mmol, 1 eq), ZnCl₂ (5.1g,

37.3 mmol, 1.25 eq) and quinine (24.2 g, 74.6 mmol) in THF (200 mL) was added dropwise at -78 °C the freshly prepared LiHMDS solution. The reaction mixture was allowed to warm up to 25 °C within 12 h. After addition of Et₂O (300 mL), the reaction mixture was hydrolyzed by addition of 1 M aqueous KHSO₄ solution (250 mL). The organic layer was dried with Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The residue was diluted in a mixture of toluene/MeOH (390 mL, 2:1) and treated directly with trimethylsilyldiazomethane in ether solution (2M, 22.5 mL, 45 mmol). The reaction mixture was stirred for 12 h. After evaporation of the solvent, the oily residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 9:1) to afford **II-53** (4.15 g, 18.4 mmol, 62% yield).

Rf = 0.40 (SiO₂; cyclohexane/EtOAc 8:2; KMnO₄)

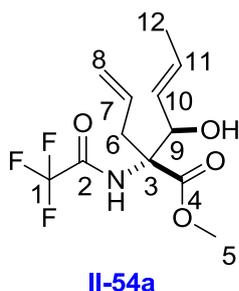
NMR ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ : 6.99 (bs, 1H, NH) ; 5.64 (m, 1H, H₇) ; 5.15 (m, 2H, H₈) ; 4.68 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₃) ; 3.79 (s, 2H, H₅) ; 2.62 (m, 2H, H₆)

NMR ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ : 170.7 (C₄) ; 156.8 (q, *J*_{C-F} = 37.8 Hz, C₂) ; 131.0 (C₇) ; 120.3 (C₈) ; 115.7 (q, *J*_{C-F} = 288.0 Hz, C₁) ; 53.0 (3) ; 52.1 (C₅) ; 36.0 (C₆)

HRMS (ESI⁺) *m/z* : Calculated for C₈H₁₀F₃NO₃Na [M+Na]⁺: 248.0510. Found 248.0505

(2R, 3R, E)-Methyl 2-allyl-3-hydroxy-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)hex-4-enoate and (2R, 3S, E)-methyl 2-allyl-3-hydroxy-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)hex-4-enoate **II-54a & **II-54b****

A LiHMDS solution was prepared by adding *n*-BuLi (1.6 M in hexane, 0.7 mL, 1.05 mmol, 2.5 eq) at -78 °C to HMDS (0.25 mL, 1.2 mmol, 1.2 eq) in THF (1.5 mL) and stirred 10 min at -78 °C then 30 min at 25 °C. To a solution of compound **II-53** (95 mg, 0.42 mmol, 1 eq) and anhydrous ZnCl₂ (144 mg, 1.055 mmol) in THF (2 mL) was added at -78 °C the freshly prepared LiHMDS solution using transfer canula. The mixture was stirred at -78 °C for 1 h and freshly distilled crotonaldehyde (100 μL, 1.2 mmol, 1.2 eq) in THF (1 mL) was added slowly to the reaction mixture. After stirring for 12 h, the mixture was diluted in EtOAc (20 mL) and a solution of 1 M KHSO₄ (10 mL) was added to hydrolyze the enolate. After decantation the aqueous phase was extracted with EtOAc (3x30 mL). The combined organic phases were washed with a saturated solution of NaCl, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum to afford a crude containing **II-54a** and **II-54b**, in a relative ratio 3/2, determined by ¹H NMR. The diastereomers were separated by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 0.5:10) to afford **II-54a** (46 mg, 0.16 mmol, 37% yield) and **II-54b** (31 mg, 0.1 mmol, 25% yield).

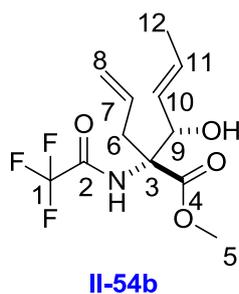


$C_{12}H_{16}F_3NO_4$
 $M=295.25$ g/mol
 Colorless oil

R_f = 0.59 (SiO₂; cyclohexane/EtOAc 6:4; KMnO₄)

NMR ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ : 7.59 (s, NH) ; 5.77 (m, 1H, H₁₁) ; 5.51 (m, 1H, H₇) ; 5.33 (dd, $J = 15.2$ Hz, $J = 6.1$ Hz, 1H, H₁₀) ; 5.14 (m, 2H, H₈) ; 4.59 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, H₉) ; 4.00 (d, $J = 9.4$ Hz, OH) ; 3.85 (s, 3H, H₅) ; 3.11 (dd, $J = 14.5$ Hz, $J = 7.9$ Hz, 1H, H₆) ; 2.70 (dd, $J = 14.5$ Hz, $J = 6.9$ Hz, 1H, H₆) ; 1.69 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H₁₂)

NMR ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ : 171.4 (C₄) ; 157.5 (q, $J_{C-F} = 36.9$ Hz, C₂) ; 130.7 (C₁₀) ; 130.2 (C₇) ; 127.6 (C₁₁) ; 120.8 (C₈) ; 115.8 (q, $J_{C-F} = 288$ Hz, C₁) ; 75.5 (C₉) ; 70.0 (C₈) ; 53.8 (C₅) ; 36.0 (C₆) ; 17.8 (C₁₂)



$C_{12}H_{16}F_3NO_4$
 $M=295.25$ g/mol
 Colorless oil

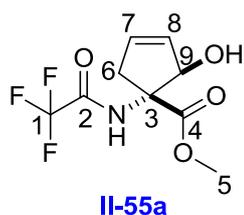
R_f = 0.53 (SiO₂; cyclohexane/EtOAc 6:4; KMnO₄)

NMR ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ : 7.04 (s, NH) ; 5.82 (m, 1H, H₁₁) ; 5.58 (m, 1H, H₇) ; 5.39 (dd, $J = 15.2$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₁₀) ; 5.21 (m, 2H, H₈) ; 4.55 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H₉) ; 3.85 (s, 3H, H₅) ; 3.07 (d, $J = 8.9$ Hz, OH) ; 3.00 (dd, $J = 14.1$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H, H₆) ; 2.86 (dd, $J = 14.1$ Hz, $J = 6.1$ Hz, 1H, H₆) ; 1.74 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H₁₂)

NMR ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ : 170.8 (C₄) ; 156.9 (q, $J_{C-F} = 38.4$ Hz, C₂) ; 131.7 (C₁₀) ; 131.1 (C₇) ; 127.3 (C₁₁) ; 121.1 (C₈) ; 115.0 (q, $J_{C-F} = 291$ Hz, C₁) ; 75.6 (C₉) ; 78.4 (C₃) ; 53.6 (C₅) ; 36.5 (C₆) ; 18.0 (C₁₂)

(1*R*, 2*R*)-Methyl 2-hydroxy-1-(2,2,2-trifluoroacetamido)cyclopent-3-enecarboxylate and (1*R*, 2*S*)-methyl 2-hydroxy-1-(2,2,2-trifluoroacetamido)cyclopent-3-enecarboxylate **II-55a & **II-55b****

To a stirring solution of 3:2 mixture of diastereomers **II-54a** and **II-54b** (4.21 g, 14.26 mmol, 1 eq) in DCM (100 mL) was added Grubbs 2nd catalyst (360 mg, 0.43 mmol, 0.03 eq). The mixture was stirred at 25 °C for 12 h. The solvent was evaporated under vacuum and the diastereomers were separated by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 1:4) to afford **II-55a** (2.22 g, 8.77 mmol, 62% yield) and **II-55b** (0.86 g, 3.38 mmol, 24% yield).

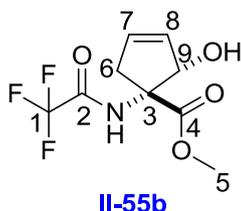


$C_9H_{10}F_3NO_4$
M=295.25 g/mol
Grey solid

R_f = 0.24 (SiO₂; cyclohexane/EtOAc 6:4; KMnO₄)

NMR ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ : 7.34 (s, 1H, NH) ; 6.01 (m, 1H, H₇) ; 5.72 (m, 1H, H₈) ; 4.95 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H₉) ; 3.83 (s, 3H, H₅) ; 2.80 (dd, *J* = 17.8 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₆) ; 3.37 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H, H₆) ; 2.94 (d, *J* = 6.6 Hz, OH)

NMR ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ : 170.7 (C₄) ; 156.9 (q, *J*_{C-F} = 37.1 Hz, C₂) ; 133.3 (C₇) ; 130.6 (C₈) ; 115.6 (q, *J*_{C-F} = 289.1 Hz, C₁) ; 84.6 (C₉) ; 70.4 (C₃) ; 53.4 (C₅) ; 41.5 (C₆)

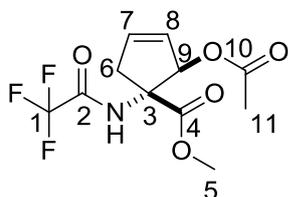


$C_9H_{10}F_3NO_4$
M=295.25 g/mol
Grey solid

R_f = 0.35 (SiO₂; cyclohexane/EtOAc 6:4; KMnO₄)

NMR ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ : 7.81 (s, 1H, NH) ; 6.02 (m, 1H, H₇) ; 5.79 (m, 1H, H₈) ; 5.16 (bs, 1H, H₉) ; 3.78 (s, 3H, H₅) ; 3.22 (dd, *J* = 17.5 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₆) ; 2.86 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H, H₆) ; 2.47 (bs, OH)

NMR ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ : 170.7 (C₄) ; 156.9 (q, *J*_{C-F} = 37.1 Hz, C₂) ; 133.3 (C₇) ; 130.6 (C₈) ; 115.6 (q, *J*_{C-F} = 289.1 Hz, C₁) ; 84.6 (C₉) ; 70.4 (C₃) ; 53.4 (C₅) ; 41.5 (C₆)

(1*R*, 2*R*)-Methyl 2-acetoxy-1-(2,2,2-trifluoroacetamido)cyclopent-3-enecarboxylate**II-60**

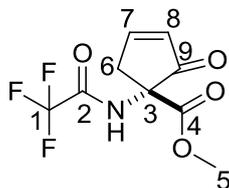
C₁₁H₁₂F₃NO₅
 M=295.25 g/mol
 White solid

To a stirring solution of compound **II-55a** (200 mg, 0.79 mmol, 1 eq) and DMAP (106.2 mg, 0.87 mmol, 1.1 eq) in DCM (5 mL) was added Ac₂O (0.08 mL, 0.79 mmol, 1 eq). The mixture was stirred at 25 °C for 12 h. The mixture was diluted in DCM (10 mL) and washed with a saturated solution of CuSO₄ (2 x 10 mL), a saturated solution of NaHCO₃ and saturated solution of NaCl. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered evaporated under vacuum. The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/ cyclohexane 1:4) to afford **II-60** (201 mg, 0.68 mmol, 86% yield).

Rf = 0.57 (SiO₂; cyclohexane/EtOAc 6:4; KMnO₄)

NMR ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ : 8.04 (s, 1H, NH) ; 6.11 (m, 1H, H₇) ; 6.05 (m, 1H, H₉) ; 5.64 (m, 1H, H₈) ; 3.75 (s, 3H, H₅) ; 3.49 (dd, *J* = 17.3 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₆) ; 2.78 (dd, *J* = 17.4 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₆) ; 2.06 (s, 3H, H₁₁)

NMR ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ : 171.9 (C₄) ; 169.4 (C₁₀) ; 157.6 (q, *J*_{C-F} = 38.1 Hz, C₂) ; 135.2 (C₇) ; 126.1 (C₈) ; 115.6 (q, *J*_{C-F} = 286.3 Hz, C₁) ; 85.6 (C₉) ; 69.9 (C₃) ; 53.3 (C₅) ; 42.0 (C₆) ; 20.7 (C₁₁)

(*R*)-Methyl 2-oxo-1-(2,2,2-trifluoroacetamido)cyclopent-3-enecarboxylate II-67

C₉H₈F₃NO₄
 M=251.16 g/mol
 Grey solid

To a solution of compound **II-55a** (269 mg, 1.07 mmol, 1 eq) in DCM (10 mL) was added MnO₂ (1.85 g, 21.25 mmol, 20 eq) and the mixture was stirred at 25 °C for 12 h. MnO₂ (1.85 g, 21.25 mmol, 20 eq) was then added and the reaction mixture was maintained 3 h. The mixture was filtered over Celite to remove MnO₂. The crude residue was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 6:4) to afford **II-67** (245 mg, 0.98 mmol, 92% yield).

Rf = 0.38 (SiO₂; cyclohexane/EtOAc 6:4; KMnO₄)

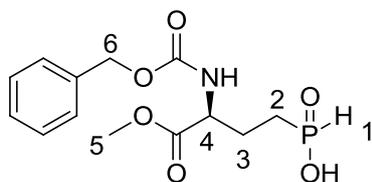
NMR ^1H (250 MHz; CDCl_3) δ : 7.87 (m, H_7) ; 7.56 (s, NH) ; 6.37 (m, 1H, H_8) ; 3.79 (s, 3H, H_5) ; 3.37 (ddd, $J = 19.0$ Hz, $J = 2.6$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_6) ; 3.09 (dd, $J = 18.9$ Hz, $J = 2.6$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_6)

NMR ^{13}C (75 MHz; CDCl_3) δ : 198.3 (C_9) ; 167.4 (C_4) ; 163.3 (C_7) ; 156.5 (q, $J_{\text{C-F}} = 38.0$ Hz, C_2) ; 131.3 (C_8) ; 115.3 (q, $J_{\text{C-F}} = 287.7$ Hz, C_1) ; 65.2 (C_3) ; 54.2 (C_5) ; 39.9 (C_6)

Experimental Part

Chapter III : Determination of stereogenic carbinol configuration

[((S)-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)phosphinic acid] “P-Hint”



$C_{13}H_{18}NO_6P$
 $M=315.26$ g/mol
 White solid

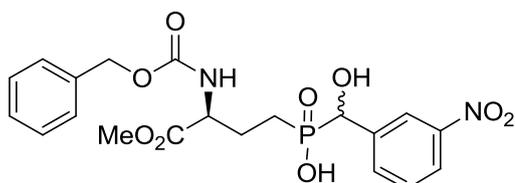
A mixture of hypophosphorous acid (1.44 g, 21.8 mmol, 10.9 eq), *N*-benzyloxycarbonyl-L- α -vinylglycine methyl ester (507 mg, 2 mmol, 1 eq) and AIBN (8 mg, 0.05 mmol, 0.025 eq) in MeOH (20 mL) was refluxed at 80 °C for 5 h. The MeOH was evaporated under vacuum and the residue was treated with water (20 mL) and extracted with EtOAc (3x30 mL). The organic layers were washed with water (3x10 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum to afford “P-H_{int}” (610 mg, 1.9 mmol, 95% yield).

NMR 1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ : 7,33 (m, 5H, H_{Ar}) ; 7.12 (d, $J_{H-P} = 555.0$ Hz, 1H, H_1) ; 4.41 (m, 1H, H_4) ; 5.09 (s, 2H, H_6) ; 3.74 (s, 3H, H_5) ; 1.92 (m, 4H, H_1 and H_2)

NMR ^{31}P (202 MHz; $CDCl_3$) δ : 36.9 (d, $J_{P-H} = 551$ Hz)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (202 MHz; $CDCl_3$) δ : 36,9

((S)-3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-methoxy-4-oxobutyl)(hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphinic acid



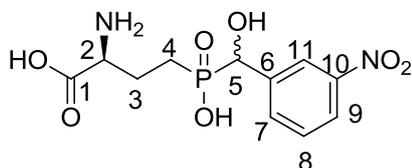
$C_{20}H_{23}N_2O_9P$
 $M=466.38$ g/mol
 Yellowish solid

The *general procedure B* was followed using 3-nitrobenzaldehyde (453 mg, 3.0 mmol, 2.7 eq), “P-H_{int}” (352 mg, 1.1 mmol, 1 eq) and BSA (1.45 mL, 6 mmol, 5.5 eq) in DCM (12 mL) to afford crude residue (511 mg, 1.1 mmol) and used without further purification.

