

PASCALL GIGUÈRE

**SYNTHÈSE BIOCATALYTIQUE
D'HÉTÉROCYCLES AZOTÉS**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en chimie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE CHIMIE
FACULTÉ DES SCIENCES ET GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

D'un devoir accompli, une étincelle s'y enfuit,

Elle en donne la vie, de laquelle je surgis,

Grâce à ton énergie c'est accompli,

Repose en paix au paradis.

Line Chamberland

1955-1997

Résumé

Les projets présentés dans cet ouvrage ont été le fruit d'une collaboration université-industrie auxquelles ont participé activement le laboratoire du Professeur Robert Chênevert du département de chimie de l'Université Laval ainsi que la compagnie OmegaChem Inc. Cette dernière se spécialise dans la synthèse et la distribution de produits de chimie fine dont les dérivés fluorés de la proline mais elle exploite également un volet de synthèse sur demande pour la recherche pharmaceutique actuelle.

Les travaux réalisés se subdivisent en trois projets principaux dont : la synthèse énantiosélective de dérivés de l' α -méthylsérinol, la synthèse énantiosélective de pyrrolidines 2,5-disubstituées et de pipéridines 2,6-disubstituées ainsi que la synthèse énantiosélective d'hydroxyprolines.

Le premier projet consistait à développer des dérivés chiraux de l' α -méthylsérinol par voie de synthèse chimio-enzymatique. Les dérivés du *N,O*-isopropylidène- α -méthylsérinol chiraux sont des synthons qui peuvent faire partie d'une multitude de synthèses énantiosélectives due à leur polyfonctionnalisation. Ces intermédiaires de synthèse présentent donc un potentiel de commercialisation qui ne demande qu'à être exploré.

Le second projet consistait à développer des pyrrolidines 2,5-disubstituées chirales ainsi que des pipéridines 2,6-disubstituées également par voie de synthèse chimio-enzymatique. Ces hétérocycles azotés ont un potentiel commercial relié à leur utilité dans la synthèse de composés bioactifs pharmaceutiques.

Dans le dernier projet, l'objectif était de développer des dérivés de la 3-hydroxyproline chiraux par voie biocatalytique grâce à l'utilisation combinée d'enzymes et de levures. La spécialisation de la compagnie OmegaChem Inc. dans le développement de dérivés de la proline justifiait l'exploration de voies de synthèses biocatalytiques des dérivées de la proline à des fins commerciales.

Remerciements

En tout premier lieu, je voudrais remercier mon directeur de recherche, le professeur Robert Chênevert, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. L'opportunité qu'il m'a offerte m'a permis de parfaire mes compétences en chimie organique mais également d'acquérir l'expérience nécessaire à l'intégration du marché du travail. De plus, je tiens à souligner le soutien financier de la compagnie OmegaChem Inc. qui a été indispensable à la réalisation de cet ouvrage.

La réalisation de ces projets n'aurait été possible sans l'apport d'une personne dévouée et disponible qu'a été le co-directeur de recherche Mohammed Dasser (Ph.D.). Ce dernier, de concert avec le professeur Chênevert, a assuré non seulement l'orientation des projets mais aussi ma motivation grâce à ses précieux conseils tout au long de ces deux années. Je suis d'autant plus reconnaissant pour la confiance qu'il a eu en moi et l'effort qu'il a mis afin que je joigne son équipe de recherche actuelle au sein de la compagnie OmegaChem Inc.

Sans aucun doute, l'inoubliable harmonie avec mes collègues de laboratoire a fait de ces deux années d'études supérieures les plus plaisantes de mon cheminement scolaire. Je les remercie pour leurs conseils et leur dévouement à mon égard. Ils ont été d'excellentes personnes avec lesquelles j'ai développé une amitié irremplaçable. Sans aucun doute, j'apprécierai grandement de travailler avec ces gens. Je crois qu'il est également important de souligner l'active participation de Dr Feu Dave Caron dans le cadre du projet relatif aux pipéridines. À tous ces collègues, les plus proches comme les plus éloignés, je vous souhaite une merveilleuse carrière.

Somme toute, je ne pourrais terminer sans remercier ma conjointe qui a su me supporter dans les moments les plus difficiles de ma vie. Je veux aussi mentionner l'effort d'une mère qui a tout fait au cours de sa vie pour que je réussisse. J'aimerais surtout lui dire que je suis maintenant un être accompli, digne et fier de ce qu'elle m'a enseigné avant son départ.

Table des matières

CHAPITRE I : INTRODUCTION	2
LA BIOCATALYSE	2
1.2 LES BIOCATALYSEURS : LES ENZYMES	3
1.2.1 Structure des enzymes	4
1.2.2 Forme des enzymes	5
1.2.3 Classifications des enzymes	5
1.2.3.1 Les oxydo-réductases	6
1.2.3.2 Les hydrolases	8
1.3 LES MODÈLES EMPIRIQUES DE PRÉDICTION	11
1.3.1 Les cétones	12
1.3.2 Les alcools primaires	12
1.3.3 Les alcools secondaires	12
1.3.4 Les esters carboxyliques	13
1.4 LA TRANSESTÉRIFICATION ENZYMATIQUE STÉRÉOSÉLECTIVE	13
1.4.1 Les agents acylants	14
1.5 LES MÉTHODES BIOCATALYTIQUES D'OBTENTION DE COMPOSÉS ÉNANTIOMÉRIQUEMENT PURS	16
1.5.1 Les dédoublements cinétiques enzymatiques de composés racémiques	16
1.5.1.1 Le dédoublement cinétique	16
1.5.2 La synthèse asymétrique biocatalytique	18
1.5.2.1 La bioréduction catalytique	18
1.5.2.2 La désymétrisation	18
CHAPITRE II : SYNTHÈSE ÉNANTIOSÉLECTIVE DE DÉRIVÉS DE L'ALPHA- MÉTHYLSÉRINOL	20
2.1 SOURCE ET FONCTION (UTILITÉ) DE LA SÉRINE	20
2.2 LA SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS CHIRAUX DE LA SÉRINE	22
2.2.1 Les <i>N</i> -Boc- <i>N,O</i> -isopropylidènesérinaldéhydes chiraux	22
2.2.1.2 Préparation des <i>N</i> -Boc- <i>N,O</i> -isopropylidènesérinaldéhydes chiraux	22
2.2.1.3 Les applications des <i>N</i> -Boc- <i>N,O</i> -isopropylidènesérinaldéhydes chiraux	25
2.2.2. Les <i>N</i> -Boc- <i>N,O</i> -isopropylidène- α -méthylsérinaldéhydes chiraux	26
2.2.2.1 Préparation des <i>N</i> -Boc- <i>N,O</i> -isopropylidène- α -méthylsérinaldéhydes chiraux	26
2.2.2.2 Les applications des <i>N</i> -Boc- <i>N,O</i> -isopropylidène- α -méthylsérinaldéhydes chiraux	29
2.3 STRATÉGIES ET MÉTHODES SÉLECTIONNÉES	30
2.4 RÉSULTATS DE LA SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS CHIRAUX DE L'ALPHA-MÉTHYLSÉRINOL	32
2.4.1 Désymétrisation enzymatique du <i>N</i> -Boc-2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol	32
2.4.2 Synthèse et dédoublement enzymatique du <i>N</i> -Boc- <i>N,O</i> -isopropylidène- α - méthylsérinol et de son ester correspondant	35
2.4.3 Synthèse et dédoublement enzymatique du 1-(4-(hydroxyméthyl)-2,2,4- triméthylloxazolidin-3-yl)butan-1-one et de son ester correspondant	37
2.5 CONCLUSION	40
CHAPITRE III : SYNTHÈSE ÉNANTIOSÉLECTIVE DE PYRROLIDINES 2,5- DISUBSTITUÉES ET DE PIPÉRIDINES 2,6-DISUBSTITUÉES	42
3.1 NOMENCLATURE DES PYRROLIDINES ET DES PIPÉRIDINES	42
3.2 SOURCES NATURELLES ET ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES PYRROLIDINES ET DES PIPÉRIDINES ..	42
3.3 PRÉPARATION DES PYRROLIDINES ET DES PIPÉRIDINES	44

3.3.1 Synthèse des pyrrolidines	44
3.3.1.1 Synthèse enzymatique des pyrrolidines 2,5-disubstituées	45
3.3.1.2 Les applications des pyrrolidines 2,5-disubstituées	48
3.3.2 Synthèse des pipéridines	48
3.3.2.1 Synthèse enzymatique des pipéridines 2,6-disubstituées	50
3.3.2.2 Les applications des dérivés de pipéridines	51
3.4 STRATÉGIE ET MÉTHODES SÉLECTIONNÉES	52
3.5 RÉSULTATS DE LA SYNTHÈSE DES PYRROLIDINES ET DES PIPÉRIDINES	54
3.5.1 Synthèse des pyrrolidines 2,5-disubstituées	54
3.5.1.1 Désymétrisation du <i>cis</i> -diméthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate.....	56
3.5.1.2 Désymétrisation du <i>cis</i> -diéthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate.....	58
3.5.1.3 Analyse d'excès énantiomères du monoacide (+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 19 et (+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 20 par formation de dérivés chiraux	59
3.5.1.4 Désymétrisation du <i>cis</i> -1- <i>tert</i> -butyl 2,5-diméthyl et diéthyl pyrrolidine-1,2,5-tricarboxylate	61
3.5.1.5 Détermination de la configuration absolue des acides (+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 25 et (+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 26	62
3.5.1.6 Désymétrisation du <i>tert</i> -butyl 2,5-bis(hydroxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate... 63	
3.5.1.7 Désymétrisation du <i>tert</i> -butyl 2,5-bis(acétoxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate ... 64	
3.5.1.8 Détermination de la configuration absolue du monoacétate (-)-(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 27	66
3.5.2 Préparation de l'acide 2-carboxylique (2 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-6-(acétoxyméthyl)-1-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)pipéridine	67
3.5.2.1 Détermination de la configuration absolue de l'acide (+)-(2 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)- 37	68
3.5.3 CONCLUSION	70
CHAPITRE IV : SYNTHÈSE ÉNANTIOSÉLECTIVE D'HYDROXYPROLINE	75
4.1 SOURCE ET FONCTION DE LA PROLINE ET DE SES DÉRIVÉS HYDROXYLÉS	75
4.2 SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE LA PROLINE	77
4.2.1 Synthèse enzymatique d'hydroxyproline	79
4.2.2 Les applications de la proline et de ses dérivés hydroxylés	81
4.3 STRATÉGIE ET MÉTHODES SÉLECTIONNÉES	82
4.4 RÉSULTATS DE LA SYNTHÈSE DU <i>N</i> -BOC-(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-3-HYDROXYPROLINE	83
4.4.1 Synthèse du 1- <i>tert</i> -butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate.....	83
4.4.2 Bioréduction du 1- <i>tert</i> -butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate	85
4.4.3 Séparation des isomères <i>cis</i> et <i>trans</i> <i>N</i> -Boc-(±)-3-hydroxyproline par lactonisation . 87	
4.4.4 Dédoublage cinétique du (±)- <i>cis</i> -1- <i>tert</i> -butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrrolidine-1,2-dicarboxylate par acylation et hydrolyse enzymatique	87
4.4.5 Dédoublage cinétique du (±)- <i>trans</i> -1- <i>tert</i> -butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrrolidine-1,2-dicarboxylate par acylation et hydrolyse enzymatique.....	89
4.4.6 Préparation de la (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-3-hydroxyproline.....	90
4.4.7 CONCLUSION	92
CONCLUSION GÉNÉRALE	95
PARTIE EXPÉRIMENTALE	98
5.1 APPAREILS ET CARACTÉRISATION	98
5.2 PARTIE EXPÉRIMENTALE RELATIVE AU CHAPITRE 2	99
5.2.1 Désymétrisation enzymatique du <i>N</i> -Boc-2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol.....	99
5.2.2 Synthèse et dédoublement enzymatique du <i>N</i> -Boc- <i>N</i> , <i>O</i> -isopropylidène- α -méthylsérinol et de son ester correspondant	104

5.2.3 Synthèse et dédoublement enzymatique du 1-(4-(hydroxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidin-3-yl)butan-1-one et de son ester correspondant	111
5.3 PARTIE EXPÉRIMENTALE RELATIVE AU CHAPITRE 3	117
5.3.1 Synthèse des pyrrolidines 2,5-disubstituées	117
5.3.2 Désymétrisation du <i>cis</i> -diméthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate.....	124
5.3.3 Désymétrisation du <i>cis</i> -diéthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate.....	126
5.3.4 Synthèse des monoacides racémiques <i>N</i> -Bn (±)- <i>cis</i> - 19 et (±)- <i>cis</i> - 20	127
5.3.5 Désymétrisation du <i>cis</i> -1- <i>tert</i> -butyl 2,5-diméthyl et diéthyl pyrrolidine-1,2,5-tricarboxylate	129
5.3.6 Synthèse des monoacides racémiques <i>N</i> -Boc (±)- <i>cis</i> - 25 et (±)- <i>cis</i> - 26	132
5.3.7 Détermination de la configuration absolue des acides ((+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 25 et ((+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 26)	133
5.3.8 Désymétrisation du <i>tert</i> -butyl 2,5-bis(hydroxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate ...	134
5.3.9 Désymétrisation du <i>tert</i> -butyl 2,5-bis(acétoxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate	137
5.3.10 Détermination de la configuration absolue du monoacétate (-)-(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 27	140
5.3.11 Préparation de l'acide <i>cis</i> -2-carboxylique 6-(acétoxyméthyl)-1-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)pipéridine	142
5.3.12 Détermination de la configuration absolue de l'acide (+)-(2 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)- 37	149
5.4 PARTIE EXPÉRIMENTALE RELATIVE AU PROJET 4	151
5.4.1 Synthèse du 1- <i>tert</i> -butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate.....	151
5.4.2 Bioréduction du 1- <i>tert</i> -butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate	158
5.4.3 Séparation des isomères <i>cis</i> et <i>trans</i> <i>N</i> -Boc-(±)-3-hydroxyproline par lactonisation	160
5.4.4 Dédoublement cinétique du (±)- <i>cis</i> -1- <i>tert</i> -butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrrolidine-1,2-dicarboxylate par acylation et hydrolyse enzymatique	163
5.4.5 Dédoublement cinétique du <i>trans</i> -(±)-1- <i>tert</i> -butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrrolidine-1,2-dicarboxylate par acylation et hydrolyse enzymatique	168
5.4.6 Préparation du (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-1- <i>tert</i> -butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrrolidine-1,2-dicarboxylate..	171
BIBLIOGRAPHIE.....	173

Liste des tableaux

TABLEAU 1. TAUX DE CONVERSION (%), TAUX DE MONOACÉTATE DANS LE MÉLANGE FINAL (3/(3+4)), TEMPS DE RÉACTION (H) ET EXCÈS ÉNANTIOMÈRES MESURÉS* SUR LE MONOACÉTATE 3 (EE ₃) LORS D'ESSAIS D'ACYLATIONS ENZYMATIQUES RÉALISÉS AVEC DIVERSES LIPASES..	33
TABLEAU 2. TAUX DE CONVERSION (%), TEMPS DE RÉACTION (H) ET EXCÈS ÉNANTIOMÈRES MESURÉS* SUR LE MONOACÉTATE 3 (EE ₃) LORS D'ESSAIS D'HYDROLYSES ENZYMATIQUES RÉALISÉS AVEC DIVERSES LIPASES.	34
TABLEAU 3. TEMPS DE RÉACTION (H), TAUX DE CONVERSION (%), [ALPHA] _D DE L'ALCOOL 6 ET DE L'ACÉTATE 5, RATIO ÉNANTIOMÈRES (E) ET EXCÈS ÉNANTIOMÈRES MESURÉS* SUR L'ALCOOL 6 (EE ₆) ET L'ACÉTATE 5 (EE ₅) LORS D'ESSAIS D'HYDROLYSES ENZYMATIQUES RÉALISÉS AVEC DIVERSES LIPASES.	36
TABLEAU 4. TEMPS DE RÉACTION (H), TAUX DE CONVERSION (%), [ALPHA] _D DE L'ALCOOL 6 ET DE L'ACÉTATE 5, RATIO ÉNANTIOMÈRES (E) ET EXCÈS ÉNANTIOMÈRES MESURÉS* SUR L'ALCOOL 6 (EE ₆) ET L'ACÉTATE 5 (EE ₅) LORS D'ESSAIS D'ACYLATIONS ENZYMATIQUES RÉALISÉS AVEC DIVERSES LIPASES..	36
TABLEAU 5. TEMPS DE RÉACTION (H), TAUX DE CONVERSION (%), [ALPHA] _D DE L'ALCOOL 9 ET DE L'ESTER 8, RATIO ÉNANTIOMÈRES (E) ET EXCÈS ÉNANTIOMÈRES MESURÉS* SUR L'ALCOOL 9 ET L'ESTER 8 LORS D'ESSAIS D'HYDROLYSES ENZYMATIQUES RÉALISÉS AVEC ANL ET CRL..	39
TABLEAU 6. CONDITIONS DU MILIEU AQUEUX, TEMPS DE RÉACTION(H), RENDEMENT (%) ET EXCÈS ÉNANTIOMÈRES* (EE ₍₊₎₋₁₉) MESURÉS SUR LE PRODUIT (+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-19 LORS DE L'HYDROLYSE DU DIESTER 13 AVEC DIVERSES LIPASES..	57
TABLEAU 7. CONDITIONS DU MILIEU AQUEUX, TEMPS DE RÉACTION(H), RENDEMENT (%) ET EXCÈS ÉNANTIOMÈRES (EE ₍₊₎₋₂₀) MESURÉS SUR LE PRODUIT (+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-20 LORS DE L'HYDROLYSE DU DIESTER <i>CIS</i> -14 AVEC DIVERSES LIPASES.....	59
TABLEAU 8. TEMPS DE RÉACTION (H), RENDEMENT (%) ET EXCÈS ÉNANTIOMÈRES MESURÉS (EE) LORS DE LA DÉSYMÉTRISATION DES SUBSTRATS <i>CIS</i> -15 ET <i>CIS</i> -16 PAR HYDROLYSE AVEC DIVERSES LIPASES.	62
TABLEAU 9. TEMPS DE RÉACTION (H), TAUX DE CONVERSION (%), POURCENTAGE DE MONO/(MONO +DI) ET EXCÈS ÉNANTIOMÈRES MESURÉS LORS DE LA DÉSYMÉTRISATION PAR ACYLATION DU DIOL <i>CIS</i> -17.....	64
TABLEAU 10. TEMPS DE RÉACTION (H), TAUX DE CONVERSION (%), POURCENTAGE DE MONO/(MONO +DI) ET EXCÈS ÉNANTIOMÈRES MESURÉS LORS DE LA DÉSYMÉTRISATION PAR HYDROLYSE DU DIACÉTATE <i>CIS</i> -18.	66
TABLEAU 11. TEMPS DE RÉACTION (H), CONCENTRATION DU SUBSTRAT (G/L) ET EXCÈS ÉNANTIOMÈRES MESURÉS (EE _{<i>CIS</i>-47}) LORS DE LA BIORÉDUCTION DE LA CÉTONE 40 AVEC DES LEVURES DE MARQUES DIFFÉRENTES.....	86
TABLEAU 12. TEMPS DE RÉACTION (H), TAUX DE CONVERSION DU SUBSTRAT (%), RATIO ÉNANTIOMÈRE (E) ET EXCÈS ÉNANTIOMÈRES MESURÉS DU PRODUIT 50 ET DU SUBSTRAT 47 LORS DE L'ACYLATION DU <i>CIS</i> -(±)-1- <i>TERT</i> -BUTYL 2-ÉTHYL 3-HYDROXYPYRROLIDINE-1,2-DICARBOXYLATE.	88

Liste des figures

FIGURE 1. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DES ENZYMES.	4
FIGURE 2. FORME DES ENZYMES.	5
FIGURE 3. OXYDO-RÉDUCTION À L'AIDE D'ALCOOLS DÉSHYDROGÉNASES.	6
FIGURE 4. LA NICOTINAMIDE ADÉNINE DINUCLÉOTIDE (NAD(P)H).	7
FIGURE 5. RÉGÉNÉRATION DU COFACTEUR.	7
FIGURE 6. HYDROLYSE À L'AIDE DE L'ACÉTYLCHOLINE ESTÉRISE.	8
FIGURE 7. LA TRIADE CATALYTIQUE.	9
FIGURE 8. MÉCANISME RÉACTIONNEL DE LA TRIADE CATALYTIQUE.	10
FIGURE 9. LIAISONS HYDROGÈNES IMPLIQUÉES DANS L'ACTIVATION INTERFACIALE DE CRL.	11
FIGURE 10. MODÈLE DE PRÉDICTION POUR LA BIORÉDUCTION DE CÉTONES.	12
FIGURE 11. MODÈLE DE PRÉDICTION POUR L'ACYLATION D'ALCOOLS PRIMAIRES OU L'HYDROLYSE D'ESTERS CORRESPONDANTS.	12
FIGURE 12. MODÈLE DE PRÉDICTION POUR L'ACYLATION D'ALCOOLS SECONDAIRES OU L'HYDROLYSE D'ESTERS CORRESPONDANTS.	13
FIGURE 13. MODÈLES DE PRÉDICTION POUR L'HYDROLYSE D'ESTERS CARBOXYLIQUES ET L'ESTÉRIFICATION D'ACIDES CARBOXYLIQUES.	13
FIGURE 14. LA TRANSESTÉRIFICATION ENZYMATIQUE.	14
FIGURE 15. LES AGENTS ACYLANTS.	15
FIGURE 16. ACYLATION ENZYMATIQUE À L'AIDE D'ESTERS D'ÉNOLS.	15
FIGURE 17. MÉTHODES D'OBTENTION DE COMPOSÉS ÉNANTIOMÉRIQUEMENT PURS.	16
FIGURE 18. LE DÉDOUBLEMENT CINÉTIQUE.	16
FIGURE 19. DIFFÉRENCIATION DES FACES ÉNANTIOTOPES D'UN SYSTÈME TRIGONAL.	18
FIGURE 20. LA DÉSYMÉTRISATION.	19
FIGURE 21. DÉSYMÉTRISATION COUPLÉE À UN DÉDOUBLEMENT CINÉTIQUE.	19
FIGURE 22. STRUCTURE DE LA SÉRINE.	20
FIGURE 23. BIOSYNTÈSE DE LA SÉRINE.	21
FIGURE 24. STRUCTURE DU (<i>R</i>)-ISOPROPYLIDÈNESÉRINALDÉHYDE ET DU (<i>S</i>)- ISOPROPYLIDÈNESÉRINALDÉHYDE.	22
FIGURE 25. PRÉPARATION DU (<i>S</i>)-ISOPROPYLIDÈNESÉRINALDÉHYDE.	23
FIGURE 26. PRÉPARATION DU (<i>R</i>)-ISOPROPYLIDÈNESÉRINALDÉHYDE.	24
FIGURE 27. PRÉPARATION DU (<i>R</i>)-ISOPROPYLIDÈNESÉRINALDÉHYDE À PARTIR DE LA L- MÉTHIONINE.	25
FIGURE 28. LES APPLICATIONS DES <i>N</i> -BOC- <i>N</i> , <i>O</i> -ISOPROPYLIDÈNESÉRINALDÉHYDES CHIRAUX.	26
FIGURE 29. PRÉPARATION DU (<i>R</i>)- ET DU (<i>S</i>)-ISOPROPYLIDÈNE-ALPHA-MÉTHYLSÉRINALDÉHYDE À PARTIR DU (<i>R</i>)-2-MÉTHYLGLYCIDOL.	27
FIGURE 30. PRÉPARATION DU (<i>R</i>) ET DU (<i>S</i>)-ISOPROPYLIDÈNESÉRINALDÉHYDE À PARTIR DE LA SYNTHÈSE ÉNANTIOSÉLECTIVE DE L'ALPHA-MÉTHYLSÉRINE.	28
FIGURE 31. PRÉPARATION DU (<i>S</i>)-ISOPROPYLIDÈNE-ALPHA-MÉTHYLSÉRINALDÉHYDE À PARTIR DE LA DÉSYMÉTRISATION ENZYMATIQUE ÉNANTIOSÉLECTIVE DE L'ALPHA-MÉTHYLSÉRINOL.	29
FIGURE 32. LES APPLICATIONS DES <i>N</i> -BOC- <i>N</i> , <i>O</i> -ISOPROPYLIDÈNE-ALPHA-MÉTHYL- SÉRINALDÉHYDES CHIRAUX.	30
FIGURE 33. SCHÉMA RÉACTIONNEL ENVISAGÉ POUR LA SYNTHÈSE DES ALDÉHYDES DE GARNER ALPHA-MÉTHYLÉS.	31
FIGURE 34. DÉSYMÉTRISATION DU <i>N</i> -BOC-2-AMINO-2-MÉTHYL-1,3-PROPANEDIOL PAR ACYLATION ENZYMATIQUE.	32
FIGURE 35. DÉSYMÉTRISATION DU <i>N</i> -BOC-2-AMINO-2-MÉTHYL-1,3-PROPANEDIOL PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE.	34

FIGURE 36. PRÉPARATION ET DÉDOUBLEMENT CINÉTIQUE ENZYMATIQUE DU <i>N</i> -BOC- <i>N,O</i> -ISOPROPYLIDÈNE-ALPHA-MÉTHYLSÉRINOL ET DE SON ESTER CORRESPONDANT.	35
FIGURE 37. PRÉPARATION ET DÉDOUBLEMENT CINÉTIQUE ENZYMATIQUE DE L'OXAZOLIDINE 8 ET DE SON ALCOOL 9 CORRESPONDANT.	38
FIGURE 38. RÉSUMÉ DES DÉSYMÉTRISATIONS ET DES RÉOLUTIONS ENZYMATIQUES EFFECTUÉES SUR LES DÉRIVÉS DE L'ALPHA-MÉTHYLSÉRINOL.	40
FIGURE 39. TRAVAUX FUTURS.	41
FIGURE 40. STRUCTURE DE LA PYRROLIDINE ET DE LA PIPÉRIDINE.	42
FIGURE 41. SOURCES NATURELLES DE PYRROLIDINES.	43
FIGURE 42. SOURCES NATURELLES DE PIPÉRIDINES.	44
FIGURE 43. L'AMINOCYCLISATION INTERMOLÉCULAIRE DES DIESTERS ALPHA,ALPHA'-2,5-DIBROMOADIPATES.	45
FIGURE 44. DÉSYMÉTRISATION DES PYRROLIDINES <i>CIS</i> -2,5-DISUBSTITUÉES.	46
FIGURE 45. DÉSYMÉTRISATION DES PYRROLIDINES <i>TRANS</i> -2,5-DISUBSTITUÉES.	47
FIGURE 46. DÉSYMÉTRISATION DE PYRROLINES ET DE PYRROLIDINES.	47
FIGURE 47. LES APPLICATIONS DES PYRROLIDINES 2,5-DISUBSTITUÉES.	48
FIGURE 48. PRÉPARATION DE PIPÉRIDINES <i>CIS</i> -2,6-DISUBSTITUÉES.	49
FIGURE 49. DÉSYMÉTRISATION DE PIPÉRIDINES.	50
FIGURE 50. DÉDOUBLEMENT CINÉTIQUE DYNAMIQUE DE PYRIDINE 2,6-DISUBSTITUÉES.	50
FIGURE 51. RÉACTION ASYMÉTRIQUE DE MANNICH CATALYSÉE PAR L'ACIDE L-PIPÉCOLIQUE.	51
FIGURE 52. SYNTHÈSE D'ALCALOÏDES.	52
FIGURE 53. SCHÉMA RÉACTIONNEL ENVISAGÉ POUR LA SYNTHÈSE DES PYRROLIDINES 2,5-DISUBSTITUÉES.	53
FIGURE 54. SCHÉMA RÉACTIONNEL ENVISAGÉ POUR LA SYNTHÈSE DES PIPÉRIDINES 2,6-DISUBSTITUÉES.	54
FIGURE 55. SYNTHÈSE DES PYRROLIDINES 2,5-DISUBSTITUÉES.	55
FIGURE 56. DÉSYMÉTRISATION DU <i>CIS</i> -DIMÉTHYL 1-BENZYLPIRROLIDINE-2,5-DICARBOXYLATE.	57
FIGURE 57. DÉSYMÉTRISATION DU <i>CIS</i> -DIÉTHYL 1-BENZYLPIRROLIDINE-2,5-DICARBOXYLATE.	58
FIGURE 58. FORMATION DES DÉRIVÉS CHIRAUX ENTRE LES MONOACIDES (+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 19 ET (+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 20 ET LA (<i>R</i>)-(+)-MÉTHYLBENZYLAMINE.	60
FIGURE 59. SYNTHÈSE DES MONOACIDES RACÉMIQUES (±)- <i>CIS</i> - 19 ET (±)- <i>CIS</i> - 20	60
FIGURE 60. DÉSYMÉTRISATION DU <i>CIS</i> -1- <i>TERT</i> -BUTYL 2,5-DIMÉTHYL ET DIÉTHYL PYRROLIDINE-1,2,5-TRICARBOXYLATE.	61
FIGURE 61. DÉTERMINATION DE LA CONFIGURATION ABSOLUE DES ACIDES (+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 25 ET (+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 26	63
FIGURE 62. DÉSYMÉTRISATION DU <i>TERT</i> -BUTYL 2,5-BIS(HYDROXYMÉTHYL)PYRROLIDINE-1-CARBOXYLATE.	64
FIGURE 63. DÉSYMÉTRISATION PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU <i>TERT</i> -BUTYL 2,5-BIS(ACÉTOXYMÉTHYL)PYRROLIDINE-1-CARBOXYLATE.	65
FIGURE 64. DÉTERMINATION DE LA CONFIGURATION ABSOLUE DU MONOACÉTATE (-)-(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 27	66
FIGURE 65. PRÉPARATION DE L'ACIDE 2-CARBOXYLIQUE (2 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-6-(ACÉTOXYMÉTHYL)-1-(<i>TERT</i> -BUTOXYCARBONYL)PIPÉRIDINE.	68
FIGURE 66. DÉTERMINATION DE LA CONFIGURATION ABSOLUE DE L'ALCOOL (+)-(2 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)- 37	69
FIGURE 67. PRÉPARATION DES PYRROLIDINES 2,5-DISUBSTITUÉES CHIRALES.	71
FIGURE 68. DÉSYMÉTRISATION DE PYRROLINES DISUBSTITUÉES ET DE PYRROLIDINES TÉTRASUBSTITUÉES.	72
FIGURE 69. PRÉPARATION DE L'ACIDE (+)-(2 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)- 37	73
FIGURE 70. STRUCTURE DE LA PROLINE.	75
FIGURE 71. SOURCES NATURELLES D'HYDROXYPROLINES.	76
FIGURE 72. BIOSYNTHÈSE DE LA PROLINE.	77
FIGURE 73. CONDENSATION DE DIECKMANN ET BIORÉDUCTION.	79

FIGURE 74. SYNTHÈSE CHIMIOENZYMATIQUE DE LA (+)-CASTANOSPERMINE.	79
FIGURE 75. SYNTHÈSE CHIMIOENZYMATIQUE DE LA (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-HYDROXYPROLINE.	80
FIGURE 76. HYDROXYLATION ENZYMATIQUE DE LA L-PROLINE.....	81
FIGURE 77. LES APPLICATIONS DES <i>CIS</i> -3-HYDROXYPROLINES.	81
FIGURE 78. SCHÉMA RÉACTIONNEL ENVISAGÉ POUR LA SYNTHÈSE DU <i>N</i> -BOC <i>CIS</i> -(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-3- HYDROXYPROLINE.....	82
FIGURE 79. PRÉPARATION DU 1- <i>TERT</i> -BUTYL 2-ÉTHYL 3-OXOPYRROLIDINE-1,2-DICARBOXYLATE. 84	
FIGURE 80. BIORÉDUCTION DU 1- <i>TERT</i> -BUTYL 2-ÉTHYL 3-OXOPYRROLIDINE-1,2-DICARBOXYLATE.	86
FIGURE 81. SÉPARATION DES ISOMÈRES <i>CIS</i> ET <i>TRANS</i> <i>N</i> -BOC-(±)-3-HYDROXYPROLINE PAR LACTONISATION.....	87
FIGURE 82. DÉDOUBLEMENT CINÉTIQUE DU (±)- <i>CIS</i> -1- <i>TERT</i> -BUTYL 2-ÉTHYL 3- HYDROXYPYRROLIDINE-1,2-DICARBOXYLATE PAR ACYLATION ENZYMATIQUE.	88
FIGURE 83. DÉDOUBLEMENT CINÉTIQUE DU (±)- <i>CIS</i> -1- <i>TERT</i> -BUTYL 2-ÉTHYL 3- HYDROXYPYRROLIDINE-1,2-DICARBOXYLATE PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE.	89
FIGURE 84. DÉDOUBLEMENT CINÉTIQUE DU (±)- <i>TRANS</i> -1- <i>TERT</i> -BUTYL 2-ÉTHYL 3- HYDROXYPYRROLIDINE-1,2-DICARBOXYLATE PAR ACYLATION ENZYMATIQUE.	90
FIGURE 85. PRÉPARATION DU (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-1- <i>TERT</i> -BUTYL 2-ÉTHYL 3-HYDROXYPYRROLIDINE-1,2- DICARBOXYLATE.	91
FIGURE 86. CONDENSATION DE DIECKMANN.	92
FIGURE 87. RÉACTIONS BIOCATALYSÉES SUR LES DÉRIVÉS DE LA PROLINE.	93
FIGURE 88. PRÉPARATION DES <i>N</i> -BOC- <i>CIS</i> -3-HYDROXYPROLINE (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>) ET (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>).	94

Liste des équations

ÉQUATION 1. LE RATIO ÉNANTIOMÈRE D'UN DÉDOUBLEMENT CINÉTIQUE.....	17
ÉQUATION 2. LE RATIO ÉNANTIOMÈRE D'UNE DÉSYMÉTRISATION.	20

Liste des abréviations

Ac: Acétate	PCL : <i>Pseudomonas cepacia</i> lipase
AcOEt: Acétate d'éthyle	PeSL: <i>Penicillium</i> sp. lipase
ADN: Acide désoxyribonucléique	P _f : Point de fusion
ANL: <i>Aspergillus niger</i> lipase	PLE: Pig liver esterase
ARN: Acide ribonucléique	PSL: <i>Pseudomonas</i> sp. lipase
Asp: Acide aspartique	RML: <i>Rhizomucor meihei</i> lipase
ATP: Adénosine triphosphate	RMN: Résonance magnétique nucléaire
Bn: Benzyle	ROL: <i>Rizhopus Oreus</i> lipase
Boc: <i>Tert</i> -butoxycarbonyle	RSL: <i>Rizhopus</i> sp. lipase
CAL-B: <i>Candida antarctica B</i>	Ser: Sérine
Cbz: Benzyloxycarbonyle	TBAF: Fluorure de tétrabutylammonium
CCL: <i>Candida cylindracea</i> lipase	TEMPO: 2,2,6,6-Tétraméthyl-1-pipéridinyloxy
CCM: Chromatographie sur Couche Mince	THF: Tétrahydrofurane
CRL: <i>Candida rugosa</i> lipase	Tris-HCl: Hydrochlorure de tris(hydroxyméthyl)aminométhane
CSL: <i>Candida</i> sp. lipase	TsOH: Acide <i>p</i> -toluènesulfonique
DIBAL: Hydrure de diisobutylaluminium	VIH: Virus de l'immunodéficience humaine
DMAP: Diméthylaminopyridine	WGL: Wheat germ lipase
DMF: Diméthylformamide	
DMP: Diméthoxypropane	
DMSO: Diméthylsulphoxide	
E: Ratio énantiomérique	
EDC: <i>N</i> -(3-Diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide	
ee: Excès énantiomère	
ESI: Electrospray ionisation	
FID: Flame ionisation detector	
GC: Gaz chromatography	
GCL: <i>Geotricum candidum</i> lipase	
Glu: Acide glutamique	
His: Histidine	
HPLC: High performance liquid chromatography	
3-Hyp: 3-Hydroxyproline	
IC: Ionisation chimique	
IR: Infrarouge	
IUB: International Union of biochemistry	
LiHMDS: Lithium bis(triméthylsilyl)amide	
Ms: Mésylate	
MSL: <i>Mucor</i> sp. lipase	
NAD(P)H: Nicotinamide adénine dinucléotide	
NMO: 4-Méthylmorpholine <i>N</i> -oxyde	

Chapitre I : Introduction

La biocatalyse

Depuis plusieurs décennies, l'intérêt pour la biocatalyse est en constante évolution. Alimenté par la découverte de plusieurs nouvelles enzymes¹, la pratique de la biocatalyse a nécessité au fil du temps l'intervention de plusieurs disciplines telle la biochimie, la chimie organique, la microbiologie, la biologie moléculaire et l'enzymologie proprement dite. À ce sujet, plusieurs ouvrages littéraires traitent du potentiel des biocatalyseurs²⁻⁶. L'étude exhaustive de la biocatalyse a rendu l'approche biocatalytique beaucoup plus accessible et davantage employée en synthèse organique pour la préparation de composés chiraux énantiomériquement purs⁷⁻¹⁰.