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; MeOD) δ : 48.4

SM (ESI⁻) m/z : 465.1 [$M-H$]⁻

(2S)-2-Amino-4-(hydroxy(hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphoryl)butanoic acid
LSP1-2093



$C_{11}H_{15}N_2O_7P$
 $M=318.22\text{g/mol}$
 White solid

The *general procedure C* was followed using phosphinic acid previously described (511 mg, 1.1 mmol, 1 eq) and 6 M HCl (50 mL). The crude compound (652 mg) was purified by cation exchange resin chromatography. The compound was eluted with water to afford **LSP1-2093** (60 mg, 0.19 mmol, 6% yield on 2 steps).

NMR ^1H (500 MHz; D_2O) δ : 8.27 (s, 1H, H_{11}) ; 8.17 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_9) ; 7.80 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_7) ; 7.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_8) ; 4.98 (d, $J_{\text{H-P}} = 9.5$ Hz, 1H, H_5) ; 4.03 (m, 1H, H_2) ; 2.10 (m, 2H, H_3) ; 1.70 (m, 2H, H_4)

NMR ^{13}C (126 MHz; D_2O) δ : 173.5 (C_1) ; 149.3 (C_{10}) ; 141.6 (C_6) ; 134.9 (C_7) ; 130.9 (C_8) ; 124.2 (C_9) ; 123.0 (C_{11}) ; 73.6 (d, $J_{\text{C-P}} = 107$ Hz, C_5) ; 55.1 (d, $J_{\text{C-P}} = 13.9$ Hz, C_1) ; 24.7 (C_3) ; 23.8 (d, $J_{\text{C-P}} = 90.0$ Hz, C_4)

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (101 MHz; D_2O) δ : 49.7

MS (ESI $^-$) m/z : 317.2 [M-H] $^-$

The diastereomers of **LSP1-2093** were separated by HPLC with the preparative Crownpack column with a $2.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ flow, a 2 mL injection loop, and a dual UV detection at 210 and 254 nm, at 25 °C. 3 injections were performed; each injection prepared at pH 2 with 9.0 mg of **LSP1-2093** in 1.8 mL of diluted solution of HCl. The diastereomer with the shortest retention time was named **I** and the other one **II**. 12 mg of pure **LSP1-2093 dia I** and 12 mg of pure **LSP1-2093 dia II** were obtained.

LSP1-2093 dia I

^1H NMR (500 MHz; D_2O) δ : 8.22 (s, 1H, H_{11}) ; 8.14 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H H_9) ; 7.76 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_7) ; 7.56 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_8) ; 5.04 (d, $J_{\text{H-P}} = 9.5$ Hz, 1H, H_5) ; 4.07 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H_2) ; 2.11 (m, 2H, H_3) ; 1.83 (m, 2H, H_4)

MS (ESI $^-$) m/z : 317.1 [M-H] $^-$

HPLC-MS: $R_t = 8.14$ min

HPLC (Crownpak): $R_t = 16.7$ min ($T = 21$ °C, detection $\lambda = 210 / 254$ nm)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 2.0$ ($c = 0.6$, H_2O)

LSP1-2093 dia II

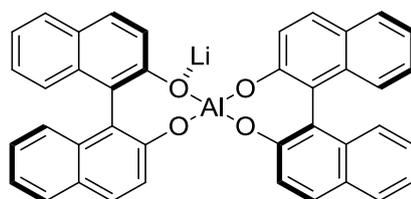
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz; D_2O) δ : 8.22 (s, 1H, H_{11}) ; 8.14 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, H_9) ; 7.75 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, H_7) ; 7.56 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_8) ; 5.06 (d, $J_{\text{H-P}} = 8.5$ Hz, 1H, H_5) ; 4.06 (bs, 1H, H_2) ; 2.12 (dd, $J_{\text{H-P}} = 23.3$ Hz, $J = 10.0$ Hz, 2H, H_3) ; 1.94 (d, $J_{\text{H-P}} = 11.7$ Hz; 1H, H_4) ; 1.78 (d, $J_{\text{H-P}} = 12.0$ Hz; 1H, H_4)

MS (ESI) m/z : 317.1 $[\text{M-H}]^-$

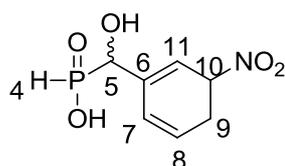
HPLC-MS: $R_t = 8.10$ min

HPLC (Crownpak): $R_t = 21.4$ min ($T = 21$ °C, detection $\lambda = 210 / 254$ nm)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 29.0$ ($c = 0.6$, H_2O)

(R)-ALB (0.1 M in THF solution)

To a solution of aluminium hydride (LiAlH_4 , 3 eq) in THF was added a solution of (R)-BINOL (2 eq) in THF. After stirring for 12 h, the solution of (R)-ALB (0.1 M in THF solution) was ready to use.

((±)-Hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)phosphinic acid III-4

$\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$
 $M = 217.12$ g/mol
 Orange oil

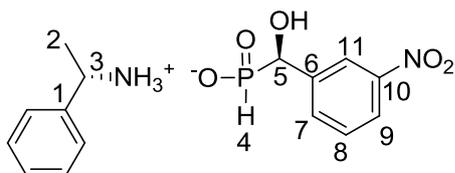
To a stirring solution of 4-nitrobenzaldehyde (2 g, 13.2 mmol, 1 eq) and hypophosphorous acid (50% in water, 4.4 g, 66.2 mmol, 5 eq) in THF (30 mL) was added dropwise at 0 °C BSA (13 mL, 53 mmol, 4 eq). The mixture was allowed to warm up to 25 °C within 12 h. At 0 °C, 1 M HCl (10 mL) was added to quench the reaction. The compound was extracted with EtOAc (3x30 mL) and combined organic layers were washed with 1 M HCl and a saturated solution of NaCl, dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum to afford III-4 (1.56 g, 7.2 mmol, 54% yield).

NMR ^1H (500 MHz; MeOD) δ : 8.35 (s, 1H, H₁₁) ; 8.19 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H₉) ; 7.84 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H₇) ; 7.62 (t, J = 8.1 Hz, 1H, H₈) ; 6.9 (d, $J_{\text{H-P}}$ = 555 Hz, 1H, H₄) ; 5.06 (d, $J_{\text{H-P}}$ = 9.0 Hz, 1H, H₅)

NMR ^{31}P (202 MHz; MeOD) δ : 29.6 (d, $J_{\text{P-H}}$ = 555 Hz)

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (202 MHz; MeOD) δ : 29.6

(S)-1-Phenylethanaminium-(R)-(hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate **III-6a**



$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$
 $M=338.30$ g/mol
 White crystals

The (\pm)-phosphinic acid **III-4** (1.05 g, 4.84 mmol, 1 eq) and (*S*)-methylbenzylamine (586 mg, 4.84 mmol, 1 eq) were stirred in MeOH (10 ml) for 12 h. The solvent was evaporated and the product crystallized in a mixture of MeOH/acetonitrile (10 mL, 1/1) to afford **III-6a** (461 mg, 1.36 mmol, 28% yield).

NMR ^1H (250 MHz; MeOD) δ : 8.30 (s, 1H, H₁₁) ; 8.10 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H₉) ; 7.82 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₇) ; 7.55 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H₈) ; 7.44 (m, 5H, H_{Ar}) ; 6.85 (d, $J_{\text{H-P}}$ = 508 Hz, H₄) ; 4.73 (d, $J_{\text{H-P}}$ = 9.7 Hz, 1H, H₅) ; 4.40 (q, J = 6.9 Hz, 1H, H₃) ; 1.63 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H₂)

NMR ^{13}C (126 MHz; MeOD) δ : 149.6 (C₁₀) ; 143.2 (C₆) ; 140.1 (C₁) ; 134.3 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 4.5 Hz, C₇) ; 130.0 (C₈) ; 130.3 and 127.7 (CH_{Ar}) ; 122.8 (C₉) ; 122.7 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 5.3 Hz, C₁₁) ; 74.9 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 100 Hz, C₅) ; 52.3 (C₃) ; 21.0 (C₂)

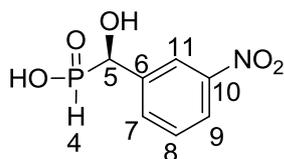
NMR ^{31}P (101 MHz; MeOD) δ : 18.8 (d, $J_{\text{P-H}}$ = 508 Hz)

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (101 MHz; MeOD) δ : 18.8

Mp : 187 °C

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 339.1110. Found 339.1112.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ - 3.0 (c = 2.0, MeOH)

((R)-Hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphinic acid III-4a

$C_7H_8NO_5P$
 $M=217.12$ g/mol
 Orange solid

III-6a (461 mg, 1.36 mmol, 1 eq) was treated with a cation exchange resin (Dowex AG50W4, 50-100mesh, H^+ form, 1g) in MeOH (20 mL) for 12 h. Resin was removed by filtration and the solvent was evaporated under vacuum to afford **III-4a** (289 mg, 1.33 mmol, 98% yield).

NMR 1H (250 MHz; MeOD) δ : 8.33 (s, 1H, H_{11}) ; 8.17 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_9) ; 7.84 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_7) ; 7.61 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_8) ; 6.90 (d, $J_{H-P} = 554$ Hz, H_4) ; 5.05 (d, $J_{H-P} = 8.1$ Hz, 1H, H_5)

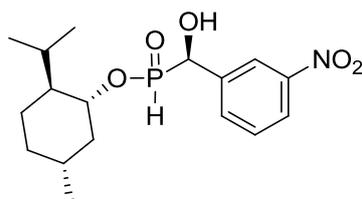
NMR ^{13}C (126 MHz; MeOD) δ : 149.5 (C_{10}) ; 140.2 (C_6) ; 134.3 (d, $J_{C-P} = 3.8$ Hz, C_7) ; 130.4 (C_9) ; 130.0 (C_8) ; 122.7 (d, $J_{C-P} = 4.6$ Hz, C_{11}) ; 72.2 (d, $J_{C-P} = 110$ Hz, C_5)

NMR ^{31}P (101 MHz; MeOD) δ : 29.3 (d, $J_{P-H} = 555$ Hz)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz ; MeOD) δ : 29.3

MS (ESI $^-$) m/z : 216.0 [$M-H$] $^-$

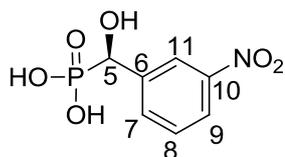
$[\alpha]_D^{20}$: + 27.1 (c = 2.0, MeOH)

(1R, 2S, 5R)-2-Isopropyl-5-methylcyclohexyl ((R)-hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate III-7a & III-7a'

$C_{17}H_{26}NO_5P$
 $M=355.36$ g/mol
 Orange oil

To a stirring solution of **III-4a** (235 mg, 1.08 mmol, 1 eq) in THF (10 mL) were added PPh_3 polymer bound (200-400 mesh, 3 mmol triphenylphosphine/g resin, 718 mg, 2.16 mmol, 2 eq) and (-)-menthol (676 mg, 4.33 mmol, 4 eq). The mixture was cooled at 0 °C and diisopropylazodicarboxylate (425 μ l, 2.16 mmol, 2 eq) was added. The mixture was then stirred at reflux for 2 h. The mixture was diluted in EtOAc and filtrated on Celite. The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc) to afford majoratory **III-7a** and **III-7a'** (62 mg, 0.174 mmol, 21% yield).

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; MeOD) δ : 34.85 and 28.41 (20%), 33.18 and 30.36 (80%)

(R)-(Hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphonic acid III-8a

$C_7H_8NO_6P$
 $M=233.12$ g/mol
 Orange oil

A solution of (*R*) phosphinic acid **III-4a** (30 mg, 0.14 mmol, 1eq), DMSO (27 μ L, 0.14 mmol, 1 eq) and iodine (0.4 mg, 0.0014 mmol, 0.01 eq) in THF (2ml) was heated at 60 °C for 5 h. After cooling to 25 °C, the mixture was evaporated to dryness and the residue was washed with DCM (5x20 mL). The insoluble material was dissolved in MeOH and evaporated under vacuum to afford **III-8a** (30 mg, 0.13 mmol, 93% yield).

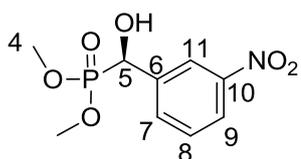
NMR 1H (250 MHz; MeOD) δ : 8.41 (s, 1H, H₁₁) ; 8.15 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H₉) ; 7.89 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H₇) ; 7.58 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H₈) ; 5.05 (d, J_{H-P} = 14.3 Hz, 1H, H₅)

NMR ^{13}C (126 MHz; MeOD) δ : 149.5 (C₁₀) ; 142.9 (C₆) ; 134.6 (d, J_{C-P} = 4.6 Hz, C₇) ; 130.1 (C₈) ; 123.3 (C₉) ; 123.1 (d, J_{C-P} = 4.5 Hz, C₁₁) ; 71.3 (d, J_{C-P} = 161 Hz, C₅)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (202 MHz; MeOD) δ : 18.7

SM (ESI) m/z : 232.2 [M-H]⁻

$[\alpha]_D^{20}$: + 19.7 (c = 1.0, MeOH)

(R)-Dimethyl (hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphonate III-9a

$C_9H_{12}NO_6P$
 $M=261.17$ g/mol
 Orange oil

To a solution of (*R*)-phosphonic acid **III-8a** (30 mg, 0.13 mmol, 1 eq) in a mixture of solvent DCM/MeOH (1 mL: 37 μ l, 0.90 mmol, 7 eq) was added dropwise at 25 °C diazomethane (1 M in Toluene, 320 μ l, 0.65 mmol, 5 eq). After stirring for 1 h, the solvent was evaporated under vacuum and the crude residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM/ AcOEt 2:8) to afford **III-9a** (4 mg, 0.015 mmol, 12% yield).

NMR 1H (250 MHz; MeOD) δ : 8.38 (s, 1H, H₁₁) ; 8.18 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H₉) ; 7.88 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H₇) ; 7.62 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H₈) ; 5.27 (d, J_{H-P} = 13.7 Hz, 1H, H₅) ; 3.78 and 3.76 (d, J_{H-P} = 10.5 Hz, 6H, H₄)

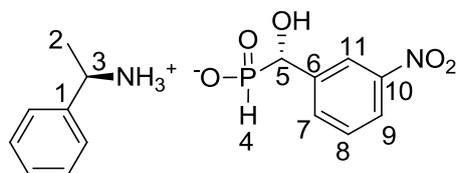
NMR ^{13}C (126 MHz; MeOD) δ : 149.5 (C_{10}) ; 141.3 (C_6) ; 134.4 (d, $J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, C_7) ; 130.4 (C_8) ; 123.8 (d, $J_{\text{C-P}} = 3.4$ Hz, C_9) ; 122.9 (d, $J_{\text{C-P}} = 5.8$ Hz, C_{11}) ; 70.0 (d, $J_{\text{C-P}} = 165$ Hz, C_5) ; 54.9 and 54.30 (d, $J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, C_4)

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (202 MHz; MeOD) δ : 20.5

SM (ESI $^+$) m/z : 262.1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: + 35.0 ($c = 1.0$, MeOH)

(*R*)-1-Phenylethanaminium-(*S*)-(hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate **III-6b**



$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$
 $M = 338.30$ g/mol
 White crystals

The (\pm)-phosphinic acid **III-4** (1.02 g, 4.70 mmol, 1 eq) and (*R*)-methylbenzylamine (570 mg, 4.70 mmol, 1 eq) were stirred in MeOH (10 ml) for 12 h. The solvent was evaporated and the product crystallized in a mixture of MeOH/acetonitrile (10 mL, 1/1) to afford **III-6b** (514 mg, 1.52 mmol, 32% yield).

NMR ^1H (250 MHz; MeOD) δ : 8.30 (s, 1H, H_{11}) ; 8.10 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H_9) ; 7.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_7) ; 7.55 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_8) ; 7.44 (m, 5H, H_{Ar}) ; 6.85 (d, $J_{\text{H-P}} = 510$ Hz, H_4) ; 4.73 (d, $J_{\text{H-P}} = 9.7$ Hz, 1H, H_5) ; 4.41 (q, $J = 6.9$ Hz, 1H, H_3) ; 1.60 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H_2)

NMR ^{13}C (126 MHz; MeOD) δ : 149.5 (C_{10}) ; 143.1 (C_6) ; 140.0 (C_1) ; 134.3 (d, $J_{\text{C-P}} = 4.3$ Hz, C_7) ; 130.0 (C_8) ; 130.2 and 127.6 (CH_{Ar}) ; 122.7 (C_9) ; 122.6 (d, $J_{\text{C-P}} = 5.1$ Hz, C_{11}) ; 74.9 (d, $J_{\text{C-P}} = 102$ Hz, C_5) ; 52.3 (C_3) ; 20.9 (C_2)

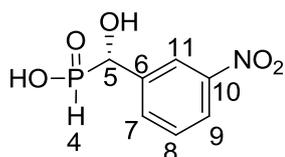
NMR ^{31}P (101 MHz; MeOD) δ : 24.2 ($J_{\text{P-H}} = 510$ Hz)

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (101 MHz; MeOD) δ : 24.2

HRMS (ESI $^+$) m/z : Calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 339.1110. Found 339.1111.

Mp : 187°C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: + 3.7 ° ($c = 2.0$, MeOH)

((S)-Hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphinic acid **III-4b**


$C_7H_8NO_5P$
 $M=217.12$ g/mol
 Orange solid

III-6b (514 mg, 1.52 mmol, 1 eq) was treated with a cation exchange resin (Dowex AG50W4, 50-100mesh, H^+ form, 1g) in MeOH (20 mL) for 12 h. Resin was removed by filtration and the solvent was evaporated under vacuum to afford **III-4b** (361 mg, 1.66 mmol, quantitative yield).

NMR 1H (250 MHz; MeOD) δ : 8.35 (s, 1H, H_{11}) ; 8.19 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_9) ; 7.85 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_7) ; 7.63 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_8) ; 6.90 (d, $J_{H-P} = 555$ Hz, H_4) ; 5.06 (d, $J_{H-P} = 8.5$ Hz, 1H, H_5)

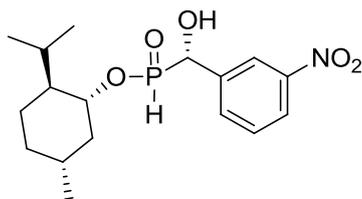
NMR ^{13}C (63 MHz; MeOD) δ : 149.2 (C_{10}) ; 140.0 (C_6) ; 134.3 (d, $J_{C-P} = 4.6$ Hz, C_7) ; 130.4 (d, $J_{C-P} = 2.7$ Hz, C_9) ; 130.0 (C_8) ; 122.5 (d, $J_{C-P} = 5.0$ Hz, C_{11}) ; 72.3 (d, $J_{C-P} = 109$ Hz, C_5)

NMR ^{31}P (101 MHz; MeOD) δ : 28.7 (d, $J_{P-H} = 549$ Hz)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; MeOD) δ : 28.7

MS (ESI) m/z : 216.0 $[M-H]^-$

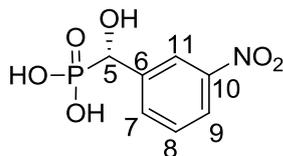
$[\alpha]_D^{20}$: - 27.4 (c = 2.0, MeOH)

(1R, 2S, 5R)-2-Isopropyl-5-methylcyclohexyl ((S)-hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate **III-7b & **III-7b'****


$C_{17}H_{26}NO_5P$
 $M=355.36$ g/mol
 Orange oil

To a stirring solution of **III-4b** (178 mg, 0.82 mmol, 1 eq) in THF (10 mL) were added PPh_3 polymer bound (200-400 mesh, 3 mmol triphenylphosphine/g resin, 547 mg, 1.65 mmol, 2 eq) and (-)-menthol (515 mg, 3.29 mmol, 4 eq). The mixture was cooled at 0 °C and diisopropylazodicarboxylate (324 μ l, 3.29 mmol, 2 eq) was added. The mixture was then stirred at reflux for 2 h. The mixture was diluted in EtOAc and filtered PPh_3 on Celite. The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc) to afford majoratory **III-7b** and **III-7b'** (62 mg, 0.174 mmol, 21% yield).

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; MeOD) δ : 35.07 and 28.13 (90%), 32.98 and 30.50 (10%)

(S)-(Hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphonic acid III-8b

$C_7H_8NO_6P$
 $M=233.12$ g/mol
 Orange oil

A solution of (*S*) phosphonic acid **III-4b** (30 mg, 0.14 mmol, 1eq), DMSO (27 μ L, 0.14 mmol, 1 eq) and iodine (0.4 mg, 0.0014 mmol, 0.01 eq) in THF (2ml) was heated at 60 °C for 5 h. After cooling to 25 °C, the mixture was evaporated to dryness and the residue was washed with DCM (5x20 mL). The insoluble material was dissolved in MeOH and evaporated under vacuum to afford **III-8b** (23 mg, 0.1 mmol, 71% yield).

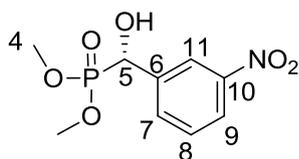
NMR 1H (250 MHz; MeOD) δ : 8.41 (s, 1H, H₁₁) ; 8.15 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H₉) ; 7.88 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H₇) ; 7.57 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H₈) ; 5.05 (d, J_{H-P} = 14.0 Hz, 1H, H₅)

NMR ^{13}C (63 MHz; MeOD) δ : 149.5 (C₁₀) ; 142.9 (C₆) ; 134.6 (d, J_{C-P} = 4.6 Hz, C₇) ; 130.0 (C₈) ; 123.3 (C₉) ; 123.1 (d, J_{C-P} = 4.9 Hz, C₁₁) ; 71.3 (d, J_{C-P} = 163 Hz, C₅)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (101 MHz; MeOD) δ : 18.8

MS (ESI⁻) m/z : 232.0 [M-H]⁻

$[\alpha]_D^{20}$: - 23.0 (c = 1.0, MeOH)

(S)-Dimethyl (hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphonate III-9b

$C_9H_{12}NO_6P$
 $M=261.17$ g/mol
 Orange oil

To a solution of (*S*)-phosphonic acid **III-8b** (23 mg, 0.1 mmol, 1 eq) in a mixture of solvent DCM/MeOH (1 mL: 28 μ l, 0.69 mmol, 7 eq) was added dropwise at 25 °C diazomethane (1 M in Toluene, 250 μ l, 0.50 mmol, 5 eq). After stirring for 1 h, the solvent was evaporated under vacuum and the crude residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM/EtOAc 2:8) to afford **III-9b** (17 mg, 0.07 mmol, 67% yield).

NMR 1H (250 MHz; MeOD) δ : 8.38 (s, 1H, H₁₁) ; 8.19 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₉) ; 7.88 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₇) ; 7.62 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H₈) ; 5.26 (d, J_{H-P} = 13.7 Hz, 1H, H₅) ; 3.80 and 3.78 (d, J_{H-P} = 10.0 Hz, 6H, H₄)

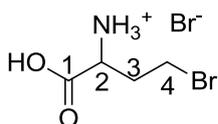
NMR ^{13}C (126 MHz; MeOD) δ : 149.7 (C₁₀) ; 141.4 (C₆) ; 134.5 (d, J_{C-P} = 5.3 Hz, C₇) ; 130.5 (C₈) ; 123.9 (d, J_{C-P} = 2.7 Hz, C₉) ; 123.0 (d, J_{C-P} = 6.0 Hz, C₁₁) ; 70.2 (d, J_{C-P} = 166 Hz, C₅) ; 54.5 and 54.3 (d, J_{C-P} = 7.1 Hz, C₄)

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (101 MHz; MeOD) δ : 23.0

MS (ESI $^{+}$) m/z : 264.1 [M+Na] $^{+}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ - 23.2 (c = 1.0, MeOH)

2-Amino-4-bromobutanoic acid **III-11**



$\text{C}_4\text{H}_9\text{BrNO}_2^+$
M=183.02 g/mol
White solid

$\text{C}_4\text{H}_9\text{Br}_2\text{NO}_2$
M=262.93 g/mol
White solid

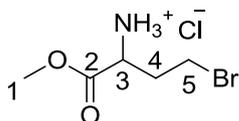
DL-Homoserine **III-10** (500 mg, 4.2 mmol, 1 eq) was dissolved in 33% HBr/AcOH (12 mL) and the mixture was heated at 75 °C for 12 h. After cooling to 25 °C, evaporation of solvent under vacuum afforded **III-11** (1.1 g, 4.1 mmol, quantitative yield) as bromide ammonium salt.

NMR ^1H (500 MHz; MeOD) δ : 4.15 (t, J = 6.7 Hz, 1H, H $_2$) ; 3.64 (m, 2H, H $_4$) ; 2.53 (m, 1H, H $_3$) ; 2.35 (m, 1H, H $_3$)

NMR ^{13}C (500 MHz; MeOD) δ : 171.0 (C $_1$) ; 52.70 (C $_2$) ; 34.83 (C $_3$) ; 28.7 (C $_4$)

MS (ESI $^{+}$) m/z : 181.9 [M $_{\text{Br}79}$] $^{+}$; 183.8 [M $_{\text{Br}81}$] $^{+}$

Methyl 2-amino-4-bromobutanoate **III-12**



$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{BrNO}_2^+$
M=197.05 g/mol
Yellowish oil

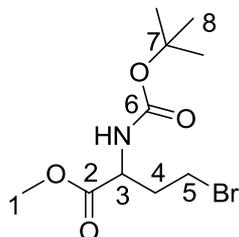
$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{BrClNO}_2$
M=232.50 g/mol
Yellowish oil

To a stirring solution of **III-11** (1.1 g, 4.41 mmol, 1 eq) in MeOH (13 mL) was added at 0 °C thionyl chloride (0.64 mL, 8.82 mmol, 2 eq) The reaction mixture was allowed to warm up to 25 °C within 12 h. The solvent was evaporated to afford **III-12** (1.1 g, 4.7 mmol) quantitative yield) as chloride ammonium salt.

NMR ^1H (250 MHz; MeOD) δ : 4.23 (t, J = 6.7 Hz, 1H, H $_3$) ; 3.88 (s, 3H, H $_1$) ; 3.62 (t, J = 6.7 Hz, 2H, H $_5$) ; 2.53 (m, 1H, H $_4$) ; 2.36 (m, 1H, H $_4$)

NMR ^{13}C (250 MHz; MeOD) δ : 168.7 (C $_2$) ; 55.0 (C $_1$) ; 51.9 (C $_3$) ; 34.0 (C $_4$) ; 28.6 (C $_5$)

MS (ESI $^{+}$) m/z : 195.9 [M $_{\text{Br}79}$] $^{+}$; 197.9 [M $_{\text{Br}81}$] $^{+}$

Methyl 4-bromo-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)butanoate III-13

$C_{10}H_{18}BrNO_4$
 $M=296.16$ g/mol
 Yellowish oil

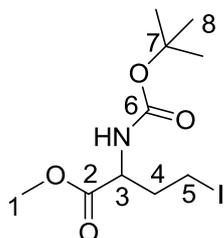
To a solution of **III-12** (1.1 g, 4.7 mmol, 1 eq) in THF (20 mL) were added successively NEt_3 (0.726 mL, 6.5 mmol, 1.4 mmol) and Boc_2O (2.17 mL, 9.46 mmol, 2 eq). The reaction mixture was stirred at 25 °C for 12 h. After evaporation of solvent, the residue was dissolved in EtOAc (20 mL) and washed with 1 M citric acid (10 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The crude compound was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 1:9) to afford **III-13** (1.04 g, 3.5 mmol, 74 % yield).

$R_f = 0.23$ (SiO_2 ; EtOAc/ cyclohexane 1:9, $KMnO_4$)

NMR 1H (500 MHz; MeOD) δ : 4.33 (m, 1H, H_3) ; 3.74 (s, 3H, H_1) ; 3.50 (m, 2H, H_5) ; 2.32 (m, 1H, H_4) ; 2.20 (m, 1H, H_4) ; 1.44 (s, 9H, H_8)

NMR ^{13}C (500 MHz; MeOD) δ : 174.1 (C_2) ; 157.9 (C_6) ; 80.8 (C_7) ; 53.9 (C_3) ; 53.3 (C_1) ; 36.0 (C_4) ; 30.2 (C_5) ; 29.2 (C_8)

MS (ESI $^+$) m/z : 317.8 [$M_{Br79}+Na$] $^+$; 319.8 [$M_{Br81}+Na$] $^+$

Methyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-iodobutanoate III-14

$C_{10}H_{18}INO_4$
 $M=343.16$ g/mol
 Yellowish oil

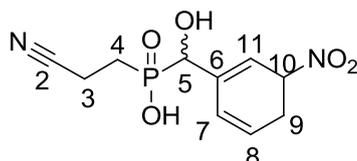
III-13 (225 mg, 0.76 mmol, 1 eq) and NaI (570 mg, 3.8 mmol, 5 eq) were dissolved in acetone (20 mL). After stirring for 2 h, the solvent was evaporated and the residue was washed with water (10 mL) and a saturated solution of NaCl (10 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum to afford **III-14** (259 mg, 0.75 mmol, 99% yield) which was used without further purification.

NMR 1H (252 MHz; MeOD) δ : 4.26 (m, 1H, H_3) ; 3.76 (s, 3H, H_1) ; 3.29 (m, 2H, H_5) ; 2.31 (m, 1H, H_4) ; 2.16 (m, 1H, H_4) ; 1.47 (s, 9H, H_8)

NMR ^{13}C (250 MHz; MeOD) δ : 173.7 (C_2) ; 157.8 (C_6) ; 80.6 (C_7) ; 55.4 (C_3) ; 52.8 (C_1) ; 36.5 (C_4) ; 28.7 (C_8) ; 1.1 (C_5)

MS (ESI $^+$) m/z : 365.9 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

(Hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)phosphinic acid III-22



$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$
 $M=270.18$ g/mol
 Yellowish solid

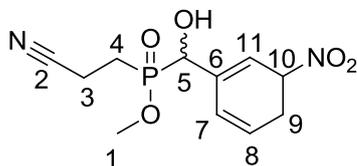
To a stirring solution of **III-4** (942 mg, 4.34 mmol, 1 eq) in DCM (35 mL) were added successively at 0 °C, NEt_3 (2.3 mL, 17.35 mmol, 4 eq) and TMSBr (2.42 mL, 17.37 mmol, 4 eq). After stirring 2 h at 25 °C, acrylonitrile (0.58 mL, 8.68 mmol, 2 eq) was added dropwise to the mixture at 0 °C which was allowed to warm up to 25 °C within 12 h. 1 M HCl (10 mL) was added at 0 °C and the compound was extracted with EtOAc (3x20 mL). The combined organic layers were washed with 1 M HCl (20 mL) and a saturated solution of NaCl (20 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum to afford **III-22** (652 mg, 2.4 mmol, 56% yield).

NMR ^1H (250 MHz; MeOD) δ : 8.39 (s, 1H, H_{11}) ; 8.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_9) ; 7.88 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H_7) ; 7.62 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_8) ; 5.13 (d, $J_{\text{H-P}} = 9.6$ Hz, 1H, H_5) ; 2.76 (m, 2H, H_3) ; 2.20 (m, 2H, H_4)

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (101 MHz; MeOD) δ : 42.4

MS (ESI $^-$) m/z : 269 [M-H] $^-$

Methyl (2-cyanoethyl)(hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate III-23



$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$
 $M=284.22$ g/mol
 Yellowish oil

To a stirring solution of **III-22** (724 mg, 2.85 mmol, 1 eq) in toluene/MeOH (15 mL, 2:1) was added at 0 °C TMSN_2 (1.45 mL, 3.42 mmol, 1.2 eq). After stirring for 4 h at 25 °C, the solvent was evaporated and the crude compound was purified by column chromatography on silica gel (MeOH/ EtOAc 5:95) to afford **III-23** (132 mg, 0.46 mmol, 16% yield).