En plus d'être interdisciplinaire, la biocatalyse est applicable au domaine industriel¹¹⁻²⁰. Depuis les années 1960, son exploitation industrielle a augmenté de façon exponentielle. Par conséquent, la biocatalyse s'applique désormais à plus de secteurs d'activité industrielle que jamais. Elle participe notamment à l'industrie pharmaceutique, l'industrie alimentaire, l'industrie agricole, l'industrie des produits de chimie fine ainsi qu'à l'industrie des cosmétiques. Chaque année, au États-Unis plus de 6 millions de tonnes du produit d'isomérisation glucose-fructose sont produites par biocatalyse suivie par la production de plus 25 000 tonnes de péniciline, un antibiotique de la famille des bêta-lactames. De plus, l'utilisation des biotechnologies dans le secteur alimentaire produit plus de 30 000 tonnes de vitamine C et 2000 tonnes d'aspartame par an. Incontestablement, la versatilité de l'approche biocatalytique se traduit par une vaste gamme de procédés industriels^{21,22} comme le brassage de la bière, la fermentation du vin, la transformation du fromage, le tannage du cuir et la synthèse de produits chimiques.

Depuis l'imposante tragédie de la thalidomide du siècle dernier, il devenait primordial d'effectuer l'étude toxicologique des deux énantiomères d'un nouveau médicament. L'industrie pharmaceutique a su tirer avantage de la sélectivité de la biocatalyse pour acquiescer à cette contrainte²³⁻²⁷.

D'immenses efforts ont également été déployés durant les dernières décennies de recherche, pour établir de nouvelles voies industrielles²⁸ de synthèse énantiosélective. Parmi celle-ci, la biocatalyse s'est avérée une voie efficace de synthèse industrielle de composés de chimie fine²⁹⁻³³ destinés à l'innovation de nouveaux médicaments.

1.2 Les biocatalyseurs : les enzymes

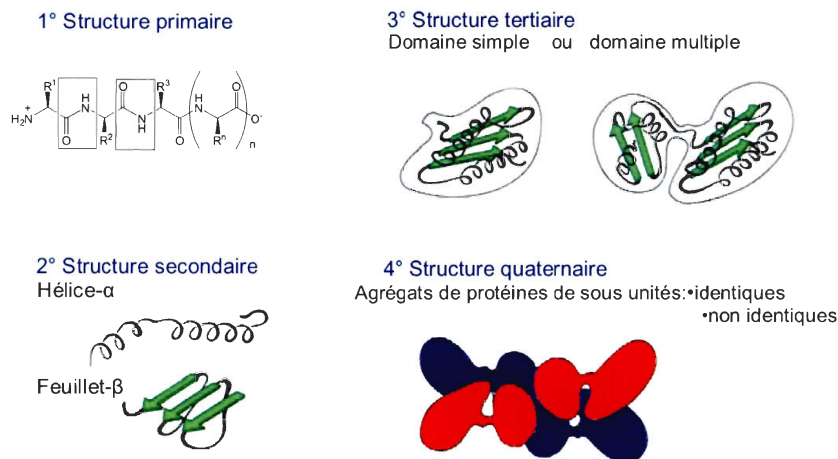
Les enzymes sont des catalyseurs naturels qui émergent du monde du vivant. On dit d'eux qu'ils possèdent une promiscuité catalytique qui se définit par la capacité d'un site actif à catalyser plus d'une transformation chimique³⁴. C'est pourquoi elles catalysent une multitude de réactions chimiques nécessaires au maintien et au développement des organismes vivants, source intarissable de biocatalyseurs. Tout comme les catalyseurs chimiques, c'est en diminuant la barrière énergétique d'activation qu'elles catalysent les réactions chimiques et biochimiques. Dans un environnement aqueux se situant près de la neutralité, ces biocatalyseurs sont d'une efficacité remarquable puisqu'ils accélèrent d'un facteur 10^7 les réactions chimiques s'y produisant. Dans le but d'exploiter cette caractéristique, il est possible de les retirer de leur milieu naturel afin de les utiliser en synthèse organique. D'ailleurs, elles conservent leurs propriétés catalytiques en milieu organique. Certaines sont dites "catalyseurs parfaits" puisque leur vitesse de réaction n'est limitée que par la diffusion des réactifs et des produits.

Du dédoublement de composés racémiques, à l'introduction de centres chiraux, en passant par la conversion sélective de groupements fonctionnels, les enzymes catalysent plusieurs réactions^{35,36} connues en chimie organique. Mentionnons entre autre la transestérification³⁷, l'oxydo-réduction³⁸⁻⁴¹, les protections et les déprotections⁴², l'hydroxylation^{43,44} et la racémisation⁴⁵.

1.2.1 Structure des enzymes

D'un point de vue structural, tous les enzymes sont des macromolécules polaires constituées de protéines de masse moléculaire de l'ordre de 10^4 - 10^6 g/mol. La biosynthèse de ces protéines globulaires s'effectue généralement à partir des 20 acides aminés naturels connus, mais il est possible de retrouver d'autres acides aminés dans leur séquence tel la 4-hydroxyproline, la 5-hydroxylysine et la sérine *O*-phosphorylé⁴⁶. La structure tridimensionnelle des enzymes est composée de 4 niveaux hiérarchiques soit la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire (Figure 1).

Figure 1. Structure tridimensionnelle des enzymes.

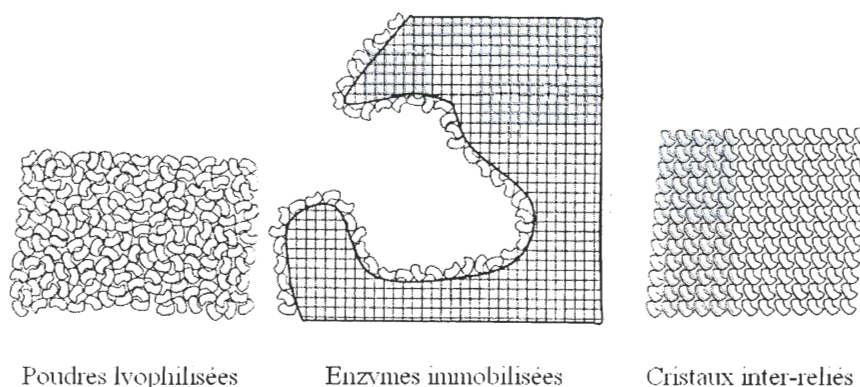


La séquence des acides aminés liés par des liens peptidiques représente la structure primaire. La chaîne peptidique de cette dernière possède la capacité de se replier ou de s'aplanir afin de générer des cavités servant de centres actifs. De plus, puisque la rotation autour des liens C-C et C-N est restreinte stériquement par la chaîne latérale de chaque acide aminé, deux arrangements structuraux deviennent énergétiquement favorisés : les hélices α et les feuillets β . Ceux-ci représentent les deux seuls arrangements possibles en ce qui concerne la structure secondaire. L'agencement des hélices α et des feuillets β entre eux forment la structure tertiaire. Il en existe deux types : celles composées d'un domaine simple et celles composées d'un domaine multiple. L'agrégation de ces domaines simples ou multiples, de structure similaire ou non, définit la structure quaternaire des enzymes.

1.2.2 Forme des enzymes

Une variété de techniques de préparation a été mise au point afin d'améliorer la stabilité des enzymes. De ces techniques nous retrouvons la lyophilisation, l'immobilisation et la cristallisation qui génèrent des enzymes sous forme de poudres lyophilisées, d'enzymes immobilisées^{47,48} ainsi que de cristaux inter-reliés⁴⁹ (Figure 2).

Figure 2. Forme des enzymes.



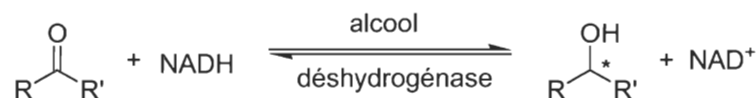
1.2.3 Classifications des enzymes

Jusqu'à présent, plus de 3200 enzymes ont été reconnues par l'Union Internationale de Biochimie⁵⁰⁻⁵² (IUB). De ce nombre, seulement 10% ont été étudiées (~300 enzymes) puisqu'on estime qu'il existe environ 25 000 enzymes présentes dans la nature. Dans l'objectif de classer les enzymes, l'IUB a mise en place une nomenclature qui attribue une numérotation relative à la classe de réaction qu'elles catalysent, à leurs sous-classes, à leurs sous-sous-classes ainsi qu'à leur individualité. Chaque enzyme est ainsi décrite par 4 chiffres présentés sous la forme générale E.C. A.B.C.D., précédés des lettres E et C pour "Enzyme Commission". Cette classification a été établie selon six grandes classes soit; les oxydo-réductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases. Les travaux de ce mémoire portent essentiellement sur la première et la troisième classe, c'est pourquoi les oxydo-réductases et les hydrolases sont présentées plus en détail.

1.2.3.1 Les oxydo-réductases

Les enzymes réunies sous cette classe catalysent des réactions d'oxydo-réduction³⁸⁻⁴¹. Cette importante classe qui couvre 25% des publications relatives aux enzymes⁵³, comprend les déshydrogénases, les oxydases, les oxygénases et les peroxydases. Afin d'améliorer leur contrôle stéréochimique, il existe plusieurs modifications et traitements possibles⁴⁶. La modification des substituants du substrat et des conditions de réactions telle la concentration du substrat, l'incorporation d'un inhibiteur, l'utilisation de solvants organiques, l'ajout de cyclodextrines ou de polymères hydrophobes ainsi que le changement de température et de pression ont pour effet d'augmenter la sélectivité voire même jusqu'à l'inverser. Les traitements comme le vieillissement, l'homogénéisation à haute pression et la déshydratation à l'acétone des cellules permettent également d'influencer la stéréosélectivité de ces enzymes. La participation d'un cofacteur en quantité stoechiométrique constitue le principal inconvénient de certaines enzymes de cette classe. Les alcools déshydrogénases en sont un excellent exemple (Figure 3).

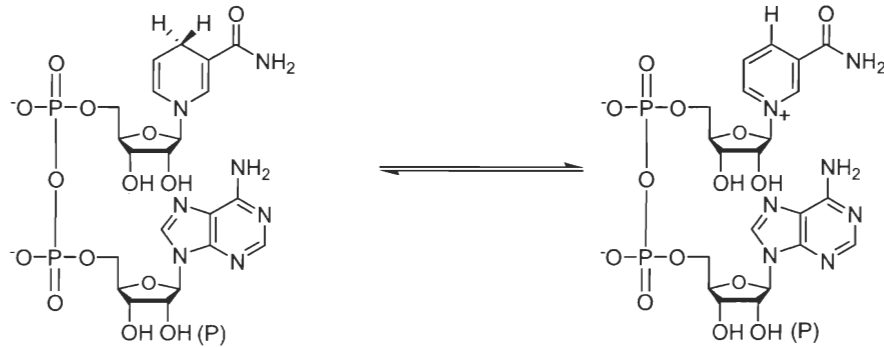
Figure 3. Oxydo-réduction à l'aide d'alcools déshydrogénases.



1.2.3.1.1 Les alcools déshydrogénases

Les alcools déshydrogénases ont pour fonction de catalyser la réduction des cétones et l'oxydation des alcools. L'éthanol, le lactate, le glycérol ainsi que leurs formes oxydés correspondantes figurent comme substrats naturels de ces enzymes. Certaines levures⁵⁴, comme *Saccharomyces cerevisiae*, contiennent des alcools déshydrogénases et peuvent être utilisées sous forme de cellules entières. Ces dernières ont largement été utilisées en chimie organique^{38,40}. De plus, cette forme est avantageuse pour la réduction à l'échelle préparative puisque la cellule entière renferme déjà le cofacteur nécessaire à l'enzyme pour qu'elle ait une activité catalytique. La nicotinamide adénine dinucléotide (NAD(P)H) est un des cofacteurs couramment employés (Figure 4).

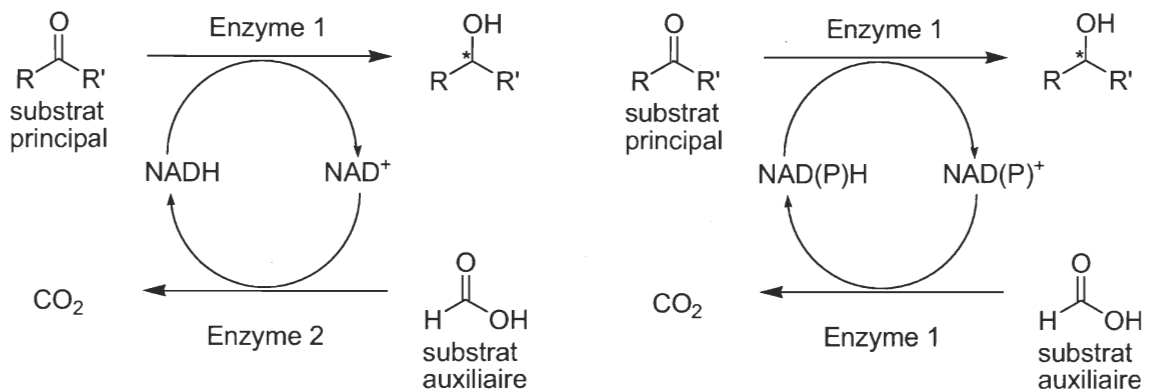
Figure 4. La nicotinamide adénine dinucléotide (NAD(P)H).



1.2.3.1.2 La régénération du cofacteur

La régénération du cofacteur peut être classée selon deux systèmes différents soit les systèmes à une enzyme et les systèmes à deux enzymes. Pour ce qui est des systèmes à une enzyme, la réduction du substrat et du cofacteur s'effectue à l'aide de ce même enzyme, tandis que les systèmes à deux enzymes nécessitent l'intervention de deux enzymes distinctes (Figure 5).

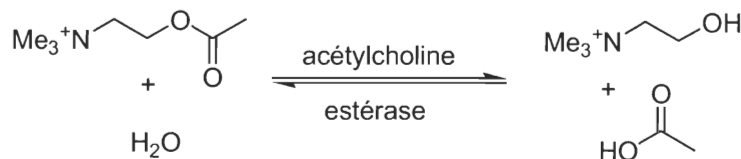
Figure 5. Régénération du cofacteur.



1.2.3.2 Les hydrolases

Ces enzymes³ sont au cœur de la recherche sur la biocatalyse puisqu'elles totalisent 65% des publications relatives aux biocatalyseurs^{53,55,56}. Dans cette classe, on retrouve plusieurs sous classes comme les lipases, les estérases, les protéases, les amylases, etc. Les hydrolases sont reconnues pour conserver leur activité catalytique en milieu organique. Ces dernières ont l'avantage d'accepter un large éventail de substrats avec une énantiosélectivité et une régiosélectivité élevées. De plus, ces sélectivités peuvent être contrôlées par la modification du substrat ou des conditions de réactions^{57,58}. Ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser en outre des liaisons de type C-O, C-N et C-C (Figure 6).

Figure 6. Hydrolyse à l'aide de l'acétylcholine estérase.

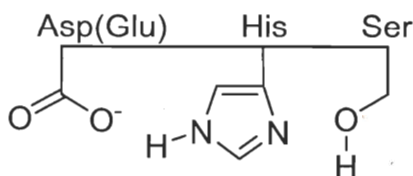


La fonction naturelle des lipases est l'hydrolyse des triglycérides en glycérol et en acide gras. Elles catalysent aussi l'hydrolyse d'esters hydrophobes et la transestérification en milieu organique. Tout comme les amylases, certaines lipases catalysent la synthèse d'amides carboxyliques⁵⁹. Elles sont aussi utiles pour la synthèse de composés biologiquement actifs⁶⁰ mais principalement employées dans le dédoublement d'alcools racémiques^{61,62} et la différenciation énantiosélective de composés *méso* ou prochiraux⁶³.

1.2.3.2.1 La triade catalytique

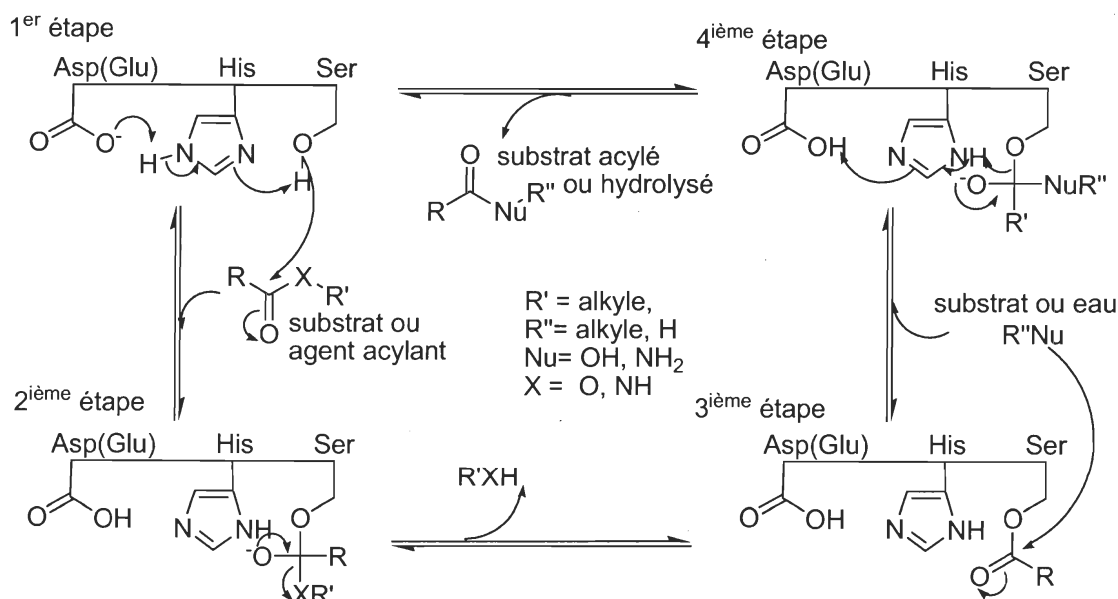
Le mécanisme d'action des hydrolases à sérine tel les lipases, les estérases et les protéases, fait intervenir une triade catalytique situé à l'intérieur de la cavité du site actif de l'enzyme⁶³. Cette triade effectue le travail de catalyse et elle est constituée de trois groupements fonctionnels catalytiques dont : un acide, une base azotée et un alcool. Ces groupements proviennent respectivement de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique, de l'histidine et de la sérine (Figure 7).

Figure 7. La triade catalytique.



L'agencement de ces trois acides aminés permet d'initier la catalyse puisqu'il diminue la valeur du pKa de la fonction alcool de la sérine (Figure 8). Ainsi, le caractère nucléophile de l'alcool devient suffisamment élevé pour amorcer la catalyse. La première étape débute par une attaque nucléophile sur la fonction carbonyle du substrat dans le cas d'une hydrolyse, ou de l'agent acylant lors d'une acylation. Il y a donc formation d'un intermédiaire tétraédrique puis la fonction acyle devient liée de façon covalente à l'enzyme. La régénération de la fonction carbonyle libère un nucléophile et la fonction alcool de la sérine se retrouve acylée par le substrat ou l'agent acylant. L'enzyme est maintenant prête pour subir l'attaque nucléophile du substrat ou de l'eau. Dans le cas d'hydrolyse d'esters ou d'amides, c'est l'eau qui formera un intermédiaire tétraédrique avec le complexe substrat-enzyme, tandis que dans le cas d'une transestérification ou d'une aminolyse d'ester, c'est la fonction alcool ou amine du substrat qui formera cet intermédiaire. Finalement, il y aura expulsion du substrat hydrolysé ou acylé, protonation de l'alcool de la sérine suivi d'une déprotonation de l'acide aspartique (ou glutamique) par le groupement imidazole de l'histidine.

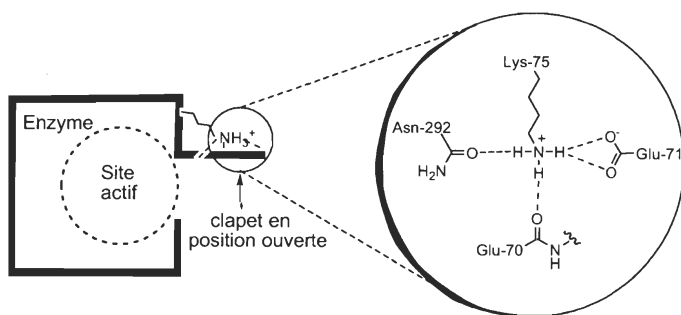
Figure 8. Mécanisme réactionnel de la triade catalytique.



1.2.3.2.2 L'activation interfaciale

Certaines lipases détiennent un segment hélicoïdal (clapet) qui bloque l'accès au site actif. Lorsque ces lipases sont liées à des lipides, le clapet se trouve en position ouverte permettant ainsi l'accès au site actif. Cette ouverture créée par l'interaction des lipides avec les lipases s'appelle l'activation interfaciale. L'insolubilité des substrats génère une interface hydrophile-hydrophobe qui permet d'activer l'enzyme en positionnant le clapet en conformation ouverte. C'est pourquoi les lipases à activation interfaciale montrent une activité accrue lorsqu'elles se trouvent en présence d'un substrat hydrophobe. Le maintien de la conformation en position ouverte est possible grâce aux interactions de type pont hydrogène. Par exemple, dans le cas de la lipase de *Candida rugosa* ces interactions se produisent entre la lysine-75, la glutamine-70, la glutamine-71 et l'asparagine-292 (Figure 9). Il est possible d'ajouter certains additifs^{55,57,58,64} pour assurer une orientation du clapet en position ouverte et ainsi accroître l'activité de l'enzyme.

Figure 9. Liaisons hydrogène impliquées dans l'activation interfaciale de CRL.



1.3 Les modèles empiriques de prédiction

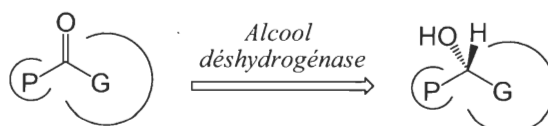
Depuis les 25 dernières années, plusieurs réactions organiques catalysées par des biocatalyseurs ont été étudiées en profondeur. Il est maintenant possible de prédire la stéréosélectivité de certaines enzymes et leur sélectivité face à certains types de substrat. L'encombrement stérique est à la base de plusieurs de ces règles de prédiction et elle dirige généralement la distinction entre deux énantiomères. Les modèles de prédictions décrivent toujours l'énantiosélectivité préférentielle d'une enzyme, par contre ils ne permettent pas de prédire le degré d'énantiosélectivité.

Plusieurs modèles et structures tridimensionnelles sont décrits dans la littérature notamment ceux de l'oxydo-réductase *Curvularia falcata*⁶⁵, de la chymotrypsine⁶⁶, de la subtilisine⁶⁷⁻⁶⁹, de l'estérase de foie de porc⁷⁰⁻⁷², de la lipase de pancréas de porc⁷³, de *Candida rugosa*⁷⁴⁻⁷⁷, de *Candida antarctica*^{78,79}, de *Pseudomonas fluorescens*⁸⁰, de *Pseudomonas cepacia*^{74,81-83}, de *Pseudomonas rugosa*⁸⁴, de *Geotricum candidum*⁸⁵ et de *Mucor* sp.⁸⁶. Grâce aux nombreux résultats empiriques ainsi qu'aux études cristallographiques, les modèles de prédiction sont de plus en plus fiables. Cependant il n'en demeure pas moins qu'une enzyme peut démontrer pour un substrat donné, une stéréosélectivité inverse à celle prédite.

1.3.1 Les cétones

Le premier de ces modèles est celui de Prelog⁶⁵. Celui-ci prédit l'énantiosélectivité de l'alcool déshydrogénase de *Curvularia falcata* lors de la réduction de cétones. Ce modèle se base essentiellement sur la taille des substituants situés de chaque côté du groupement carbonyle (Figure 10).

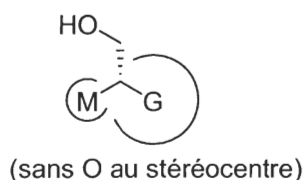
Figure 10. Modèle de prédiction pour la bioréduction de cétone.



1.3.2 Les alcools primaires

Face aux alcools primaires, Kazlauskas et ses collègues^{81,83,87} ont étudié l'énantiopréférence de la lipase de *Pseudomonas cepacia*. Le modèle obtenu montre l'énantiomère qui réagit habituellement le plus rapidement lors de l'acylation de l'alcool ou lors de l'hydrolyse de son ester correspondant. Il est à noter que cette règle ne s'applique pas s'il y a un atome d'oxygène lié au stéréocentre (Figure 11).

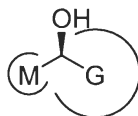
Figure 11. Modèle de prédiction pour l'acylation d'alcools primaires ou l'hydrolyse d'esters correspondants.



1.3.3 Les alcools secondaires

La plupart des lipases répondent au modèle des alcools secondaires avec une sélectivité similaire^{74,88,87}, à l'exception de la lipase de *Candida rugosa*. Comparativement à la lipase de *Candida antarctica* B, de *Pseudomonas cepacia* et de *Rhizomucor meiheii*, son site actif est plus gros ce qui lui permet d'accepter des substrats de plus grandes tailles. Par conséquent, elle a tendance à favoriser l'énantiomère opposé. De façon identique au modèle des alcools primaires, ce modèle représente l'énantiomère le plus réactif lors de l'acylation de l'alcool ou de l'hydrolyse de son ester correspondant (Figure 12).

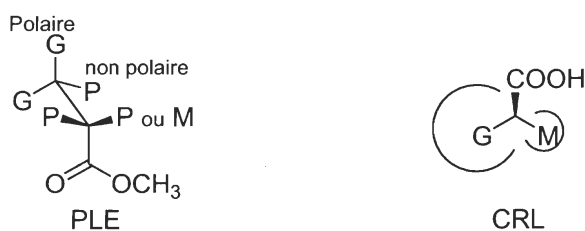
Figure 12. Modèle de prédiction pour l'acylation d'alcools secondaires ou l'hydrolyse d'esters correspondants.



1.3.4 Les esters carboxyliques

Face aux esters carboxyliques, des modèles ont été établis en outre pour la lipase de *Candida rugosa*^{75,77,87} ainsi que pour l'estérase de foie de porc^{89,70-72,87} (Figure 13). Le modèle ainsi obtenu pour CRL, prédit quel énantiomère réagit le plus rapidement lors de l'estérification de l'acide ou lors de l'hydrolyse de l'ester. Au contraire de CAL-B, CRL présente une meilleure énantiosélectivité vis-à-vis plusieurs acides carboxyliques et leurs esters correspondants. Puisqu'il n'y a pas de données cristallographiques disponibles dans le cas de PLE, c'est le modèle cubique tridimensionnel de Jones qui a permis d'établir un modèle de prédiction. Ce modèle se base également sur la taille des substituants avec la particularité de faire intervenir les concepts d'hydrophobicité et de polarité puisque cette estérase contient des pochettes hydrophobes et polaires à l'intérieur de son site actif.

Figure 13. Modèles de prédiction pour l'hydrolyse d'esters carboxyliques et l'estérification d'acides carboxyliques.

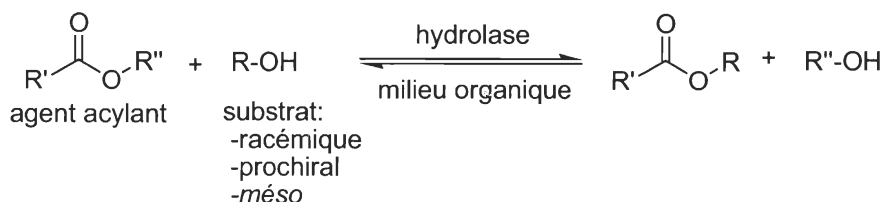


1.4 La transestérification enzymatique stéréosélective

Comme son nom l'indique, la transestérification enzymatique stéréosélective consiste à transférer un groupement acyle d'un agent acylant, vers un accepteur de groupement acyle à l'aide d'une enzyme. Cet accepteur peut être racémique, prochiral ou *méso* (Figure 14). La transestérification est l'avantage principal de l'utilisation des solvants organiques en synthèse enzymatique faisant appel aux hydrolases. Elle peut être utilisée à des fins de protection, mais c'est habituellement dans l'objectif de générer un

enrichissement énantiomérique que l'on emploie la transestérification enzymatique stéréosélective³⁷.

Figure 14. La transestérification enzymatique.



La stéréosélectivité^{90,91} ainsi que la régiosélectivité⁹² de ce type de réaction peut être contrôlée par la modification du solvant. L'équilibre de ce type de réaction réversible dépend grandement de la quantité d'eau présente dans le milieu organique. En diminuant la quantité d'eau, l'équilibre sera ainsi déplacé en faveur des produits, c'est pourquoi il est avantageux d'utiliser un milieu organique faible en eau. Toutefois, les solvants organiques employés doivent permettre à l'enzyme de conserver un degré d'hydratation suffisant car le retrait de la couche aqueuse vitale peut entraîner une désactivation complète de l'enzyme.

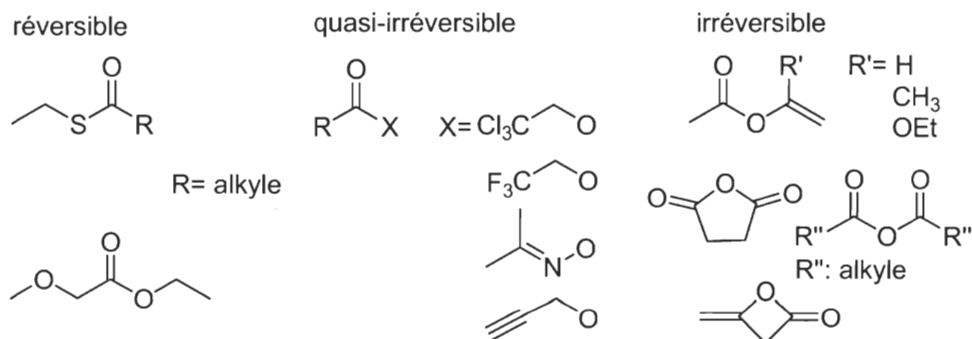
L'emploi d'agents acylants irréversibles est une autre stratégie permettant de déplacer l'équilibre de la réaction en faveur des produits. On les emploie régulièrement pour dédoubler cinétiquement des alcools racémiques ou désymétriser des diols prochiraux ou *mésó*.

1.4.1 Les agents acylants

Les agents acylants⁹³ activés utilisés pour la transestérification enzymatique se regroupent sous trois catégories : les réversibles, les quasi-irréversibles et les irréversibles (Figure 15). Les agents de la première catégorie tels les thioesters et le méthoxyacétate d'éthyle, sont moins efficaces que ceux des autres catégories puisqu'ils libèrent des nucléophiles possédant la capacité d'attaquer le produit acylé. On qualifie les agents de la deuxième catégorie comme quasi-irréversibles car ils relâchent des nucléophiles faibles quasi inoffensifs qui se décomposent même lentement dans ces conditions de réactions. Cette catégorie inclue les alcanooates trichlorés et trifluorés, les oximes et les cyanométhylesters. Sans aucun doute, les agents irréversibles sont maintenant les plus

utilisés et les plus performants pour effectuer des réactions de transestérification irréversible.

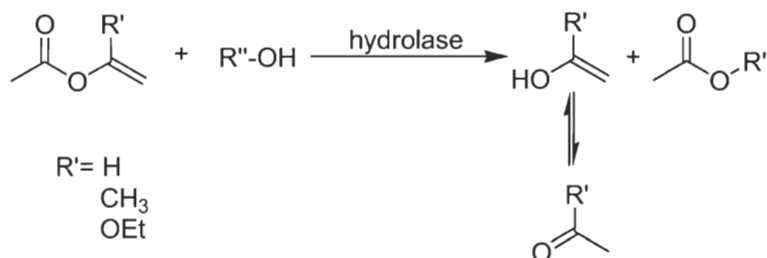
Figure 15. Les agents acylants.



1.4.1.1 Les agents irréversibles

Les esters d'énols comme l'acétate de vinyle et l'acétate d'isopropène font partie des agents acylants les plus efficaces. Lors de réactions de transestérification, ils libèrent des alcools qui tautomérisent en leurs composés carbonylés correspondants, c'est-à-dire l'acétaldéhyde et l'acétone (Figure 16). L'acétaldéhyde peut être néfaste et conduire à la désactivation de certaines enzymes tel que GCL et CRL. L'emploi des éthoxyvinyl esters comme agent acylant est une autre solution permettant d'éviter la désactivation de l'enzyme puisque le nucléophile libéré tautomérise en acétate d'éthyle.

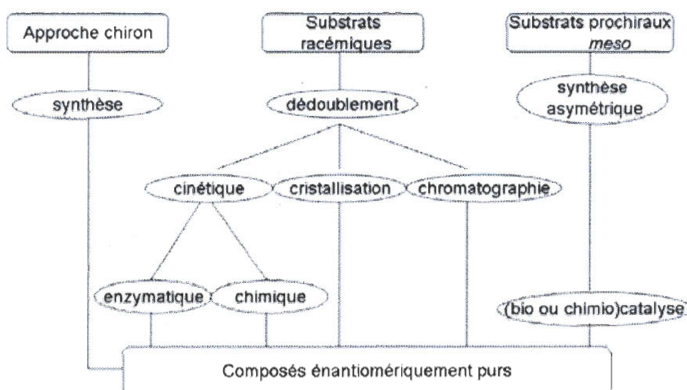
Figure 16. Acylation enzymatique à l'aide d'esters d'énols.



1.5 Les méthodes biocatalytiques d'obtention de composés énantiomériquement purs

Afin d'obtenir des composés énantiomériquement purs en synthèse organique, plusieurs méthodes sont disponibles⁶²(Figure 17). Les plus communes sont l'approche chiron, le dédoublement de composés racémiques par catalyse enzymatique ou chimique, par cristallisation préférencielle ou par chromatographie ainsi que la synthèse asymétrique bio ou chimiocatalytique. Les méthodes biocatalytiques seront discutées plus en détails.

Figure 17. Méthodes d'obtention de composés énantiomériquement purs.

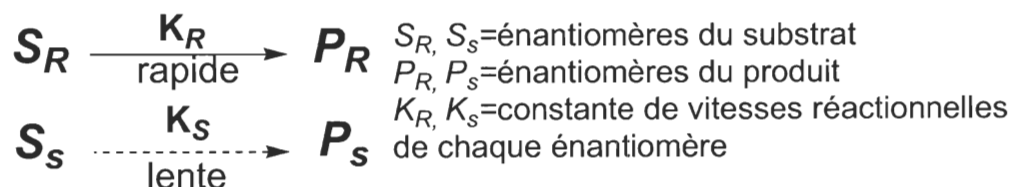


1.5.1 Les dédoublements cinétiques enzymatiques de composés racémiques

1.5.1.1 Le dédoublement cinétique

La méthode la plus répandue en synthèse enzymatique est sans aucun doute le dédoublement cinétique^{61,62}. D'un point de vue général, le dédoublement cinétique consiste à appliquer une modification chimique favorisée pour un seul énantiomère d'un mélange racémique, en abaissant sa barrière énergétique. Par conséquent, le rendement théorique est limité à 50% (Figure 18).

Figure 18. Le dédoublement cinétique.



La stéréosélectivité de cette méthode repose donc sur la différence de vitesse réactionnelle entre deux énantiomères lors de leur transformation biochimique. D'ailleurs il est possible d'évaluer l'énantiosélectivité d'une réaction enzymatique à partir du rapport des constantes de vitesse réactionnelle de chaque énantiomère (K_R / K_S). On parle alors de ratio énantiomère, désigné par le terme grand E. Le groupe de Sih⁹⁴⁻⁹⁶ a développé des équations permettant de calculer cette énantiosélectivité (Équation 1). Pour ce faire deux des trois variables suivantes sont nécessaires : la pureté énantiomérique du substrat résiduel, la pureté énantiomérique du produit ou le degré de conversion.

Équation 1. Le ratio énantiomère d'un dédoublement cinétique.

$$E = K_R / K_S$$

$$E = \frac{\ln [(1-c)(1-ee_s)]}{\ln [(1-c)(1+ee_s)]} ; E = \frac{\ln [(1-c)(1-ee_s)]}{\ln [(1-c)(1+ee_s)]} ; E = \frac{\ln \left[\frac{1-ee_s}{1+(ee_s/ee_p)} \right]}{\ln \left[\frac{1+ee_s}{1+(ee_s/ee_p)} \right]}$$

Dans le cas idéal d'un dédoublement parfaitement stéréosélectif, l'énantiomère pour lequel la réaction est accélérée par l'enzyme se verrait entièrement converti en produit tandis que le second énantiomère serait récupéré sous sa forme initiale. Le ratio énantiomérique serait alors beaucoup plus élevé que 100. Un dédoublement cinétique est considéré sélectif lorsque le ratio énantiomérique atteint une valeur de 20. Puisque le ratio énantiomérique est une fonction logarithmique de la pureté énantiomérique, l'énantiosélectivité évaluée est donc moins précise à de hautes valeurs (≥ 100) qu'à de faibles valeurs (≤ 20).