Rf = 0.25 (SiO_2 ; MeOH/ EtOAc 5:95)

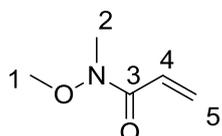
NMR ^1H (250 MHz; MeOD) δ : 8.39 (s, 2H, H₁₁) ; 8.23 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H₉) ; 7.90 (d, J = 7.7 Hz, 2H, H₇) ; 7.65 (t, J = 8.0 Hz, 2H, H₈) ; 5.31 (d, $J_{\text{H-P}}$ = 11.5 Hz, 1H, H₅) ; 5.29 (d, $J_{\text{H-P}}$ = 8.0 Hz, 1H, H₅) ; 3.73 and 3.55 (d, $J_{\text{H-P}}$ = 10.2 Hz, 6H, H₁) ; 2.78 (m, 4H, H₃) ; 2.28 (m, 4H, H₄)

NMR ^{13}C (63 MHz; MeOD) δ : 149.6 (C₁₀) ; 140.5 (C₆) ; 134.3 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 4.4 Hz, C₇) and 134.1 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 4.2 Hz, C₇) ; 130.6 (C₈) ; 123.9 (C₉) ; 122.8 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 4.7 Hz, C₁₁) and 122.6 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 4.4 Hz, C₁₁) ; 120.2 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 5.3 Hz, C₂) and 120.0 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 5.4 Hz, C₂) ; 71.9 and 71.0 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 111.1 Hz, C₅) ; 53.7 and 53.0 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 111.1 Hz, C₁) ; 22.0 and 21.2 (d, $J_{\text{C-P}}$ = 90.6 Hz, C₄) ; 11.0 (C₃)

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (101 MHz; MeOD) δ : 49.83 and 50.23

MS (ESI⁺) m/z : 284.8 [M+H]⁺

N*-methoxy-*N*-methylacrylamide **III-26*



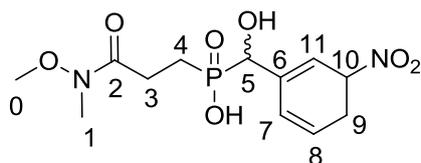
C₅H₉NO₂
 M=115.13 g/mol
 Yellowish oil

To a stirring solution of *N,O*-dimethylhydroxylamine (2 g, 20.5 mmol, 1.1 eq) and acryloyl chloride (1.51 mL, 18.7 mmol, 1 eq) in CHCl₃ (40 mL) was added dropwise at 0 °C anhydrous pyridine (3.3 mL, 41.3 mmol, 2.2 eq). After stirring 1.5 h at 25 °C, the solvent was evaporated. The residue was dissolved in 1 M HCl and aqueous layer was extracted with a mixture of DCM/Et₂O (3x30 mL, 1:1). The combined organic layers were washed with a saturated solution of NaHCO₃ and a saturated solution of NaCl, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum to afford **III-26** (1.4 g, 12.2 mmol, 65% yield).

NMR ^1H (400 MHz; CDCl₃) δ : 6.74 (dd, J = 17.3 Hz, J = 10.4 Hz, 1H, H₄) ; 6.44 (dd, J = 17.1 Hz, J = 2 Hz, 1H, H₅) ; 5.76 (dd, J = 10.3 Hz, J = 2 Hz, 1H, H₅) ; 3.27 (s, 3H, H₁) ; 3.72 (s, 3H, H₂)

NMR ^{13}C (100 MHz; CDCl₃) δ : 166.5 (C₃) ; 129.0 (C₄) ; 125.9 (C₅) ; 61.8 (C₁) ; 32.4 (C₂)

(Hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)phosphinic acid **III-27**



C₁₂H₁₇N₂O₇P
 M=332.25 g/mol
 Yellowish solid

To a stirring solution of **III-4** (330 mg, 1.52 mmol, 1 eq) in DCM (15 mL) were added successively at 0 °C NEt₃ (0.85 mL, 6.08 mmol, 4 eq) and TMSBr (0.81 mL, 6.08 mmol, 4 eq).

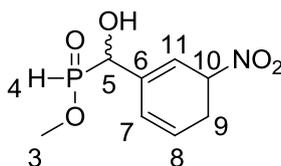
After stirring for 2 h at 25 °C, (1.52 mmol) **III-26** (175 mg, 1.52 mmol, 1 eq) was added dropwise to the mixture at 0 °C. The mixture was allowed to warm up to 25 °C within 12 h and 1 M HCl (10 mL) was added at 0 °C. The compound was extracted with EtOAc (3x30 mL) and combined organic layers were washed with 1 M HCl (20 mL) and a saturated solution of NaCl (20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum to afford **III-27** (100 mg, 0.3 mmol, 20%).

NMR ¹H (250 MHz; MeOD) δ : 8.39 (s, 1H, H₁₁) ; 8.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₉) ; 7.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₇) ; 7.60 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₈) ; 5.12 (d, *J*_{H-P} = 9.7 Hz, 1H, H₅) ; 3.72 (s, 3H, H₀) ; 3.18 (s, 3H, H₁) ; 2.76 (m, 2H, H₃) ; 2.12 (m, 2H, H₄)

NMR ³¹P_{cpd} (162 MHz; MeOD) δ : 47.0

MS (ESI⁺) *m/z* : 333.0 [M+H]⁺

Methyl (hydroxy(3-nitrocyclohexa-1,5-dien-1-yl)methyl)phosphinate **III-28**



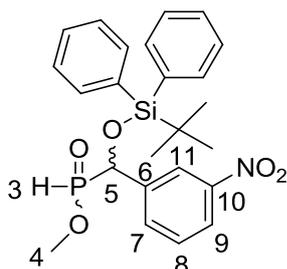
C₈H₁₂NO₅P
M=233.16 g/mol
Yellowish oil

To a solution of **III-4** (524 mg, 2.40 mmol, 1 eq) in MeOH (20 mL) was added EDC (648 mg, 3.38 mmol, 1.4 eq). The reaction mixture was stirred at 25 °C for 12 h. MeOH was evaporated and the residue was dissolved in 1 M HCl (10 mL) and extracted with EtOAc (3x20 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum to afford a mixture of 2 diastereomers **III-28** (369 mg, 1.58 mmol, 66% yield).

NMR ¹H (500 MHz; MeOD) δ : 8.35 (s, 2H, H₁₁) ; 8.21 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H₉) ; 7.85 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H₇) ; 7.65 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₈) ; 6.96 (d, *J*_{H-P} = 564 Hz, 1H, H₄) and 6.87 (d, *J*_{H-P} = 567 Hz, 1H, H₄) ; 5.24 (d, *J*_{H-P} = 7.3 Hz, 1H, H₅) and 5.21 (d, *J*_{H-P} = 10.6 Hz, 1H, H₅) ; 3.85 and 3.74 (d, *J*_{H-P} = 11.3 Hz, 2H, H₃)

NMR ³¹P_{cpd} (202 MHz; MeOD) δ : 39.7 and 36.9

Methyl (((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate **III-30**



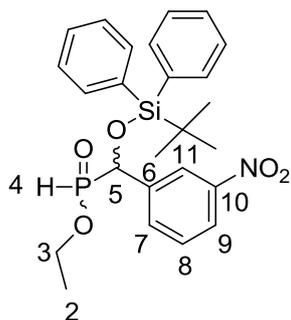
C₂₄H₂₈NO₅PSi
M=469.54 g/mol
Yellowish oil

To a solution of **III-4** (286 mg, 1.32 mmol, 1 eq) in THF (10 mL) was added at 0 °C successively NEt₃ (0.37 mL, 31.6 mmol, 2 eq) and TBDPSCl (0.24 mL, 1.3 mmol, 1 eq). The reaction mixture was stirred at 25 °C for 12 h. Then, the solvent was evaporated under vacuum and the crude compound was dissolved in MeOH (20 mL). At 0 °C, PivCl (0.24 mL, 1.98 mmol, 1.5 eq) and pyridine (0.21 mL, 2.64 mmol, 2 eq) were added successively dropwise to the reaction mixture which was stirred for 1 h at 25 °C. After evaporation of solvent under vacuum, the crude residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 1:1) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-30** (307 mg, 0.65 mmol, 50% yield over 2 steps).

Rf = 0.61 (SiO₂; EtOAc/cyclohexane 4:1; UV)

NMR ¹H (400 MHz; MeOD) δ : 8.10 (m, 4H, H_{Ar}) ; 7.71 (m, 4H, H_{Ar}) ; 7.65 (m, 2H, H_{Ar}) ; 7.45 (m, 12H, H_{Ar}) ; 7.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H_{Ar}) ; 7.20 (t, *J* = 7.7 Hz, 4H, H_{Ar}) ; 6.94 (d, *J*_{H-P} = 565 Hz, 1H, H₃) and 6.89 (d, *J*_{H-P} = 568 Hz, 1H, H₃) ; 5.28 (d, *J*_{H-P} = 7.4 Hz, 1H, H₅) and 5.23 (d, *J*_{H-P} = 8.6 Hz, 1H, H₅) ; 3.70 and 3.67 (d, *J*_{H-P} = 1.8 Hz, 6H, H₄) ; 1.14 and 1.13 (s, 18H, *t*-Bu)

NMR ³¹P_{cpd} (162 MHz; MeOD) δ : 35,49 and 35.44

Ethyl (((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate **III-31**

$C_{25}H_{30}NO_5PSi$
 $M=483.57$ g/mol
 Yellowish oil

To a solution of **III-4** (3.43 g, 15.8 mmol, 1 eq) in THF (10 mL) was added at 0 °C successively NEt_3 (4.4 mL, 31.6 mmol, 2 eq) and TBDPSCl (4.5 mL, 17.4 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred at 25 °C for 12 h. Then, the solvent was evaporated under vacuum and the crude compound was dissolved in EtOH (80 mL). At 0 °C, PivCl (3.9 mL, 31.7 mmol, 2 eq) and pyridine (3.42 mL, 42.3 mmol, 2.7 eq) were added successively dropwise to the reaction mixture which was stirred for 1 h at 25 °C. After evaporation of solvent under vacuum, the crude residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 1:1) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-31** (3.0 g, 6.2 mmol, 50% yield over 2 steps).

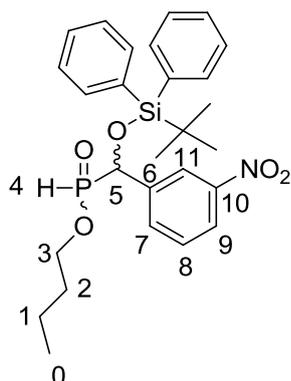
Rf = 0.44 (SiO₂; EtOAc/cyclohexane 1:1; UV)

NMR ¹H (400 MHz; MeOD) δ : 8.14 (m, 4H, H₁₁ and H₉) ; 7.71 (m, 4H, H_{Ar}) ; 7.66 (m, 2H, H₇) ; 7.44 (m, 12H, H_{Ar}) ; 7.32 (m, 2H, H_{Ar}) ; 7.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H, H_{Ar}) ; 6.98 and 6.89 (d, $J_{H-P} = 571$ Hz, 2H, H₄) ; 5.25 (d, $J_{H-P} = 7.3$ Hz, 1H, H₅) and 5.20 (d, $J_{H-P} = 8.9$ Hz, 1H, H₅) ; 4.07 (m, 4H, H₃) ; 4.07 (m, 4H, H₁₃) ; 1.14 and 1.13 (s, 18H, *t*-Bu) ; 1.23 (m, 6H, H₂)

NMR ¹³C (101 MHz; MeOD) δ : 149.4 (x2) (C₁₀) ; 138.9 and 138.7 (C₆) ; 137.1 (x4), 137.0 (x2) and 136.9 (x2) (CH_{Ar}) ; 134.8 and 134.6 (d, $J_{C-P} = 5.0$ Hz, C₇) ; 133.2, 133.1 and 133.0 (x2) (Cq_{Ar}) ; 131.6, 131.5 and 131.4 (x2) (CH_{Arp}) ; 130.6 and 130.5 (C₈) ; 129.1 (x2), 129.0 (x2), 128.9 (x2) and 128.8 (x2) (CH_{Arp}) ; 124.2 and 124.1 (d, $J_{C-P} = 2.8$ Hz, C₉) ; 123.6 (d, $J_{C-P} = 5.4$ Hz, C₁₁) and 123.5 (d, $J_{C-P} = 5.2$ Hz, C₁₁) ; 74.1 (d, $J_{C-P} = 115.9$ Hz, C₅) and 74.0 (d, $J_{C-P} = 114.3$ Hz, C₅) ; 65.3 and 64.9 (d, $J_{C-P} = 7.5$ Hz, C₃) ; 27.4 (x2) (*t*-Bu) ; 20.1 (x2) (Cq *t*-Bu) ; 16.6 and 16.5 (d, $J_{C-P} = 2.3$ Hz, C₂)

NMR ³¹P_{cpd} (161 MHz; MeOD) δ : 33.1 and 32.9

HRMS (ESI+) m/z : Calculated for $C_{25}H_{31}NO_5PSiNa$ [M+Na]⁺ : 507.160. Found 507.160

Butyl (((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate **III-32**

$C_{27}H_{34}NO_5PSi$
 $M=511.62$ g/mol
 Yellowish oil

To a solution of **III-4** (110 mg, 0.52 mmol, 1 eq) in THF (4 mL) was added at 0 °C successively NEt_3 (0.14 mL, 1.04 mmol, 2 eq) and TBDPSCl (0.15 mL, 0.57 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred at 25 °C for 12 h. Then, the solvent was evaporated under vacuum and the crude compound was dissolved in BuOH (4 mL). At 0 °C, PivCl (95 μ L, 0.78 mmol, 1.5 eq) and pyridine (84 μ L, 1.04 mmol, 2 eq) were added successively dropwise to the reaction mixture which was stirred for 1 h at 25 °C. After evaporation of solvent under vacuum, the crude residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 1:1) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-32** (207 mg, 0.4 mmol, 50% yield over 2 steps).

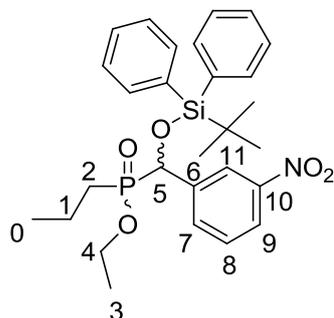
Rf = 0.63 (SiO₂; EtOAc/cyclohexane 3:7; UV)

NMR ¹H (400 MHz; MeOD) δ : 8.15 and 8.11 (m, 4H, H₁₁ and H₉) ; 7.71 (m, 4H, H_{Ar}) ; 7.63 (m, 2H, H₇) ; 7.48 (m, 12H, H_{Ar}) ; 7.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H_{Ar}) ; 7.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H, H_{Ar}) ; 6.96 (d, $J_{HP} = 568$ Hz, 1H, H₄) and 6.92 (d, $J_{HP} = 531$ Hz, 1H, H₄) ; 5.26 (d, $J_{HP} = 6.9$ Hz, 1H, H₅) and 5.21 (d, $J_{HP} = 8.5$ Hz, 1H, H₅) ; 4.00 (m, 4H, H₃) ; 1.56 (m, 4H, H₂) ; 1.30 (m, 4H, H₁) ; 1.15 and 1.13 (s, 18H, *t*-Bu) ; 0.87 and 0.86 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, H₀)

NMR ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ : 149.4 (x2) (C₁₀) ; 138.9 and 138.7 (C₆) ; 137.1 (x4), 137.0 (x2) and 136.9 (x2) (CH_{Ar}) ; 134.8 and 134.7 (d, $J_{C-P} = 5.0$ Hz, C₇) ; 133.2, 133.1 and 133.0 (x2) (C_{qAr}) ; 131.6, 131.5 and 131.4 (x2) (CH_{Arp}) ; 130.6 and 130.5 (d, $J_{C-P} = 2.2$ Hz, C₈) ; 129.1 (x2), 129.0 (x2), 128.9 (x2) and 128.8 (x2) (CH_{Ar}) ; 124.2 and 124.1 (d, $J_{C-P} = 2.7$ Hz, C₉) ; 123.7 (d, $J_{C-P} = 5.5$ Hz, C₁₁) and 123.5 (d, $J_{C-P} = 5.1$ Hz, C₁₁) ; 74.3 (d, $J_{C-P} = 115.9$ Hz, C₅) and 74.2 (d, $J_{C-P} = 115.1$ Hz, C₅) ; 68.9 and 68.5 (d, $J_{C-P} = 8.0$ Hz, C₃) ; 33.5 and 33.4 (d, $J_{C-P} = 8.0$ Hz, C₂) ; 27.6 and 27.4 (*t*-Bu) ; 20.1 (x2)(C_q *t*-Bu) ; 19.7 (x2) (C₁) ; 13.8 and 13.7 (C₀)

NMR ³¹P_{cpd} (162 MHz; MeOD) δ : 33.25 and 33.20

Ethyl (((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)(3-nitrophenyl)methyl)(propyl)phosphinate **III-34**



$C_{28}H_{36}NO_5PSi$
 $M=525.65$ g/mol
 Yellowish oil

To a stirring deoxygenated solution of **III-31** (465 mg, 0.96 mmol, 1 eq) in THF (20 mL) was added at -78 °C freshly prepared LiHMDS (0.82 mL in THF (5 mL), 0.96 mmol, 1 eq). After 5 min, iodopropane (0.28 mL, 2.89 mmol, 3 eq) was added to the mixture which was allowed to warm up to 25 °C within 12 h. The reaction mixture was quenched with a saturated solution of NaCl, extracted with EtOAc (3x30 mL) then combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 1:1) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-34** (26 mg, 0.05 mmol, 5% yield).