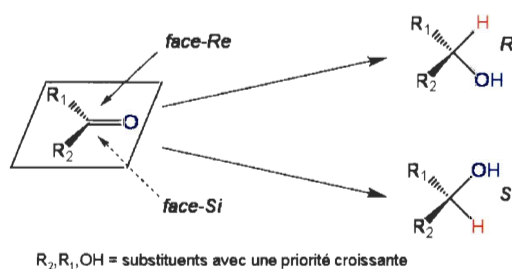
Il existe d'autres types de dédoublement cinétique dont le dédoublement cinétique dynamique⁹⁷⁻¹⁰². Ce dernier s'appuie sur les mêmes bases que le dédoublement cinétique. La différence entre ces deux méthodes réside dans la racémisation *in-situ* du substrat résiduel tout au long de la réaction, sans toutefois qu'il y ait racémisation du produit. La racémisation peut être effectuée par un catalyseur chimique¹⁰³ ou enzymatique⁴⁵. Cette méthode permet l'obtention de rendements théoriques de 100% puisque le substrat résiduel peut être recyclé en entier.

1.5.2 La synthèse asymétrique biocatalytique

1.5.2.1 La bioréduction catalytique

En employant la bioréduction catalytique, il est possible d'introduire un centre chiral sur des systèmes trigonaux comme celui des cétones. Cette méthode permet l'obtention de rendement théorique de 100% et fait appel aux oxydo-réductases ainsi qu'aux réactions d'oxydo-réduction³⁸⁻⁴¹. Au cours de ce processus, la chiralité est introduite par la réduction de la cétone en alcool. L'attaque de l'hydrure du cofacteur peut être effectuée du côté de la face Re ou Si tout dépendant de la stéréosélectivité de l'enzyme (Figure 19).

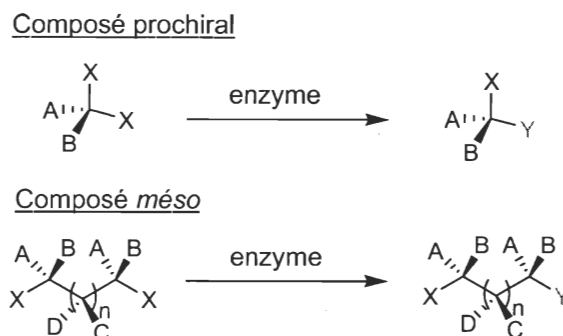
Figure 19. Différenciation des faces énantiopes d'un système trigonal.



1.5.2.2 La désymétrisation

La désymétrisation^{104,105} de substrats prochiraux ou méso est une autre méthode qui présente l'avantage d'obtenir des rendements théoriques de 100% en synthèse enzymatique. La désymétrisation de composés symétriques consiste à modifier un des groupes énantiopes du substrat de sorte que la symétrie soit éliminée. Pendant ce processus, un des deux groupements du substrat réagit plus rapidement puisque les enzymes ont la capacité de différencier les groupements énantiopes des substrats achiraux. Ceci a pour effet d'introduire l'asymétrie dans la molécule et de générer par le fait même un ou plusieurs centres de chiralité (Figure 20).

Figure 20. La désymétrisation.



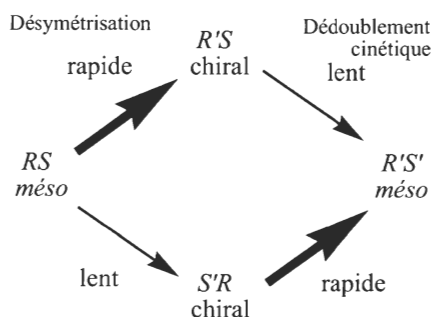
L'énantiosélectivité de la désymétrisation peut s'évaluer à l'aide de la pureté énantiomérique du produit puisque celle-ci reste constante tout au long de la réaction (Équation 2).

Équation 2. Le ratio énantiomérique d'une désymétrisation.

$$E = (1 + ee_p / 1 - ee_p)$$

Plusieurs désymétrisations catalysées par des lipases sur des substrats *méso* sont suivies d'une résolution cinétique subséquente. Cette deuxième réaction permet fréquemment d'augmenter la pureté énantiomérique du produit au détriment d'un rendement théorique. Par contre, il est possible que cette réaction subséquente diminue non seulement le rendement mais aussi la pureté énantiomérique (Figure 21).

Figure 21. Désymétrisation couplée à un dédoublement cinétique.



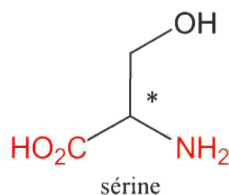
L'évaluation de l'énantiosélectivité de cette méthode est plus difficile que celle des dédoublements cinétiques puisqu'il est nécessaire que trois variables soient mesurées : l'énantiosélectivité ainsi que la vitesse relative de chaque étape. Pour cette raison, la plupart des chercheurs rapportent uniquement la pureté énantiomérique et le rendement.

Chapitre II : Synthèse énantiosélective de dérivés de l'alpha-méthylsérinol

2.1 Source et fonction (utilité) de la sérine

La sérine fait partie des 20 acides α -aminés naturels plus particulièrement des 10 acides aminés non essentiels puisqu'elle peut être biosynthétisée par l'humain. Elle est présente dans la plupart des protéines et c'est l'un des acides aminés naturels les plus abondants chez l'humain. Elle constitue approximativement 4% des acides aminés des protéines de l'organisme humain. Cet acide α -aminé aliphatique possède une fonction alcool qui le rend hydrophile, mais surtout qui lui permet d'effectuer des réactions d'estérifications avec l'acide phosphorique (Figure 22). Cette réaction est importante dans la régulation de l'activité des protéines.

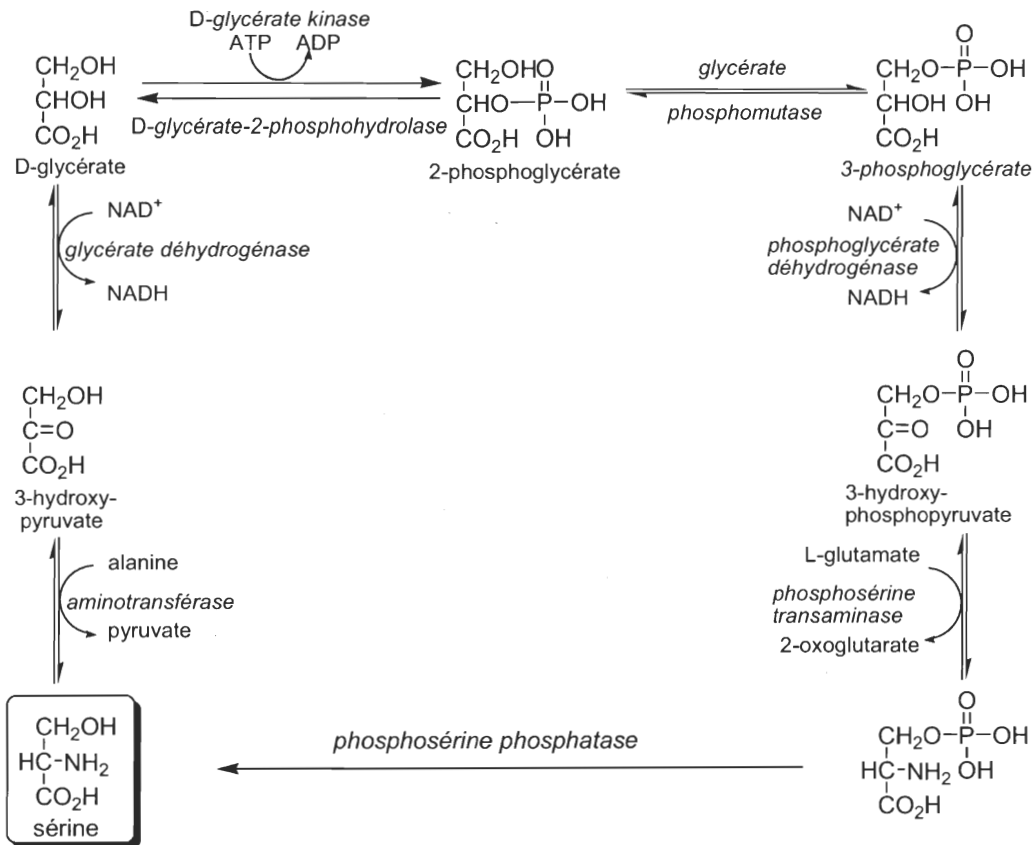
Figure 22. Structure de la sérine.



La sérine joue un rôle important dans plusieurs réactions d'hydrolyse catalysées par les hydrolases à sérine, puisqu'elle fait partie de la triade catalytique présente dans la cavité du site actif de ces enzymes. Son rôle est également majeur dans une variété de voies biosynthétiques impliquant l'absorption de la créatine et la formation de pyrimidines, de purines, de porphyrines. Elle est aussi spécialement importante au fonctionnement propre du cerveau et du système nerveux central puisqu'elle est présente dans les protéines qui forment le cerveau et qui recouvrent les nerfs. Cet acide aminé aide à la formation de phospholipides nécessaire à la construction de chaque cellule du corps humain. Son implication est utile aux fonctions de l'ARN et de l'ADN, au métabolisme des gras et des acides gras, à la formation des muscles ainsi qu'au maintien en santé du système immunitaire. C'est en aidant à la production d'immunoglobulines et d'anticorps, que la sérine renforce le système immunitaire.

Chez l'être humain, la sérine est biosynthétisée dans le foie et dans les reins selon deux voies de synthèse à partir de l'acide D-glycérique, des acides 2- et 3-phosphoglycériques (Figure 23). Une des voies de synthèse produit la sérine directement par transamination de l'hydroxypyruvate, et l'autre voie produit la sérine à partir de la phosphosérine formée à l'aide du 3-phosphoglycérate. La voie de synthèse faisant intervenir les intermédiaires phosphorylés est prédominante chez la plupart des vertébrés.

Figure 23. Biosynthèse de la sérine.

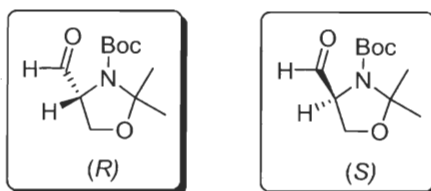


2.2 La synthèse de dérivés chiraux de la sérine

2.2.1 Les *N*-Boc-*N,O*-isopropylidènesérinaldéhydes chiraux

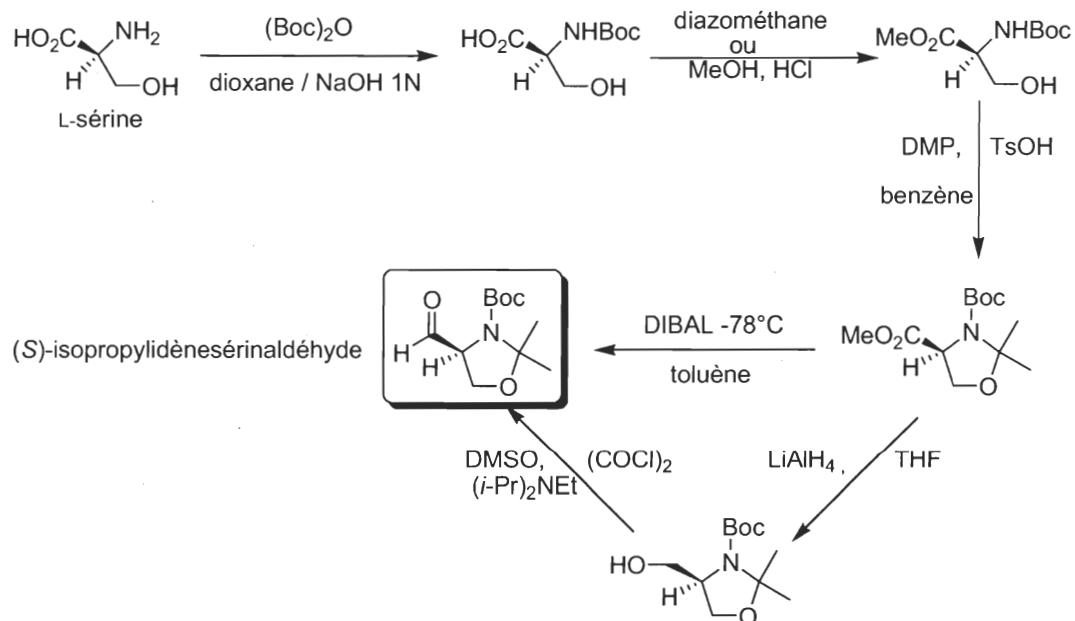
Parmi les dérivés chiraux de la sérine qui ont fréquemment fait l'objet d'études depuis les 20 dernières années, nous retrouvons les isopropylidènesérinaldéhydes connus sous le nom des aldéhydes de Garner (Figure 24). Ses formes énantiomériquement pures ont été intensément étudiées puisque le développement d'une méthode simple et réalisable à l'échelle préparative est crucial pour ses applications en synthèse. Ces derniers synthons peuvent être préparés à partir d'une source chirale attrayante comme les acides aminés naturels telle la L-sérine et la L-méthionine. Les dérivés chiraux de la sérine constituent des précurseurs d'acides aminés, de sucre aminés synthétiques ainsi que d'antibiotiques.

Figure 24. Structure du (*R*)-isopropylidènesérinaldéhyde et du (*S*)-isopropylidènesérinaldéhyde.



2.2.1.2 Préparation des *N*-Boc-*N,O*-isopropylidènesérinaldéhydes chiraux

Garner fut le premier à préparer le (*S*)-isopropylidènesérinaldéhyde par approche chiron à partir de la L-sérine¹⁰⁶ et c'est ce qui donna naissance à ce type d'aldéhyde (Figure 25). Les critères considérés par Garner et Park^{107,108} pour la préparation de ces isopropylidènes sont les suivants : tout d'abord sa synthèse devait être réalisable à l'échelle préparative, ensuite ce synthon devait présenter une stabilité chimique et configurationnelle, il devait posséder également l'habilité à exercer un contrôle stéréoisomérique lors de réactions d'additions et être facilement déprotégeable lors de manipulations subséquentes.

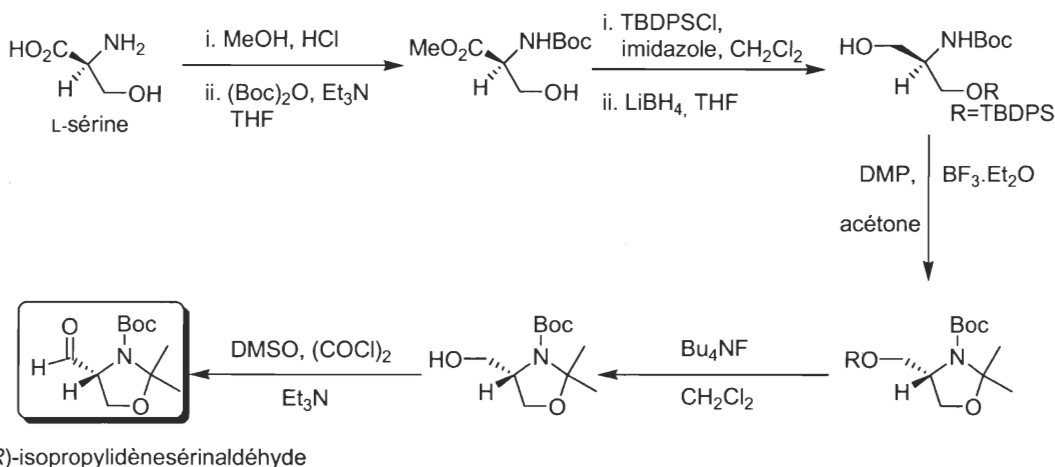
Figure 25. Préparation du (*S*)-isopropylidènesérinaldéhyde.

En dépit du fait que la préparation de l'ester méthylique de l'isopropylidène ainsi que sa transformation en aldéhyde aient été décrites en détail^{107,108}, plusieurs groupes de recherche ont observé certains inconvénients¹⁰⁹⁻¹¹³ provenant de la procédure originale. La présence d'aldéhyde, d'alcool et d'ester non réagit, lors de la réduction avec DIBAL, a forcé l'élaboration d'une voie alternative, c'est pourquoi Meffre et ses collaborateurs¹¹² ont décrit une séquence de réduction-oxydation pour pallier à cet inconvénient (Figure 25). Ils ont premièrement réduit l'ester méthylique en alcool à l'aide de l'hydrure d'aluminium et de lithium, afin d'oxyder l'alcool en aldéhyde sous les conditions d'oxydation de Swern. Par contre, l'utilisation de la triéthylamine, préalablement publié par Roush et Hunt¹¹⁰ pour l'oxydation de Swern, génère une faible pureté énantiomérique de l'aldéhyde (ee :75%). De ce fait, Dondoni et Perrone¹¹³ ont fait appel à l'utilisation d'une base encombrée de Hünig, la diisopropyléthylamine, pour augmenter la pureté énantiomérique à 96%.

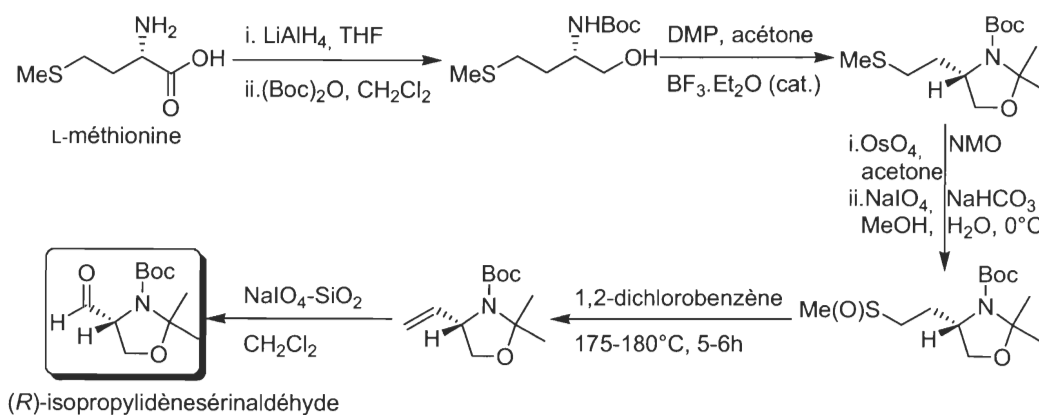
Dans le but d'obtenir l'aldéhyde de Garner de configuration *R*, Avenozza et Cativiela¹¹⁴ ont élaboré une voie de synthèse permettant d'inverser la configuration de l'isopropylidènesérinaldéhyde. La racémisation du produit (15%) due à l'utilisation de la triéthylamine lors de l'oxydation de Swern, constitue l'unique inconvénient de leur

méthode. Leur synthèse, réalisée par approche chiron à partir de la L-sérine, est un choix avantageux puisque la D-sérine est trois fois plus dispendieuse que la L-sérine (Figure 26). Son coût élevé est attribuable à son origine synthétique puisqu'il ne fait pas partie intégrante de la famille des acides aminés naturels.

Figure 26. Préparation du (*R*)-isopropylidènesérinaldéhyde.

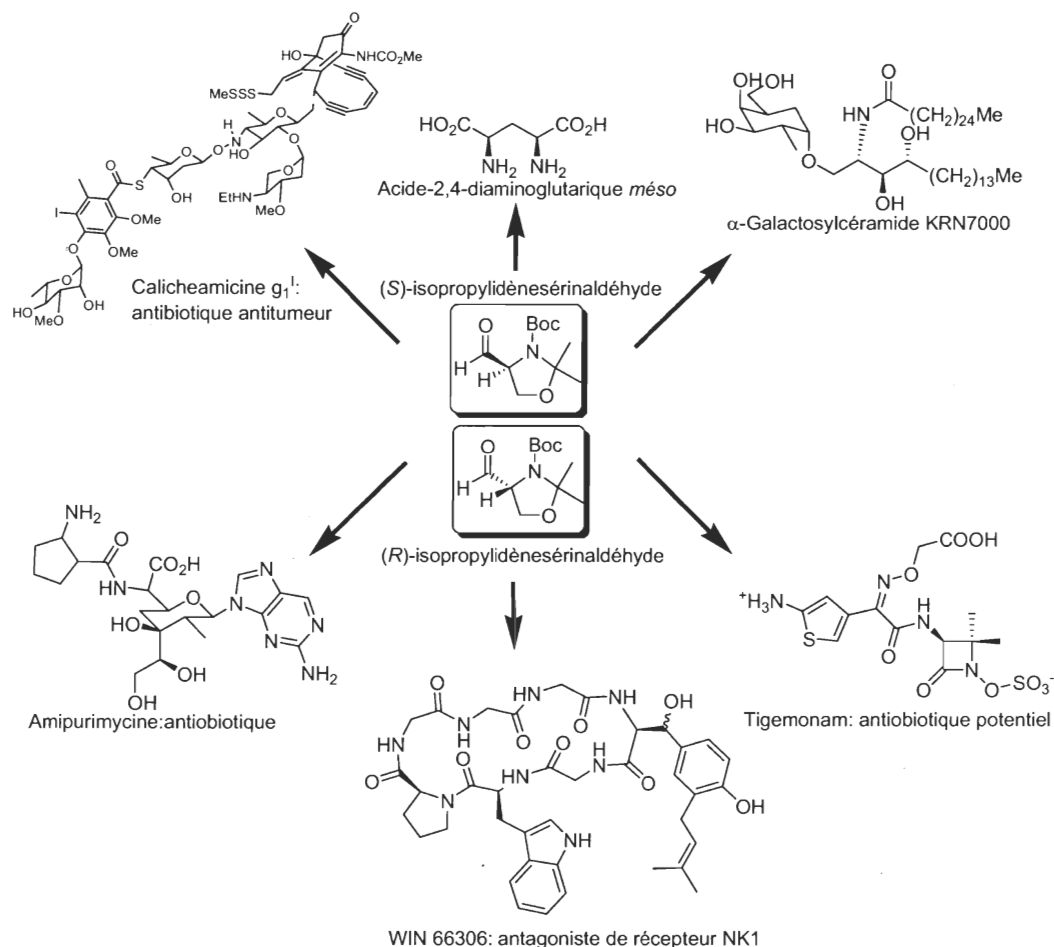


La conversion de la L-méthionine en dérivé de la sérine d'Ohfuné et ses collaborateurs¹¹⁵ a grandement inspiré Datta et Kumar¹¹⁶ pour développer une voie alternative permettant de synthétiser l'aldéhyde de Garner de configuration *R*. Le coût élevé de la D-sérine justifiait le développement d'une nouvelle voie de synthèse à partir de la L-méthionine. Leur stratégie de synthèse sélectionnée consistait à former un groupement sulfoxide sur la L-méthionine, pour ensuite le soumettre à une déhydrosulfénylation dans le 1,2-dichlorobenzène afin de produire l'alcène. Finalement, l'obtention de l'alcène leur a permis de générer l'aldéhyde de Garner de configuration *R* par oxydation (Figure 27).

Figure 27. Préparation du (*R*)-isopropylidènesérinaldéhyde à partir de la L-méthionine.

2.2.1.3 Les applications des *N*-Boc-*N,O*-isopropylidènesérinaldéhydes chiraux

Les *N*-Boc-*N,O*-isopropylidènesérinaldéhydes comme synthons ont sans aucun doute une importance en synthèse organique puisque la diversité de leurs applications est très étendue. Que ce soit pour la synthèse d'acides aminés synthétiques, d'antagonistes de récepteurs ou d'antibiotiques, ils constituent d'excellents composés de départ pour la préparation de synthons énantiomériquement purs potentiellement utiles. D'ailleurs ils ont permis la réalisation de plusieurs synthèses, notamment celle du sucre aminé calichéamicine γ_1 ¹¹⁰, de l'acide 2,4-diaminoglutarique *méso*¹¹⁷, de l' α -galactosylcéramide¹¹⁸, de l'amipuricyne¹¹⁹, d'un heptapeptide cyclique¹²⁰ et du Tigemonam¹²¹ pour ne mentionner que ceux-ci (Figure 28).

Figure 28. Les applications des *N*-Boc-*N,O*-isopropylidènesérinaldéhydes chiraux.

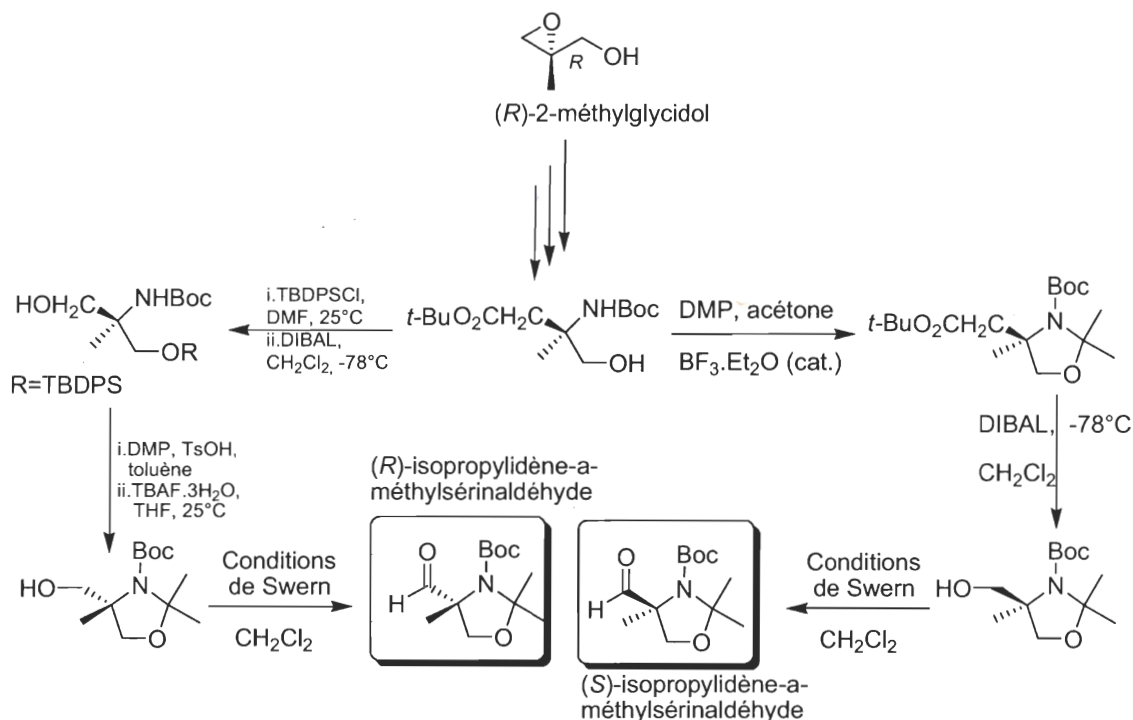
2.2.2. Les *N*-Boc-*N,O*-isopropylidène- α -méthylsérinaldéhydes chiraux

2.2.2.1 Préparation des *N*-Boc-*N,O*-isopropylidène- α -méthylsérinaldéhydes chiraux

Avenzoza et Cativiela¹²² ont utilisé de l'approche chiron pour élaborer une synthèse de l'isopropylidène- α -méthylsérinaldéhyde (Figure 29). La versatilité de cette stratégie leur a permis de générer les énantiomères de configuration *R* et *S* à partir du même composé de départ, le *(R)*-2-méthylglycidol. Pour ce faire, le dérivé trichloroacétimide de ce dernier a été transformé en dérivé du sérinol, à l'aide d'une cyclisation catalysée par le chlorure de diéthylaluminium (Et_2AlCl), suivi d'une pivaloylation, d'une hydrolyse acide de l'oxazolidine formée et d'une *tert*-butoxycarbonylation¹²³. La manipulation de ce dérivé clé

à l'aide de réactions de protection, de réduction, d'acétalisation et d'oxydation s'est avérée efficace sur une échelle de 3 grammes.

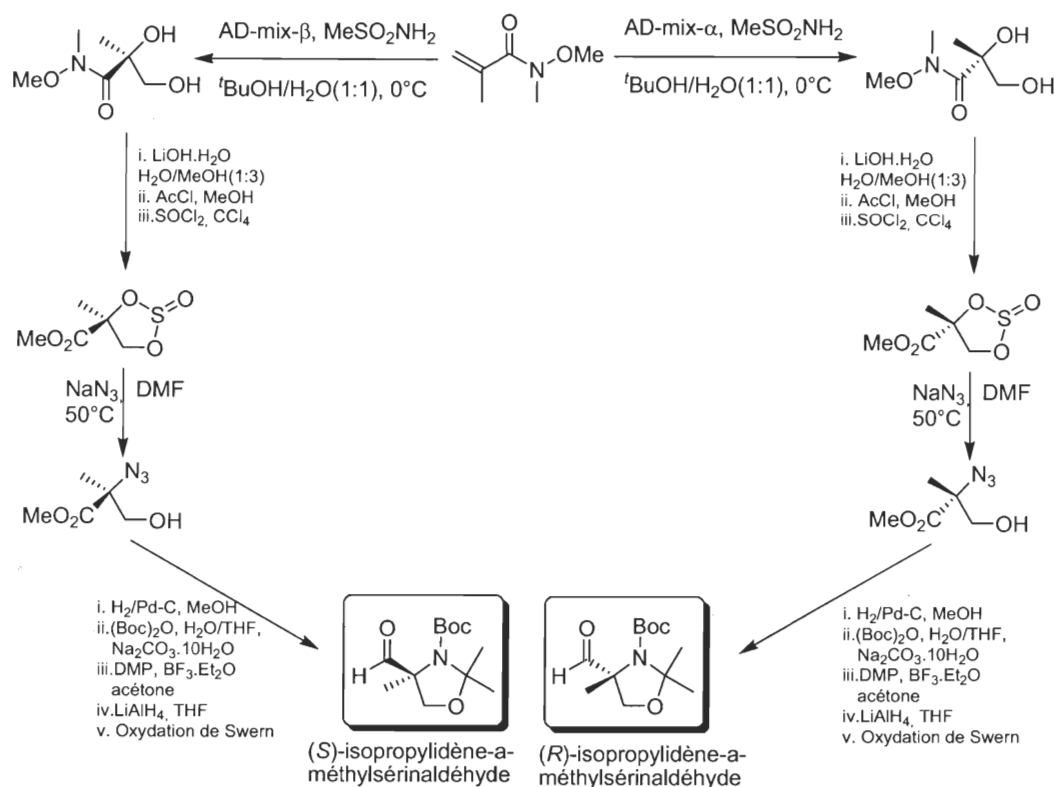
Figure 29. Préparation du (*R*)- et du (*S*)-isopropylidène- α -méthylsérinaldéhyde à partir du (*R*)-2-méthylglycidol.



Plus récemment, Avenoza et Catiuela¹²⁴ ont élaboré une synthèse énantiosélective du (*S*)- et du (*R*)- α -méthylsérines afin de l'appliquer à la synthèse du (*S*)- et du (*R*)-*N*-Boc-, *N*,*O*-isopropylidène- α -méthylsérinals (Figure 30). L'étape clé de leur stratégie de synthèse est une dihydroxylation de Sharpless de l'amide de Weinreb de l'acide 2-méthyl-2-propénoïque. Suite à l'obtention des diols (*S*) et (*R*), l'amide de Weinreb de chaque énantiomère a été hydrolysé, l'acide généré a été estérifié et ensuite les diols ont été cyclisés à l'aide du chlorure de thionyle. Le sulfonate produit a permis l'insertion de l'azote. Ce dernier a été hydrogéné en amine qui a été protégé par un groupement Boc. L'ester méthylique de l'isopropylidène formé a été réduit avec l'hydrure d'aluminium et de lithium, et oxydé sous les conditions de Swern dans le but de générer le (*S*) et le (*R*)-*N*-Boc-

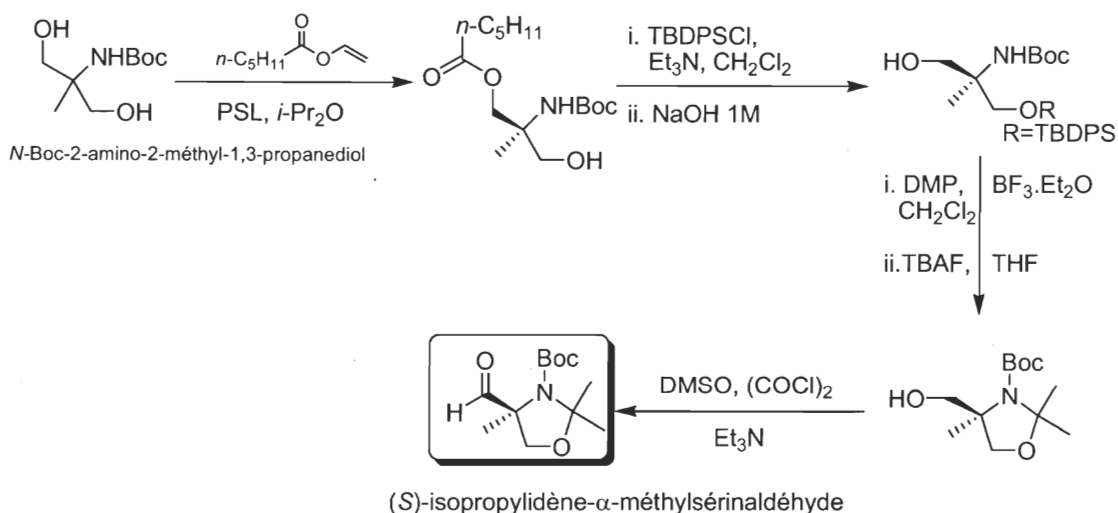
N,O-isopropylidène- α -méthylsérinal. L'inconvénient de cette méthode réside en son nombre élevé d'étapes.

Figure 30. Préparation du (*R*) et du (*S*)-isopropylidènesérinaldéhyde à partir de la synthèse énantiosélective de l' α -méthylsérine.



Parallèlement à nos recherches, Nishi¹²⁵ et ses collaborateurs ont décrit plus récemment une synthèse énantiosélective du (*S*)-*N*-Boc-*N,O*-isopropylidène- α -méthylsérinal à partir du 2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol (Figure 31). L'étape clé leur permettant de générer la chiralité est une désymétrisation du diol prochiral comportant un centre quaternaire. L'utilisation de la lipase de *Pseudomonas* sp. et de l'hexanoate de vinyle comme agent acylant dans l'isopropyléther leur a permis d'obtenir une pureté optique enrichie. Cette voie de synthèse s'avère intéressante, par contre l'excès énantiomère maximal de 89% obtenu démontre l'inconvénient de cette méthode soit la stéréosélectivité non satisfaisante de la lipase utilisée. Les recherches menées au cours de ce projet ont également prouvé la faible stéréosélectivité de plusieurs hydrolases face à ce substrat.

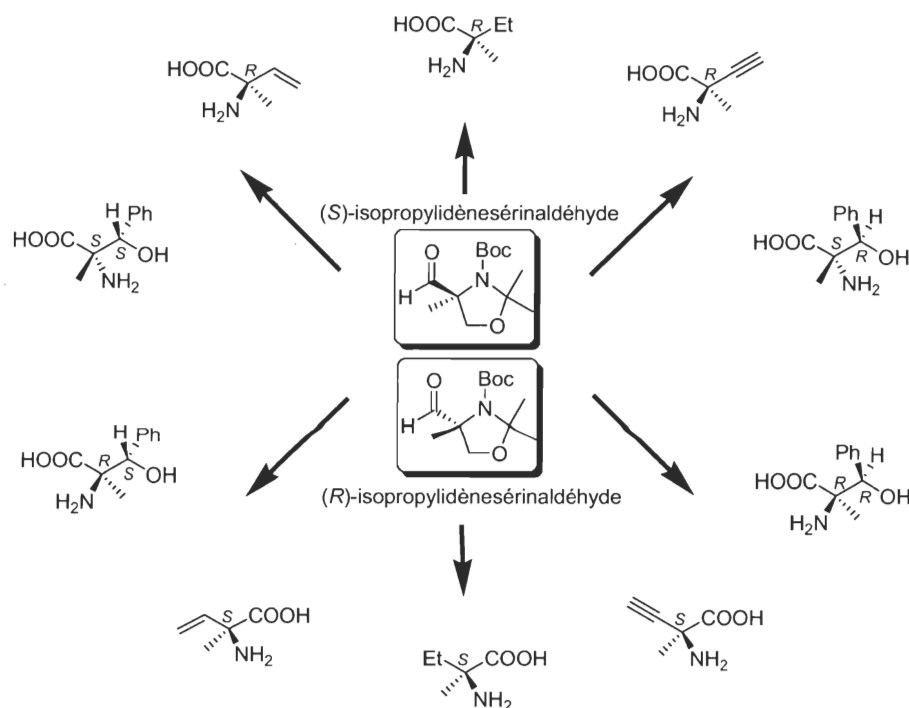
Figure 31. Préparation du (*S*)-isopropylidène- α -méthylsérinaldéhyde à partir de la désymétrisation enzymatique énantiosélective de l' α -méthylsérinol.



2.2.2.2 Les applications des *N*-Boc-*N,O*-isopropylidène- α -méthylsérinaldéhydes chiraux

L'application principale des *N*-Boc-*N,O*-isopropylidène- α -méthylsérinaldéhydes chiraux est sans contredit la synthèse d'acides α -aminés α -alkylés. Ce type d'acides aminés est fréquemment utilisé dans le design et la synthèse de plusieurs analogues conformationnels de peptides bioactifs, puisque la contrainte conformationnelle qu'ils offrent est de grande utilité en synthèse peptidomimétique. Plusieurs molécules biologiquement actives ont des sous-structures similaires aux acides α -aminés α -alkylés. Mentionnons parmi ces acides aminés, l'acide 2-amino-2-méthylbutanoïque¹²², l' α -méthyl- β -phénylsérine¹²⁶ ainsi que l' α -vinylalanine et l' α -éthynylalanine¹²⁷ (Figure 32).

Figure 32. Les applications des *N*-Boc-*N,O*-isopropylidène- α -méthyl-sérinaldéhydes chiraux.



2.3 Stratégies et méthodes sélectionnées

Tout d'abord, le but de ce projet visait l'élaboration d'une voie de synthèse chimioenzymatique des aldéhydes de Garner α -méthylés à l'échelle préparative. Pour ce faire, nous avons envisagé d'utiliser un produit commercial peu dispendieux, l' α -méthyl sérinol.

Pour combler l'objectif principal de ce projet, une première stratégie a été établie inspirée de la désymétrisation du sérinol effectuée par Williams et Neri^{128,129}. L'avantage de cette méthode réside dans le coût du réactif de départ peu élevé, mais également dans la possibilité d'obtenir un rendement se rapprochant de 100% grâce à la désymétrisation enzymatique. La complémentarité des enzymes pourra aussi être exploitée pour produire les deux énantiomères des aldéhydes de Garner α -méthylés soit par hydrolyse enzymatique ou par transestérification enzymatique (Figure 33).

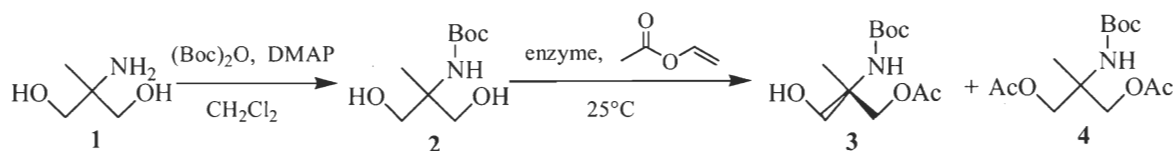
2.4 Résultats de la synthèse des dérivés chiraux de l'alpha-méthylsérinol

2.4.1 Désymétrisation enzymatique du *N*-Boc-2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol

Initialement, il est important de protéger l'amine du diol prochiral **1** afin d'éliminer les réactions d'acylation secondaire sur cette fonction. Ainsi, le diol prochiral **1** de départ disponible commercialement à faible coût a été protégé par un groupement *tert*-butoxycarbonyl à l'aide de l'anhydride de di-*tert*-butoxycarbonyl et récupéré dans un rendement quantitatif. Par la suite, le diol prochiral **2** a pu être soumis à un criblage enzymatique dans l'acétate de vinyle afin d'observer quelles lipases démontrent une activité en acylation enzymatique.

Plusieurs lipases ont été testées dont CAL-B, ROL, ANL, PSL, RSL, GCL, PeSL, RNL, MSL, CCL et WGL. Les lipases qui sont avérées actives sont PeSL, CAL-B, CSL et CCL. En employant ces lipases, le diol **2** a été acylé pour générer le monoacétate **3**, cependant la conversion n'a pas été complète dans tous les cas. Seule la lipase de *Candida antarctica* B a converti en entier le diol **2** en monoacétate **3**, cependant le mélange final contenait également 23% de diacétate **4**. De plus, la sélectivité demeure aussi faible que celles des autres lipases (Figure 34). Pour tenter d'augmenter la sélectivité de CAL-B, le butyrate de vinyle a été utilisé comme agent acylant mais l'excès énantiomère obtenu n'a pas été enrichi davantage.

Figure 34. Désymétrisation du *N*-Boc-2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol par acylation enzymatique.



Le tableau ci-dessous présente les données relatives au temps de réaction, à l'excès énantiomère, au taux de conversion du diol **2**, au pourcentage de monoacétate **3** dans le mélange final, et ce en fonction de la lipase utilisée pour désymétriser le diol prochiral **2** par acylation enzymatique (Tableau 1).

Tableau 1. Taux de conversion (%), taux de monoacétate dans le mélange final ($3/(3+4)$), temps de réaction (h) et excès énantiomères mesurés* sur le monoacétate **3** (ee_3) lors d'essais d'acylations enzymatiques réalisés avec diverses lipases.

lipase	temps (h)	conversion (%)	taux de $3/(3+4)$ (%)	ee_3 (%)
CCI	72	10	100	20
CSI	72	10	100	33
PeSI	72	20	100	43
CAL-B	1.25	100	70	39
CAL-B**	1.25	100	0	0

* ee mesurés par HPLC-colonne chirale Chiracel AD-H

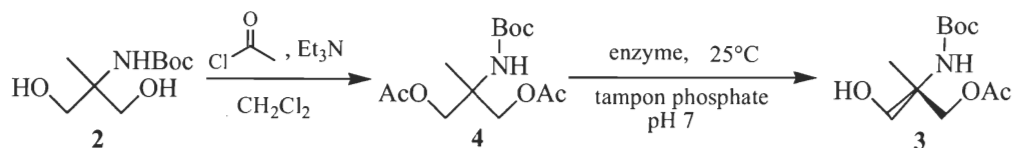
** acylation dans le butyrate de vinyle

À la lumière des résultats de la désymétrisation par acylation enzymatique du diol **2**, il était essentiel compte tenu les faibles excès énantiomères générés, d'étudier la désymétrisation du diacétate **4** par hydrolyse enzymatique. Pour ce faire, le diol **2** a été préalablement acylé de manière chimique, à l'aide du chlorure d'acétyle en présence de la triéthylamine, pour produire le diacétate **4**. Ce dernier a été récupéré dans un rendement satisfaisant de 88% après purification par chromatographie éclair sur gel de silice.

L'acétate (\pm)-**3** nécessaire à la mise au point de la méthode d'analyse d'excès énantiomères par HPLC en phase chirale, a été obtenu également de cette manière en employant qu'un équivalent de chlorure d'acétyle.

Subséquentement à l'acylation chimique du diol **2**, le diacétate **4** a été soumis au criblage enzymatique, dans une solution tampon phosphate à pH 7, pour évaluer quelles lipases présentent une activité en fonction de ce substrat. Diverses lipases ont été testées dont CAL-B, ROL, PLE, ANL, PSL, RSL, GCL, PeSL, RNL, MSL, CCL et WGL. De ce criblage, quatre lipases ont été retenues pour désymétriser le diacétate **4** : CAL-B, PLE, CRL, PeSL et RSL. Similairement aux conditions du criblage, la désymétrisation s'est effectuée dans une solution tampon phosphate à pH 7 (Figure 35).

Figure 35. Désymétrisation du *N*-Boc-2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol par hydrolyse enzymatique.



Il est fort probable qu'en cours de réaction ces lipases aient subi une désactivation, puisque le taux de conversion le plus élevé obtenu est de 48 % (PeSL). En ce qui a trait à la stéréosélectivité, aucune des lipases a été suffisamment sélective à l'exception de PeSL qui a démontré une sélectivité élevée mais une faible conversion sur une échelle de 50 mg. La désymétrisation du dibutyrate a aussi été essayée avec CAL-B et PeSL dans le but d'augmenter la sélectivité, mais les excès énantiomères obtenus ont été uniquement de 63% et 77% respectivement. Les données relatives à la désymétrisation du substrat **4** avec ces lipases sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2. Taux de conversion (%), temps de réaction (h) et excès énantiomères mesurés* sur le monoacétate **3** (ee_3) lors d'essais d'hydrolyses enzymatiques réalisés avec diverses lipases.

lipase	temps (h)	conversion (%)	ee_3 (%)
PeSL	96	20	99
CRL	96	40	36
CAL-B	96	30	32
RSL	96	10	21
PLE	24	44	75

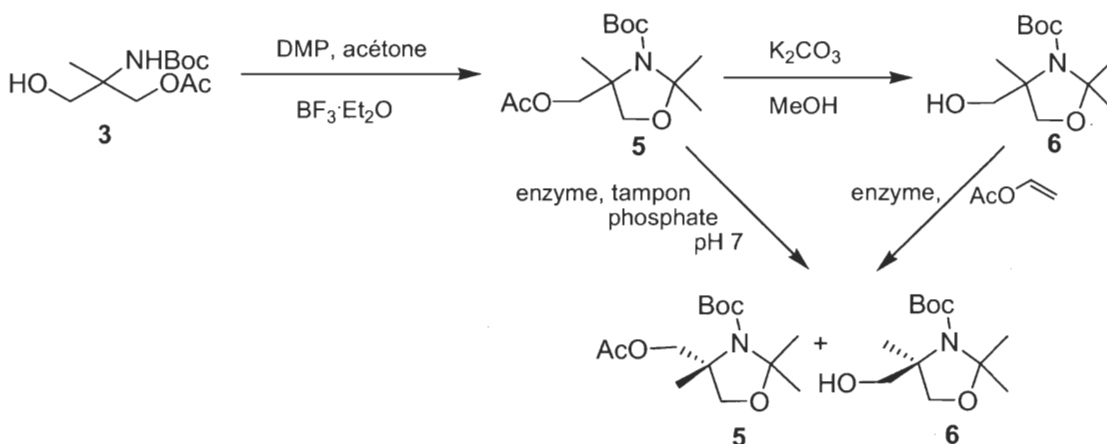
* ee mesurés par HPLC-colonne chirale Chiracel AD-H

La deuxième stratégie a donc été envisagée puisque les résultats de la désymétrisation par acylation et par hydrolyse enzymatique n'ont pas été satisfaisants.

2.4.2 Synthèse et dédoublement enzymatique du *N*-Boc-*N,O*-isopropylidène- α -méthylsérinol et de son ester correspondant

En premier lieu, il a été nécessaire d'acétaliser le mono acétate **3** afin d'effectuer un dédoublement cinétique. Il a donc été possible d'accéder au *N,O*-acétonide (\pm)-**5** par acétalisation du mono acétate **3** sous la catalyse de l'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dans l'acétone avec un rendement de 60 %. L'hydrolyse basique subséquente a permis de récupérer dans un rendement quantitatif l'alcool (\pm)-**6**. L'obtention des deux substrats racémiques (\pm)-**5** et (\pm)-**6** a également permis d'étudier la stéréosélectivité des lipases vis-à-vis ceux-ci (Figure 36).

Figure 36. Préparation et dédoublement cinétique enzymatique du *N*-Boc-*N,O*-isopropylidène- α -méthylsérinol et de son ester correspondant.



Tout d'abord, un criblage enzymatique par hydrolyse a été effectué sur l'acétate (\pm)-**5** avec les lipases suivantes : ANL, PSL, PPL, PCL, CAL-B, ROL, PeSL, RNL, RSL, GCL, MSL, CRL et WGL. Plusieurs de ces enzymes ont présenté une forte activité enzymatique puisque sept de ces lipases ont hydrolysé l'acétate (\pm)-**5** : CRL, ANL, PSL, PPL, PCL, ROL, RSL et GCL. L'acétate (\pm)-**5** a donc été hydrolysé dans une solution tampon phosphate afin d'obtenir le produit d'hydrolyse **6** et l'ester résiduel **5**. Malgré la diversité de lipases employées aucune n'a démontré une sélectivité élevée face à l'acétate (\pm)-**5**, les ratios énantiomères en témoignent (Tableau 3).

Tableau 3. Temps de réaction (h), taux de conversion (%), $[\alpha]_D$ de l'alcool **6** et de l'acétate **5**, ratio énantiomères (E) et excès énantiomères mesurés* sur l'alcool **6** (ee_6) et l'acétate **5** (ee_5) lors d'essais d'hydrolyse enzymatiques réalisés avec diverses lipases.

lipase	temps (h)	conversion (%)	ee_5 (%)	$[\alpha]_D$ 5	ee_6 (%)	$[\alpha]_D$ 6	ratio énantiomère E
CRL,CCL,ANL,ROL	24	100	0		0		0
PPL	60	77	28	-	8	+	<2
PCL	144	10	4	-	38	+	<2
GCL	24	16	4	+	17	-	<2
RSL	21	78	2	+	8	-	<2

* ee mesurés par GC-colonne chirale Chiraldex β -Dm

** ee de l'acétate **5** mesurés sur l'alcool (S)-**6** obtenu de l'hydrolyse basique

Compte tenu de la faible sélectivité des lipases vis-à-vis l'acétate (\pm)-**5**, il devenait primordial d'étudier le dédoublement cinétique de l'alcool racémique (\pm)-**6**, et ce par transestérification enzymatique. Tout comme l'hydrolyse de l'acétate (\pm)-**5**, les mêmes lipases ont été testées. De celles-ci, c'est CRL, CSL, RSL, GCL, PCL et PPL qui ont démontré une activité face à l'alcool racémique (\pm)-**6**. Ce dernier a été acylé dans l'acétate de vinyle afin de générer le produit d'acylation **5** et l'alcool résiduel **6**. Tout comme l'hydrolyse de l'acétate (\pm)-**5**, les lipases n'ont pas été sélectives pour acyler l'alcool correspondant (Tableau 4).

Tableau 4. Temps de réaction (h), taux de conversion (%), $[\alpha]_D$ de l'alcool **6** et de l'acétate **5**, ratio énantiomères (E) et excès énantiomères mesurés* sur l'alcool **6** (ee_6) et l'acétate **5** (ee_5) lors d'essais d'acylations enzymatiques réalisés avec diverses lipases.

lipase	temps (h)	conversion (%)	ee_5 (%)	$[\alpha]_D$ 5	ee_6 (%)	$[\alpha]_D$ 6	ratio énantiomère E
CSL,CCL	24	100	0		0		0
RSL	168	21	28	-	8	+	<2
GCL	168	51	22	-	23	+	<2
PCL	168	50	26	+	27	-	<2
PPL	168	5	22	+	1	-	<2

* ee mesurés par GC-colonne chirale Chiraldex β -Dm

** ee de l'acétate **5** mesurés sur l'alcool (S)-**6** obtenu de l'hydrolyse basique

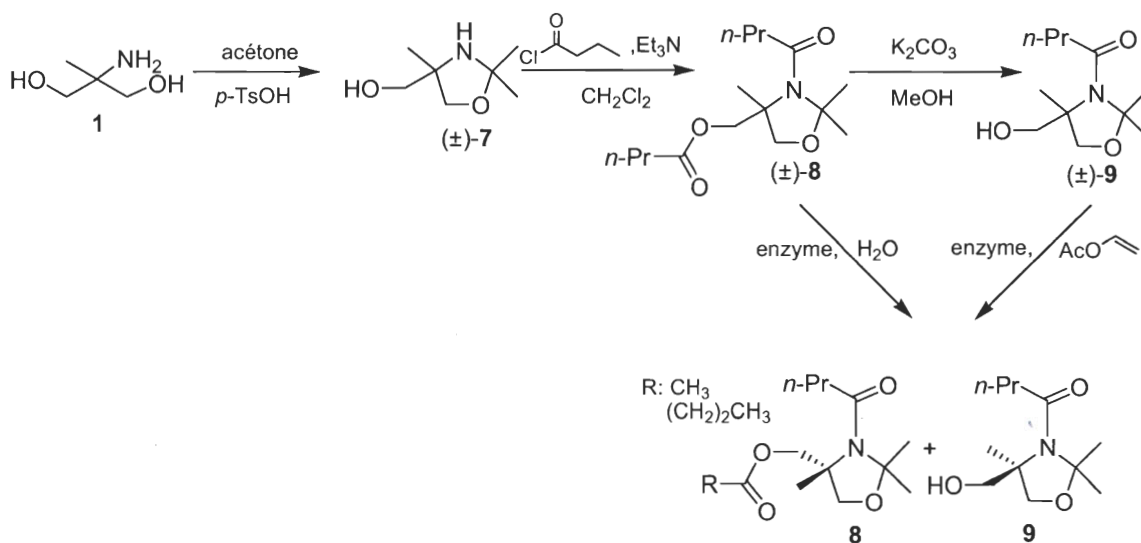
Face à ces résultats, des modifications ont été apportées au substrat dans le but d'obtenir une meilleure sélectivité puisque les résultats du dédoublement cinétique par hydrolyse et par acylation n'ont pas permis d'enrichir l'excès énantiomère de l'acétate (\pm)-**5** et l'alcool (\pm)-**6**.

2.4.3 Synthèse et dédoublement enzymatique du 1-(4-(hydroxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidin-3-yl)butan-1-one et de son ester correspondant

La modification du *N,O*-acétonide a été réalisé en privilégiant une voie de synthèse applicable à l'échelle préparative. De plus, afin d'augmenter la sélectivité des lipases, nous avons projeté d'allonger la chaîne aliphatique de l'alcool primaire (\pm)-**6**, car l'allongement de la chaîne peut induire une sélectivité plus élevée chez les lipases.

De la sorte, l'oxazolidine (\pm)-**7** a été généré par acétalisation du diol **1** selon la méthode de Bonnet¹³¹ (Figure 37). Cet oxazolidine a été récupéré sous forme de cristaux blancs dans un rendement de 64 % suite à sa purification par distillation sous pression réduite. L'oxazolidine (\pm)-**7** est un substrat intéressant pour démontrer la stéréosélectivité et la chimiosélectivité des lipases. Cependant, aucune chimiosélectivité n'a pu être observée avec l'utilisation de quelques lipases dont PPL, PCL, PSL, CAL-B et CRL lors de l'acylation enzymatique de l'oxazolidine (\pm)-**7**. Suite à ces observations, il était essentiel de protéger l'amine avant de procéder à l'étude enzymatique du substrat racémique (\pm)-**7**.

Figure 37. Préparation et dédoublement cinétique enzymatique de l'oxazolidine **8** et de son alcool **9** correspondant.



Toujours dans l'objectif d'élaborer une voie de synthèse à grande échelle, l'oxazolidine **(±)-7** a été diacylé à l'aide du chlorure de butyryle pour produire l'ester correspondant **(±)-8** qui a pu être purifié par distillation sous pression réduite (Figure 37). Ainsi l'amine **(±)-7** a été protégée tout en répondant également à la deuxième caractéristique visée par la modification du substrat, c'est-à-dire l'allongement de la chaîne aliphatique. La protection de l'amine à l'aide de l'anhydride de *tert*-butoxycarbonyle a été tentée, par contre le rendement a été extrêmement faible (8%). L'encombrement peut expliquer ce faible rendement.

Le criblage enzymatique de l'ester **(±)-8** a été réalisé à l'aide de plusieurs lipases comme PPL, CAL-B, PSL, PLE, RSL, GCL, PeSL, CRL et ANL. Seul les deux dernières lipases ont présenté une activité enzymatique envers l'ester **(±)-8** (Figure 37). Les essais de dédoublement cinétique enzymatique par hydrolyse catalysé par CRL et ANL ont été suivis par chromatographie sur couches minces. L'analyse de l'excès énantiomère de l'alcool **9** et de l'ester résiduel **8** a été effectuée suite à leur séparation, mais aucune de ces deux lipases n'a démontré une sélectivité significative. Une baisse de la température à $5\text{ }^\circ\text{C}$ ainsi qu'un ajout de différentes concentrations de CaCl_2 ont été tentés pour augmenter la faible sélectivité de la lipase de *Candida rugosa*. Cette ingénierie du milieu aqueux n'a fourni qu'un faible accroissement de la stéréosélectivité (Tableau 5).

Tableau 5. Temps de réaction (h), taux de conversion (%), $[\alpha]_D$, ratio énantiomères (E) et excès énantiomères mesurés* sur l'alcool **9** et l'ester **8** lors d'essais d'hydrolyses enzymatiques réalisés avec ANL et CRL.

lipase	temps (h)	conversion (%)	ee ₈ (%)	$[\alpha]_D$ 8	ee ₉ (%)	$[\alpha]_D$ 9	ratio énantiomère (E)
à 22°C							
ANL	6.75	10	5	-	44	-	3
CRL	29	75	47	-	17	-	2
à 5°C							
CRL							
CaCl ₂ : 0.00M	7	43	59	-	79	-	15
CRL							
CaCl ₂ : 0.02M	7	33	39	-	78	-	11
CRL							
CaCl ₂ : 0.08M	7	40	51	-	78	-	13
CRL							
CaCl ₂ : 0.10M	7	38	47	-	78	-	12
CRL							
CaCl ₂ : 0.50M	7	22	23	-	82	-	12

* GC-colonne chirale Astec ChiralDex (β -DM 120)

ee de l'acétate **8 mesurés sur l'alcool (+)-**9** obtenu de l'hydrolyse basique

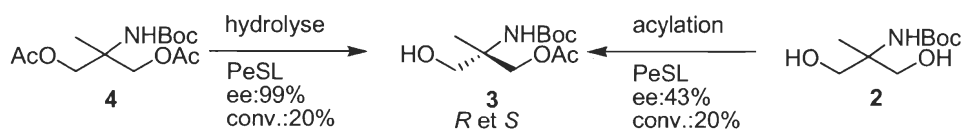
La faible sélectivité en hydrolyse de CRL et de ANL a justifié l'étude de l'acylation enzymatique de l'alcool (\pm)-**9** qui a été préparé par hydrolyse basique de l'ester (\pm)-**8** correspondant (Figure 37). Les lipases suivantes ont été utilisées pour effectuer le criblage enzymatique : CRL, ANL, CAL-B, PPL, ANL, ROL, RSL, GCL, PeSL, RNL, MSL et WGL. Dans ce cas-ci, aucune lipase n'a démontré une activité satisfaisante dans l'acétate de vinyle.

2.5 Conclusion

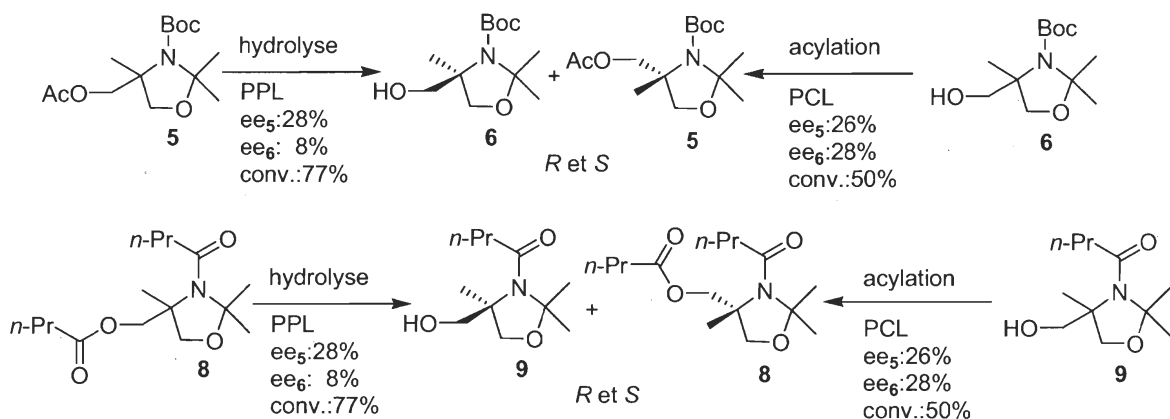
Ce projet visait la préparation d'un éventail de dérivés chiraux de l' α -méthylsérinol par voie chimioenzymatique. Le développement effectué sur la désymétrisation et la résolution cinétique de plusieurs dérivés de l' α -méthylsérinol afin d'accroître la sélectivité des lipases utilisées n'a cependant pas conduit à la préparation de composés énantiomériquement purs. La plupart des enzymes n'ont pas été assez stéréosélectives ou actives vis-à-vis ces dérivés autant par acylation que par hydrolyse (Figure 38).

Figure 38. Résumé des désymétrisations et des résolutions enzymatiques effectuées sur les dérivés de l' α -méthylsérinol.

1^{er} stratégie: désymétrisation



2^{ème} stratégie: résolution enzymatique

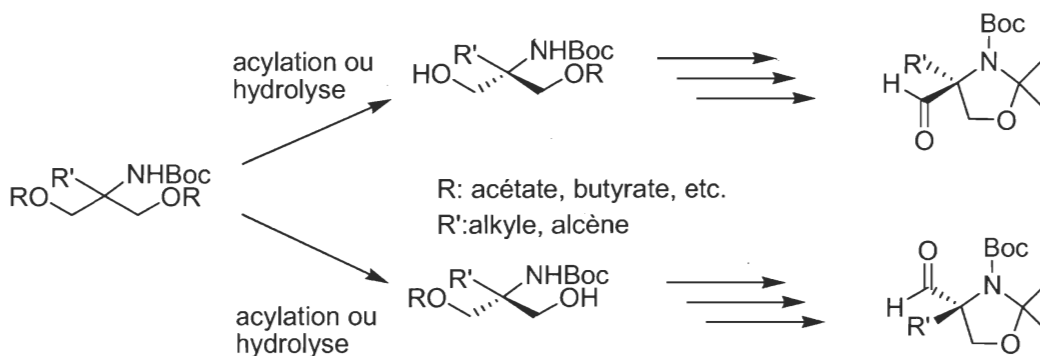


D'abord, tous les substrats qui ont été soumis à l'acylation ainsi qu'à l'hydrolyse de leurs esters correspondants n'ont pu être générés avec un excès énantiomérique et un rendement élevé simultanément. Dans certains cas de hauts excès énantiomères ont été obtenus cependant la conversion était faible sur petite échelle. C'est le cas notamment de la désymétrisation du diacétate 4 par hydrolyse à l'aide de PeSL (ee:99%, conv.:20%). Compte tenu de la faiblesse de ces résultats, la résolution enzymatique des oxazolidinone 5 et 6 par hydrolyse et acylation a été explorée. Le meilleur résultat obtenu n'a été que de 38% pour l'excès énantiomères de l'alcool 6 lors de l'hydrolyse de l'acétate 5 à l'aide de PCL.

La modification du substrat n'a pas permis d'obtenir une meilleure sélectivité des lipases employées. En effet, l'hydrolyse ou l'acylation des oxazolidines **8** et **9** n'a pas généré des composés de haute pureté optique. Le meilleur cas a été l'hydrolyse enzymatique de l'ester **8** à l'aide de CRL qui a fourni un excès énantiomère de 47% pour l'alcool **9** correspondant. L'abaissement de la température à 5°C a permis d'élever l'excès à 79% avec cependant un ratio énantiomère que de 15 pour cette réaction, ce qui est faible pour une résolution cinétique. Ce dernier n'a pu être augmenté davantage même avec l'ajout de CaCl₂. Curieusement aucune enzyme n'a démontré une activité catalytique pour l'acylation de l'alcool **9**.

Étant donné la faible sélectivité des lipases utilisées pour l'hydrolyse ou l'acylation des divers substrats de ce projet, aucune synthèse viable à l'échelle préparative n'a pu être mise au point. Les travaux futurs devraient s'orienter vers l'optimisation des conditions de désymétrisation de l' α -méthylsérinol développé par Nishi¹²⁵ après la fin de ce travail. La désymétrisation des dérivés du sérinol portant des chaînes alkyles différentes pourra également être une avenue intéressante. Ainsi, l'obtention de dérivées chiraux par désymétrisation permettra de développer une gamme d'amino alcools et de dérivés chiraux de l'aldéhyde de Garner (Figure 39).

Figure 39. Travaux futurs.

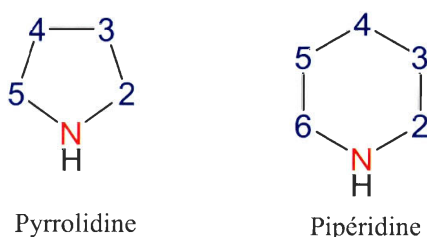


Chapitre III : Synthèse énantiosélective de pyrrolidines 2,5-disubstituées et de pipéridines 2,6-disubstituées

3.1 Nomenclature des pyrrolidines et des pipéridines

Les pyrrolidines et les pipéridines sont des hétérocycles azotés. Le cycle des pyrrolidines contient 5 membres, dont un est un atome d'azote. On les retrouve généralement disubstituées en position 2,5, 2,3 et 2,4. La pyrrolidine est en soi un liquide fortement basique. Ce type de structure est présente dans les feuilles de tabac¹³². Pour ce qui est des pipéridines, leur cycle est composé de 5 atomes de carbone et d'un atome d'azote. On les retrouve souvent soit disubstituées en position 2,6 et 3,5 ou trisubstituées en position 2,4,6 (Figure 40).

Figure 40. Structure de la pyrrolidine et de la pipéridine.



3.2 Sources naturelles et activité biologique des pyrrolidines et des pipéridines

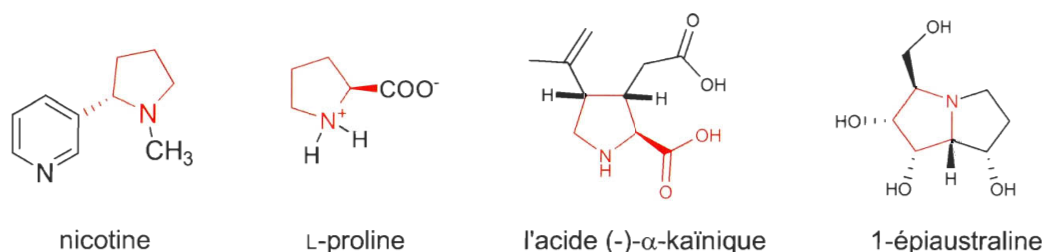
Les pyrrolidines et les pipéridines sont fréquemment rencontrées dans les organismes vivants. On les retrouve principalement sous forme d'alcaloïdes dans les plantes, les animaux et les microorganismes. D'ailleurs, la synthèse racémique ou stéréosélective de ces alcaloïdes¹³³⁻¹³⁹ et des hétérocycles azotés saturés¹⁴⁰ ont fait l'objet d'études intensives depuis de nombreuses années.

Plusieurs sources naturelles contiennent des cycles pyrrolidines comme la nicotine, la L-proline, l'acide (-)- α -kaïnique et la 1-épi australine (Figure 41). L'acide (-)- α -kaïnique, isolé des algues marines japonaises *Digenea simplex* a suscité l'intérêt depuis sa première isolation par Takemoto en 1953¹⁴¹. Cet acide est composé essentiellement d'un cycle

pyrrolidine trisubstitué en position 2,3,4. L'intérêt porté pour la synthèse de ce composé^{142,143} réside dans son activité neuropharmacologique au sein du système nerveux central.

La 1-épi australine est un alcaloïde de type pyrrolizidine qui peut être synthétisé à partir de dérivés de la pyrrolidine. Cet inhibiteur de glycosidases a été isolé par Harris en 1989¹⁴⁴, à partir d'une plante légumineuse australienne *Castanospermum australe* A. Cunn.. Tout récemment, Donohoe a publié des synthèses stéréosélectives de cet inhibiteur^{145,146}.

Figure 41. Sources naturelles de pyrrolidines.



En ce qui a trait aux pipéridines, il existe également de nombreuses sources naturelles à partir desquelles ces hétérocycles biologiquement actifs comme l'alcaloïde de dendrobates (+)-241, l'acide pipécolique, la monomorine I et la nojirimycine ont été isolés (Figure 42).

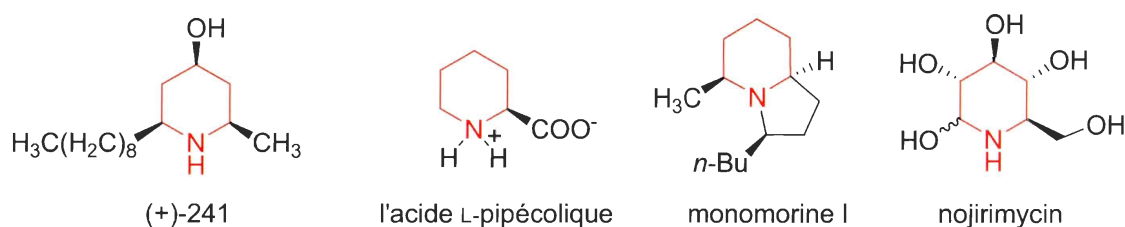
Entre autres, plusieurs monocycles et bicycles contenant la structure pipéridine ont été isolés de la peau des grenouilles dendrobates. C'est le cas de l'alcaloïde de dendrobates (+)-241, une pipéridine trisubstitué en position 2,4,6. Sa synthèse racémique a été réalisée par Daly¹⁴⁷ tandis que sa synthèse énantiosélective a été réalisée par Chênevert et Dickman¹⁴⁸. Cet alcaloïde est reconnu pour être un poison extrêmement puissant. Pour sa part, la monomorine I est une phéromone de reconnaissance spatiale isolée de la fourmi Pharaoh. Sa structure renferme aussi un cycle pipéridine.

L'acide pipécolique est un autre exemple de produit naturel biologiquement actif. Cet acide aminé non-protéino-génique est une cible attrayante pour plusieurs synthèses de produits naturels. *In vivo*, cet acide est un métabolite de la lysine. Il se retrouve dans les

fluides physiologiques humains à des concentrations particulièrement élevées chez les patients atteints du syndrome de Zellweger, de désordres génétiques et de maladies du foie¹⁴⁹.

Les sucres azotés de sources naturelles sont aussi composés de cycles pipéridines. Leur synthèse^{150,151} a suscité un intérêt grandissant depuis la découverte en 1966 du premier alcaloïde de ce type, la nojirimycine isolée du microorganisme *Streptomyces*¹⁵². Ce sucre azoté est un inhibiteur de glycosidases qui possède un potentiel thérapeutique remarquable pour le traitement du diabète, des infections virales et des tumeurs métastatiques.

Figure 42. Sources naturelles de pipéridines.



3.3 Préparation des pyrrolidines et des pipéridines

3.3.1 Synthèse des pyrrolidines

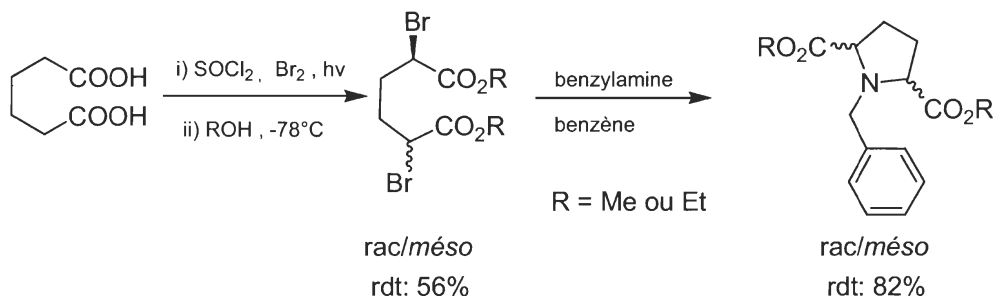
Depuis la découverte des premiers alcaloïdes de type pyrrolidine dans le venin des fourmis *Solenopsis*, plusieurs chercheurs se sont impliqués dans l'étude de ces produits naturels. Inopportunistement, leurs extractions à partir des plantes, des animaux et des microorganismes n'ont pas fourni des quantités suffisantes pour étudier en profondeur leur activité biologique ainsi que leurs mécanismes d'action. Il devenait donc indispensable de mettre au point des synthèses efficaces de pyrrolidines. Leur potentiel biologique a captivé l'intérêt des chimistes organiciens passionnés par le défi que représentait la synthèse énantiosélective des pyrrolidines 2,5-disubstitués.

En 1996, Figadère et Pichon¹⁵³ en ont dressé une liste complète couvrant une période d'environ 50 ans. Ces synthèses stéréosélectives se regroupent sous deux classes distinctes. La première classe implique la formation du cycle pyrrolidine par cyclisation

d'amines bis-homoallyliques, par cycloadditions 1,3-dipolaires, par cyclisation réductive ou par substitution nucléophile S_N2 . La deuxième fait intervenir la participation des hétérocycles azotés, comme la proline, sur lesquels des transformations chimiques sont appliquées tel l'oxydation, la réduction ainsi que les substitutions nucléophile et électrophile.

Dans le but de parfaire les objectifs de ce projet, notre attention s'est arrêtée sur une méthode de synthèse stéréosélective en particulier, l'aminocyclisation intermoléculaire des diesters α,α' -2,5-dibromoadipates (Figure 43). Cette stratégie de synthèse a été décrite par Cignarella¹⁵⁴ et réutilisée fréquemment¹⁵⁵⁻¹⁶³. Elle fait intervenir la benzylamine et les diesters α,α' -2,5-dibromoadipates qui ont été préparés selon des méthodes¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ datant du début du 20^{ème} siècle. En 1923, Seeman¹⁶⁷ a observé un mélange d'isomères lors de l'utilisation de la benzylamine. La diastéréosélectivité de cette aminocyclisation intermoléculaire est donc proportionnelle au rapport *méso*/racémique du dibromo de départ. Mise à part la diastéréosélectivité de cette méthode, l'emploi de la distillation peut rendre celle-ci envisageable à l'échelle préparative.

Figure 43. L'aminocyclisation intermoléculaire des diesters α,α' -2,5-dibromoadipates.