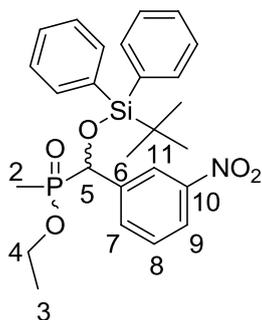
Rf = 0.30 (SiO_2 ; EtOAc/cyclohexane 1:1; UV)

NMR 1H (400 MHz; MeOD) δ : 8.10 and 8.06 (m, 4H, H₁₁ and H₉) ; 7.71 (m, 4H, H_{Ar}) ; 7.63 (m, 2H, H₇) ; 7.44 (m, 12H, H_{Ar}) ; 7.31 (m, 2H, H_{Ar}) ; 7.20 (m, 4H, H_{Ar}) ; 5.23 (d, $J_{H-P} = 7.9$ Hz, 1H, H₅) and 5.16 (d, $J_{H-P} = 9.9$ Hz, 1H, H₅) ; 4.00 and 3.78 (m, 4H, H₄) ; 1.75 (m, 4H, H₁) ; 1.52 (m, 4H, H₂) ; 1.19 (m, 6H, H₃) ; 1.12 (s, 18H, *t*-Bu) ; 0.94 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, H₀)

NMR ^{13}C (100 MHz; MeOD) δ : 149.2 (x2) (C₁₀) ; 140.3 (x2) (C₆) ; 137.2 (x2), 137.1 (x2) and 137.0 (x4) (CH_{Ar}) ; 135.1 and 135.0 (d, $J_{C-P} = 4.5$ Hz, C₇) ; 133.2 (x2) and 133.1 (x2) (Cq_{Ar}) ; 131.4, 131.3 (x2) and 131.2 (CH_{Arp}) ; 130.3 and 130.2 (C₈) ; 128.9 (x4) and 128.7 (x4) (CH_{Ar}) ; 124.0 (x2) (d, $J_{C-P} = 4.8$ Hz, C₉) ; 123.9 (x2) (d, $J_{C-P} = 5.9$ Hz, C₁₁) ; 75.1 and 74.9 (d, $J_{C-P} = 109.1$ Hz, C₅) ; 63.4 and 63.3 (d, $J_{C-P} = 7.5$ Hz, C₄) ; 27.8 and 27.6 (d, $J_{C-P} = 90.0$ Hz, C₂) ; 27.5 (x2) (*t*-Bu) ; 20.2 (x2)(Cq *t*-Bu) ; 16.9 (d, $J_{C-P} = 5.2$ Hz, C₃) ; 16.0 (d, $J_{C-P} = 5.4$ Hz, C₁) ; 15.8 (d, $J_{C-P} = 15.1$ Hz, C₀)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (162 MHz; MeOD) δ : 51.2 and 50.7

Ethyl (((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)(3-nitrophenyl)methyl)(methyl)phosphinate **III-35**



$C_{26}H_{32}NO_5PSi$
 $M=497.60$ g/mol
 Yellowish oil

To a stirring deoxygenated solution of **III-31** (192 mg, 0.40 mmol, 1 eq) in THF (10 mL) was added at -78 °C freshly prepared LiHMDS (0.40 mL in THF (3 mL), 0.44 mmol, 1.1 eq). After 5 min, iodomethane (27 μ L, 0.44 mmol, 1.1 eq) was added to the mixture which was allowed to warm up to 25 °C within 12 h. The reaction mixture was quenched with a saturated solution of NaCl, extracted with EtOAc (3x10 mL) then combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 1:1) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-35** (129 mg, 0.26 mmol, 65% yield).

Rf = 0.28 (SiO_2 ; EtOAc/cyclohexane 1:1; UV)

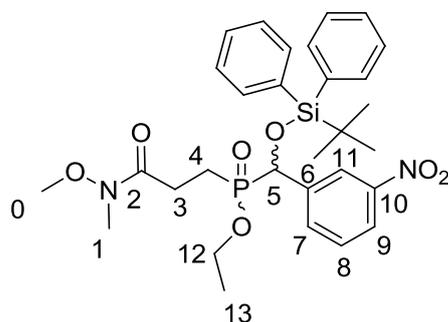
NMR 1H (400 MHz; MeOD) δ : 8.09 (bs, 2H, H_{11}) ; 8.03 (t, $J = 9.1$ Hz, 2H, H_9) ; 7.70 (m, 4H, H_{Ar}) ; 7.62 (t, $J_{H-P} = 7.4$ Hz, 2H, H_7) ; 7.43 (m, 12H, H_{Ar}) ; 7.28 (m, 2H, H_{Ar}) ; 7.19 (m, 4H, H_{Ar}) ; 5.24 (d, $J_{H-P} = 10.1$ Hz, 1H, H_5) and 5.18 (d, $J_{H-P} = 12.0$ Hz, 1H, H_5) ; 3.96 (m, 4H, H_4) ; 1.48 and 1.42 (d, $J_{H-P} = 13.8$ Hz, 6H, H_2) ; 1.22 (m, 6H, H_3) ; 1.13 and 1.12 (s, 18H, *t*-Bu)

NMR ^{13}C (100 MHz; MeOD) δ : 149.2 (x2) (C_{10}) ; 140.3 and 140.2 (C_6) ; 137.2 (x2), 137.1 (x2), 137.0 (x2) and 136.9 (x2) (CH_{Ar}) ; 135.0 and 134.9 (d, $J_{C-P} = 4.0$ Hz, C_7) ; 133.4, 133.2 and 133.1 (x2) (C_{qAr}) ; 131.4, 131.3 (x2) and 131.2 (CH_{Arp}) ; 130.3 and 130.2 (C_8) ; 128.9 (x4), 128.7 (x2) and 128.6 (x2) (CH_{Ar}) ; 123.9 and 123.8 (d, $J_{C-P} = 2.3$ Hz, C_9) ; 123.8 (d, $J_{C-P} = 6.0$ Hz, C_{11}) and 123.7 (d, $J_{C-P} = 5.2$ Hz, C_{11}) ; 75.6 (d, $J_{C-P} = 115.3$ Hz, C_5) and 75.0 (d, $J_{C-P} = 115.0$ Hz, C_5) ; 63.2 and 62.9 (d, $J_{C-P} = 7.0$ Hz, C_4) ; 27.5 (x2) (*t*-Bu) ; 20.2 (x2) (C_{q-t-Bu}) ; 16.9 and 16.8 (d, $J_{C-P} = 3.1$ Hz, C_3) ; 10.6 (d, $J_{C-P} = 91.2$ Hz, C_2) and 10.0 (d, $J_{C-P} = 92.7$ Hz, C_2)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (162 MHz; MeOD) δ : 51.5 and 51.0

HRMS (ESI $^+$) m/z : Calculated for $C_{26}H_{32}NO_5PSiNa$ [$M+Na$] $^+$: 520.169. Found 520.168

Ethyl (((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)(3-nitrophenyl)methyl)(3-(methoxy(methyl)amino)-3-oxopropyl)phosphinate **III-37**



C₃₀H₃₉N₂O₇PSi
M=598.70 g/mol
Yellowish oil

To a stirring deoxygenated solution of **III-31** (208 mg, 0.43 mmol, 1 eq) in THF (10 mL) was added at -78 °C freshly prepared LiHMDS (0.40 mL in THF (4 mL), 0.47 mmol, 1.1 eq). After 5 min, **III-26** (55 mg, 0.47 mmol, 1.1 eq) was added to the mixture which was allowed to warm up to 25 °C within 12 h. The reaction mixture was quenched with a saturated solution of NaCl, extracted with EtOAc (3x10 mL) then combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-37** (106 mg, 0.18 mmol, 41% yield).

R_f = 0.32 (SiO₂; EtOAc; UV)

NMR ¹H (400 MHz; MeOD) δ : 8.11 (bs, 2H, H₁₁) ; 8.05 and 8.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H₉) ; 7.71 (m, 4H, H_{Ar}) ; 7.66 and 7.64 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₇) ; 7.43 (m, 12H, H_{Ar}) ; 7.29 (m, 2H, H_{Ar}) ; 7.19 (m, 4H, H_{Ar}) ; 5.32 (d, *J*_{H-P} = 9.0 Hz, 1H, H₅) and 5.26 (d, *J*_{H-P} = 10.6 Hz, 1H, H₅) ; 3.96 (m, 4H, H₁₂) ; 3.65 and 3.63 (s, 6H, H₀) ; 3.16 and 3.15 (s, 6H, H₁) ; 2.61 (m, 4H, H₃) ; 2.08 (m, 4H, H₄) ; 1.22 (m, 6H, H₁₃) ; 1.13 and 1.12 (s, 18H, *t*-Bu)

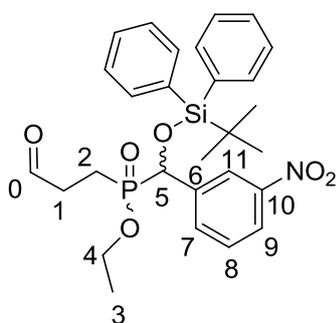
NMR ¹³C (100 MHz; MeOD) δ : 173.8 and 173.7 (C₂) ; 149.2 (x2) (C₁₀) ; 140.1 (x2) (C₆) ; 137.2 (x2), 137.1 (x4) and 137.0 (x2) (CH_{Ar}) ; 135.1 and 135.0 (d, *J*_{C-P} = 3.8 Hz, C₇) ; 133.4, 133.2, 133.1 and 133.0 (C_{qAr}) ; 131.4, 131.3 (x2) and 131.2 (CH_{Arp}) ; 130.3 (x2) (C₈) ; 128.9 (x4), 128.8 (x2), and 128.7 (x2) (CH_{Ar}) ; 123.9 (x2) (C₉) ; 123.8 (x2) (C₁₁) ; 75.3 (d, *J*_{C-P} = 112.1 Hz, C₅) and 75.0 (d, *J*_{C-P} = 111.7 Hz, C₅) ; 63.5 and 63.2 (d, *J*_{C-P} = 7.2 Hz, C₁₂) ; 61.8 (x2) (C₀) ; 32.6 (x2) (C₁) ; 27.5 (x2) (*t*-Bu) ; 25.3 (x2) (d, *J*_{C-P} = 8.9 Hz, C₃) ; 20.6 and 20.3 (d, *J*_{C-P} = 92.4 Hz, C₄) ; 20.2 (x2) (C_{q t}-Bu) ; 16.9 (x2) (d, *J*_{C-P} = 5.2 Hz, C₁₃)

NMR ³¹P_{cpd} (161 MHz; MeOD) δ : 50.7 and 50.1

HRMS (ESI⁺) *m/z* : Calculated for C₃₀H₃₉N₂O₇PSiNa [M + Na]⁺ : 621.216. Found 621.216

IR *v*_{max}/cm⁻¹ : 2934, 2854, 1661, 1529, 1355, 1232, 1105, 1025, 808, 700

Ethyl (((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)(3-nitrophenyl)methyl)(3-oxopropyl)phosphinate **III-38**



$C_{28}H_{34}NO_6PSi$
 $M=539.63$ g/mol
 Yellowish oil

To a stirring solution of **III-37** (333 mg, 0.56 mmol, 1 eq) in DCM (25 mL) was added at -78 °C DIBAL (1 M in toluene, 1.11 mL, 1.11 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at -78 °C for 2 h. The reaction mixture was stopped by addition of a saturated solution of potassium (15 mL) and compound was extracted with EtOAc (3x20 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 8:2) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-38** (252 mg, 0.47 mmol, 84% yield).

Rf = 0.54 (SiO_2 ; EtOAc; UV)

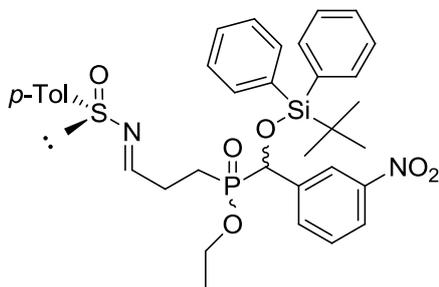
NMR 1H (400 MHz; $CDCl_3$) δ : 9.71 and 9.68 (s, 2H, H_0) ; 8.11 and 8.05 (m, 4H, H_{11} and H_9) ; 7.69 (m, 4H, H_{Ar}) ; 7.61 and 7.58 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_7) ; 7.42 (m, 12H, H_{Ar}) ; 7.31 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_{Ar}) ; 7.19 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H, H_{Ar}) ; 5.09 (d, $J_{H-P} = 8.0$ Hz, 1H, H_5) and 5.02 (d, $J_{H-P} = 12.3$ Hz, 1H, H_5) ; 3.88 (m, 4H, H_4) ; 2.60 (m, 4H, H_1) ; 1.97 (m, 4H, H_2) ; 1.19 (m, 6H, H_3) ; 1.12 (s, 18H, *t*-Bu)

NMR ^{13}C (100 MHz; $CDCl_3$) δ : 199.1 and 199.0 (C_0) ; 148.0 (x2) (C_{10}) ; 139.1 and 139.0 (C_6) ; 136.1 (x4) and 136.0 (x4) (CH_{Ar}) ; 133.7 and 133.6 ($J_{C-P} = 4.2$ Hz, C_7) ; 132.1, 132.0 and 131.9 (x2) (C_{qAr}) ; 130.5 (x2) and 130.3 (x2) (CH_{Arp}) ; 129.2 and 129.0 (C_8) ; 128.1 (x2), 128.0 (x2), 127.9 (x2) and 127.8 (x2) (CH_{Ar}) ; 123.1 and 123.0 (d, $J_{C-P} = 2.2$ Hz, C_9) ; 122.7 and 122.6 (d, $J_{C-P} = 4.7$ Hz, C_{11}) ; 74.3 and 74.1 (d, $J_{C-P} = 110.8$ Hz, C_5) ; 62.2 and 61.7 (d, $J_{C-P} = 7.0$ Hz, C_4) ; 35.8 (d, $J_{C-P} = 3.5$ Hz, C_1) and 35.7 (d, $J_{C-P} = 4.2$ Hz, C_1) ; 27.1 (x2) (*t*-Bu) ; 19.6 and 19.5 (Cq *t*-Bu) ; 17.7 (d, $J_{C-P} = 92.0$ Hz, C_2) and 16.7 (d, $J_{C-P} = 92.7$ Hz, C_2) ; 16.8 and 16.7 (d, $J_{C-P} = 5.2$ Hz, C_3)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (161 MHz; $CDCl_3$) δ : 49.0 and 48.4

HRMS (ESI $^+$) m/z : Calculated for $C_{28}H_{35}NO_6PSiNa$ [$M + Na$] $^+$: 562.1791. Found 562.1785

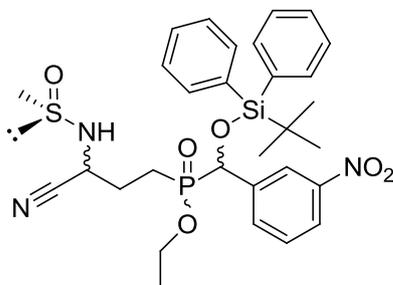
IR ν_{max}/cm^{-1} : 2929, 2859, 1723, 1529, 1355, 1232, 1110, 1034, 817, 704, 502

(E)-Ethyl (((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)(3-nitrophenyl)methyl)(3-((*p*-tolylsulfinyl)imino)propyl)phosphinate **III-40**

C₃₅H₄₁N₂O₆PSSi
 M=676.83 g/mol
 Yellowish oil

To a stirring solution of **III-38** (710 mg, 1.32 mmol, 1 eq) and (*S*)-(+)-*p*-toluensulfonamide (204 mg, 1.32 mmol, 1 eq) in DCM (25 mL) was added Ti(OEt)₄ (1.38 mL, 6.58 mmol, 5 eq). The mixture was heated at 50 °C for 24 h. After cooling to 0 °C, water (20 mL) was added to the mixture to stop the reaction. The turbid solution was filtered through Celite and washed with DCM (3x20 mL). The organic and aqueous layers were separated and the aqueous layer was extracted with DCM (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to afford crude sulfinylimine **III-40** (861 mg, 1.27 mmol, 96% yield) used in next step without further purification.