3.3.1.1 Synthèse enzymatique des pyrrolidines 2,5-disubstituées

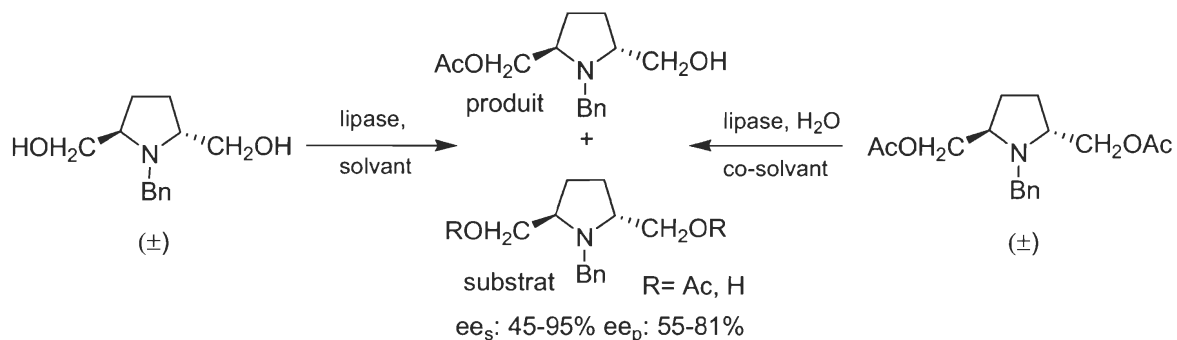
L'hydrolyse de diesters symétriques (*méso*) catalysé par les enzymes est une méthode efficace pour produire des composés optiquement actifs. La première désymétrisation des esters *cis* 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate a été rapportée en 1985 par Ohno¹⁶⁸ et ses collaborateurs. Ils ont employé l'estérase de foie de porc (PLE) pour générer le monoester méthylique avec un rendement de 85% et un excès énantiomère

de 80%. Norin et Hult¹⁶⁹ ont également rapporté la même désymétrisation en 1987 sans toutefois avoir obtenu un meilleur excès énantiomère. Cependant, après avoir publié des travaux concernant l'effet du DMSO sur l'énantiosélectivité de PLE¹⁷⁰, Boutelje¹⁷¹ et ses collaborateurs ont obtenu un excès énantiomérique de 99% pour la même réaction enzymatique. Cette désymétrisation a aussi été appliquée sur le diester éthylique *cis* par Colombo¹⁷² et ses collaborateurs, néanmoins l'excès énantiomère obtenu ne dépassait pas les 80% (Figure 44).

Figure 44. Désymétrisation des pyrrolidines *cis*-2,5-disubstituées.

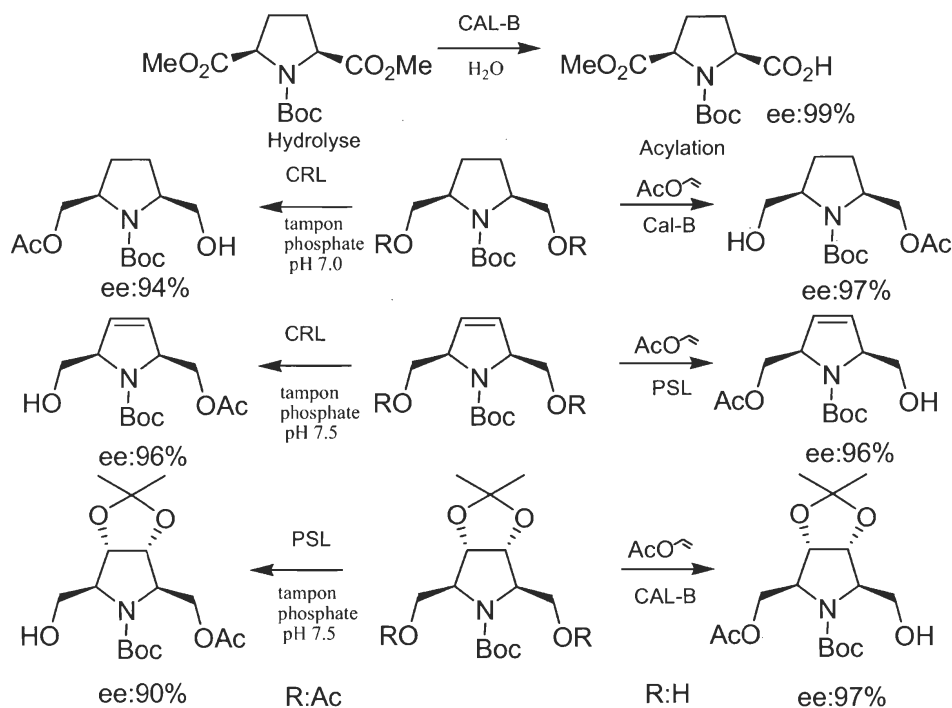


L'enrichissement énantiomérique de l'isomère *trans* des pyrrolidines 2,5-disubstituées a aussi été rapporté dans la littérature. Par contre, l'enrichissement du diester ou du diol *trans* s'est effectué par dédoublement cinétique puisque les isomères *trans* se présentent sous forme racémique dû à leur axe de symétrie C_2 (Figure 45). Achiwa¹⁷³ et ses collaborateurs ont rapporté de faibles excès énantiomères (ee :29-71%) lors du dédoublement cinétique du diméthyl pyrrolidine-2,5-dicarboxylate avec PLE. Par contre, Sibi¹⁷⁴ a publié par la suite le dédoublement cinétique séquentiel du *trans*-2,5-diol-1-benzylpyrrolidine avec de bons excès énantiomère (>99) lors de l'utilisation de PSL en acylation. Le dédoublement par hydrolyse du diacétate à l'aide de PPL (ee_s:45%, ee_p:55%), de PFL (ee_s:52%, ee_p:81%) et de PSL (ee_s:95%, ee_p:62%) a pour sa part été étudié par Kawanami^{175,176} et ses collaborateurs en 1994. Kawanami¹⁷⁷ a également publié des travaux au sujet de l'effet des substituants sur l'énantiosélectivité de PSL, PCL et de PFL en 2001 lors de l'acylation du diol *trans*.

Figure 45. Résolution des pyrrolidines *trans*-2,5-disubstituées.

En 2006, Donohoe¹⁷⁸ publia une approche enzymatique de désymétrisation de pyrrolines disubstituées. Chênevert²⁰¹ et ses collaborateurs ont également développé des désymétrisations sur des pyrrolines et des pyrrolidines à ce moment. Il est intéressant de mentionner que les synthons obtenus dans notre laboratoire détiennent de 2 à 4 centres de chiralité. De plus, la désymétrisation par acylation et par hydrolyse a permis de générer les deux énantiomères enrichis de chacun des substrats soumis aux enzymes (Figure 46). Une partie de ces travaux sont décrits à la section 3.5.

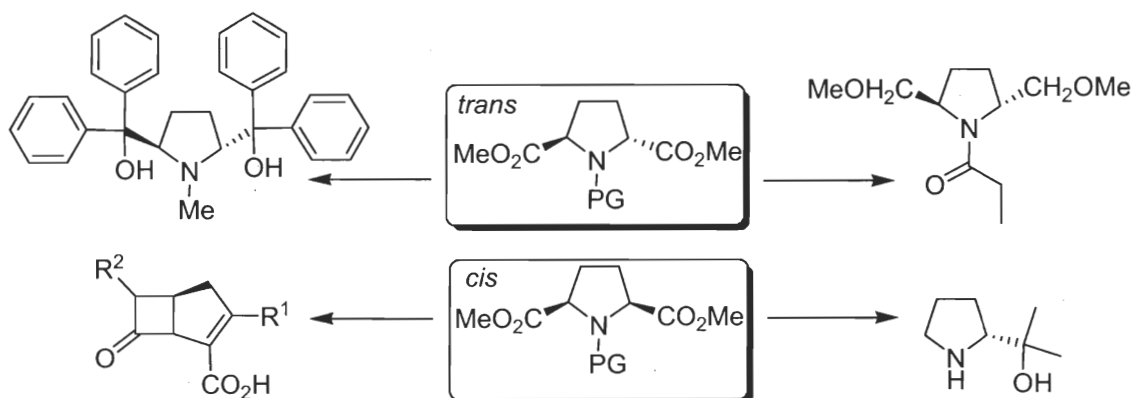
Figure 46. Désymétrisation de pyrrolines et de pyrrolidines.



3.3.1.2 Les applications des pyrrolidines 2,5-disubstituées

On attribue de nombreuses applications aux pyrrolidines 2,5-disubstituées. Notamment, ces types de composés sont employés pour synthétiser des ligands chiraux^{179,180} ainsi que des auxiliaires chiraux^{181,182}. Norin et Hult¹⁶⁹ les ont aussi utilisés comme synthons clés pour synthétiser des dérivés de la proline. La synthèse d'antibiotiques de type carbapéném¹⁶⁸ a également pu être réalisée à partir du diester méthylique désymétrisé à l'aide de PLE (Figure 47).

Figure 47. Les applications des pyrrolidines 2,5-disubstituées.



3.3.2 Synthèse des pipéridines

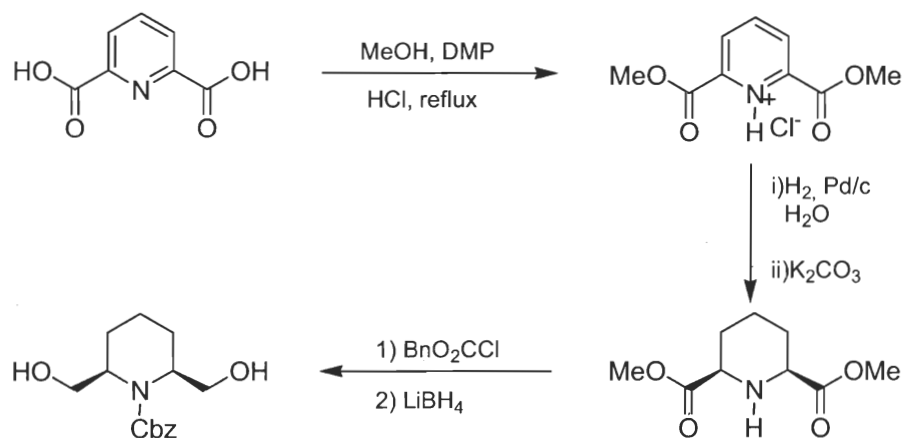
Les pipéridines fonctionnalisées font partie des synthons les plus communs que nous retrouvons dans les produits naturels. La synthèse de ces composés a été étudiée intensivement pour le développement de nouveaux médicaments contenant des hétérocycles azotés à 6 membres. Gouverné par la faible disponibilité de ces synthons et par le désir des chercheurs d'approfondir les études d'activités biologiques de ces hétérocycles azotés, d'immenses efforts ont été déployés pour les synthétiser. Entre autres, quelques revues de la littérature ont été publiées sur la synthèse des pipéridines 2,6-disubstituées¹⁸³ et la synthèse stéréosélective des pipéridines¹⁸⁴⁻¹⁸⁷.

La synthèse de ces composés a été répertoriée selon 4 catégories : la construction d'hétérocycles proprement dite, la formation d'hétérocycles par cycloaddition, la réduction des pyridines et le réarrangement d'hétérocycles. La construction d'hétérocycles est de loin

la catégorie qui renferme la plus grande diversité de réactions chimiques. On y retrouve la substitution nucléophile, l'amination réductive, les réactions d'amines avec des alcènes et des alcynes, les réactions des diènes, des enynes et des diyne, la cyclisation radicalaire et la condensation de Dieckmann.

D'après une revue de la littérature publié par Baliah¹⁸³ et ses collaborateurs, la méthode la plus efficace et la plus prometteuse à l'échelle préparative pour générer des pipéridines *cis*-2,6-disubstituées *méso* est l'hydrogénation catalytique des pyridines ou des hydroypyridines. Adkins¹⁸⁸ et ses collaborateurs ont employé un grand nombre de pipéridines 2,6-disubstituées afin de déterminer les conditions d'hydrogénation appropriées. Chênevert et Dickman¹⁸⁹ ont utilisé cette méthode pour préparer des pipéridines *cis*-2,6-disubstituées *méso* (Figure 48). L'étape clé consiste à hydrogéner le diester méthylique de la pyridine 2,6-dicarboxylate et de neutraliser le produit généré. Chênevert et Dickman¹⁴⁸ ont observé la production d'un mélange d'isomères *cis/trans* (~8:1) séparable par recristallisation lors de l'hydrogénation catalytique. Néanmoins, l'utilisation du diacide de pyridine-2,6-dicarboxylique comme produit de départ fait de cette méthode une excellente méthode de produire des pipéridines *cis*-2,6-disubstituées *méso* à faible coût.

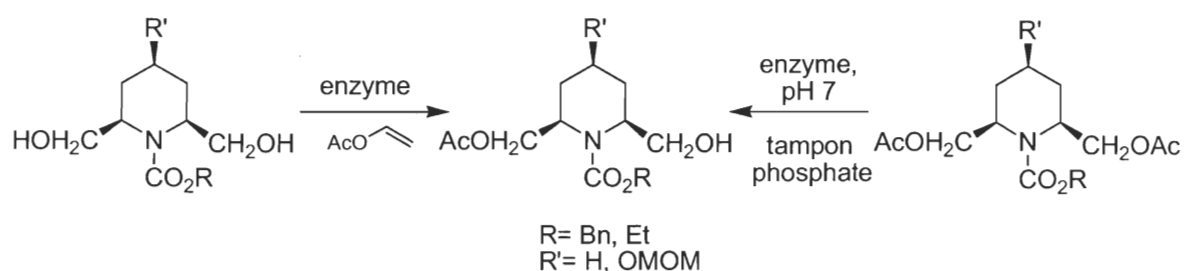
Figure 48. Préparation de pipéridines *cis*-2,6-disubstituées.



3.3.2.1 Synthèse enzymatique des pipéridines 2,6-disubstituées

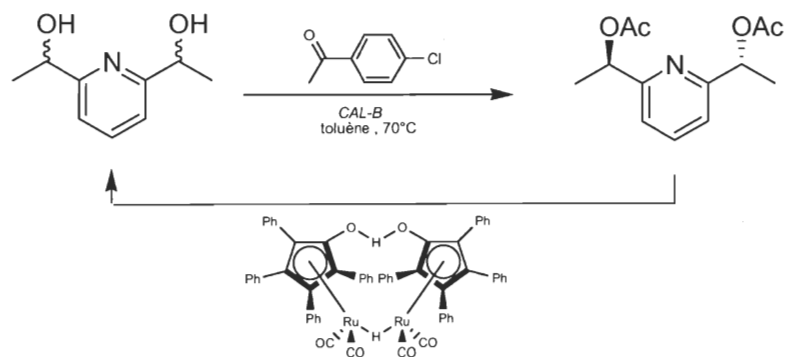
Chênevert^{189,190,148,191} et ses collaborateurs ont publié plusieurs désymétrisations notamment celle des pipéridines 2,6-disubstituées et 2,4,6-trisubstituées (Figure 49). Grâce à la lipase d'*Aspergillus niger*, ils ont obtenu d'excellents excès énantiomérique ($ee \geq 98\%$) en ce qui concerne les désymétrisations des pipéridines 2,6-disubstituées. Dans le cas de pipéridines trisubstituées, c'est non seulement la lipase d'*Aspergillus niger* qui a généré de fort excès énantiomères ($ee \geq 98\%$) et de bons rendements (76-83%), mais également la lipase de *Candida antarctica*.

Figure 49. Désymétrisation de pipéridines.



Bäckvall¹⁹² et ses collaborateurs ont récemment rapporté des améliorations substantielles sur le dédoublement cinétique dynamique d'une variété d'alcools secondaires par transestérification enzymatique en présence d'un complexe au ruthénium comme catalyseur. Parmi ces alcools secondaires, nous retrouvons un cas similaire aux pipéridines 2,6-disubstituées du point de vue structural, celui d'une pyridine 2,6-disubstituées. Celle-ci a pu être obtenue sous sa forme énantiomériquement pure avec un bon rendement (78%) par dédoublement cinétique dynamique (Figure 50).

Figure 50. Dédoublement cinétique dynamique de pyridine 2,6-disubstituées.

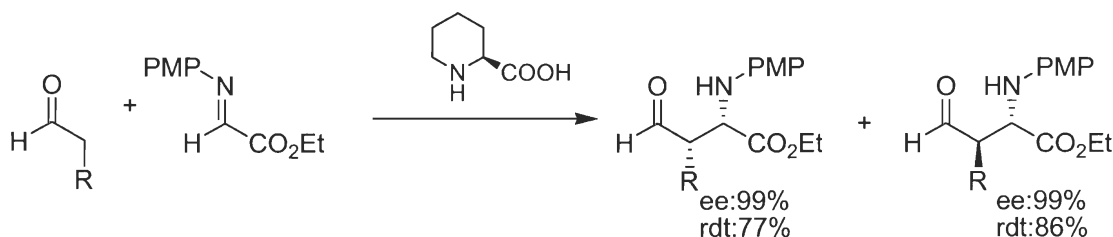


3.3.2.2 Les applications des dérivés de pipéridines

Due à leur capacité de mimer certains acides aminés, les dérivés de pipéridines sont employés en synthèse peptidomimétique. Dans l'industrie pharmaceutique, ces types de composés sont d'une grande utilité pour le design de nouveaux médicaments.

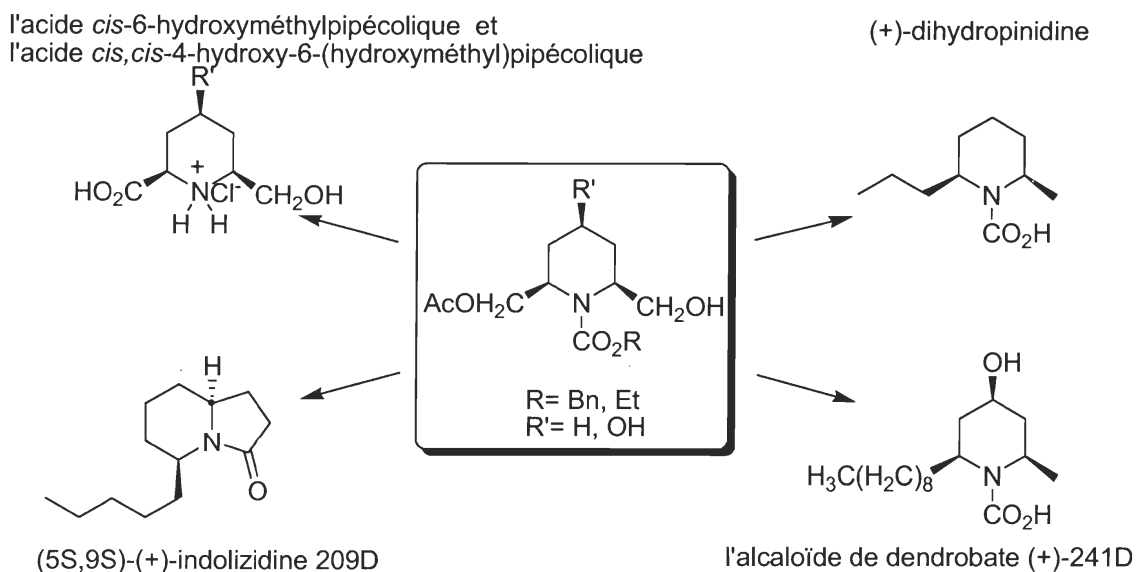
La synthèse asymétrique de l'acide pipécolique et de ses dérivés demeure encore un sujet d'actualité^{193,194}. Ces acides sont des constituants clés pour la synthèse peptidomimétique de plusieurs molécules bioactives naturelles auxquelles on attribue des propriétés anti-cancéreuses¹⁹⁵, immunosuppressives¹⁹⁶ et anesthésiques¹⁹⁷ etc.. L'acide L-pipécolique peut également servir de catalyseur pour des réactions asymétriques de Mannich¹⁹⁸ (Figure 51).

Figure 51. Réaction asymétrique de Mannich catalysée par l'acide L-pipécolique.



La voie de synthèse enzymatique développée par Chênevert et ses collaborateurs est d'une grande importance pour synthétiser des alcaloïdes de type pipéridines tel l'acide *cis*-6-hydroxyméthylpipécolique¹⁹⁹, la (+)-dihydropinidine et l'alcaloïde des dendrobates (+)-241D¹⁴⁸, la (5*S*,9*S*)-(+)-indolizidine 209D¹⁹¹ et l'acide *cis,cis*-4-hydroxy-6-(hydroxyméthyl)pipécolique²⁰⁰ (Figure 52).

Figure 52. Synthèse d'alcaloïdes.

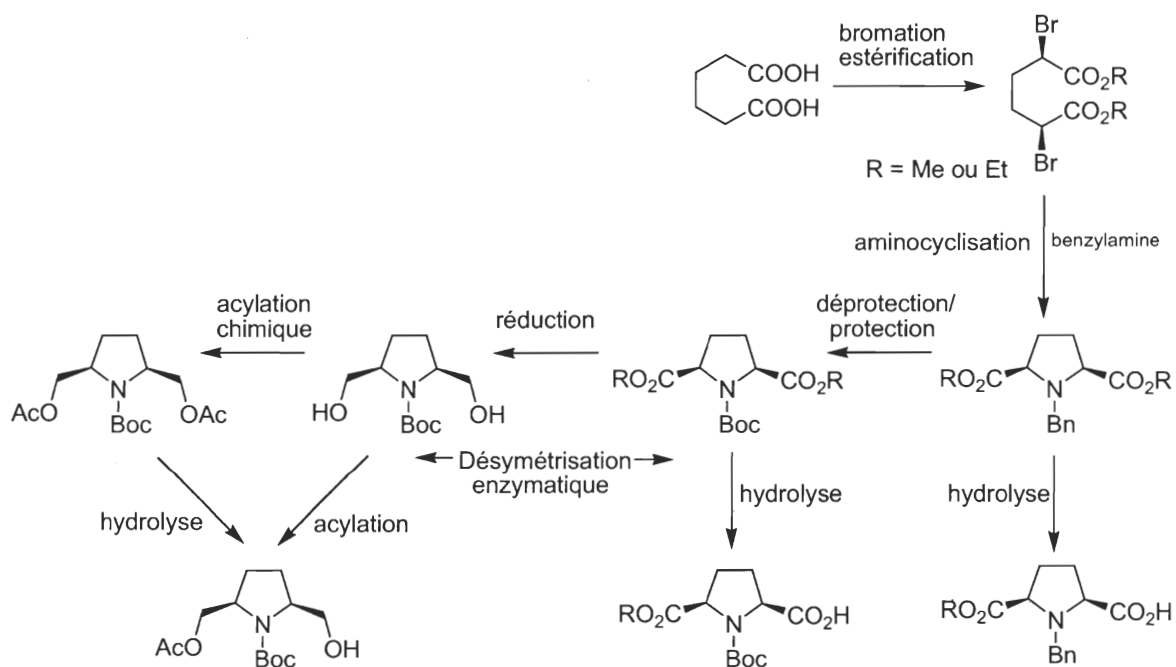


3.4 Stratégie et méthodes sélectionnées

L'objectif de ce projet, consiste à synthétiser des pyrrolidines 2,5-disubstituées ainsi que des pipéridines 2,6-disubstituées ayant une pureté optique accrue. L'étape clé permettant d'enrichir l'excès énantiomère de ces hétérocycles se base essentiellement sur la désymétrisation enzymatique de ces composés *méso*. Ces réactions ont été réalisées grâce à la biocatalyse des enzymes de la famille des hydrolases. Il va de soi que la disponibilité, le prix des réactifs ainsi que la purification contribuent aux principales contraintes industrielles de ce projet.

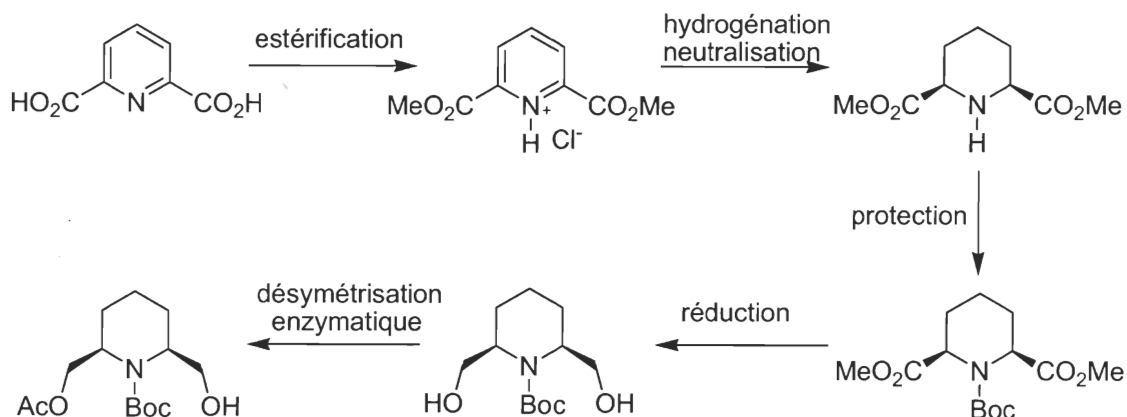
En ce qui a trait aux pyrrolidines, la méthode initialement choisie pour synthétiser les différents synthons a été décrite par Cignarella et Nathansohn¹⁵⁴. Cette aminocyclisation s'effectue par réaction de substitution nucléophile intermoléculaire entre un diester adipique dibromé et la benzylamine. Les pyrrolidines 2,5-disubstituées par des groupements esters ont pu être désymétrisées par hydrolyse enzymatique en s'inspirant des conditions de réaction établies par Ohno¹⁶⁸, Norin et Hult¹⁶⁹ et Boutelje¹⁷¹. Ces diesters ont aussi été réduits en alcool primaire afin de développer des réactions de désymétrisation enzymatique sur ce substrat. L'acylation de ce diol de configuration *cis* a également ouvert la porte à l'hydrolyse enzymatique (Figure 53).

Figure 53. Schéma réactionnel envisagé pour la synthèse des pyrrolidines 2,5-disubstituées.



Dans le cas des pipéridines, l'approche développée par Adkins¹⁸⁸ et ses collaborateurs a été privilégiée puisqu'elle s'avère efficace pour produire l'isomère *cis* 2,6 disubstitué, mais surtout parce qu'elle a aussi été employée dans notre laboratoire de recherche pour conduire à la synthèse de plusieurs alcaloïdes. En fait, cette méthode repose sur l'hydrogénation catalytique de la pyridine 2,6-disubstituée par des esters méthyliques qui peut être obtenue par estérification du diacide correspondant. La sélectivité de cette méthode, le faible coût des réactifs ainsi que le faible nombre d'étape de synthèse figure parmi les principaux avantages de cette méthode. La biocatalyse de ce synthon s'inspire d'une réaction mise aux points dans notre laboratoire pour la synthèse de l'alcaloïde (5*S*,9*S*)-(+)-indolizidine 209D¹⁹¹, toutefois la protection Cbz de l'amine a été remplacée par un groupement Boc pour la réalisation à grande échelle (Figure 54).

Figure 54. Schéma réactionnel envisagé pour la synthèse des pipéridines 2,6-disubstituées.



3.5 Résultats de la synthèse des pyrrolidines et des pipéridines

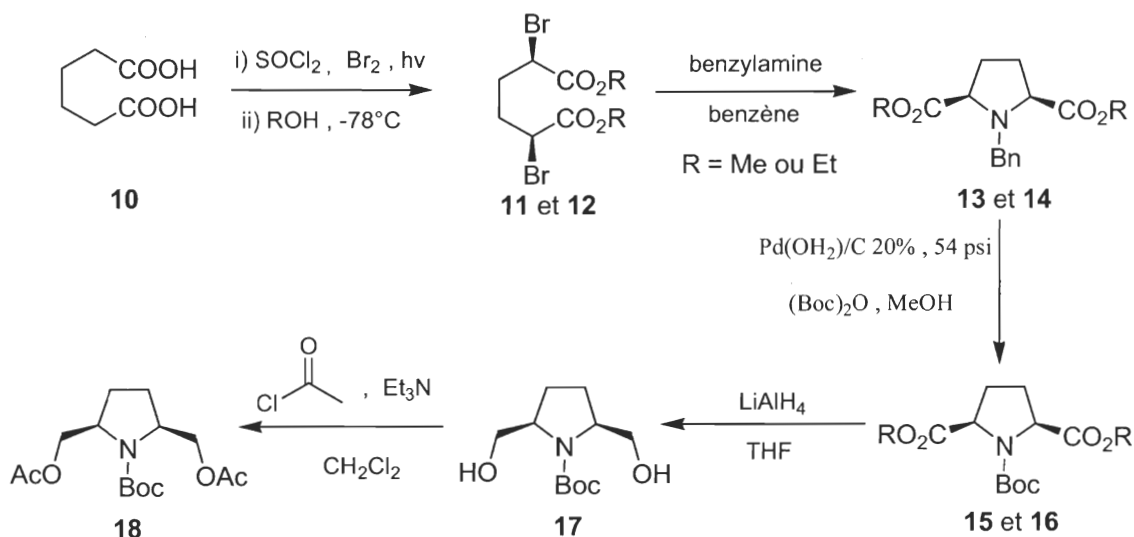
3.5.1 Synthèse des pyrrolidines 2,5-disubstituées

L'intérêt grandissant pour les pyrrolidines 2,5-disubstituées en synthèse peptidomimétique justifie le développement de tels synthons pour la recherche pharmaceutique. Leurs potentiels à mimer certains acides aminés ainsi que leurs caractéristiques structurales leur permettant d'introduire des changements conformationnels à l'intérieur d'une chaîne peptidique, représentent certains avantages que l'on peut exploiter de ces composés en synthèse peptidomimétique.

Les premières pyrrolidines visées ont été celles disubstituées par des groupements esters en position 2 et 5. Pour les obtenir, les diesters α,α' -2,5-dibromoadipates **11** et **12** ont premièrement été préparés selon la méthode de Willstätter¹⁶⁴, Le Seuer¹⁶⁵ et Ingold¹⁶⁶. D'abord, le chlorure de l'acide adipique **10** a été généré en présence du chlorure de thionyle. Subséquemment, la bromation du chlorure d'acide formé s'est effectuée in situ. Par la suite, afin d'obtenir le diester méthylique **11** et éthylique **12**, le chlorure d'acide a été versé dans le méthanol et dans l'éthanol. Ainsi, les diesters *méso* ont été précipités à -78°C dans leurs alcools respectifs. Les cristaux ont pu être récupérés par filtration à froid à chaque jour pendant une semaine. Le rendement pour cette étape de 40 % peut sembler faible, cependant les réactifs de départ sont peu dispendieux. La recristallisation de ces composés permet également d'obtenir une bonne pureté pour les diesters **11** et **12** (Figure 55).

De manière parallèle, les pyrrolidines 2,5-disubstituées **13** et **14** ont été générées par cyclisation intermoléculaire entre la benzylamine et le diester α,α' -2,5-dibromoadipate **11** et **12** correspondant. La sélectivité de cette réaction est approximativement de 3 :1 en faveur de l'isomère *cis*, et ce dans les deux cas. Malgré de nombreux essais de distillation sous pression réduite, la séparation de l'isomère *cis* du *trans* n'a pu être réalisée. Néanmoins, la séparation de ces isomères fut le fruit d'une purification laborieuse par chromatographie éclair sur gel de silice. Cette purification demeure toujours la principale limitation pour le développement à grande échelle de ces composés (Figure 55).

Figure 55. Synthèse des pyrrolidines 2,5-disubstituées.



Les pyrrolidines *N*-Boc **15** et **16** ont été obtenus par hydrogénéation du groupement benzyle combiné à une protection *in situ* en présence de $(\text{Boc})_2\text{O}$. Le diol **17** a été obtenu avec un bon rendement (85%) ce qui indique que la fonction Boc n'a pas subi de réduction complète pour générer le produit secondaire *N*-méthylé. Le diacétate **18** a été produit par acylation classique avec le chlorure d'acétyle dans le dichlorométhane en présence de triéthylamine.

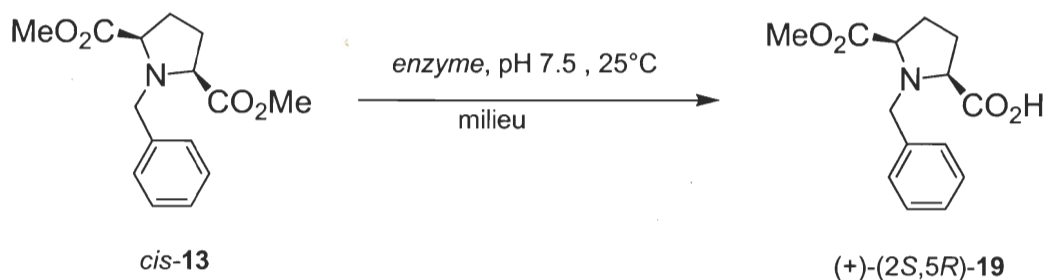
Pour enrichir leurs excès énantiomères, ces diesters méthylique **13** et éthylique **14** *N*-benzylé et leurs homologues *N*-Boc **15** et **16** ont été soumis à l'hydrolyse enzymatique de quelques hydrolases (voir section 3.5.1.1, 3.5.1.2 et 3.5.1.5). Les pyrrolidines protégées par un groupement *tert*-butoxy ont été obtenues par hydrogénéation sous la catalyse de

l'hydroxyde de palladium sur charbon en présence de l'anhydride de *tert*-butoxycarbone dans le méthanol. De cette manière, la protection sur l'amine a pu être interchangée *in-situ* quantitativement (Figure 55).

Suite au remplacement du groupement benzyle par un groupement *tert*-butoxycarbone, les diesters **15** et **16** *N*-Boc ont été réduits par l'agent réducteur LiAlH₄ pour générer le diol **17** avec un rendement de 85%. Ce diol a été acylé, en présence du chlorure d'acétyle et de la triéthylamine, de manière quantitative pour produire le diacétate **18** (Figure 55). Ces deux composés ont été purifiés par chromatographie éclair sur gel de silice puisqu'ils ont été synthétisés sur une échelle n'excédant pas l'ordre du gramme. Des réactions de désymétrisation enzymatique ont été développées sur ces deux substrats à la section 3.5.1.7 et 3.5.1.8.

3.5.1.1 Désymétrisation du *cis*-diméthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate

La première pyrrolidine désymétrisée fut celle disubstituée par des esters méthyliques **13**. Cette dernière a été soumise à quelques hydrolases dont PLE, CAL-B, PSL, CRL, ANL, PCL, PPL, RNL, RSL, GCL, CCL, PeSL et CSL. Seul PLE et CAL-B ont démontré une activité. Puisque la sélectivité et l'activité de PLE pour ce substrat étaient bien connues de la littérature, le développement sur une échelle préparative a été tenté. En ce qui a trait à la lipase de *Candida antarctica*, aucune publication n'a fait mention de son utilisation pour désymétriser le diester *cis*-**13**, pourtant elle s'est avérée active envers ce substrat. C'est en désymétrisant le diester *cis*-**13** que le monoacide (*2S,5R*)-**19** a pu être généré, toutefois avec des rendements faibles se situant près de 40 % avec les deux hydrolases (Figure 56). Ces rendements peu élevés s'expliquent par la difficulté à extraire le composé de la phase aqueuse dû à son groupement acide et à son amine au caractère basique. La saturation en NaCl de la phase aqueuse n'a pas permis d'améliorer l'extraction.

Figure 56. Désymétrisation du *cis*-diméthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate.

Pour débiter, le diester méthylique **13** a été désymétrisé selon les meilleurs conditions élaborées par Boutelje¹⁷¹ et ses collaborateurs, c'est-à-dire l'utilisation de PLE avec une solution tampon tris-HCl contenant 25 % de DMSO. Il n'a pas été possible d'obtenir un excès énantiomère supérieur à 82 % pour ce substrat même en apportant certaines modifications au milieux aqueux en changeant la nature et la concentration du cosolvant. De plus, la lipase de *Candida antarctica* n'a pas été plus sélective que PLE au contraire, elle a fourni un faible excès énantiomère de 50% (Tableau 6). L'évaluation des excès énantiomères a été effectuée par RMN ¹H suite à la formation de dérivés chiraux avec le (*R*)-(+)- α -méthylbenzylamine (voir 3.5.1.3). La configuration absolue a déjà été établie par Boutelje¹⁷¹.

Tableau 6. Conditions du milieu aqueux, temps de réaction(h) , rendements (%) et excès énantiomères* ($ee_{(+)-19}$) mesurés sur le produit (+)-(2*S*,5*R*)-**19** lors de l'hydrolyse du diester *cis*-**13** avec diverses lipases.

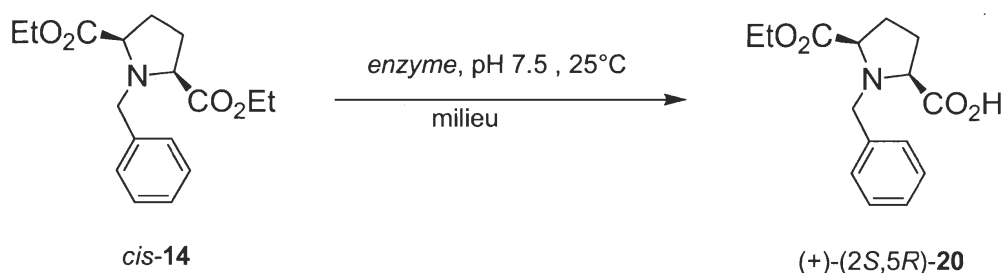
enzyme	condition du milieu aqueux	$ee_{(+)-19}$ (%)	temps de réaction (h)	rdt (%)
PLE	H ₂ O 10% MeOH	38	22	35
	Tampon tris-HCl 0.25M	35	21	26
	Tampon tris-HCl 0.25M +10% MeOH	55	18	49
	Tampon tris-HCl 0.25M +25% MeOH	82	24	32
CAL-B	Tampon tris-HCl 0.25M	50	20	45

* excès déterminé par RMN ¹H par dérivation

3.5.1.2 Désymétrisation du *cis*-diéthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate

Dans le but d'augmenter la sélectivité de PLE et de CAL-B, le diester éthylique *cis*-**14** a été désymétrisé puisque l'allongement de la chaîne aliphatique peut entraîner un effet favorable au niveau de la sélectivité des hydrolases. Le diester *cis*-**14** a donc été hydrolysé en monoacide (2*S*,5*R*)-**20** sous la catalyse de PLE et de CAL-B (Figure 57). Comme dans le cas du diester *cis*-**13** le rendement est faible pour les mêmes raisons, c'est-à-dire la difficulté d'extraction du produit du milieu aqueux.

Figure 57. Désymétrisation du *cis*-diéthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate.



Peut importe les différentes conditions employées, l'estérase de foie de porc n'a pas été suffisamment sélective. Au contraire la lipase de *Candida antarctica* s'est montrée hautement sélective indépendamment des conditions employées en générant des excès énantiomères supérieurs à 98% (Tableau 7). Les meilleures conditions retenues ont été l'utilisation de CAL-B dans l'eau déminéralisée qui a été soigneusement ajustée à pH 7.5 par l'ajout d'une solution NaOH. Ces conditions ont permis la réalisation de cette désymétrisation à l'échelle de la dizaine de grammes. Cependant, l'extraction laborieuse du produit (2*S*,5*R*)-**20** de la phase aqueuse limite l'exploitation de cette réaction sur une échelle préparative. Les excès énantiomères ont été évalués par RMN ¹H suite à la formation de dérivés chiraux avec le (*R*)-(+)- α -méthylbenzylamine (voir 3.5.1.3). La configuration absolue a pu être déterminée par corrélation avec les données cristallographiques publiées par Colombo¹⁷² et ses collaborateurs. Suite à la désymétrisation du diester *cis*-**14** à l'aide de PLE, ils obtiennent la configuration 2*S*,5*R* pour le monoacide *cis*-**20**. Le (+)-(2*S*,5*R*)-**20** a également été obtenu avec l'utilisation de PLE et de CAL-B, ce qui permet d'affirmer que ces deux enzymes génèrent la même configuration absolue 2*S*,5*R* pour le monoacide (+)-(2*S*,5*R*)-**20**. Il est à noter que Colombo

et ses collaborateurs n'ont pas publié la valeur de polarimétrie pour le monoacide *cis*-**20**, cependant ils ont effectué des études cristallographiques sur un dérivé du monoacide *cis*-**20** qui confirme la configuration *2S,5R*.

Tableau 7. Conditions du milieu aqueux, temps de réaction(h), rendements (%) et excès énantiomères ($ee_{(+)-20}$) mesurés sur le produit (+)-(2*S*,5*R*)-**20** lors de l'hydrolyse du diester *cis*-**14** avec diverses lipases.

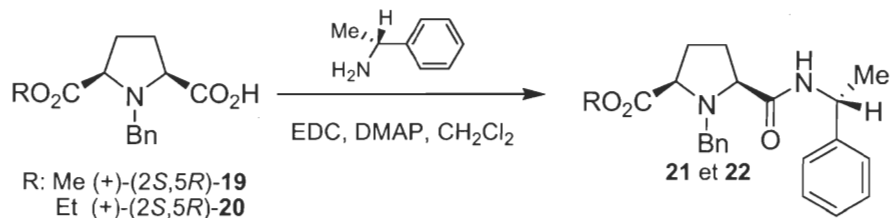
enzyme	condition du milieu aqueux	$ee_{(+)-20}$ (%)	temps de réaction (h)	rdt (%)
PLE	H2O 10% MeOH	50	19	35
	Tampon tris-HCl 0.25M	45	22	42
	Tampon tris-HCl 0.25M +10% MeOH	67	20	40
CAL-B	H2O	99	21	37
	Tampon tris-HCl 0.25M	99	22	35
	Tampon tris-HCl 0.25M +10% MeOH	99	20	40
	Tampon tris-hcl 0.25M +25% DMSO	99	21	38

* ee déterminé par RMN 1H

3.5.1.3 Analyse d'excès énantiomères du monoacide (+)-(2*S*,5*R*)-19** et (+)-(2*S*,5*R*)-**20** par formation de dérivés chiraux**

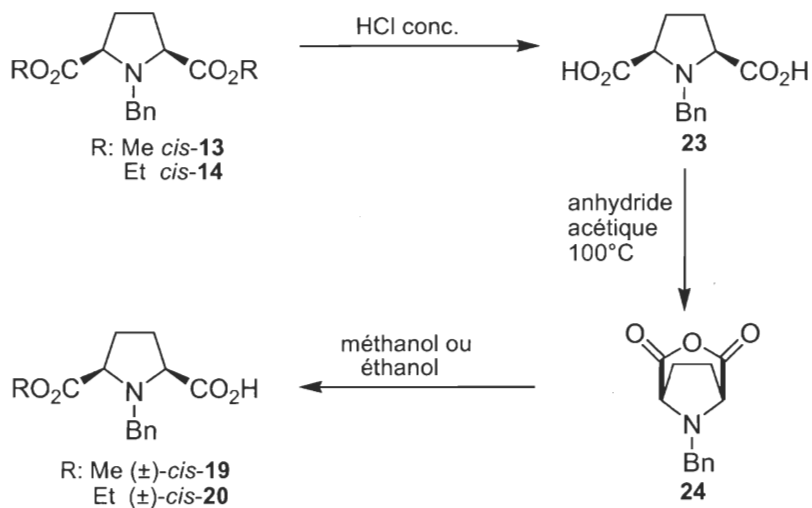
La formation de diastéréoisomères avec la (*R*)-(+)-méthylbenzylamine a été employée pour déterminer l'excès énantiomère du monoacide (2*S*,5*R*)-**19** et (2*S*,5*R*)-**20**. De la sorte, les amides **21** et **22** ont pu être synthétisés sous la catalyse du DMAP en présence de l'agent de couplage EDC (Figure 58). Les amides obtenus ont finalement été analysés par RMN 1H .

Figure 58. Formation des dérivés chiraux entre les monoacides (+)-(2*S*,5*R*)-**19** et (+)-(2*S*,5*R*)-**20** et la (*R*)-(+)-méthylbenzylamine.



Dans le cadre de la mise au point d'une méthode d'analyse d'excès énantiomères, il est primordial d'obtenir les composés sous leur forme racémique afin de valider la méthode. Pour obtenir les monoacides (\pm)-**19** et (\pm)-**20**, les diesters *cis*-**13** et *cis*-**14** ont d'abord été hydrolysés en diacide **23**. Ensuite, l'anhydride **24** a été formé en chauffant le diacide **23** à 100°C dans l'anhydride acétique. L'ouverture de cet anhydride s'est effectuée dans le méthanol et l'éthanol pour produire les monoacides (\pm)-*cis*-**19** et (\pm)-*cis*-**20** (Figure 59).

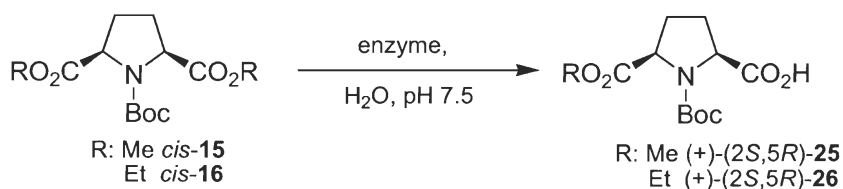
Figure 59. Synthèse des monoacides racémiques (\pm)-*cis*-**19** et (\pm)-*cis*-**20**.



3.5.1.4 Désymétrisation du *cis*-1-*tert*-butyl 2,5-diméthyl et diéthyl pyrrolidine-1,2,5-tricarboxylate

La lipase de *Candida antarctica* et l'estérase de foie de porc ont d'abord été employées sans effectuer de criblage enzymatique puisque ces deux enzymes ont démontré une haute sélectivité face aux *N*-benzyl pyrrolidines 2,5-disubstituées. Comme prévu, ces deux enzymes ont présenté une activité catalytique envers le diester méthylique *cis*-**15** et le diester éthylique *cis*-**16**. Toutefois l'estérase a converti en entier les substrats *cis*-**15** et *cis*-**16** en monoacide (+)-(2*S*,5*R*)-**25** et (+)-(2*S*,5*R*)-**26** à l'intérieur d'un intervalle de 36 heures. La lipase de *Candida antarctica* a cessé de les convertir après une période de 24 heures. Même avec un temps de réaction un peu plus long (36h) dans le cas de CAL-B, le taux de conversion des diesters en monoacide n'a pas été augmenté. Le faible taux de conversion peut s'expliquer par l'inhibition de la lipase (Figure 60).

Figure 60. Désymétrisation du *cis*-1-*tert*-butyl 2,5-diméthyl et diéthyl pyrrolidine-1,2,5-tricarboxylate.



Pour ce qui est de PLE, elle a été très sélective puisqu'elle a généré des excès énantiomères supérieurs à 99% dans les deux cas avec des rendements de 75%. Dans le cas de CAL-B, les excès énantiomères sont de 99% pour les deux substrats *cis*-**15** et *cis*-**16** malgré son faible taux de conversion de 40% et 38%. Le tableau 8 ci-dessous rassemble les données pertinentes relatives à la désymétrisation de ces diesters *cis*-**15** et *cis*-**16**. Les excès énantiomères ont été mesurés par HPLC en phase chirale (Chiracel OD-H).

Tableau 8. Temps de réaction (h), rendements (%) et excès énantiomères mesurés (ee) lors de la désymétrisation des substrats *cis*-**15** et *cis*-**16** par hydrolyse avec diverses lipases.

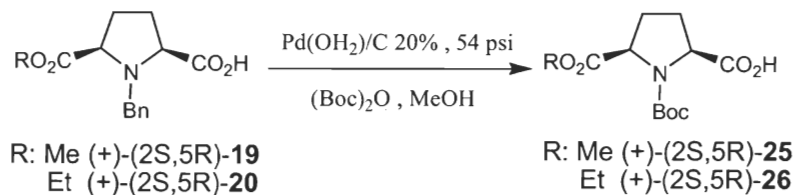
enzyme	ee (%)	temps de réaction (h)	rdt (%)
PLE			
(+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 25	99	36	75
(+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 26	99	36	75
CAL-B			
(+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 25	99	24	40
(+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 26	99	24	38

*ee déterminé par HPLC Chiracel OD-H

3.5.1.5 Détermination de la configuration absolue des acides (+)-(2*S*,5*R*)-**25** et (+)-(2*S*,5*R*)-**26**

La configuration absolue de l'acide (2*S*,5*R*)-**25** a pu être déterminé par corrélation chimique avec l'acide (2*S*,5*R*)-**19** (Figure 61). La corrélation de ces structures s'est effectuée par hydrogénation du groupement *N*-benzyle de l'acide (+)-(2*S*,5*R*)-**19** et protection *in-situ* de l'amine libre à l'aide de l'anhydride de *tert*-butoxycarbone dans le méthanol pour fournir l'acide (2*S*,5*R*)-**25**. De plus, puisque le signe de la valeur du pouvoir rotatoire du monoacide (2*S*,5*R*)-**25** a été le même lorsque la protection *N*-benzyle a été interchangée par la protection *N*-*boc*, il est possible de confirmer que les acides ayant le même signe possèdent la même configuration absolue. Cette comparaison permet donc d'affirmer que l'acide produit par hydrolyse enzymatique du diester **15** à l'aide de la lipase CAL-B et de l'estérase PLE, détient la configuration 2*S*,5*R* puisque la valeur de polarimétrie pour l'acide (2*S*,5*R*)-**19** a été publiée par Boutelje¹⁷¹. Dans les deux cas, ces enzymes possèdent la même haute sélectivité pour l'énantiomère 2*S*,5*R* (ee: 99%).

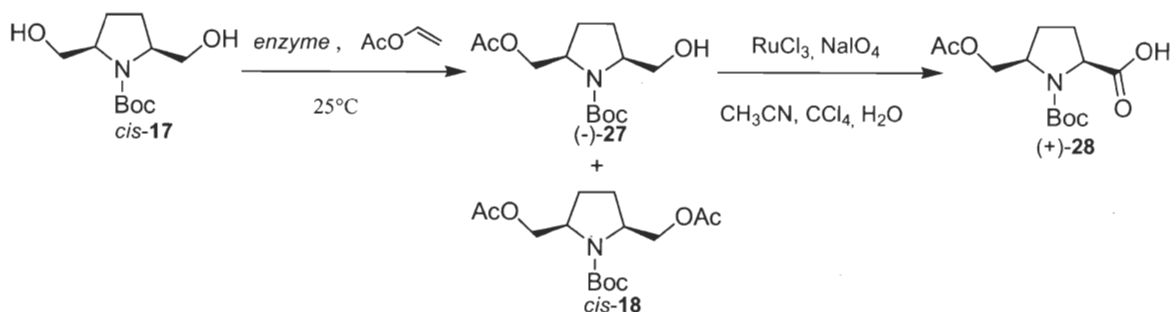
Figure 61. Détermination de la configuration absolue des acides (+)-(2*S*,5*R*)-**25** et (+)-(2*S*,5*R*)-**26**.



La même stratégie a été appliquée pour le monoacide (2*S*,5*R*)-**26** pour déterminer sa configuration absolue. Le changement de protection sur l'azote a confirmé que le signe de la valeur de polarimétrie ne change pas. De ce fait, puisque la valeur (+) a été obtenue pour le monoacide (2*S*,5*R*)-**26** généré par désymétrisation du diester éthylique **15** à l'aide de PLE et de CAL-B, il devient donc possible de corrèler la configuration absolue du monoacide (2*S*,5*R*)-**26** avec celle du monoacide (2*S*,5*R*)-**20** (Figure 61) qui a été évaluée par comparaison avec les données cristallographiques de Colombo¹⁷² et ses collaborateurs (voir 3.5.1.2).

3.5.1.6 Désymétrisation du *tert*-butyl 2,5-bis(hydroxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate

Pour désymétriser le diol *cis*-**17** par acylation enzymatique, les lipases les plus susceptibles d'être sélectives envers ce substrat ont été utilisées soit: CAL-B, CRL, ROL, PCL et PPL. Toutes ces lipases ont été actives, mais CAL-B et CRL ont été particulièrement sélectives. Grâce à l'activité catalytique de ces cinq lipases, le diol *cis*-**17** a été acylé en monoacétate **27** dans l'acétate de vinyle. La plus sélective des lipases a été celle de *Candida antarctica* qui a également produit du diacétate *cis*-**18**, en convertissant à 95 % le diol *cis*-**17** de départ. Afin d'extraire par extraction liquide-liquide le produit enrichi du meilleur essai, une oxydation de l'alcool **27** en acide **28** a été effectuée, sous la catalyse du chlorure de ruthénium en présence du périodate de sodium dans un mélange H₂O, CCl₄ et CH₃CN (Figure 62). Le rendement pour ces deux étapes a été de 65 % ce qui est très acceptable, cependant quelques impuretés abaissent le niveau de pureté du produit qui se présente sous forme d'une huile violette. Une décoloration au charbon activé dans le méthanol a été tentée, mais aucune amélioration n'a été observée.

Figure 62. Désymétrisation du *tert*-butyl 2,5-bis(hydroxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate.

Seule la lipase de *Candida antarctica* a suivi le modèle de prédiction de Kazslauska face aux alcools primaires. Les quatres autres se sont montrées anti-Kazslauska. Le meilleur excès énantiomère obtenu est de 97% et c'est avec CAL-B. Néanmoins, la valeur de 83% mesuré lors de l'acylation avec CRL aurait pu être haussée en laissant progresser un peu plus longtemps la réaction au détriment du rendement. La configuration absolue a été déterminée par corrélation chimique (voir section 3.5.8). Toutes les valeurs relatives à la désymétrisation du diol *cis*-17 ont été répertoriées dans le tableau 9.

Tableau 9. Temps de réaction (h), taux de conversion (%), pourcentages de mono/(mono + di) et excès énantiomères mesurés lors de la désymétrisation par acylation du diol *cis*-17.

enzyme	configuration absolue	ee ₂₇ (%)	temps de réaction (h)	Taux de conversion (%)	mono/(diol+mono) (%)
CAL-B	(-)-(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)	97	36	95	70
CRL	(+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	85	22	83	100
ROL	(+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	76	120	55	100
PCL	(+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	72	120	92	100
PPL	(+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	0	120	13	100

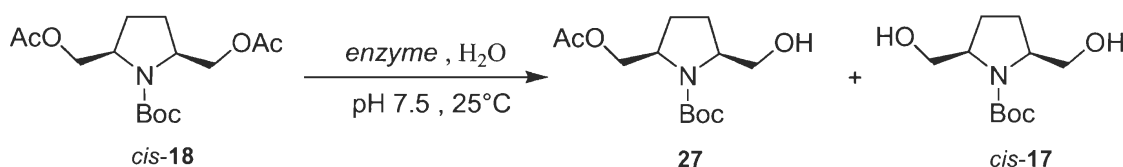
*ee ont été mesurés par GC en phase chiral Chiraldex B-Dm

3.5.1.7 Désymétrisation du *tert*-butyl 2,5-bis(acétoxméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate

Par hydrolyse enzymatique, il a été possible de désymétriser le diacétate *cis*-18 tout en examinant l'activité et la sélectivité des lipases suivantes : CAL-B, PLE, CRL, ROL, PCL et PPL. Une fois de plus, toutes ces hydrolases ont démontré une activité catalytique pour l'hydrolyse du diacétate *cis*-18 en monoacétate 27 en milieu aqueux ajusté

constamment à pH 7.5. PLE et CRL ont tout de même hydrolysé le diacétate *cis*-**18** en diol *cis*-**17** à 85 et 70% de conversion ce qui a eu pour effet d'élever l'excès énantiomère dans leur cas (Figure 63). Puisqu'il y a formation de l'énantiomère non désiré, l'hydrolyse subséquente a permis de dédoubler cinétiquement le mélange et ainsi accroître l'excès énantiomère dans le cas de CRL. Habituellement l'hydrolyse ou l'acylation d'un alcool et de son ester correspondant est complémentaire et elles permettent d'obtenir les énantiomères opposés. Dans le cas de CRL le même énantiomère a été obtenue dans les deux cas. CRL a un site actif de dimension plus grande que les autres lipases ce qui pourrait expliquer ce résultat. De plus, il a été également étonnant d'observer une si faible activité et sélectivité de la part de CAL-B compte tenu de son comportement hautement sélectif envers le diol *cis*-**17** et ses homologues²⁰¹ insaturés en position 3,4.

Figure 63. Désymétrisation par hydrolyse enzymatique du *tert*-butyl 2,5-bis(acétoxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate.



Il n'en demeure pas moins que cette réaction catalysée par ces lipases n'est pas suffisamment sélective pour justifier son développement à l'échelle préparative puisque l'excès énantiomère maximal obtenu n'a pas atteint les 97%, d'autant plus que les rendements seraient inévitablement peu élevés. De plus, il est impensable de laisser réagir plus longtemps la lipase pour élever la pureté optique puisque le diacétate *cis*-**18** a déjà été converti à 70% en diol *cis*-**17**. Un excès énantiomère de 94 % du monoacétate (+)-(2*S*,5*R*)-**27** a été obtenu avec CRL. Les résultats se rattachant à cette désymétrisation ont été regroupés dans le tableau 10 ci-dessous.

Tableau 10. Temps de réaction (h), taux de conversion (%), pourcentages de mono/(mono +di) et excès énantiomères mesurés lors de la désymétrisation par hydrolyse du diacétate *cis*-**18**.

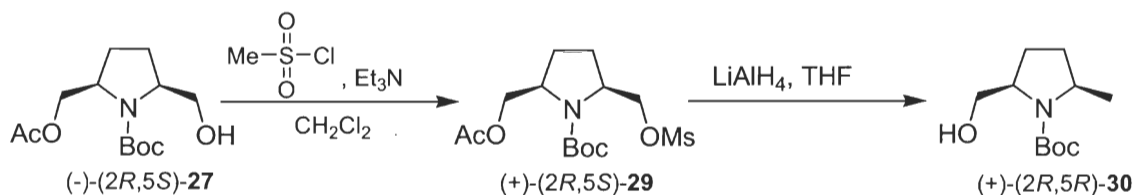
enzyme	configuration absolue	ee ₂₇ (%)	temps de réaction (h)	Taux de conversion (%)	mono/(diol+mono) (%)
CRL	(+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	94	26	94	30
PLE	(+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	75	26	100	15
PPL	(+)-(2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	61	120	50	100
CAL-B	(-)-(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)	30	120	30	100

*ee ont été mesurés par GC en phase chiral Chiraldex B-Dm

3.5.1.8 Détermination de la configuration absolue du monoacétate (-)-(2*R*,5*S*)-**27**

La configuration absolue a pu être déterminée par corrélation chimique du monoacétate (-)-(2*R*,5*S*)-**27** avec le (2*R*,5*R*)-*tert*-butyl 2-(hydroxyméthyl)-5-méthylpyrrolidine-1-carboxylate (Figure 64).

Figure 64. Détermination de la configuration absolue du monoacétate (-)-(2*R*,5*S*)-**27**.



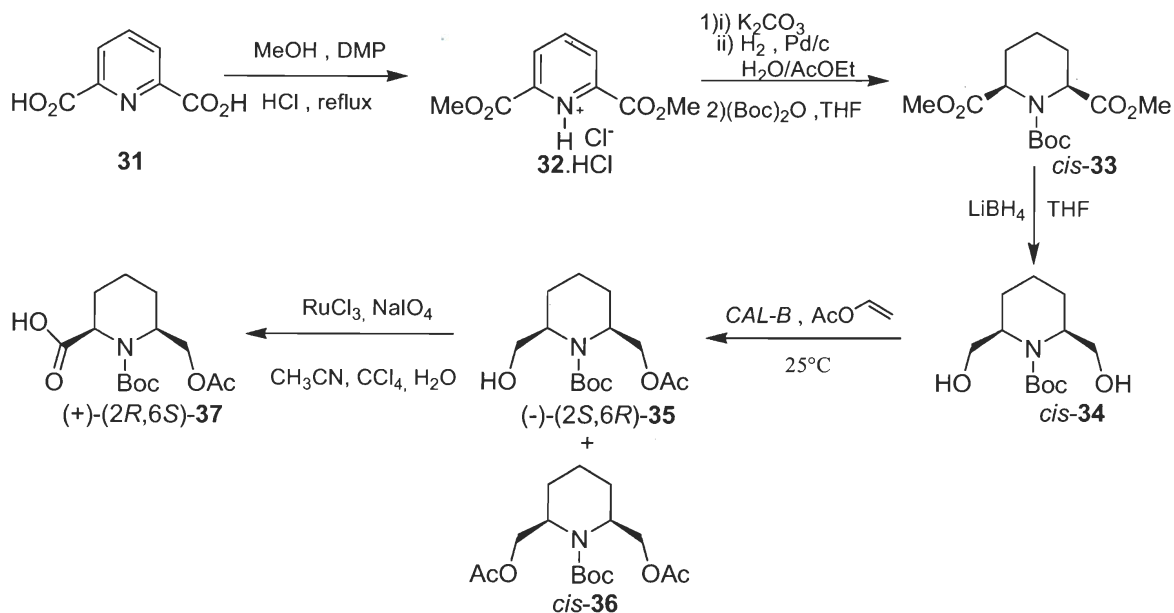
Pour ce faire, l'alcool primaire du monoacétate (-)-(2*R*,5*S*)-**27** a été mésylé à l'aide du chlorure de mésyle. Le mesylate (+)-(2*R*,5*S*)-**29** a été récupéré quantitativement pour être ensuite soumis à l'agent réducteur LiAlH₄ pour être réduit en méthyle et ainsi générer l'alcool (+)-(2*R*,5*R*)-**30**. Le rendement de 30 % pour cette étape est faible, cependant il est explicable par l'attaque des hydrures sur la fonction protectrice Boc de l'amine pour générer le produit secondaire *N*-méthyle. Outre ce faible rendement, la corrélation chimique a pu être effectuée en comparant la valeur du pouvoir rotatoire obtenue avec celle publiée

par Pedrosa²⁰² et ses collaborateurs pour l'alcool primaire (+)-(2*R*,5*R*)-**30**. L'obtention de cette configuration absolue permet donc de conclure que l'alcool produit lors de la désymétrisation du diol par acylation enzymatique à l'aide de la lipase de CAL-B détient la configuration 2*R*,5*S*, tandis que l'utilisation de CRL, ROL et PCL a généré l'alcool (+)-(2*S*,5*R*)-**27** avec prédominance de l'énantiomère de configuration 2*S*,5*R* (ee: 55-92%). Par hydrolyse enzymatique, la même prédominance a été observée lors de l'utilisation de CRL, PLE et PPL (ee: 55-92%). Lors de l'emploi de CAL-B en hydrolyse enzymatique, nous avons observé une préférence pour l'énantiomère de configuration 2*R*,5*S*, cependant la sélectivité de la lipase a été beaucoup plus faible (ee: 30%).

3.5.2 Préparation de l'acide 2-carboxylique (2*R*,6*S*)-6-(acétoxyméthyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pipéridine

La stratégie employée pour préparer l'acide (+)-(2*R*,6*S*)-**37** a permis la réalisation de sa synthèse à l'échelle préparative. Pour ce faire l'acide 2,6-dicarboxylique pyridine a d'abord été estérifié en présence du diméthoxypropane et de l'acide chlorhydrique pour générer le diester **32** avec un rendement de 75%. Le produit résultant est un solide blanc qui a été purifié par lavage dans l'éther diéthylique. Ensuite, le diester **32** sous forme d'hydrochlorure a été neutralisé à l'aide du K₂CO₃ et il a été hydrogéné sous la catalyse du palladium sur charbon pour produire un mélange *cis* et *trans* du diester **33** dans une proportion de (8 :1)¹⁴⁸. L'isomère *cis*-**33** a pu être obtenu pur par recristallisation dans un mélange de CH₂Cl₂/Hexane (1 :2) avec un rendement de 83 %. Ainsi l'amine secondaire *cis*-**32** a été protégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyle pour produire de manière quantitative le diester *cis*-**33**. Ce dernier a été purifié par évaporation sous pression réduite pour être subséquemment réduit par l'agent réducteur LiBH₄. Cette réduction a produit le diol *cis*-**34** avec un rendement de 79 % sous forme d'un solide blanc (Figure 65).

Figure 65. Préparation de l'acide 2-carboxylique (2*R*,6*S*)-6-(acétoxyméthyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pipéridine **37**.



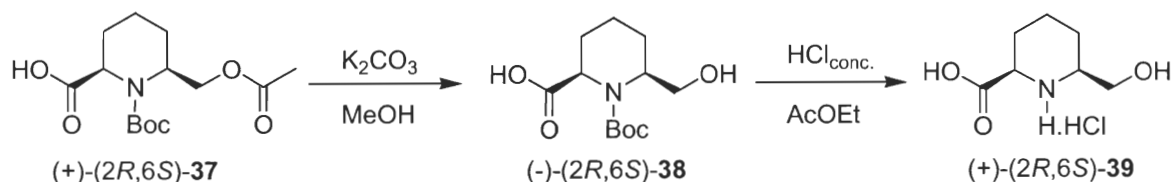
L'étape clé consiste en une désymétrisation à l'aide de la lipase de *Candida antarctica* B. L'ingénierie des conditions utilisées repose sur les travaux antérieurs du groupe de recherche de Chênevert¹⁹¹ pour la désymétrisation de l'homologue *N*-Cbz. Bien sûr les résultats obtenus dans le cas des pyrrolidines, pour la désymétrisation du diol *cis*-17, nous ont guidés quant aux conditions à utiliser. En reproduisant ces conditions, le diol *cis*-34 a été désymétrisé dans l'acétate de vinyle pendant 4 jours pour produire le monoacétate (-)-(2*R*,6*S*)-35 avec un excès énantiomère de 97 % analysé par GC en phase chirale. La lipase de *Candida antarctica* B a généré aussi le diacétate *cis*-36, c'est pourquoi le mélange brut de la désymétrisation a été soumis à une oxydation de l'alcool (-)-(2*S*,6*R*)-35. L'oxydation s'est déroulée en présence du chlorure de ruthénium et du périodate de sodium pour produire l'acide (+)-(2*R*,6*S*)-37 qui a été obtenu par extraction liquide-liquide avec un rendement global pour la désymétrisation et l'oxydation de 69 %.

3.5.2.1 Détermination de la configuration absolue de l'acide (+)-(2*R*,6*S*)-37

La détermination de la configuration absolue a été effectuée par corrélation chimique de l'acide (+)-(2*R*,6*S*)-37 avec celle de l'hydrochlorure de (2*R*,6*S*)-2-carboxy-6-(hydroxyméthyl)pipéridine (+)-(2*R*,6*S*)-39 (Figure 66). L'acide (+)-(2*R*,6*S*)-37 a donc été

soumis à l'hydrolyse basique de l'acétate dans une solution de méthanol contenant du K_2CO_3 pour produire l'alcool (-)-(2*R*,6*S*)-**38**. La déprotection *tert*-butoxycarbonyle de cette pipéridine a été effectuée sous hydrolyse acide dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'acide chlorhydrique (4:1). L'hydrochlorure (+)-(2*R*,6*S*)-**39** a été récupéré avec un rendement de 86% et de 100% pour chacune des étapes respectivement. La corrélation chimique a pu être déterminée en comparant la valeur du pouvoir rotatoire obtenue avec celle publiée par Chenêvert¹⁹⁹ pour l'hydrochlorure (+)-(2*R*,6*S*)-**39**. Il est donc vrai de dire que la désymétrisation du diol *cis*-**34** à l'aide de la lipase de *Candida antarctica* B a générée l'alcool (-)-(2*R*,6*S*)-**35**. Par conséquent, l'acide (+)-(2*R*,6*S*)-**37** issu de l'oxydation douce de cet alcool possède la même configuration 2*R*,6*S*.

Figure 66. Détermination de la configuration absolue de l'alcool (+)-(2*R*,6*S*)-**37**.

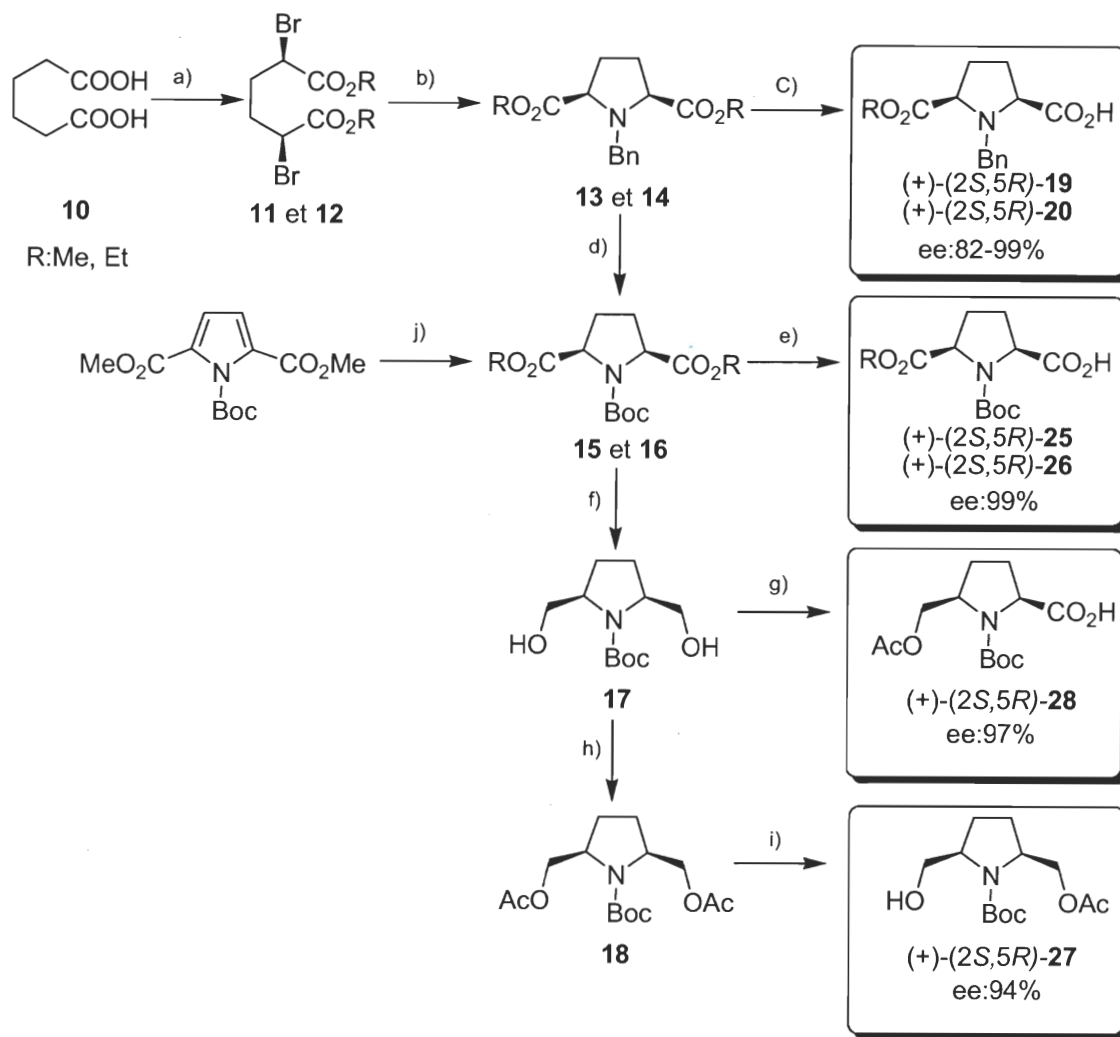


3.5.3 Conclusion

L'objectif de ce projet consistait à mettre au point des synthèses de pyrrolidines 2,5-disubstituées et de pipéridines 2,6-disubstituées chirales à l'échelle préparative. La chiralité de ces composés a été introduite par désymétrisation enzymatique à l'aide des enzymes de la famille des hydrolases. Par contre, c'est sans contredit la lipase de *Candida antarctica* B qui s'est révélée la plus stéréosélective et active dans la plupart des différents cas étudiés. Cette dernière a permis de réaliser des synthèses chimio-enzymatiques de plusieurs acides aminés chiraux sur une échelle de l'ordre de la dizaine de grammes voire même jusqu'à 25 grammes dans certains cas.

Pour ce qui est des pyrrolidines 2,5-disubstituées, la stratégie de synthèse employée a été l'aminocyclisation intermoléculaire des diesters α,α' -2,5-dibromoadipates **11** et **12** décrite par Cignarella et Nathansohn¹⁵⁴. Cette méthode trouve sa limitation dans la production d'un mélange *cis-trans* (3 :1) difficilement séparable par chromatographie éclair sur gel de silice. La distillation sous pression réduite n'a pu être réalisée adéquatement puisque les pyrrolidines **13** et **14** requièrent une pression réduite extrêmement basse. Suite à ces travaux de recherche, une alternative a été développée par Chênevert²⁰¹ et ses collaborateurs pour palier à ce problème. Il s'agit en fait de réduire par hydrogénation catalytique le 1-*tert*-butyl-2,5-1*H*-pyrrole-1,2,5-tricarboxylate. L'utilisation d'un catalyseur au platine s'est avérée indispensable puisque les conditions d'hydrogénation de la diméthylpyridine-2,6-dicarboxylate n'ont pas permis de réduire les doubles liaisons de la pyrroline en question. Cette méthode a fourni un ratio acceptable de 93 :7 en faveur de l'isomère *cis* ; par contre, l'emploi d'un catalyseur au platine peut engendrer des coûts plus élevés de synthèse à l'échelle préparative (Figure 67).

Figure 67. Préparation des pyrrolidines 2,5-disubstituées chirales.