LC-MS: 2.79 min; [M]⁺ = 676.91

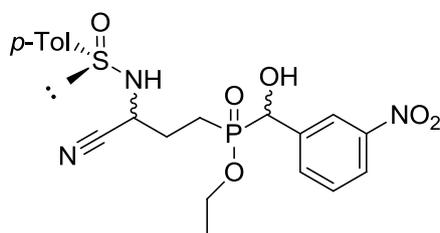
Ethyl (((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)(3-nitrophenyl)methyl)(3-cyano-3-(4-methylphenylsulfinamido)propyl)phosphinate **III-41 & **III-41'****

C₃₆H₄₂N₃O₆PSSi
 M=703.86 g/mol
 Yellowish solid

In a round-bottom flask was dissolved sulfinylimine **III-40** (861 mg, 1.27 mmol, 1 eq) in THF (25 mL). In a separate Schlenk flask, to a stirring solution of diethylaluminium cyanide (1.91 mL, 1.91 mmol, 1.5 eq) was added at -78 °C *i*-PrOH (0.1 mL, 1.27 mmol, 1 eq). This solution was allowed to reach to 25 °C, stirred for 30 min, and cannulated into the solution of **III-40** at -78 °C. The reaction mixture was brought to 25 °C and stirred for 24 h. Then was cooled to -78 °C and a saturated solution of NH₄Cl (20 mL) was added to stop the reaction. The suspension was filtered through Celite, extracted with EtOAc (3x10 mL) and washed with a saturated solution of NaCl (20 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to afford crude **III-41** & **III-41'** (448 mg, 0.64 mmol) used in next step without further purification.

LC-MS: 2.66 min; [M]⁺ = 703.86

Ethyl (3-cyano-3-(4-methylphenylsulfonamido)propyl)(hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate **III-42**

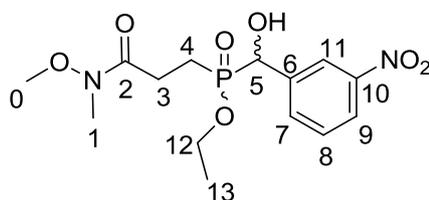


$C_{20}H_{24}N_3O_6PS$
 $M=465.46$ g/mol
 Yellowish solid

To a solution of **III-41** (397 mg, 0.59 mmol, 1 eq) in THF (15 mL) was added at 0 °C successively AcOH (40 μ L, 0.62 mmol, 1.1 eq) and TBAF (1 M in THF, 0.62 mL, 0.62 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was maintained at 25 °C for 12 h. Water (10 mL) was added to the mixture to stop the reaction. The organic and aqueous layers were separated and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3x10 mL). The combined organic layers was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum to afford crude residue **III-42** (440 mg, 0.95 mmol) used in next step without further purification.

LC-MS: 1.79 min; $[M-H]^- = 463.84$

Ethyl (hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)(3-(methoxy(methyl)amino)-3-oxopropyl)phosphinate **III-43**



$C_{14}H_{21}N_2O_7P$
 $M=360.30$ g/mol
 Yellowish solid

To a solution of **III-37** (129 mg, 0.22 mmol, 1 eq) in THF (7 mL) was added at 0 °C successively AcOH (12 μ L, 0.22 mmol, 1 eq) and TBAF (1 M in THF, 0.22 mL, 0.22 mmol, 1 eq). The reaction mixture was maintained at 25 °C for 12 h. Water (10 mL) was added to the mixture to stop the reaction. After decantation the aqueous phase was extracted with EtOAc (3x10 mL). The combined organic layers was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc) to afford **III-43** (59 mg, 0.16 mmol, 76% yield).

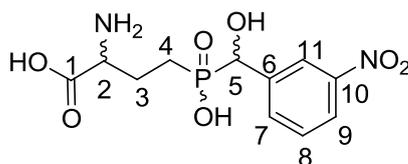
NMR 1H (400 MHz; $CDCl_3$) δ : 8.40 (s, 1H, H_{11}) ; 8.13 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H_9) ; 7.86 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_7) ; 7.52 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_8) ; 5.09 (d, $J_{H-P} = 7.6$ Hz, 1H, H_5) ; 4.00 (m, 4H, H_{12}) ; 3.65 (s, 3H, H_0) ; 3.17 (s, 3H, H_1) ; 2.74 (m, 2H, H_3) ; 2.12 (m, 2H, H_4) ; 1.22 (t, $J = 7.0$ Hz, H_{13})

NMR ^{13}C (100 MHz; CDCl_3) δ : 172.81 (C_2) ; 148.23 (C_{10}) ; 139.3 (C_6) ; 133.3 (d, $J_{\text{C-P}} = 3.8$ Hz, C_7) ; 129.15 (C_8) ; 122.7 (C_9) ; 122.1 (d, $J_{\text{C-P}} = 4.5$ Hz, C_{11}) ; 71.6 (d, $J_{\text{C-P}} = 101.4$ Hz, C_5) ; 62.0 (d, $J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, C_{12}) ; 61.3 (C_0) ; 32.4 (C_1) ; 24.6 (C_3) ; 20.2 (d, $J_{\text{C-P}} = 89.3$ Hz, C_4) ; 16.6 (d, $J_{\text{C-P}} = 5.5$ Hz, C_{13})

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (202 MHz; CDCl_3) δ : 51.7 and 50.0

2-Amino-4-(hydroxy(hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphoryl)butanoic acid **III-**

44



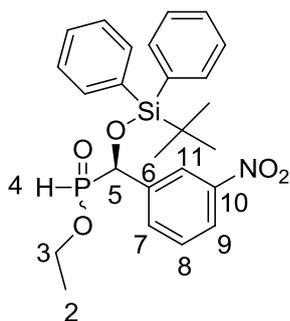
$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$
 M=318.22 g/mol
 Yellowish solid

A solution of **III-42** (440 mg, 0.95 mmol, 1 eq) in 6 M HCl (15 mL) was refluxed for 24 h. After cooling, solvent was evaporated under vacuum. The crude residue was dissolved in 1 M HCl and washed with EtOAc (3 x 15 mL). Water was evaporated and the residue was purified on cation exchange resin chromatography (Dowex AG 50W-X4, H^+ , 50-100 mesh). The compound was eluted with water to afford **III-44** (32 mg, 0.1 mmol, 8% over 3 steps).

NMR ^1H (250 MHz; CDCl_3) δ : 8.20 (s, 1H, H_{11}) ; 8.10 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_9) ; 7.72 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_7) ; 7.52 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_8) ; 4.91 (d, $J_{\text{H-P}} = 9.5$ Hz, 1H, H_5) ; 3.97 (m, 1H, H_2) ; 2.06 (m, 2H, H_3) ; 1.69 (m, 2H, H_4)

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (101 MHz; CDCl_3) δ : 37.9

MS (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 319.2 ; $[\text{M}-\text{H}]^-$ 317.3

Ethyl ((R)-((tert-butyl)diphenylsilyloxy)(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate **III-31a**

$C_{25}H_{30}NO_5PSi$
 $M=483.57$ g/mol
 Yellowish oil

To a solution of **III-4a** (4.12 g, 19.0 mmol, 1 eq) in THF (100 mL) was added at 0 °C successively NEt_3 (5.3 mL, 38.0 mmol, 2 eq) and TBDPSCl (5.9 mL, 22.8 mmol, 1.21 eq). The reaction mixture was stirred at 25 °C for 12 h. Then, the solvent was evaporated under vacuum and the crude compound was dissolved in EtOH (80 mL). At 0°C, PivCl (5.5 mL, 28.5 mmol, 1.5 eq) and pyridine (4.9 mL, 40 mmol, 2.1 eq) were added successively dropwise to the reaction mixture which was stirred for 1 h at 25 °C. After evaporation of solvent under vacuum, the crude residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 1:1) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-31a** (4.6 g, 9.5 mmol, 50% yield over 2 steps).

Rf = 0.43 (SiO₂; EtOAc/cyclohexane 1:1; UV)

NMR ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ : 8.20 (s, 1H, H₁₁) ; 8.11 and 8.10 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, H₉) ; 8.04 (s, 1H, H₁₁) ; 7.69 (d, $J = 7.0$ Hz, 4H, H_{Ar}) ; 7.61 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H₇) and 7.58 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H₇) ; 7.44 (m, 12H, H_{Ar}) ; 7.34 (m, 2H, H_{Ar}) ; 7.23 (m, 4H, H_{Ar}) ; 6.95 (d, $J_{H-P} = 559$ Hz, 1H, H₄) and 6.89 (d, $J_{H-P} = 556$ Hz, 1H, H₄) ; 5.07 (d, $J_{H-P} = 5.6$ Hz, 1H, H₅) and 4.96 (d, $J_{H-P} = 9.9$ Hz, 1H, H₅) ; 4.01 (m, 4H, H₃) ; 1.24 (m, 6H, H₂) ; 1.15 and 1.13 (s, 18H, *t*-Bu)

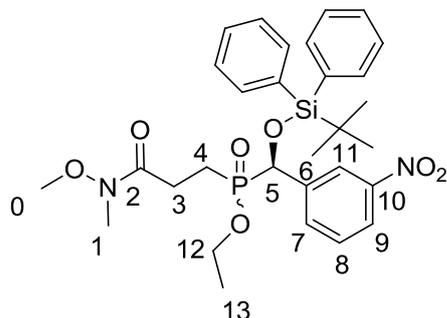
NMR ¹³C (126 MHz; CDCl₃) δ : 148.0 and 147.9 (C₁₀) ; 137.6 and 137.3 (C₆) ; 135.8 (x2), 135.7 (x2), 135.7 (x2) and 135.6 (x2) (CH_{Ar}) ; 133.4 and 133.1 (d, $J_{C-P} = 4.8$ Hz, C₇) ; 131.8 (x2), 131.6 and 131.5 (Cq_{Ar}) ; 130.4, 130.2 (x2) and 130.1 (CH_{Arp}) ; 129.2 and 129.0 (C₈) ; 127.9 (x2), 127.8 (x2), 127.7 (x2) and 127.6 (x2) (CH_{Ar}) ; 123.1 and 122.9 (d, $J_{C-P} = 2.2$ Hz, C₉) ; 122.3 (d, $J_{C-P} = 5.5$ Hz, C₁₁) and 122.2 (d, $J_{C-P} = 4.6$ Hz, C₁₁) ; 73.2 (d, $J_{C-P} = 115.3$ Hz, C₅) and 72.9 (d, $J_{C-P} = 113.1$ Hz, C₅) ; 63.4 and 63.1 (d, $J_{C-P} = 7.7$ Hz, C₃) ; 26.8 and 26.7 (*t*-Bu) ; 19.2 (x2)(Cq *t*-Bu) ; 16.1 and 16.0 (d, $J_{C-P} = 2.1$ Hz, C₂)

NMR ³¹P_{cpd} (202 MHz; CDCl₃) δ : 31.9 and 31.4

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for C₂₅H₃₀NO₅PSiNa [M+Na]⁺: 506.1529. Found 506.1518.

IR ν_{max}/cm^{-1} : 2930, 1531, 1428, 1351, 1239, 1113, 961, 908, 809, 730

Ethyl ((*R*)-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)(3-nitrophenyl)methyl)(3-(methoxy(methyl)amino)-3-oxopropyl)phosphinate **III-37a**



$C_{30}H_{39}N_2O_7PSi$
 $M=598.70$ g/mol
 Yellowish oil

To a stirring deoxygenated solution of **III-31a** (4.58 g, 9.5 mmol, 1 eq) in THF (120 mL) was added at -78 °C freshly prepared LiHMDS (6.30 mL in THF (15 mL), 10.4 mmol, 1.1 eq). After 5 min, **III-26** (1.31 g, 11.4 mmol, 1.2 eq) was added to the mixture which was allowed to warm up to 25 °C within 12 h. The reaction mixture was quenched with a saturated solution of NaCl, extracted with EtOAc (3x30 mL) then combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-37a** (1.2 g, 2.0 mmol, 41% yield).

Rf = 0.41 (SiO_2 ; EtOAc; UV)

NMR 1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ : 8.00 and 7.98 (m, 2H, H_{11}) ; 7.94 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H_9) ; 7.64 (m, 4H, H_{Ar}) ; 7.55 and 7.50 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_7) ; 7.38 (m, 6H, H_{Ar}) ; 7.31 (m, 6H, H_{Ar}) ; 7.22 (m, 2H, H_{Ar}) ; 7.11 (m, 4H, H_{Ar}) ; 5.03 (d, $J_{H-P} = 9.3$ Hz, 1H, H_5) and 4.98 (d, $J_{H-P} = 12.6$ Hz, 1H, H_5) ; 3.89 (m, 4H, H_{12}) ; 3.58 and 3.54 (s, 6H, H_0) ; 3.11 and 3.09 (s, 6H, H_1) ; 2.57 (m, 4H, H_3) ; 2.01 (m, 4H, H_4) ; 1.14 (m, 6H, H_{13}) ; 1.08 and 1.06 (s, 18H, *t*-Bu)

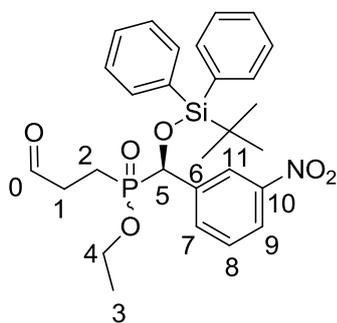
NMR ^{13}C (126 MHz; $CDCl_3$) δ : 172.4 and 172.3 (C_2) ; 147.8 and 147.7 (C_{10}) ; 139.2 and 139.1 (C_6) ; 136.1 (x4), 135.9 (x2) and 135.8 (x2) (CH_{Ar}) ; 133.6 and 133.5 (d, $J_{C-P} = 4.3$ Hz, C_7) ; 132.2, 132.1, 131.8 and 131.7 (C_{qAr}) ; 130.2 (x2), 130.1 and 130.0 (CH_{Arp}) ; 129.0 and 128.8 (C_8) ; 127.8 (x2), 127.7 (x2), 127.6 (x2) and 127.5 (x2) (CH_{Ar}) ; 122.7 and 122.6 (d, $J_{C-P} = 2.5$ Hz, C_9) ; 122.6 (d, $J_{C-P} = 4.2$ Hz, C_{11}) and 122.5 (d, $J_{C-P} = 4.9$ Hz, C_{11}) ; 74.5 (d, $J_{C-P} = 110.6$ Hz, C_5) and 74.2 (d, $J_{C-P} = 109.7$ Hz, C_5) ; 61.8 and 61.4 (d, $J_{C-P} = 7.0$ Hz, C_{12}) ; 61.3 and 61.2 (C_0) ; 32.4 (x2) (C_1) ; 27.1 and 27.0 (*t*-Bu) ; 24.3 and 24.1 (C_3) ; 19.8 and 19.1 (d, $J_{C-P} = 92.0$ Hz, C_4) ; 19.4 (x2) (C_q *t*-Bu) ; 16.7 and 16.6 (d, $J_{C-P} = 5.7$ Hz, C_{13})

NMR $^{31}P_{cpd}$ (202 MHz; $CDCl_3$) δ : 49.6 and 48.6

HRMS (ESI $^+$) m/z : Calculated for $C_{30}H_{40}N_2O_7PSi$ [$M+H$] $^+$: 599.2342. Found 599.2331.