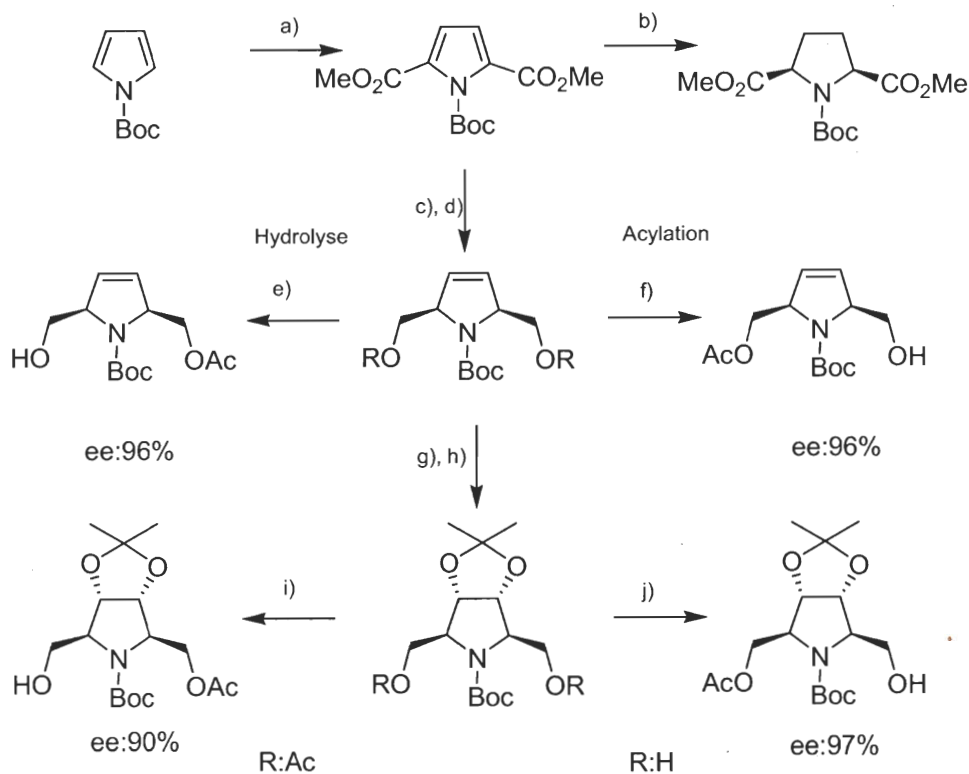


a) i) SOCl_2 , Br_2 , $h\nu$ ii) ROH , -78°C b) benzylamine, benzène c) PLE et CAL-B tampon tris-HCl $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$
 d) $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 20%, 54 psi, $(\text{Boc})_2\text{O}$, MeOH e) PLE et CAL-B, H_2O f) LiAlH_4 , THF g) 1) CAL-B, AcO^\ominus 2) RuCl_3 , NaIO_4 , CH_3CN , H_2O
 h) AcCl , Et_3N , CH_2Cl_2 i) CRL, tampon phosphate pH 7 j) Pt/C , EtOH , H_2

Suite à l'obtention de plusieurs pyrrolidines *méso* 2,5-disubstituées, il a été possible de les désymétriser par acylation ou hydrolyse enzymatique combinée dans certains cas d'une oxydation douce au périodate de sodium afin de générer des acides aminés comportant plus d'un centre de chiralité. Un des objectifs du projet a donc pu être satisfait puisque que ces pyrrolidines ont été obtenues avec des puretés optiques supérieures à 97%. Pour ce qui est du deuxième objectif, il a été accompli que partiellement puisque la synthèse des composés *cis* à l'échelle préparative était toujours limitée avant le développement des conditions d'hydrogénation de la pyrroline. Cependant, il est à noter que l'acide $(+)-(2S,5R)\text{-20}$ a tout de même été synthétisé sur une échelle d'une dizaine de

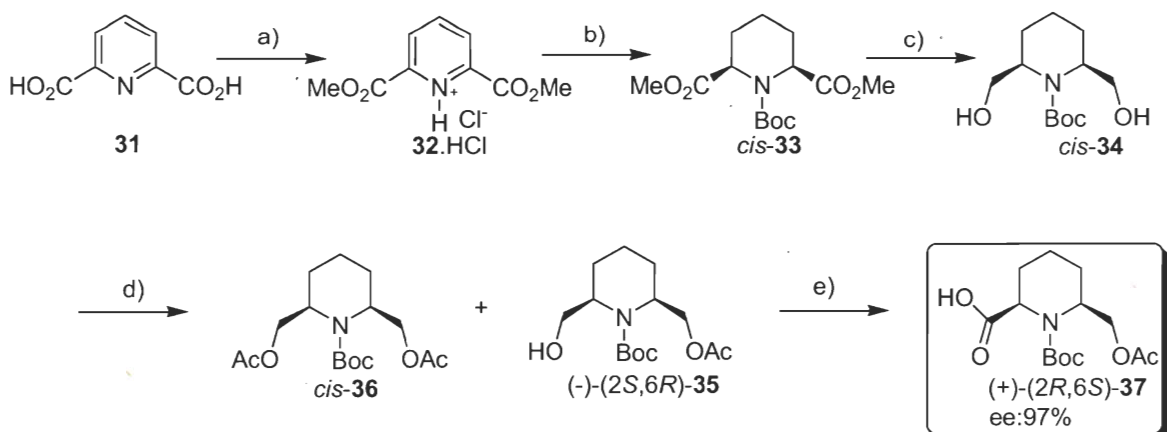
grammes en employant la lipase de *Candida antarctica* B. En ce qui concerne les autres acides aminés non naturels, ils ont tous été obtenus par désymétrisation avec des excès énantiomères élevés grâce à l'utilisation de CAL-B, PLE et CRL. Ces réactions enzymatiques n'ont pas été développées sur une échelle préparative ; par contre, ces travaux combinés à ceux de Frédéric Jacques font l'objet d'un manuscrit paru dans *Tetrahedron : Asymmetry*²⁰¹. Ce dernier a développé l'hydrogénation catalytique du 1-*tert*-butyl-2,5-1*H*-pyrrole-1,2,5-tricarboxylate ainsi que plusieurs réactions de désymétrisation enzymatique sur des pyrrolines 2,5-disubstituées et des pyrrolidines tétrasubstituées. Les composés synthétisés présentent donc l'avantage d'être optiquement enrichis en plus de détenir plusieurs centres de chiralité (Figure 68).

Figure 68. Désymétrisation de pyrrolines disubstituées et de pyrrolidines tétrasubstituées.



Dans le cas des pipéridines, les objectifs principaux ont tous deux été satisfaits. La synthèse chimio-enzymatique de l'acide 2-carboxylique (2*R*,6*S*)-6-(acétoxyméthyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pipéridine **37** a été réalisée sur une échelle préparative avec une haute pureté optique (ee :97%). La méthode sélectionnée est l'hydrogénation catalytique d'Adkins¹⁸⁸ qui a d'ailleurs été utilisée par Chênevert et Dickman¹⁸⁹ pour préparer des pipéridines *cis*-2,6-disubstituées *méso*. Cette méthode de synthèse combinée à la purification par recristallisation a permis de générer le diester *cis*-**33** (Figure 69).

Figure 69. Préparation de l'acide (+)-(2*R*,6*S*)-**37**.



a) DMP, HCl, MeOH b) i) K_2CO_3 ii) Pd/C, $H_2O/AcOEt$, H_2 2) $(Boc)_2O$, THF c) $LiBH_4$, THF d) CAL-B, AcO e) $RuCl_3$, $NaIO_4$, CH_3CN , CCl_4 , H_2O

Le développement de la désymétrisation enzymatique du diol *cis*-**34** a été inspiré des conditions développées sur les pyrrolines et les pyrrolidines 2,5-disubstituées mais également sur la désymétrisation de son homologue *N*-Cbz publié par Chênevert^{189,190,148,191}. Pour ce dernier la lipase d'*Aspergillus niger* s'est montrée la plus stéréosélective (ee >98%) tandis que dans le cas de l'homologue *N*-Boc c'est la lipase de *Candida antarctica* B qui a permis d'enrichir optiquement l'alcool (-)-(2*S*,6*R*)-**35** (ee :97%) sur une échelle de 25 grammes. Grâce à l'oxydation douce au périodate de sodium, l'acide a pu être obtenu par extraction acido-basique dans un rendement de 69% pour la désymétrisation et l'oxydation. L'apparence du produit final laisse croire que la pureté chimique de l'huile violette obtenue reste à être améliorée.

En résumé, c'est la désymétrisation enzymatique de composés *méso* qui a été au cœur de la stratégie sélectionnée pour enrichir optiquement les pyrrolidines 2,5-disubstituées et les pipéridines 2,6-disubstituées. La lipase de *Candida antarctica* B qui s'est avérée la plus stéréosélective dans la majorité des synthons désymétrisés dans le cadre de ces projets. En ce qui concerne les pyrrolidines, plus de cinq amino alcools ont été obtenus avec des excès énantiomères élevés (>97%), sans compter les pyrrolines 2,5-disubstituées et les pyrrolidines tétrasubstituées désymétrisées lors des recherches de Frédéric Jacques²⁰¹. Toutes les configurations absolues associées aux synthons chiraux présentés dans ce chapitre ont été prouvées par corrélation chimique des divers composés répertoriés dans la littérature.

Les travaux ultérieurs pourront s'orienter vers le développement de l'hydrogénation catalytique du 1-*tert*-butyl-2,5-1*H*-pyrrole-1,2,5-tricarboxylate afin d'accéder au procédé à l'échelle préparative des différents acides aminés chiraux s'y rattachant. De plus, la synthèse de l'acide 2-carboxylique (2*R*,6*S*)-6-(acétoxyméthyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pipéridine pourra être développée sur une échelle du kilo-lab si toutefois la capacité des installations d'hydrogénation le permet.

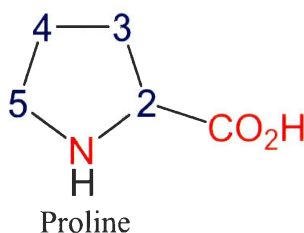
Chapitre IV : Synthèse énantiosélective d'hydroxyproline

4.1 Source et fonction de la proline et de ses dérivés hydroxylés

La proline fait partie des 10 acides aminés naturels non-essentiels puisqu'elle est biosynthétisée par le foie. Cet acide aminé hydrophobe a été isolé de la caséine en 1901. Ses dérivés hydroxylés ont été isolés du collagène de tendon de bœuf^{203,204}, des éponges méditerranéennes^{205,206}, du Mucrorin-D²⁰⁷ et de l'antibiotique télomycine²⁰⁸⁻²¹⁰. La télomycine est un produit naturel qui contient des 3-Hyp stabilisant les feuilletts β des peptides²¹¹. La manufacture des prolines est effectuée par hydrolyse acide du collagène animal. Cependant, d'autres méthodes devront être développées puisque la purification par cette méthode s'avèrent longue et fastidieuse engendrant beaucoup de perte²¹².

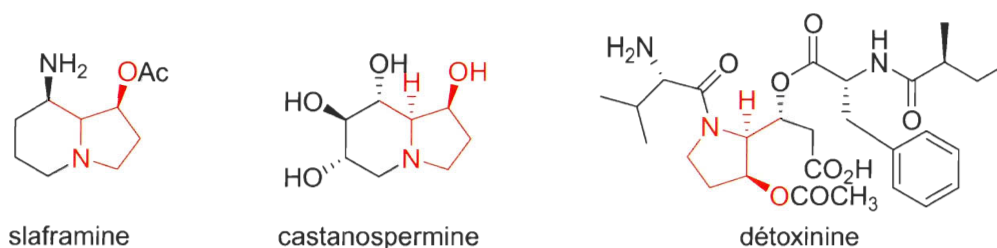
La structure de la proline est constituée d'un cycle pyrrolidine substitué en position 2 par un acide carboxylique (Figure 70). La proline est le seul acide aminé cyclique qui a son groupement R lié directement au groupement amino. Elle joue un rôle unique et important dans la conformation des peptides et des protéines²¹³ puisque son cycle pyrrolidine force le lien peptidique à se fixer dans une conformation donnée. Pour leur part, les dérivés hydroxylés de la proline ont pour effet d'augmenter la stabilité de cette conformation par formation de liaisons hydrogène. Leurs groupements hydroxy fournissent un contrôle électronique qui oriente les angles des liaisons des peptides²¹⁴. D'ailleurs, l'importance de ces hydroxyprolines dans la stabilisation de la triple structure hélicoïdale du collagène est reconnu depuis plusieurs décennies^{215,214,216}.

Figure 70. Structure de la proline.



La nature a produit une diversité de prolines modifiées²¹⁷ comme la *cis*-3-hydroxyproline. Cet acide α -aminé est une unité structurale de certains composés biologiques comme la slaframine^{218,219}, la castanospermine²²⁰ et la déttoxine D₁²²¹ (Figure 71). On la retrouve aussi dans les alcaloïdes polyhydroxylés^{222,223}. La forme *trans*-3-hydroxy-L-prolinol est présente dans les graines de légumes *Castanospermum australe*²²⁴. Pour ce qui est de la *trans*-4-hydroxy-L-proline, elle est un constituant des cyclopeptides toxiques comme le phalloïdine qui provient des *Amanita phalloïdes*²²⁵.

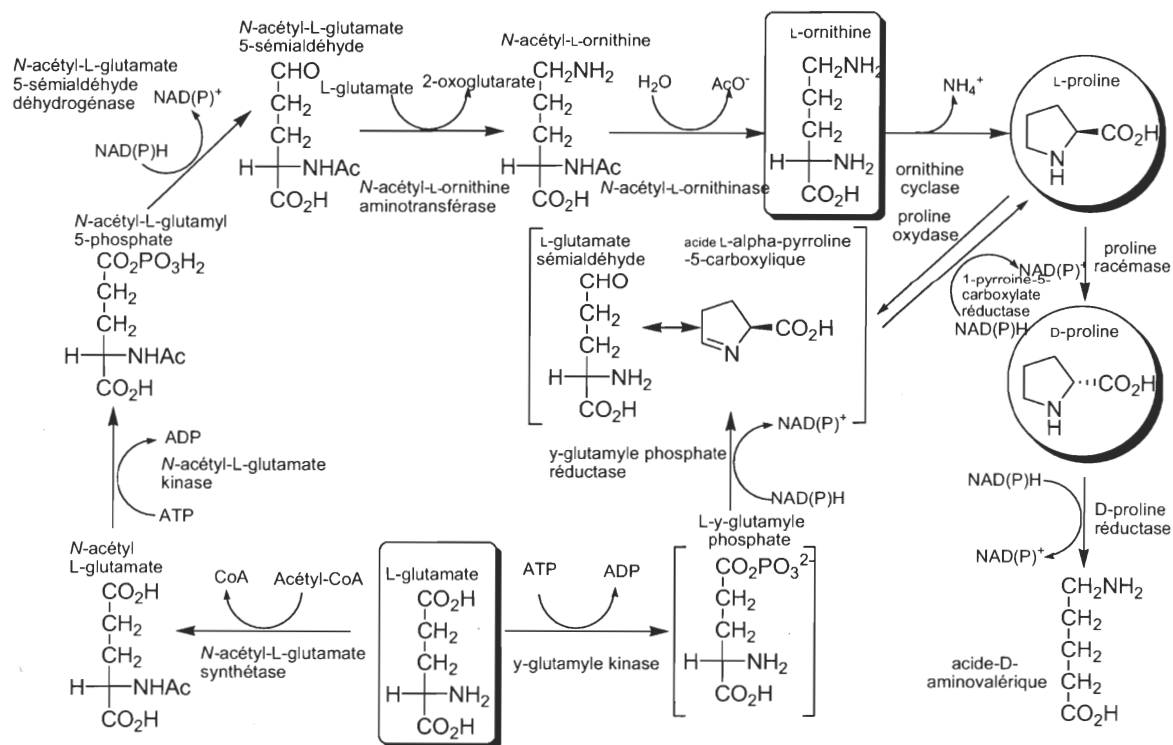
Figure 71. Sources naturelles d'hydroxyprolines.



La proline et ses dérivés hydroxylés sont extrêmement importants pour le fonctionnement propre des articulations et des tendons. Ces composés aident aussi à maintenir le muscle du cœur fort ainsi qu'à contenir la perte de collagène durant le vieillissement. *In vivo*, la proline est biosynthétisée à partir de l'acide glutamique²²⁶ (Figure 72). À partir de l'acide glutamique, il y a deux voies possibles. En premier lieu, le carbonyle en position γ est réduit en aldéhyde par l'action de deux enzymes, la γ -glutamyle kinase et la γ -glutamyle phosphate réductase. Ensuite, l'aldéhyde de la L-glutamique- γ -sémialdéhyde réagit avec l'amine spontanément pour former une base de Schiff, acide L- α -pyrroline-5-carboxylique, éliminant ainsi une molécule H₂O. Cet pyrroline est ensuite réduite par la 1-pyrroline-5-carboxylate réductase pour générer la L-proline. La deuxième voie implique premièrement l'acétylation de l'acide glutamique par la N-acétyl-L-glutamate synthétase. Ensuite la phosphorylation de la N-acétyl-L-glutamate par la N-acétyl-L-glutamate kinase. Ainsi, la N-acétyl-L-glutamyl-5-phosphate obtenue est réduite par la N-acétyl-L-glutamyl-5-sémialdéhyde déhydrogénase. La prochaine transformation implique le transfert d'un groupement amine par la N-acétyl-L-ornithine aminotransférase et l'hydrolyse du groupement N-acétyl par la N-acétyl-L-ornithinase pour fournir la L-ornithine. Cette dernière est cyclisée à l'aide de l'ornithine cyclase pour produire la L-

proline. Finalement, la L-proline obtenue par l'une ou l'autre des voies de biosynthèse peut être transformée en D-proline à l'aide de la proline racémase.

Figure 72. Biosynthèse de la proline.



La biosynthèse des hydroxyprolines est réalisée à partir de la proline par hydroxylation enzymatique avec l'intervention de l'acide ascorbique (vitamine C). Chez l'humain, la déficience en hydroxyproline apparaît uniquement s'il y a une déficience en vitamine C résultant d'une pauvre conversion de la proline en hydroxyproline. Une augmentation des hydroxyprolines dans l'urine est généralement associée avec un bris des tissus connectifs signe d'une déficience en vitamine C. Cette déficience aura pour effet de réduire la stabilité des molécules de collagène.

4.2 Synthèse d'analogues de la proline

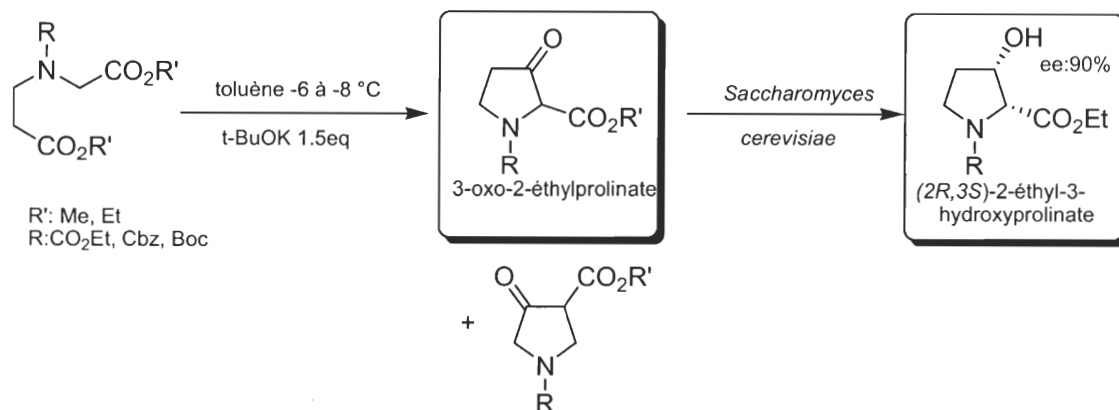
La synthèse stéréosélective des analogues de la proline de sources naturelles est un champ d'étude attrayant. Ces dérivés portent des groupements fonctionnels additionnels qui possèdent certains intérêts conformationnels comme constituants des peptides modifiés. De

nombreuses synthèses ont été développées dans la littérature pour synthétiser des analogues et des homologues de la proline et des hydroxyprolines²²⁷. Ces dernières ont été synthétisées par différentes approches²²⁸ dont la cyanation réductive²²⁹⁻²³¹, la condensation de Dieckmann suivie d'une bioréduction²³², l'amination réductive²³³, la cyclocarbamation stéréosélective²³⁴, l'amination diastéréosélective²³⁵, l'amidation intramoléculaire²³⁶ et la photocyclisation²³⁷.

Particulièrement, des synthèses du *trans*-3-hydroxyproline ont été mises au point par approche chiron à partir de l'acide pyroglutamique^{238,239}, de la L-sérine²³⁴, du D-mannitol²⁴⁰ et de l'acide malique²³⁰. Récemment, une autre approche à partir de sucres comme le D-glucono δ -lactone et l'acide L-gluconique γ -lactone a permis de synthétiser les isomères *cis* et *trans*²⁴¹. Une synthèse totale de l'isomère *cis* à partir du L-sérinal a également été rapportée par Jurczak²⁴².

La condensation de Dieckmann rapportée par Rapoport²⁴³ combinée à la bioréduction²³² du *N*-Boc-3-oxoéthylprolinate nous a inspiré pour développer à l'échelle préparative les synthons présentés dans ce chapitre. Cette condensation a initialement été utilisée par Kuhn et Osswald²⁴⁴, cependant ils avaient rapporté l'unique formation du 4-oxo-3-éthyl carboxylate. Cette réaction a ensuite été réutilisée par plusieurs chercheurs^{232,245-248} qui ont noté la formation de deux isomères, le 4-oxo-3-éthyl-prolinate et le 3-oxo-2-éthyl-prolinate. Malgré la formation des deux isomères, cette méthode est intéressante puisqu'elle offre la possibilité de séparer ces deux composés par extraction liquide-liquide²⁴⁶. De plus, la bioréduction à l'aide de la levure *Saccharomyces cerevisiae* permet d'accéder au *cis*-3-hydroxy-2-éthyl-prolinate avec un bon excès énantiomérique (~90-99%)^{232,247,248} (Figure 73). D'autres chercheurs ont rapporté un excès de 80%^{245,246} du à la présence de multiples enzymes de sélectivité inverse dans la levure de boulanger²⁴⁹. Néanmoins, cette stratégie a servi Williams²⁵⁰ et son équipe pour réaliser la synthèse totale de la paraherquamide A.

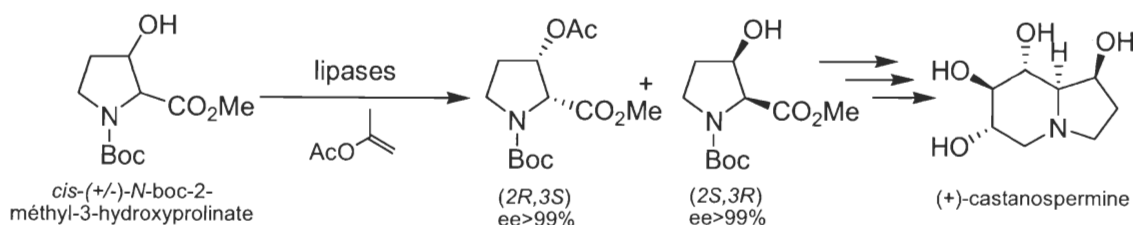
Figure 73. Condensation de Dieckmann et bioréduction.



4.2.1 Synthèse enzymatique d'hydroxyproline

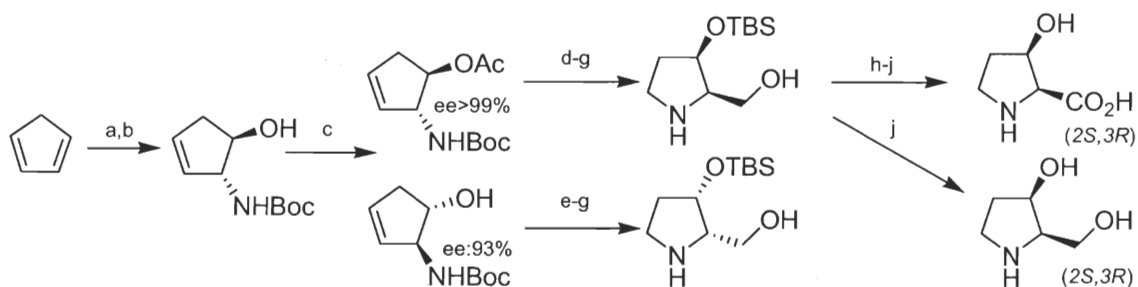
La bioréduction du 3-oxo-2-éthylprolinate établie par Cooper²⁴⁵ a été améliorée par Sih²⁵¹ afin d'augmenter la sélectivité. Les améliorations apportées pour obtenir une meilleure sélectivité ont été le changement de l'oxydo-réductase employée. Ainsi la réduction du *N*-boc-2-méthyl-3-oxoprolinate par l'espèce de *Dipodascus* s'est avérée très sélective (ee ≥ 99%). Ils ont également exploré une voie alternative, soit l'hydrolyse énantiosélective enzymatique du substrat acylé chimiquement en position 3 (Figure 74). La lipase de *Candida cylindracea* et de *Pseudomonas* sp. ont été hautement chimio- et énantiosélective face à l'hydrolyse de ce substrat puisqu'ils ont généré des excès énantiomères ≥ 99% avec une excellente énantiosélectivité (E > 100). Cette stratégie a conduit à la synthèse de la (+)-castanospermine et a aussi pu servir à Götschi²⁵² pour réaliser la synthèse totale de la cyclothialidine, un inhibiteur de l'ADN gyrase.

Figure 74. Synthèse chimioenzymatique de la (+)-castanospermine.



Une synthèse chimioenzymatique de la (2*S*,3*R*)-3-hydroxyproline a été élaborée par Johnson²⁵³ et ses collaborateurs (Figure 75). Cette approche est basée sur la formation d'un amino alcool dérivé du cyclopentadiène. Cette amino alcool a été soumis à un dédoublement cinétique enzymatique par acylation en milieu organique. La lipase de *Candida antarctica* s'est montrée très sélective pour le produit (ee ≥ 98%), toutefois le substrat résiduel (ee : 93%) a dû être recristallisé pour atteindre une pureté optique équivalente.

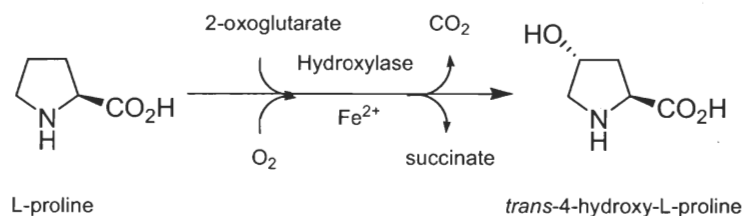
Figure 75. Synthèse chimioenzymatique de la (2*S*,3*R*)-3-hydroxyproline.



Réactifs et conditions: (a) AcOOH après NH₃/MeOH; (b) Boc₂O, EtOAc; (c) *Candida antarctica*, acétate d'isopropényle, TP, 4h; (d) KOH, MeOH; (e) TBDSCl, imidazole, DMF; (f) O₃, MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) après DMS; (g) NaBH₃CN, AcOH, MeOH; (h) NaOCl, TEMPO, KBr, NaHCO₃, Et₂O-H₂O; (i) NaIO₄, RuCl₃ (cat.), Me₂CO; (j) HCl, MeOH-H₂O

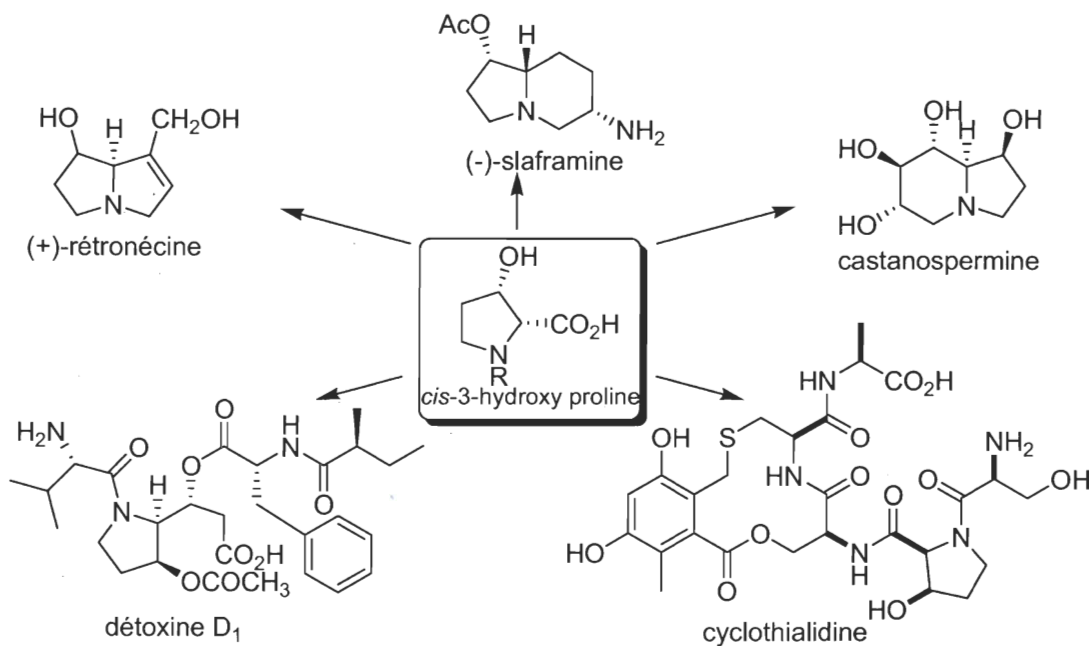
La manufacture des hydroxyprolines, par hydrolyse acide du collagène animal, comporte des purifications fastidieuses qui entraînent beaucoup de pertes. C'est pourquoi, depuis des méthodes ont été développées pour produire la L-proline par fermentation à faible coût. Il est maintenant pensable qu'un processus d'hydroxylation enzymatique devienne un choix économique. Shibasaki²¹² a mis au point une production de la *trans*-4-hydroxy-L-proline par hydroxylation enzymatique. Cette hydroxylation de la L-proline catalysée par une dioxygénase dépendante au 2-oxoglutarate, requiert la participation du 2-oxoglutarate, de l'oxygène et d'ions ferreux (Figure 76).

Figure 76. Hydroxylation enzymatique de la L-proline.



4.2.2 Les applications de la proline et de ses dérivés hydroxylés

L'isomère *cis*-3-hydroxy-D-proline est un précurseur utile pour la synthèse d'alcaloïdes comme la (-)-rétronécine²⁵⁴, la (-)-slaframine^{255,246}, la déttoxine D₁²²¹ et la (+)-castanospermine²⁵¹ et ses épimères²⁴⁸ (Figure 77). Ce rare synthon est également employé dans la synthèse de la cyclothialidine²⁵², un inhibiteur potentiel d'ADN gyrase isolé du microorganisme *Streptomyces filipinensis*. Quant à l'isomère *trans*-3-hydroxy-L-proline, il a été employé en outre comme précurseur d'inhibiteur de β -lactamase²⁵⁶.

Figure 77. Les applications des *cis*-3-hydroxyprolines.

On attribue de nombreuses applications à l'isomère *trans*-4-hydroxy-L-proline²⁵⁷ comme la synthèse de dérivés pyrrolidines, pipérazines et pipéridines. Cet isomère est aussi utilisé pour synthétiser des bicycles comme les dérivés de la benzodiazépine et pour la

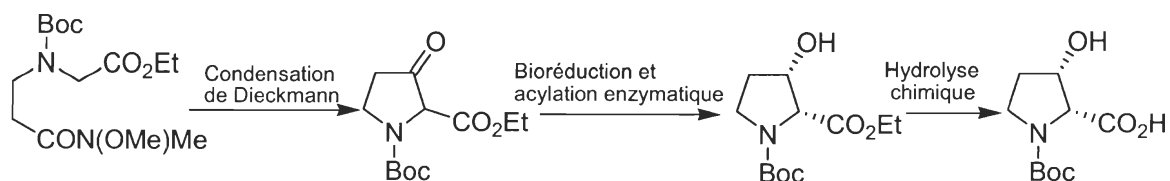
synthèse stéréocontrôlée de l'acide (-)-kaïnique²⁵⁸. De plus, il est un excellent synthon chiral pour la synthèse de produits pharmaceutiques comme les anti-inflammatoires, les antibactériens contenant des carbapénems et des fluoroquinolones, les antibiotiques pour les infections reliées au VIH et bien d'autres. Tout comme la proline, cet hydroxyproline est employé à titre de catalyseur chiral pour des réactions d'hydrogénations asymétriques.

4.3 Stratégie et méthodes sélectionnées

Le présent projet visait essentiellement la synthèse d'hydroxyprolines à l'échelle préparative. Les travaux effectués ont principalement été axés vers la synthèse de la D-3-hydroxyproline de configuration *cis*. Le choix de cet isomère a été gouverné premièrement par la sélectivité de la *Saccharomyces cerevisiae* lors de la bioréduction et deuxièmement par le potentiel commercial accru de ce composé dû à sa disponibilité commerciale limitée.

La stratégie qui a été employée pour produire la D-3-hydroxyproline s'inspire des travaux de Knight et Cooper²⁴⁵ qui ont développé la bioréduction du *N*-Boc 2-éthyl 3-oxoprolinate. Pour obtenir ce synthon, nous avons effectué d'abord une condensation de Dieckmann mise au point par Kuhn et Osswald²⁴⁴. Cependant, dû à la faible sélectivité de cette réaction, il a été essentiel de modifier le synthon de départ ainsi que les conditions de réaction en se basant sur les travaux de Sibi²⁵⁹ afin d'accroître la sélectivité. Des réactions enzymatiques ont également été développées sur le *N*-Boc 2-éthyl 3-hydroxy proline puisque la bioréduction n'a pas généré un excès énantiomère supérieur à 97%. La bioréduction et l'acylation enzymatique ont donc été utilisées conjointement pour hausser l'excès énantiomère du produit de la bioréduction. Finalement, l'hydrolyse chimique des fonctions esters a permis d'obtenir le *N*-Boc D-3-hydroxy proline. Cette stratégie est applicable à l'échelle semi-préparative pour ce synthon (Figure 78).

Figure 78. Schéma réactionnel envisagé pour la synthèse du *N*-Boc *cis*-(2*R*,3*S*)-3-hydroxyproline.

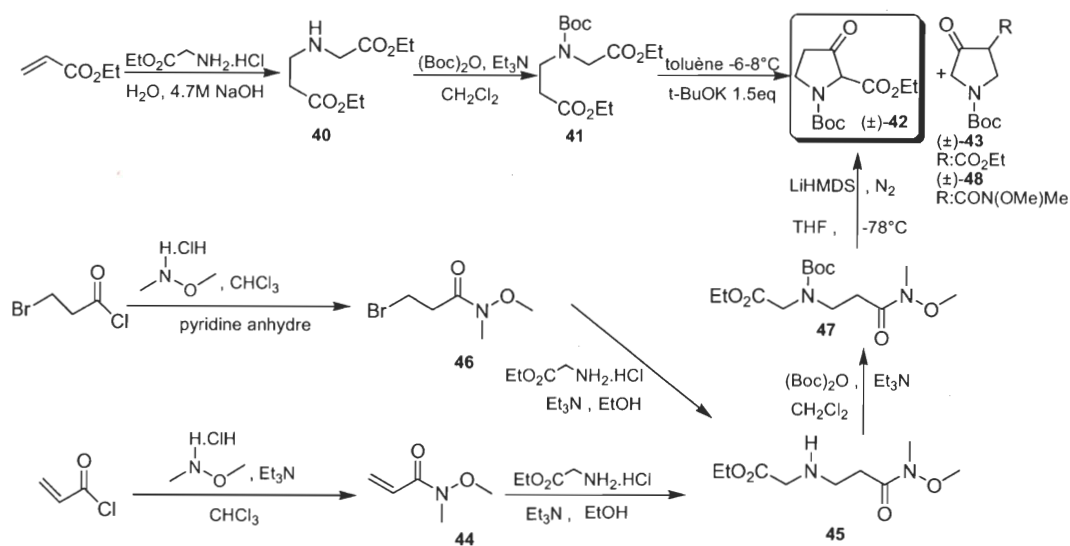


Parallèlement au développement du *N*-Boc D-3-hydroxy proline, des réactions enzymatiques sur l'isomère *trans* ont aussi été élaborées. D'abord, l'enrichissement de ce substrat a été tenté par acylation enzymatique, en effectuant un dédoublement cinétique sur la portion alcool. Ensuite, le dédoublement cinétique par hydrolyse enzymatique de la portion ester de ce substrat a été exploré.

4.4. Résultats de la synthèse du *N*-Boc-(2*R*,3*S*)-3-hydroxyproline

4.4.1 Synthèse du 1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate

La première voie de synthèse employée consistait d'abord à synthétiser le diester **40** par addition de Michael. Cette réaction a été effectuée entre l'ester éthylique de la glycine et l'acrylate d'éthyle. Ensuite, la protection de l'amine secondaire avec l'anhydride de *tert*-butoxycarbonyle a généré le diester **41**. Les rendements ont été de 70 % et 90 % après distillation des produits sous pression réduite. Le diester **41** a été cyclisé en pyrrolidine (\pm)-**42** par une condensation de Dieckmann avec un rendement de 35 % (Figure 79). La faible sélectivité de cette réaction a engendré aussi la production de la pyrrolidine (\pm)-**43** et elle s'explique par la possibilité de former l'énolate en α ou en β de l'amine lors de l'utilisation du *tert*-butoxyde de potassium comme base à -6°C . Contrairement à ce qui est publié dans la littérature, il a été impossible de séparer les isomères formés par extraction liquide-liquide à l'aide d'une solution tampon carbonate pH 9.5 pour entraîner le composé (\pm)-**43** sous forme d'énolate dans la phase aqueuse. Par conséquent, la distillation sous pression réduite a été essayée, mais la faible volatilité du composé (\pm)-**42** a forcé l'emploi de la distillation bulle à bulle de type Kugelrohr. Cette purification a permis de rendre le produit (\pm)-**42** plus limpide, par contre elle n'a pas été efficace pour éliminer le composé (\pm)-**43** et les impuretés visibles sur CCM. Il a donc été nécessaire d'utiliser une purification sur gel de silice.

Figure 79. Préparation du 1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate.

À la lumière des résultats obtenus, il devenait primordial d'augmenter la sélectivité de la condensation de Dieckmann et d'élaborer une méthode de purification du composé (±)-42. Pour ce faire, l'augmentation de la sélectivité a été basée premièrement sur les travaux de Sibi²⁵⁹. Afin de diminuer l'acidité du proton en position β de l'amine, l'amide 47 a été synthétisé par addition de Michael de l'ester éthylique de la glycine sur l'acrylamide 44. Ensuite l'amine secondaire de l'amide 45 a été protégée. Les rendements pour ces deux réactions ont été de 80% et 93% respectivement. La purification de ces deux composés s'est effectuée par lavage tout comme l'acrylamide 44, cependant certaines précautions ont dû être prises puisque ce dernier est volatil. Cet acrylamide 44 a préalablement été généré

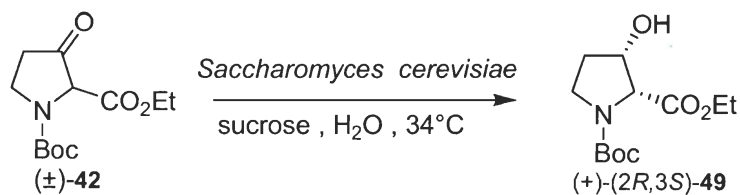
par amidation du chlorure d'acryloyle à l'aide de l'amine de Weinreb avec un rendement de 60% causé par la perte du produit par évaporation.