IR ν_{max}/cm^{-1} : 2932, 1663, 1530, 1427, 1351, 1233, 1112, 1032, 910, 823, 731

Ethyl ((*R*)-((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)(3-nitrophenyl)methyl)(3-oxopropyl)phosphinate **III-38a**



$C_{28}H_{34}N_2O_6PSi$
 $M=539.63$ g/mol
 Yellowish oil

To a stirring solution of **III-37a** (1.2 g, 2.0 mmol, 1 eq) in DCM (50 mL) was added at -78 °C DIBAL (1 M in toluene, 4.0 mL, 4.0 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at -78 °C for 2 h. The reaction mixture was stopped by addition of a saturated solution of potassium (30 mL) and compound was extracted with EtOAc (3x30 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 8:2) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-38a** (849 mg, 1.57 mmol, 78% yield).

Rf = 0.57 (SiO_2 ; EtOAc ; UV)

NMR 1H (500 MHz; $CDCl_3$) δ : 9.71 and 9.68 (s, 2H, H_0) ; 8.11 and 8.04 (m, 4H, H_{11} and H_9) ; 7.69 (m, 4H, H_{Ar}) ; 7.61 and 7.58 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_7) ; 7.42 (m, 12H, H_{Ar}) ; 7.30 (t, $J_{H-P} = 7.0$ Hz, 2H, H_{Ar}) ; 7.19 (t, $J_{H-P} = 7.0$ Hz, 4H, H_{Ar}) ; 5.09 (d, $J_{H-P} = 7.9$ Hz, 1H, H_5) and 5.02 (d, $J_{H-P} = 11.9$ Hz, 1H, H_5) ; 3.87 (m, 4H, H_4) ; 2.60 (m, 4H, H_1) ; 1.98 (m, 4H, H_2) ; 1.19 (m, 6H, H_3) ; 1.13 and 1.12 (s, 18H, *t*-Bu)

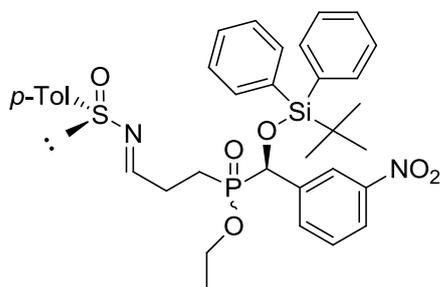
NMR ^{13}C (126 MHz; $CDCl_3$) δ : 199.1 and 199.0 (C_0) ; 148.0 (x2) (C_{10}) ; 139.1 and 139.0 (C_6) ; 136.1 (x4) and 136.0 (x4) (CH_{Ar}) ; 133.7 and 133.5 ($J_{C-P} = 4.2$ Hz, C_7) ; 132.1, 132.0 and 131.9 (x2) (C_{qAr}) ; 130.4 (x2) and 130.3 (x2) (CH_{Arp}) ; 129.1 and 129.0 (C_8) ; 128.1 (x2), 127.9 (x2), 127.8 (x2) and 127.7 (x2) (CH_{Ar}) ; 123.0 and 122.9 (d, $J_{C-P} = 2.3$ Hz, C_9) ; 122.7 and 122.5 (d, $J_{C-P} = 4.7$ Hz, C_{11}) ; 74.3 and 74.1 (d, $J_{C-P} = 110.9$ Hz, C_5) ; 62.1 and 61.7 (d, $J_{C-P} = 7.0$ Hz, C_4) ; 35.7 (d, $J_{C-P} = 3.5$ Hz, C_1) and 35.6 (d, $J_{C-P} = 4.1$ Hz, C_1) ; 27.1 (x2) (*t*-Bu) ; 19.5 and 19.4 (Cq *t*-Bu) ; 17.6 (d, $J_{C-P} = 91.7$ Hz, C_2) and 16.7 (d, $J_{C-P} = 92.8$ Hz, C_2) ; 16.8 and 16.7 (d, $J_{C-P} = 5.2$ Hz, C_3)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (202 MHz; $CDCl_3$) δ : 48.8 and 48.3

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for $C_{28}H_{35}N_2O_6PSi$ [$M+H$]⁺: 540.1971. Found 540.1960.

IR ν_{max}/cm^{-1} : 2970, 1724, 1530, 1427, 1393, 1351, 1230, 1035, 909, 822

Ethyl ((*R*)-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)(3-nitrophenyl)methyl)((*E*)-3-((*p*-tolylsulfinyl)imino)propyl)phosphinate **III-40a**

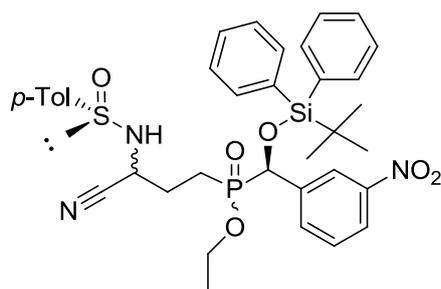


$C_{35}H_{41}N_2O_6PSSi$
 $M=676.83$ g/mol
 Yellowish oil

To a stirring solution of **III-38a** (849 mg, 1.6 mmol, 1 eq) and (*S*)-(+)-*p*-toluensulfonamide (244 mg, 1.6 mmol, 1 eq) in DCM (25 mL) was added $Ti(OEt)_4$ (1.65 mL, 7.9 mmol, 5 eq). The mixture was heated at 50 °C for 24 h. After cooling to 0 °C, water (20 mL) was added to the mixture to stop the reaction. The turbid solution was filtered through Celite and washed with DCM (3x20 mL). After decantation, the aqueous layer was extracted with DCM (3x10 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to afford crude sulfinylimine **III-40a** (919 mg, 1.36 mmol, 85% yield) used in next step without further purification.

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for $C_{35}H_{42}N_2O_6PSSi$ $[M+H]^+$: 677.2270. Found 677.2254.

Ethyl ((*R*)-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)(3-nitrophenyl)methyl)(3-cyano-3-(4-methylphenylsulfinamido)propyl)phosphinate **III-41a & **III-41a'****

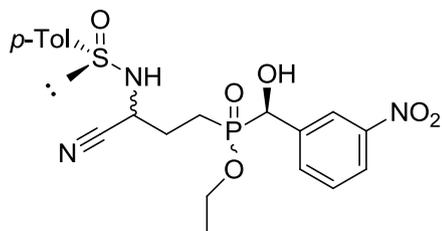


$C_{36}H_{42}N_3O_6PSSi$
 $M=703.86$ g/mol
 Yellowish solid

In a round-bottom flask was dissolved sulfinylimine **III-38a** (919 mg, 1.4 mmol, 1 eq) in THF (25 mL). In a separate Schlenk flask, to a stirring solution of diethylaluminium cyanide (6.25 mL, 6.25 mmol, 4.6 eq) was added at -78 °C *i*-PrOH (0.21 mL, 2.8 mmol, 2 eq). This solution was allowed to reach to 25 °C, stirred for 30 min, and cannulated into the solution of **III-38a** at -78 °C. The reaction mixture was brought to 25 °C, and stirred for 24 h. Then cooled to -78 °C and solution of NH_4Cl (20 mL) was added to stop the reaction. The suspension was filtered through Celite, extracted with EtOAc (3x10 mL) and washed with a saturated solution of NaCl (20 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to

afford crude **III-41a** & **III-41a'** (943 mg, 1.34 mmol) used in next step without further purification.

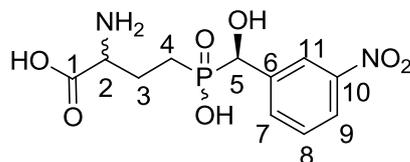
Ethyl (3-cyano-3-(4-methylphenylsulfonamido)propyl)((R)-hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate **III-42a**



$C_{20}H_{24}N_3O_6PS$
M=465.46 g/mol
Yellowish solid

To a solution of **III-41a** and **III-41a'** (932 mg, 1.3 mmol, 1 eq) in THF (25 mL) was added at 0 °C successively AcOH (0.1 mL, 1.6 mmol, 1.2 eq) and TBAF.3H₂O (507 mg, 1.6 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was maintained at 25 °C for 12 h. Water (10 mL) was added to the mixture to stop the reaction. After decantation, the aqueous phase was extracted with EtOAc (3x20 mL). The combined organic layers was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum to afford crude residue **III-42a** (1.03 g, 2.2 mmol) used in next step without further purification.

2-Amino-4-(hydroxy((*R*)-hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphoryl)butanoic acid
III-44a (1*RS*,1'*R*-LSP1-2093)



$C_{11}H_{15}N_2O_7P$
 $M=318.22$ g/mol
 Yellowish solid

A solution of **III-42a** (1.03 g, 2.2 mmol, 1 eq) in 6 M HCl (50 mL) was refluxed for 24 h. After cooling to 25 °C, solvent was evaporated under vacuum. The crude residue was dissolved in 1 M HCl and washed with EtOAc (3 x 30 mL). The water was evaporated and the residue was purified on cation exchange resin chromatography (Dowex AG 50W-X4, H^+ , 50-100 mesh). The compound was eluted with water to afford **III-44a** (76 mg, 0.24 mmol, 18% over 3 steps).

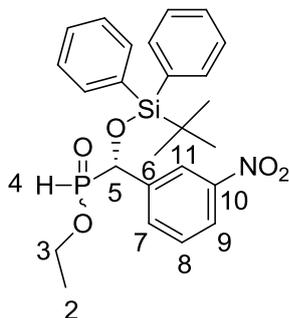
NMR 1H (500 MHz; D_2O) δ : 8.31 (s, 1H, H_{11}) ; 8.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_9) ; 7.84 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_7) ; 7.64 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_8) ; 5.04 (d, $J_{H-P} = 9.4$ Hz, 1H, H_5) ; 4.08 (m, 1H, H_2) ; 2.19 (m, 2H, H_3) ; 1.83 (m, 2H, H_4)

NMR ^{13}C (126 MHz; D_2O) δ : 172.1 (C_1) ; 147.9 (C_{10}) ; 140.2 (C_6) ; 133.5 (C_7) ; 129.5 (C_8) ; 122.7 (C_9) ; 121.6 (C_{11}) ; 72.2 (d, $J_{C-P} = 105$ Hz, C_5) ; 53.7 (d, $J_{C-P} = 12.5$ Hz, C_2) ; 23.3 (C_3) ; 22.5 and 22.4 (d, $J_{C-P} = 90.0$ Hz, C_4)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (202 MHz; D_2O) δ : 38.0

HRMS (ESI) m/z : Calculated for $C_{11}H_{14}N_2O_7P$ $[M-H]^-$: 317.0544. Found 333.0355.

LC-MS (ESI) m/z ; ($\lambda=254$ nm): $R_t = 2.71$ min ; 319.07 $[M+H]^+$; 317.05 $[M-H]^-$

Ethyl ((S)-((tert-butyl)phenylsilyloxy)(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate **III-31b**

$C_{25}H_{30}NO_5PSi$
 $M=483.57$ g/mol
 Yellowish oil

To a solution of **III-4b** (4.94 g, 22.8 mmol, 1 eq) in THF (100 mL) was added at 0 °C successively NEt_3 (6.3 mL, 45.5 mmol, 2 eq) and TBDPSCl (5.9 mL, 22.8 mmol, 1.21 eq). The reaction mixture was stirred at 25 °C for 12 h. Then, the solvent was evaporated under vacuum and the crude compound was dissolved in EtOH (80 mL). At 0 °C, PivCl (6.5 mL, 34.2 mmol, 1.5 eq) and pyridine (5.8 mL, 47.8 mmol, 2.1 eq) were added successively dropwise to the reaction mixture which was stirred for 1 h at 25 °C. After evaporation of solvent under vacuum, the crude residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 1:1) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-31b** (5.7 g, 11.8 mmol, 52% yield over 2 steps).

Rf = 0.52 (SiO_2 ; EtOAc/cyclohexane 1:1; UV)

NMR 1H (400 MHz; $CDCl_3$) δ : 8.20 (s, 1H, H_{11}) ; 8.11 and 8.10 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H_9) ; 8.05 (s, 1H, H_{11}) ; 7.69 (d, $J = 7.0$ Hz, 4H, H_{Ar}) ; 7.61 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H_7) and 7.59 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H_7) ; 7.44 (m, 12H, H_{Ar}) ; 7.34 (m, 2H, H_{Ar}) ; 7.23 (m, 4H, H_{Ar}) ; 6.96 (d, $J_{H-P} = 558$ Hz, 1H, H_4) and 6.90 (d, $J_{H-P} = 558$ Hz, 1H, H_4) ; 5.07 (d, $J_{H-P} = 5.4$ Hz, 1H, H_5) and 4.97 (d, $J_{H-P} = 9.6$ Hz, 1H, H_5) ; 4.01 (m, 4H, H_3) ; 1.23 (m, 6H, H_2) ; 1.15 and 1.13 (s, 18H, *t*-Bu)

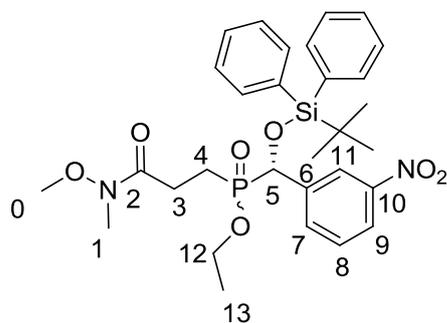
NMR ^{13}C (100 MHz; $CDCl_3$) δ : 148.2 and 148.1 (C_{10}) ; 137.8 and 137.5 (C_6) ; 136.0 (x4), 135.9 (x2) and 135.8 (x2) (CH_{Ar}) ; 133.6 and 133.3 (d, $J_{C-P} = 4.2$ Hz, C_7) ; 132.1, 132.0, 131.8 and 131.7 (C_{qAr}) ; 130.6, 130.4 (x2) and 130.3 (CH_{Arp}) ; 129.4 and 129.2 (C_8) ; 128.1 (x2), 128.0 (x4) and 127.9 (x2) (CH_{Ar}) ; 123.3 and 123.2 (C_9) ; 122.5 (d, $J_{C-P} = 5.4$ Hz, C_{11}) and 122.4 (d, $J_{C-P} = 4.4$ Hz, C_{11}) ; 73.5 (d, $J_{C-P} = 115.3$ Hz, C_5) and 73.1 (d, $J_{C-P} = 112.4$ Hz, C_5) ; 63.5 and 63.2 (d, $J_{C-P} = 7.4$ Hz, C_3) ; 27.0 and 26.9 (*t*-Bu) ; 19.5 (x2)(Cq *t*-Bu) ; 16.1 and 16.0 (d, $J_{C-P} = 3.0$ Hz, C_2)

NMR $^{31}P_{cpd}$ (161 MHz; $CDCl_3$) δ : 31.9 and 31.4

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for $C_{25}H_{30}NO_5PSiNa$ [$M+Na$]⁺: 506.1529. Found 506.1523.

IR ν_{max}/cm^{-1} : 2932, 2860, 1530, 1347, 1236, 1107, 1045, 907, 733, 702, 502

Ethyl ((*S*)-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)(3-nitrophenyl)methyl)(3-(methoxy(methyl)amino)-3-oxopropyl)phosphinate **III-37b**



$C_{30}H_{39}N_2O_7PSi$
 $M=598.70$ g/mol
 Yellowish oil

To a stirring deoxygenated solution of **III-31** (5.39 g, 11.2 mmol, 1 eq) in THF (150 mL) was added at -78 °C freshly prepared LiHMDS (10.3 mL in THF (15 mL), 12.3 mmol, 1.1 eq). After 5 min, **III-26** (1.54 g, 13.4 mmol, 1.2 eq) was added to the mixture which was allowed to warm up to 25 °C within 12 h. The reaction mixture was quenched with a saturated solution of NaCl, extracted with EtOAc (3x30 mL) then combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-37b** (2.45 g, 4.1 mmol, 37% yield).

Rf = 0.49 (SiO_2 ; EtOAc ; UV)

NMR 1H (400 MHz; $CDCl_3$) δ : 8.03 (m, 4H, H_{11} et H_9) ; 7.70 (m, 4H, H_{Ar}) ; 7.61 and 7.56 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_7) ; 7.38 (m, 12H, H_{Ar}) ; 7.29 (m, 2H, H_{Ar}) ; 7.18 (m, 4H, H_{Ar}) ; 5.08 (d, $J_{H-P} = 9.2$ Hz, 1H, H_5) and 5.04 (d, $J_{H-P} = 12.7$ Hz, 1H, H_5) ; 3.93 (m, 4H, H_{12}) ; 3.61 and 3.51 (s, 6H, H_0) ; 3.18 and 3.16 (s, 6H, H_1) ; 2.62 (m, 4H, H_3) ; 2.07 (m, 4H, H_4) ; 1.21 (m, 6H, H_{13}) ; 1.14 and 1.13 (s, 18H, *t*-Bu)

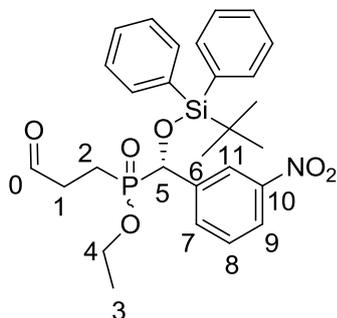
NMR ^{13}C (100 MHz; MeOD) δ : 172.4 and 172.3 (C_2) ; 148.0 (x2) (C_{10}) ; 139.1 and 139.0 (C_6) ; 136.1 (x4) and 136.0 (x4) (CH_{Ar}) ; 133.7 and 133.6 ($J_{C-P} = 4.2$ Hz, C_7) ; 132.1, 132.0 and 131.9 (x2) (C_{qAr}) ; 130.5 (x2) and 130.3 (x2) (CH_{Arp}) ; 129.2 and 129.0 (C_8) ; 128.1 (x2), 128.0 (x2), 127.9 (x2) and 127.8 (x2) (CH_{Ar}) ; 123.1 and 123.0 (d, $J_{C-P} = 2.2$ Hz, C_9) ; 122.7 and 122.6 (d, $J_{C-P} = 4.7$ Hz, C_{11}) ; 74.3 and 74.1 (d, $J_{C-P} = 110.8$ Hz, C_5) ; 62.2 and 61.7 (d, $J_{C-P} = 7.0$ Hz, C_{12}) ; 61.4 and 61.3 (C_0) ; 32.6 (x2) (C_1) ; 27.1 (x2) (*t*-Bu) ; 24.5 and 24.3 (C_3) ; 19.6 and 19.5 ($C_{q t}$ -Bu) ; 17.7 (d, $J_{C-P} = 92.0$ Hz, C_4) and 16.7 (d, $J_{C-P} = 92.7$ Hz, C_4) ; 16.8 and 16.7 (d, $J_{C-P} = 5.2$ Hz, C_{13})

NMR $^{31}P_{cpd}$ (161 MHz; MeOD) δ : 49.6 and 48.6

HRMS (ESI $^+$) m/z : Calculated for $C_{30}H_{39}N_2O_7PSiNa$ [$M+Na$] $^+$: 621.2162. Found 621.2156.

IR ν_{max}/cm^{-1} : 2933, 2862, 1664, 1528, 1350, 1233, 1110, 1031, 824, 698, 502

Ethyl ((*S*)-((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)(3-nitrophenyl)methyl)(3-oxopropyl)phosphinate **III-38b**



$C_{28}H_{34}N_2O_6PSi$
 $M=539.63$ g/mol
 Yellowish oil

To a stirring solution of **III-37b** (2.39 g, 4.0 mmol, 1 eq) in DCM (70 mL) was added at -78 °C DIBAL (1 M in toluene, 8.0 mL, 8.0 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at -78 °C for 2 h. The reaction mixture was stopped by addition of a saturated solution of potassium (40 mL) and compound was extracted with EtOAc (3x30 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/cyclohexane 8:2) to afford a mixture of 2 diastereomers **III-38b** (1.51 g, 2.80 mmol, 70% yield).

Rf = 0.44 (SiO₂; EtOAc ; UV)

NMR ¹H (400 MHz; CDCl₃) δ : 9.72 and 9.60 (s, 2H, H₀) ; 8.11 and 8.05 (m, 4H, H₁₁ and H₉) ; 7.70 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H, H_{Ar}) ; 7.60 (m, 2H, H₇) ; 7.42 (m, 12H, H_{Ar}) ; 7.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_{Ar}) ; 7.19 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H, H_{Ar}) ; 5.09 (d, $J_{H-P} = 8.4$ Hz, 1H, H₅) and 5.02 (d, $J_{H-P} = 12.2$ Hz, 1H, H₅) ; 3.90 (m, 4H, H₄) ; 2.60 (m, 4H, H₁) ; 1.97 (m, 4H, H₂) ; 1.19 (m, 6H, H₃) ; 1.12 (s, 18H, *t*-Bu)

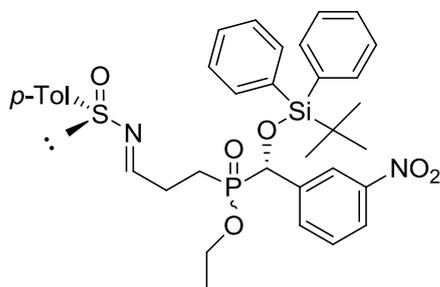
NMR ¹³C (100 MHz; CDCl₃) δ : 199.1 and 199.0 (C₀) ; 148.0 (x2) (C₁₀) ; 139.1 and 139.0 (C₆) ; 136.1 (x4) and 136.0 (x4) (CH_{Ar}) ; 133.7 and 133.6 ($J_{C-P} = 4.4$ Hz, C₇) ; 132.1, 132.0 and 131.9 (x2) (C_{qAr}) ; 130.5 (x2) and 130.3 (x2) (CH_{Arp}) ; 129.2 and 129.0 (C₈) ; 128.1 (x2), 128.0 (x2), 127.8 (x2) and 127.7 (x2) (CH_{Ar}) ; 123.1 and 123.0 (d, $J_{C-P} = 2.2$ Hz, C₉) ; 122.7 (d, $J_{C-P} = 4.5$ Hz, C₁₁) and 122.6 (d, $J_{C-P} = 5.1$ Hz, C₁₁) ; 74.3 and 74.1 (d, $J_{C-P} = 110.7$ Hz, C₅) ; 62.2 and 61.7 (d, $J_{C-P} = 7.1$ Hz, C₄) ; 35.8 (d, $J_{C-P} = 3.6$ Hz, C₁) and 35.7 (d, $J_{C-P} = 4.3$ Hz, C₁) ; 27.1 (x2) (*t*-Bu) ; 19.6 and 19.5 (C_q *t*-Bu) ; 17.7 (d, $J_{C-P} = 92.0$ Hz, C₂) and 16.7 (d, $J_{C-P} = 92.9$ Hz, C₂) ; 16.8 and 16.7 (d, $J_{C-P} = 5.4$ Hz, C₃)

NMR ³¹P_{cpd} (161 MHz; CDCl₃) δ : 48.8 and 48.3

HRMS (ESI⁺) m/z : Calculated for $C_{28}H_{34}N_2O_6PSiNa$ [M+Na]⁺: 562.1791. Found 562.1785.

IR ν_{max}/cm^{-1} : 2952, 1760, 1738, 1598, 1493, 1440, 1199, 1177, 1090

Ethyl ((*S*)-((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)(3-nitrophenyl)methyl)((*E*)-3-((*p*-tolylsulfinyl)imino)propyl)phosphinate **III-40b**

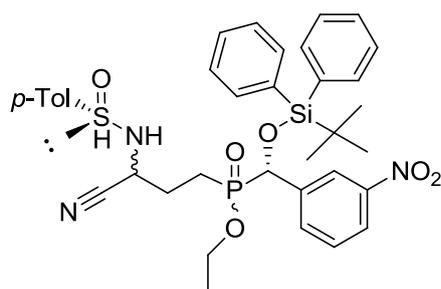


$C_{35}H_{41}N_2O_6PSSi$
 $M=676.83$ g/mol
 Yellowish oil

To a stirring solution of **III-38b** (1.36 g, 2.5 mmol, 1 eq) and (*S*)-(+)-*p*-toluensulfonamide (400 mg, 2.5 mmol, 1 eq) in DCM (40 mL) was added $Ti(OEt)_4$ (2.7 mL, 12.9 mmol, 5 eq). The mixture was heated at 50 °C for 24 h. After cooling to 0 °C, water (20 mL) was added to the mixture to stop the reaction. The turbid solution was filtered through Celite and washed with DCM (3x30 mL). The organic and aqueous layers were separated and the aqueous layer was extracted with DCM (3x30 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to afford crude sulfinylimine **III-40b** (1.79 mg, 2.6 mmol, quantitative yield) used in next step without further purification.

LC-MS: 2.77 min; $[M]^+ = 676.94$

Ethyl ((*S*)-((*tert*-butyldiphenylsilyloxy)(3-nitrophenyl)methyl)(3-cyano-3-(4-methylphenylsulfinamido)propyl)phosphinate **III-41b & **III-41b'****



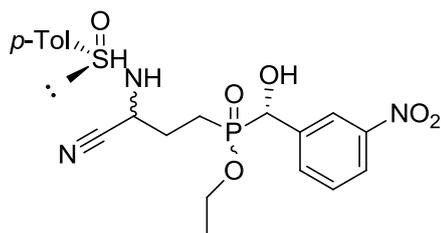
$C_{36}H_{42}N_3O_6PSSi$
 $M=703.86$ g/mol
 Yellowish solid

In a round-bottom flask was dissolved sulfinylimine **III-40b** (1.7 g, 2.5 mmol, 1 eq) in THF (30 mL). In a separate Schlenk flask, to a stirring solution of diethylaluminium cyanide (11.6 mL, 11.6 mmol, 4.6 eq) was added at -78 °C *i*-PrOH (0.38 mL, 5.0 mmol, 2 eq). This solution was allowed to reach to 25 °C, stirred for 30 min, and cannulated into the solution of **III-40b** at -78 °C and the reaction mixture was brought to 25 °C, and stirred for 24 h. The reaction mixture was cooled to -78 °C and a saturated solution of NH_4Cl (30 mL) was added to stop the reaction. The suspension was filtered through Celite, extracted with EtOAc (3x30 mL) and washed with a

saturated solution of NaCl (20 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to afford crude **III-41b** & **III-41b'** (1.68 g, 2.4 mmol) used in next step without further purification.

LC-MS: 2.65 min; [M]⁺ = 703.93

Ethyl (3-cyano-3-(4-methylphenylsulfonamido)propyl)((S)-hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphinate **III-42b**

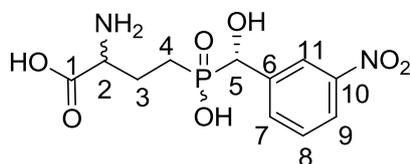


C₂₀H₂₄N₃O₆PS
M=465.46 g/mol
Yellowish solid

To a solution of **III-41b** and **III-41b'** (1.68 g, 2.4 mmol, 1 eq) in THF (25 mL) was added at 0 °C successively AcOH (0.15 mL, 2.64 mmol, 1.1 eq) and TBAF (1 M in THF, 2.64 mL, 2.64 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was maintained at 25 °C for 12 h. Water (10 mL) was added to the mixture to stop the reaction. The organic and aqueous layers were separated and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3x30 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum to afford crude residue **III-42b** (929 mg, 2.0 mmol) used in next step without further purification.

LC-MS: 1.75 min; [M-H]⁻ = 463.92

2-Amino-4-(hydroxy((S)-hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)phosphoryl)butanoic acid **III-44b (1*RS*,1'*S*-LSP1-2093)**



C₁₁H₁₅N₂O₇P
M=318.22 g/mol
Yellowish solid

A solution of **III-42b** (929 mg, 2.0 mmol, 1 eq) in 6 M HCl (50 mL) was refluxed for 24 h. After cooling to 25 °C, solvent was evaporated under vacuum. The crude residue was dissolved in 1 M HCl and washed with EtOAc (3x30 mL). The water was evaporated and the residue was purified on cation exchange resin chromatography (Dowex AG 50W-X4, H⁺, 50-100 mesh). The compound was eluted with water to afford **III-44b** (23 mg, 0.07 mmol, 3% over 3 steps).

NMR ^1H (500 MHz; D_2O) δ : 8.32 (s, 1H, H_{11}) ; 8.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_9) ; 7.85 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_7) ; 7.65 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_8) ; 5.03 (d, $J_{\text{H-P}} = 9.9$ Hz, 1H, H_5) ; 4.07 (m, 1H, H_2) ; 2.20 (m, 2H, H_3) ; 1.81 (m, 2H, H_4)

NMR ^{13}C (126 MHz; D_2O) δ : 172.2 (C_1) ; 147.9 (C_{10}) ; 140.3 (C_6) ; 133.5 (C_7) ; 129.5 (C_8) ; 122.7 (C_9) ; 121.6 (C_{11}) ; 72.3 (d, $J_{\text{C-P}} = 106$ Hz, C_5) ; 53.9 (d, $J_{\text{C-P}} = 13.9$ Hz, C_2) ; 23.6 (C_3) ; 22.6 and 22.4 (dd, $J_{\text{C-P}} = 89.5$ Hz, C_4)

NMR $^{31}\text{P}_{\text{cpd}}$ (202 MHz; D_2O) δ : 37.7

HRMS (ESI) m/z : Calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M-H}]^-$: 317.0544. Found 317.0544.

LC-MS (ESI) m/z ; ($\lambda=254$ nm): $R_t = 2.74$ min ; 319.07 $[\text{M+H}]^+$; 317.05 $[\text{M-H}]^-$

Résumé : Conception et synthèse de nouveaux agonistes de récepteurs métabotropiques du glutamate

Mots-clés : récepteurs métabotropiques du glutamate, agoniste, relation structure-activité et acides phosphiniques

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central. Il est responsable de la majorité des transmissions synaptiques. En revanche, cet acide aminé naturel est aussi impliqué dans de nombreuses neuropathologies notamment en cas de surconcentration au niveau des synapses. Les récepteurs métabotropiques du glutamate, capables de moduler la transmission synaptique, constituent des cibles thérapeutiques prometteuses. Ces récepteurs sont divisés en trois groupes et notre laboratoire s'est focalisé sur ceux du groupe III et particulièrement le sous-type 4 qui présente des caractéristiques intéressantes dans le traitement symptomatique de la douleur et de la maladie de Parkinson. Le manque d'outils pharmacologiques de ce récepteur nous a poussé à synthétiser de nouveaux agonistes orthostériques à partir du composé référence, le LSP4-2022. Cette molécule est issue de nombreuses optimisations chimiques du (S)-PCEP provenant lui d'un screening virtuel. Durant ces trois années de doctorat, nous avons pu peaufiner la relation structure-activité autour du LSP4-2022 en synthétisant des nouveaux analogues fluorés et hétérocycliques. En parallèle, une seconde étude nous a permis d'attribuer la configuration des deux diastéréomères constituant tous les composés testés à ce jour.

Summary : Design and synthesis of metabotropic glutamate receptors agonists

Keywords : metabotropic glutamate receptors, agonist, structure-activity relationship and phosphinic acids

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system. It is responsible of the majority of synaptic transmissions. In contrast, this natural amino acid is also involved in numerous neuropathologies and particularly in case of glutamate overconcentration in the synapse. Metabotropic glutamate receptors, that can modulate synaptic transmission, thus constitute promising therapeutic targets. These receptors are divided in three groups and our laboratory has been focused in group III and especially subtypes 4 which own interested properties in symptomatic treatment of pain and Parkinson Disease. The lack of pharmacological tools targeting this receptor prompts us to synthesize novel orthosteric agonist from the hit compound LSP4-2022. This molecule was obtained after several chemical optimizations from (S)-PCEP discovered from virtual screening. During my Ph.D., we could refine the structure-activity relationship of LSP4-2022 synthesizing new fluorinated and heterocyclic derivatives. Besides, a second study was carried out to identify the configuration of the two diastereomers which form tested compounds.