Une autre voie de synthèse a été explorée pour produire l'amine secondaire **45** à partir du 3-bromo-*N*-méthoxy-méthylpropanamide **46** (Figure 79). Malgré le rendement acceptable de 77% pour la synthèse de ce dernier à partir du chlorure de 3-bromopropionyle et de l'amine de Weinreb, cette voie n'a pas été efficace. La cause principale est le rendement très faible pour l'addition du composé **46** avec l'ester éthylique de la glycine dans les conditions employées.

En plus de la modification apportée sur le composé **47**, les conditions utilisées ont aussi été changées dans l'objectif d'augmenter la sélectivité de la condensation de Dieckmann (Figure 79). Tout d'abord, la base *t*-BuOK a été remplacée par LiHMDS et la température du milieu réactionnel a été abaissée à -78°C au lieu de -6°C. Ces modifications ont eu pour effet d'augmenter à 70% le rendement du composé (±)-**42**, cependant la sélectivité n'étant pas parfaite, le composé (±)-**48** a également été retrouvé dans le mélange brut. La séparation de ces composés a été réalisée aisément par filtration sur gel de silice, mais cette purification pourrait devenir une limitation pour la synthèse à l'échelle préparative. Pour les mêmes raisons énoncées qu'auparavant, la distillation ne s'avère pas efficace pour séparer les isomères formés. L'obtention de la cétone (±)-**42** a permis de mettre au point des réactions de biocatalyse sur ce substrat telle la bioréduction et l'acylation enzymatique.

4.3.2 Bioréduction du 1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate

La bioréduction de ce synthon a été mise au point et utilisée par plusieurs chercheurs^{232,245-248}. Néanmoins, il a été inévitable d'explorer davantage les conditions de réactions nécessaires à la réalisation de cette réaction à l'échelle préparative, puisque les résultats d'excès énantiomères peuvent varier grandement en fonction de la concentration du substrat. Ainsi, avec la levure de *Saccharomyces cerevisiae* en milieu aqueux à 34°C, il a été possible de réduire la cétone (±)-**42** en alcool (+)-(2*R*,3*S*)-**49**, avec une conversion totale du substrat en produit (Figure 80). Cette réaction requiert du sucrose essentiel à la régénération du cofacteur NAD⁺(P)H présent dans les cellules entières utilisées.

Figure 80. Bioréduction du 1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate.

Différents paramètres ont été testés pour augmenter l'efficacité de cette réaction. Parmi ces paramètres nous retrouvons la provenance de la levure et la concentration du substrat. Deux marques distinctes de levures ont été employées, celle obtenue chez Aldrich et celle de marque Fleischman's. De plus, trois types de levure Fleischman's ont été testés : le type traditionnelle, levée rapide et four à pain. À concentration de substrat équivalente (12g/l), la levure de marque Fleischman's de type four à pain a démontré une meilleure sélectivité avec un excès énantiomère de 84 %. Afin d'augmenter la sélectivité de cette levure, une variation de la concentration du substrat a été étudiée. Les résultats obtenus sont à l'effet qu'une baisse de la concentration augmente la sélectivité (ee : 91%) tandis qu'une hausse la diminue (ee : 74%) (Tableau 11). Le rendement obtenu de 70% est acceptable compte tenu de l'extraction du produit de la phase aqueuse qui contient beaucoup de biomasse provenant des cellules entières. Ces dernières compliquent légèrement l'extraction en causant une émulsion.

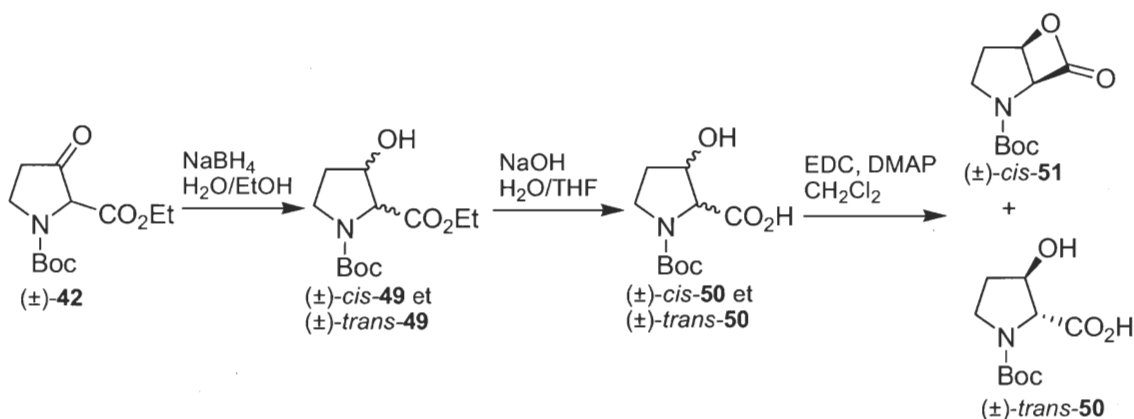
Tableau 11. Temps de réaction (h), concentrations du substrat (g/l) et excès énantiomères mesurés (ee_{(+)-(2*R*,3*S*)-49}) lors de la bioréduction de la cétone **42** avec des levures de marque différentes.

levure	conc. du substrat (g/l)	temps de réaction (h)	ee ₍₊₎₋₄₉ (%)
Aldrich	12	21	70
Levée rapide	12	36	68
Traditionnelle	12	36	68
Four à pain	12	36	84
"	20	36	74
"	5	36	91

4.3.3 Séparation des isomères *cis* et *trans* *N*-Boc-(±)-3-hydroxyproline par lactonisation

La séparation des isomères *cis* et *trans* du *N*-Boc-3-hydroxyproline a été effectuée par lactonisation de l'acide *cis*, dans l'objectif d'étudier certaines réactions enzymatiques sur son ester éthylique correspondant. L'isomère *cis* a donc été généré lors de la réduction chimique de la cétone **42** à l'aide de l'agent réducteur NaBH₄. Suite à la réduction, l'ester éthylique du mélange *cis/trans* a été hydrolysé dans des conditions basiques pour produire le mélange *cis/trans* (±)-**49** de *N*-Boc 3-hydroxyproline avec un rendement de 95%. Ensuite, l'isomère *cis*-**50** a été lactonisé en présence de EDC sous la catalyse du DMAP (Figure 81). Cette lactone (±)-*cis*-**51** a été séparée de l'acide (±)-*trans*-**50** par extraction liquide-liquide. Malgré la séparation de ces deux composés, le rendement (23%) demeure très faible d'autant plus qu'il serait nécessaire d'effectuer d'autres transformations chimiques pour obtenir la (±)-*cis*-1-*tert*-butyl 2-éthyl-3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate (±)-*cis*-**49**. Pour ces raisons, les travaux n'ont pas été explorés davantage.

Figure 81. Séparation des isomères *cis* et *trans* *N*-Boc-(±)-3-hydroxyproline par lactonisation.

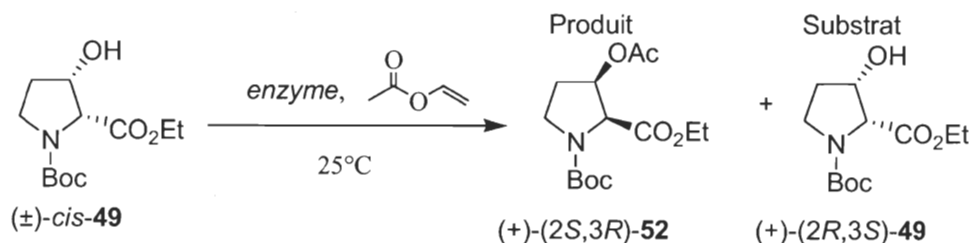


4.3.4 Dédoublage cinétique du (±)-*cis*-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate par acylation et hydrolyse enzymatique

Le dédoublement cinétique par acylation enzymatique du substrat (±)-*cis*-**49** a été mis au point dans l'objectif de combiner cette réaction à la bioréduction de la cétone **42**. Tout d'abord, l'activité de plusieurs enzymes dont CAL-B, PLE, PPL, ANL, PCL, GCL,

RNL, PeSL, WGL et MSL a été testée. Par la suite, les lipases qui étaient les plus susceptibles d'être sélectives face à cet alcool secondaire (\pm)-*cis*-**49** ont été retenues: CAL-B, CRL, PCL, PPL et CCL. Ainsi, l'emploi de ces lipases dans l'acétate de vinyle a permis de générer le produit d'acylation (+)-(*2S,3R*)-**52** et le substrat résiduel (+)-(*2R,3S*)-**49** avec une conversion avoisinant les 50 % pour ces deux composés (Figure 82).

Figure 82. Dédoublage cinétique du (\pm)-*cis*-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate par acylation enzymatique.



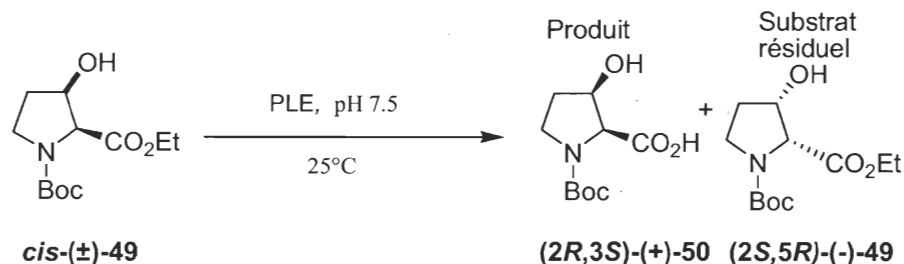
Toutes les lipases utilisées ont été extrêmement stéréosélectives envers le substrat (\pm)-*cis*-**49**, car l'énantiosélectivité de ces réactions a été supérieure à 200 dans les cinq cas. Cependant, la lipase de *Pseudomonas cepacia* a été choisie puisqu'elle a converti le tout en 3 heures, contrairement à une vingtaine d'heures pour les autres. Les excès énantiomères produits par cette lipase sont supérieurs à 97% pour le substrat résiduel (+)-(*2R,3S*)-**49** et supérieurs à 99% pour le produit (+)-(*2S,3R*)-**52**. Dans tous les cas les rendements sont près de 50%. Les excès énantiomères ont été analysés par GC ou HPLC en phase chirale (Tableau 12).

Tableau 12. Temps de réaction (h), taux de conversion du substrat (%), ratios énantiomère (E) et excès énantiomères mesurés du produit **52** et du substrat **49** lors de l'acylation du (\pm)-*cis*-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate.

enzyme	produit ee (%)	substrat ee (%)	temps de réaction (h)	Taux de conversion du substrat (%)	E
PCL	99	97	3	48	>200
CAL-B	99	91	17.5	47	>200
PPL	99	40	17.5	28	>200
CRL	99	67	24	40	>200
CCL	99	14	22	14	>200

L'hydrolyse enzymatique de la fonction ester du substrat (\pm)-*cis*-**47** est une excellente stratégie qui aurait pu conduire à l'obtention des deux énantiomères de cet hydroxyproline en séparant le produit du substrat résiduel. Cependant, uniquement PLE s'est montrée active parmi les hydrolases testées lors de l'hydrolyse enzymatique de la fonction ester (CAL-B, CRL, PPL, ANL, PCL, GCL, RNL, PeSL, WGL et MSL). Ainsi, en 6 jours dans un milieu aqueux à pH 7.5, le (\pm)-*cis*-**49** a été dédoublé en (+)-(2*R*,3*S*)-**50** et (-)-(2*S*,3*R*)-**49** à 30 % de conversion (Figure 83). Le ratio énantiomère pour cette réaction est de 8. Un excès énantiomère de 29 % a donc été obtenu pour le substrat résiduel et 71 % pour le produit. Cette réaction n'a pas été assez sélective pour pouvoir être développée à plus grande échelle.

Figure 83. Dédoublage cinétique du (\pm)-*cis*-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate par hydrolyse enzymatique.

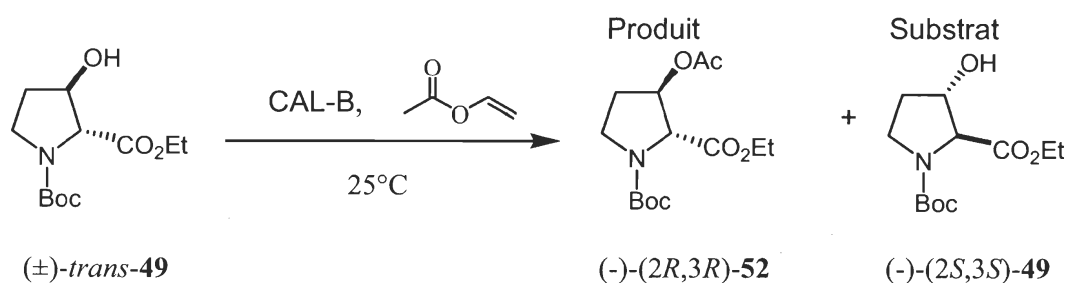


4.3.5 Dédoublage cinétique du (\pm)-*trans*-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate par acylation et hydrolyse enzymatique

Afin d'observer l'énantiosélectivité des lipases face à la 3-hydroxyproline de configuration *trans*, un dédoublage cinétique par acylation de l'alcool (\pm)-*trans*-**49** a premièrement été effectué. Pour ce faire, 6 lipases ont été testées dont : CAL-B, CCL, CRL, PPL, PCL et GCL. Seul la lipase de *Candida antarctica* B a démontré une activité catalytique envers ce substrat. Ainsi, le 3-hydroxy (\pm)-*trans*-**49** a été acylé pour générer le produit (-)-(2*R*,3*R*)-**52** avec un excès énantiomère de 32 % et le substrat résiduel (-)-(2*R*,3*R*)-**49** avec un excès énantiomère de 8 % (Figure 84). Après 21.5 heures, le substrat a

été converti à 20 % avec un ratio énantiomère de 2.1. Cette réaction n'a pas été assez sélective pour pouvoir être développée à plus grande échelle.

Figure 84. Dédoublage cinétique du (\pm)-*trans*-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate par acylation enzymatique.

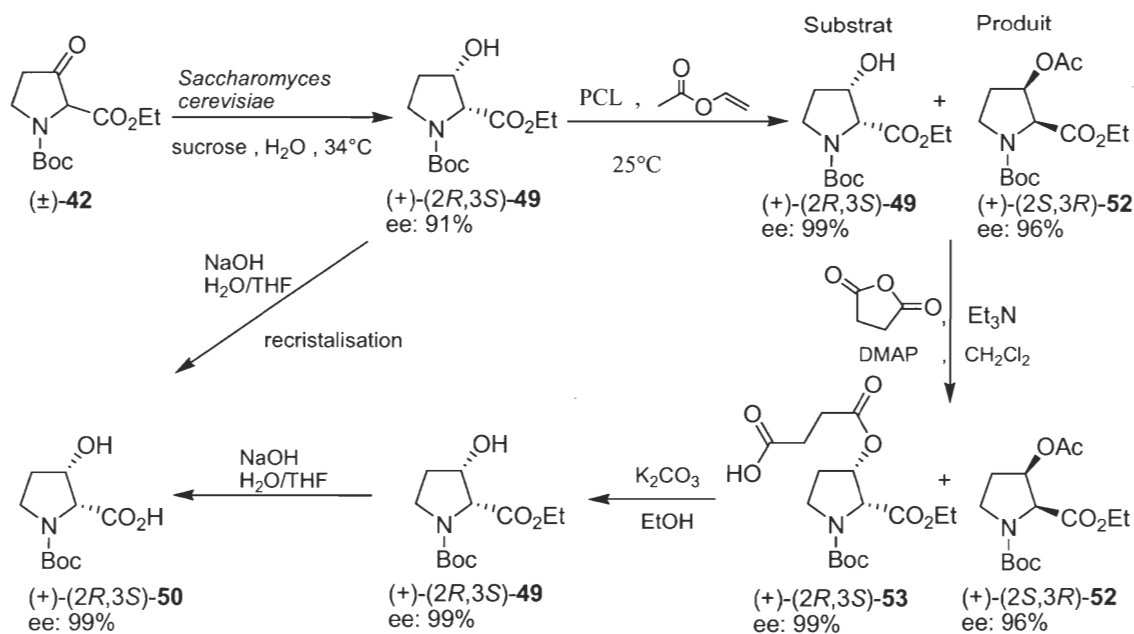


4.3.6 Préparation de la (2*R*,3*S*)-3-hydroxyproline

Les réactions enzymatiques préalablement mises au point sur l'isomère *cis* ont permis de développer une voie de synthèse à l'échelle préparative de l'acide 2-carboxylique *cis*-(2*R*,3*S*)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-hydroxypyrrolidine (+)-(2*R*,3*S*)-**50** (Figure 85). En premier lieu, la cétone **42** a été réduite à l'aide de la levure de *Saccharomyces cerevisiae* à une concentration du substrat de 5 g/l. Cette réduction a produit l'alcool (+)-(2*R*,3*S*)-**49** avec un excès énantiomère de 91% dans un rendement de 70%. Afin d'augmenter l'excès énantiomère au-dessus de 98%, l'énantiomère minoritaire a d'abord été acylé enzymatiquement avec la lipase de *Pseudomonas* sp. Le choix de cette lipase a été justifié par la sélectivité qu'elle a démontrée face à l'alcool (-)-(2*S*,3*R*)-**49** lors de l'étude de la réaction (voir 4.3.4). Ensuite, il était essentiel de séparer le produit du substrat résiduel. D'abord l'alcool (+)-(2*R*,3*S*)-**49** a été acylé à l'aide de l'anhydride succinique pour ensuite le séparer du mélange à l'aide d'une extraction liquide-liquide acido-basique. L'acide (-)-(2*R*,3*S*)-**53** a ainsi été récupéré dans un rendement de 86 %. Ce dernier a ensuite été hydrolysé à l'aide de K₂CO₃ avec un rendement quantitatif. Pour hydrolyser l'ester éthylique l'utilisation d'une base un peu plus forte a été nécessaire. De ce fait, l'acide (+)-

(2*R*,3*S*)-**50** a été obtenu par hydrolyse dans une solution aqueuse de NaOH 1N avec un rendement de 87 %. Le rendement global pour la préparation de l'acide 2-carboxylique *cis*-(2*R*,3*S*)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-hydroxypyrrolidine (+)-(2*R*,3*S*)-**50** est de 16% ce qui laisse place à l'amélioration du procédé, notamment par la recristalisation de l'acide obtenu suite à l'hydrolyse basique de l'ester (+)-(2*R*,3*S*)-**49** produit par la bioréduction de la cétone (±)-**42**.

Figure 85. Préparation du (2*R*,3*S*)-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate.

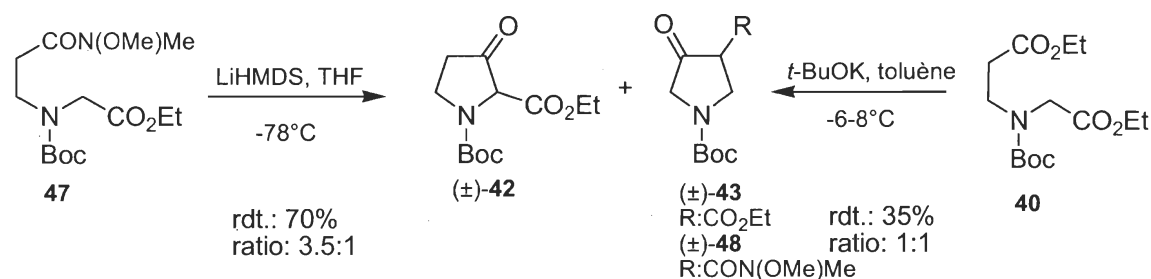


4.3.7 Conclusion

Suite aux résultats obtenus dans le cadre de ce projet, il est vrai de dire que l'objectif principal visé a été accompli. Ainsi, la synthèse de la *N*-Boc-(2*R*,3*S*)-3-hydroxyproline a pu être réalisée à l'échelle préparative par l'entremise de réactions chimiques combinées à la biocatalyse. De plus, le projet a permis d'explorer la réactivité de quelques lipases sur la *cis* et la *trans*-éthylhydroxyprolinate.

Tout d'abord, le synthon clé de ce projet, le 1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate, a été généré par condensation de Dieckmann selon la méthode de Sibi²⁵⁹. C'est toutefois la méthode la plus fréquemment utilisée dans la littérature^{232,245-248} qui a premièrement été utilisée pour cycliser l'ester **40**, par contre le ratio de 1 :1 (3-oxo :4-oxo) combiné au faible rendement a forcé un changement de stratégie. Ainsi, les conditions de Sibi²⁵⁹ ont eu pour effet d'augmenter la sélectivité de cette condensation. Pour ce faire l'amide de Weinreb **47** a du être synthétisé (figure 79). La cyclisation de cet amide en présence de la base LiHMDS à -78°C, a grandement amélioré le rendement et le ratio en faveur du *N*-Boc-3-oxoéthylprolinate. Cependant, il a été nécessaire de séparer les deux isomères par chromatographie éclair ce qui limite partiellement la production à plus grande échelle (Figure 86).

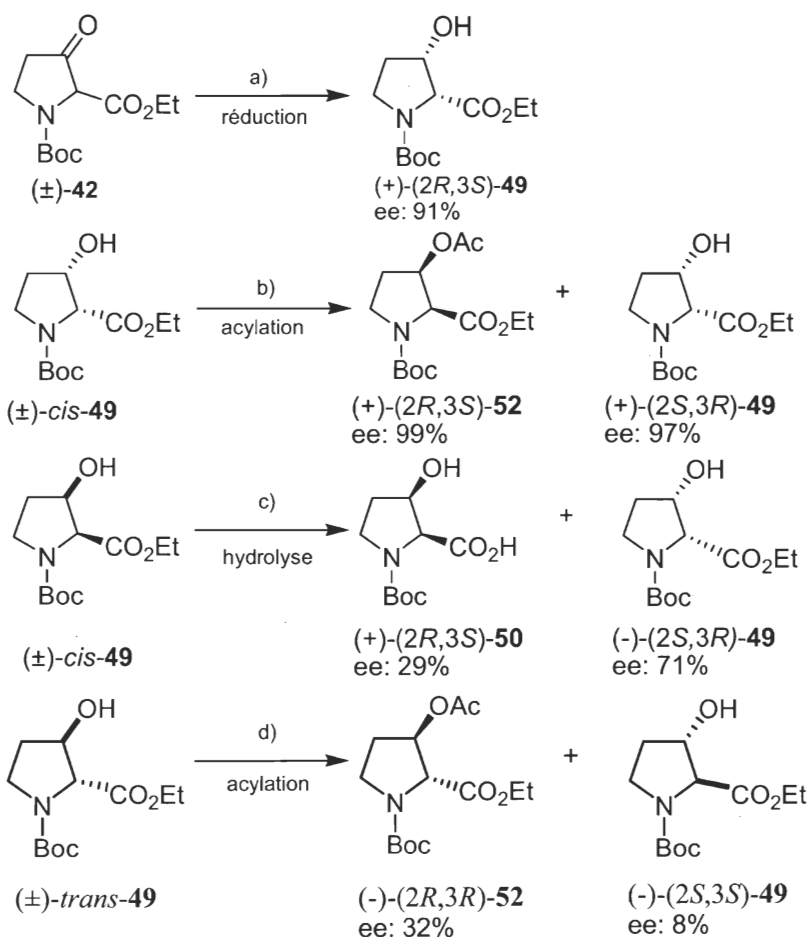
Figure 86. Condensation de Dieckmann.



À partir du synthon clé **42**, de nombreuses réactions biocatalysées ont pu être développées dont la bioréduction de la cétone **42** et la résolution enzymatique de la *cis*-3-hydroxyproline mais également de la *trans*-3-hydroxyproline (Figure 87). La bioréduction de Knight et Cooper²⁴⁵ a été développée sur une échelle de l'ordre de la dizaine de

grammes à l'aide de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La limitation de la méthode est liée à la dimension du réacteur puisque les meilleurs excès énantiomères ont été obtenus à une concentration de 5 g de substrat par litre d'eau (ee :91%). L'excès énantiomère chute à 70% à 12 g/L mais il reste sensiblement similaire à 20 g/L. Pour ce qui est de la résolution de l'éthyl *N*-Boc-*cis*-3-hydroxyprolinate, c'est en acylation que les meilleurs résultats ont été obtenus grâce à l'utilisation de PSL. Dans le cas de l'éthyl *N*-Boc-*trans*-3-hydroxyprolinate, ni l'acylation de l'alcool ni l'hydrolyse de l'ester n'a pu conduire à l'obtention de composés de haute pureté optique.

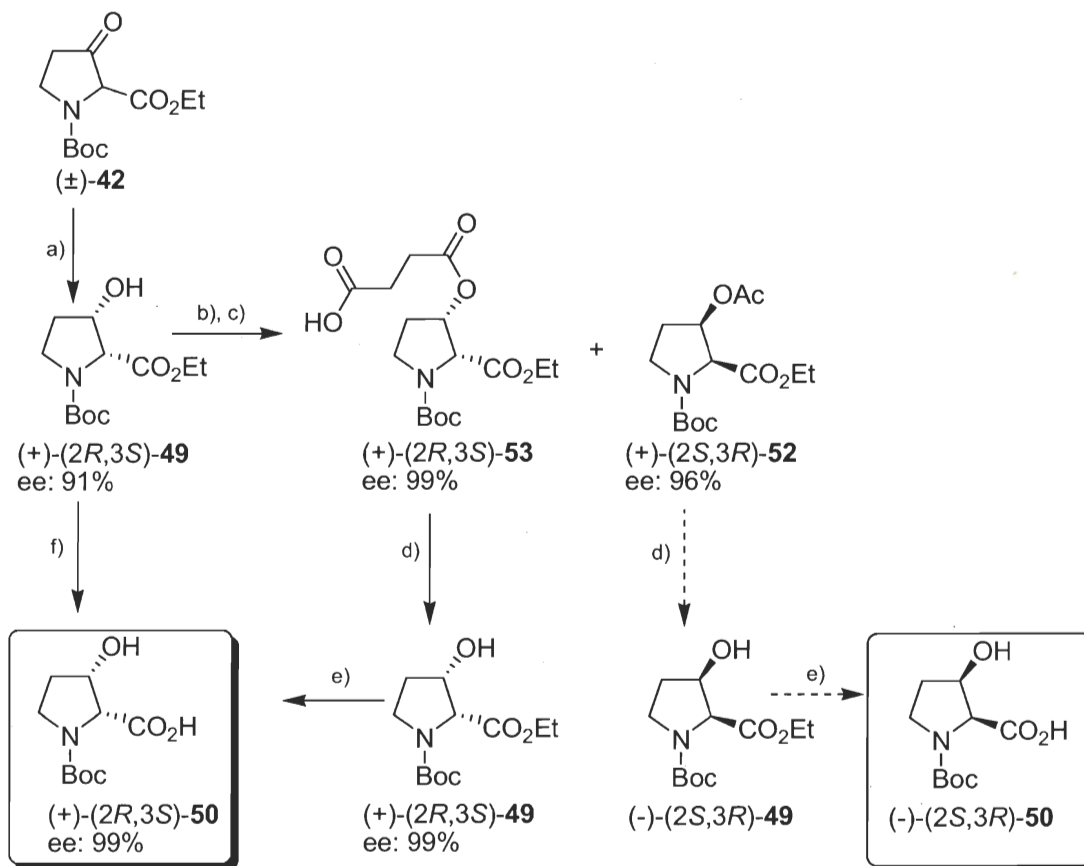
Figure 87. Réaction biocatalysées sur les dérivés de la proline.



a) *Saccharomyces cerevisiae*, sucrose, H₂O, 34°C b) PCL, AcO \rightleftharpoons c) PLE, H₂O d) CAL-B, AcO \rightleftharpoons

Le développement de la bioréduction du composé **42** combiné à l'acylation enzymatique de l'alcool a permis de mettre au point la préparation de la (2*R*,3*S*)-*N*-Boc-3-hydroxyproline. Cette dernière peut être obtenue également par recristallisation du produit de la bioréduction, cependant la combinaison à l'acylation enzymatique offre la possibilité de générer les énantiomères opposés. Une méthode d'extraction acido-basique de l'acide **53** a aussi été développée afin d'augmenter la capacité de production de cette méthode (Figure 88). Ainsi, l'application de ces réactions biocatalysées pourrait donner naissance à un procédé de synthèse des énantiomères de la *N*-Boc-*cis*-3-hydroxyproline à l'échelle semi-préparative.

Figure 88. Préparation des *N*-Boc-*cis*-3-hydroxyproline (2*R*,3*S*) et (2*S*,3*R*).



a) *Saccharomyces cerevisiae*, sucrose, H₂O b) PCL, AcO c) anhydride succinique, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂ d) K₂CO₃, EtOH
e) NaOH, H₂O, THF f) NaOH, H₂O, TH, Recristallisation

Conclusion générale

Le présent document a présenté une diversité d'approches biocatalytiques que nous avons utilisées pour mettre au point la synthèse de plusieurs hétérocycles chiraux. Les travaux ont été regroupés sous trois projets distincts.

Dans le premier projet, nous avons exploré l'enrichissement des dérivés de l' α -méthylsérinol dans le but de synthétiser différents dérivés alkylés de l'aldéhyde de Garner. Ces composés chiraux sont reconnus pour être utiles en synthèse énantiosélective grâce à leur multifonctionnalité. La première approche chimio-enzymatique utilisée a été inspirée de celle de Williams et Neri^{128,129}. Toutefois la faible sélectivité des lipases lors de la désymétrisation du *N*-Boc- α -méthylsérinol n'a pas permis de générer d'enrichissement optique. La deuxième approche a été inspiré de celle décrite par Wirz¹³⁰ et ses collaborateurs pour obtenir les énantiomères du 2-méthyl-isopropylidèneglycérol par dédoublement cinétique. Cette stratégie a été appliqué au *N,O*-isopropylidène **6** et à ses dérivés. Une fois de plus aucune lipase s'est montrée suffisamment stéréosélective pour développer un procédé industriel.

Toutefois, Nishi¹²⁵ a publié en 2005 la désymétrisation du *N*-Boc- α -méthylsérinol simultanément à nos recherches. L'agent acylant, le solvant et la lipase étaient tous différents des conditions employés dans cette ouvrage. De plus, il est à noter que l'excès énantiomère (89%) publié par Nishi n'aurait pas été suffisamment élevé pour l'élaboration d'un procédé puisque qu'un des critères était la haute pureté optique (97%).

D'autres désymétrisations de dérivés du sérinol comportant un centre quaternaire pourront donc être étudiés. Ces composés chiraux offriront ainsi la possibilité d'élaborer un procédé industriel de synthèse des dérivés de l'aldéhyde de Garner (Figure 39). La fonction aldéhyde de ces synthons pourra ouvrir la voie à une multitude de composés chiraux obtenu par réaction de Wittig.

Dans le second projet, différents hétérocycles de type pyrrolidine 2,5-disubstituées et pipéridine 2,6-disubstituées ont été préparés. Les approches chimio-enzymatiques

développées, dont la désymétrisation des *N*-Bn et *N*-Boc pyrrolidines 2,5-disubstituées, ont été basées sur les travaux de Ohno¹⁶⁸ et de Boutelje¹⁷¹. De plus, nous avons développé de nouvelles désymétrisations de pyrrolidines 2,5 disubstituées qui sont rapportées dans *Tetrahedron : Asymmetry*²⁰¹. Les deux énantiomères de la plupart des synthons ont été obtenus avec de hautes puretés optiques (ee :94-99%) (Figure 67 et 68). Certains des substrats ont été désymétrisés sur une échelle de la dizaine de grammes. Néanmoins, la synthèse de l'hétérocycle clé décrite par Cignarella et Nathansohn¹⁵⁴ a été limitée à l'échelle semi-préparative. En effet, le procédé devra être amélioré afin d'augmenter la sélectivité de cette aminocyclisation en faveur de l'isomère *cis* et ainsi éliminer la purification coûteuse par chromatographie éclair.

Dans le cadre des pipéridines, les travaux ont été inspirés de ceux développés préalablement dans notre laboratoire. D'abord l'intermédiaire clé, le *cis*-1-*tert*-butyl 2,6-diméthyl pipéridine-1,2,6-tricarboxylate a été préparé suivant la méthode d'Adkins¹⁸⁸ (figure 69). L'approche chimio-enzymatique impliquée découle directement des travaux publiés par Chênevert^{189,190,148,191} pour la désymétrisation de son homologue *N*-CBz. Le développement réalisé a mené à l'élaboration d'un procédé à l'échelle préparative de l'acide 2-carboxylique (*2R,6S*)-1-*tert*-butyl 2,6-diméthyl pipéridine-1,2,6-tricarboxylate (ee :97%). Les travaux futurs devront s'articuler autour de la production à l'échelle du kilo-lab de ce procédé.

Dans le troisième projet, nous avons réalisé la synthèse de dérivés de la 3-hydroxy proline. Nous avons vu que ces hétérocycles azotés au même titre que les autres présentés dans cet ouvrage détiennent un intérêt particulier en synthèse pharmaceutique faisant appel au peptidomimétisme.

D'abord l'intermédiaire clé, l'éthyl *N*-Boc-3-oxoprolinate, a été préparé selon la méthode Sibi²⁵⁹. Cette dernière est en fait une amélioration, tant au niveau du rendement que de la sélectivité, du procédé de Kuhn et Osswald²⁴⁴. La stratégie de Sibi a procuré un bien meilleur ratio de (3.5 :1) en faveur du 3-oxo par rapport au 4-oxo comparativement à (1 :1) avec la méthode premièrement publié par Kuhn et Osswald. Cette réaction nécessite

tout de même encore du développement afin d'augmenter sa sélectivité. Suite à l'obtention du synthon clé, plusieurs réactions biocatalysées ont pu être notamment mises au point. La première réaction impliquée a été inspirée des travaux de Knight et Cooper²⁴⁵ sur la bioréduction de l'éthyl *N*-Boc-3-oxoprolinate. Nos recherches ont permis de produire l'éthyl *N*-Boc-*cis*-3-hydroxyprolinate avec de bon excès énantiomères (ee :91%). Cependant il est à noter que ces résultats ont été obtenu à une faible concentration du substrat (5g/L) ce qui limite en soi le procédé de production à la dimension des réacteurs. L'augmentation de la concentration du substrat a conduit à une baisse remarquable de l'excès énantiomère (ee :70%).

L'acylation et l'hydrolyse enzymatique des isomères *cis* et *trans* de l'éthyl *N*-Boc-3-hydroxyprolinate ont aussi été étudiées. Les réactions les plus stéréosélectives ont été développées sur l'isomère *cis*. Ainsi, le substrat résiduel *N*-Boc 3-hydroxy éthylprolinate et le produit de dédoublement cinétique enzymatique ont été récupérés avec un fort enrichissement énantiomérique. Ces résultats nous ont permis de combiner l'acylation enzymatique à la bioréduction. L'énantiomère minoritaire a donc été acylé enzymatiquement tandis que le substrat résiduel a été subséquemment acylé chimiquement en présence de l'anhydride succinique. Par conséquent, la méthode offre la possibilité de réaliser la séparation des énantiomères opposés par simple extraction liquide-liquide acido-basique. Suite à deux autres hydrolyses basiques, notre méthode permet donc de générer les deux énantiomères du *N*-Boc-*cis*-3-hydroxyproline (figure 88). Les travaux futurs de ce projet pourront porter sur le développement de la recristallisation du produit enrichi lors de la bioréduction, sur une échelle plus importante que celle effectuée lors de nos recherches. La synthèse de l'éthyl *N*-Boc 3-oxoprolinate devra également être amélioré.

Finalement, deux des trois projets abordés dans cet ouvrage nous ont permis de développer des synthèses énantiosélectives d'hétérocycles azotés biocatalysées. De nombreux analogues liés de près ou de loin à la proline ont pu être générés avec de haute pureté optique (>97%). Cependant, la plupart des synthèses nécessitent encore du développement dans le but d'amener la synthèse de ces composés de chimie fine à l'échelle industrielle.

Partie expérimentale

5.1 Appareils et caractérisation

Les composés synthétisés pour la réalisation des projets ont été répertoriés dans cette partie expérimentale. Ils ont premièrement été caractérisés par résonance magnétique nucléaire ^1H (400 MHz) et ^{13}C (100 MHz) à l'aide d'un spectromètre Varian Inova 400. Les spectres infra-rouge de chaque composé ont été générés au moyen d'un spectrophotomètre Bomem MB-Series. Le point de fusion des composés solides a pu être déterminé grâce à un appareil Thomas HOOVER modèle 6427-H10. En ce qui concerne la détermination de l'activité optique, un polarimètre digital Jasco modèle DIP-360 a été utilisé en prenant soin d'employer uniquement des solvants de grade spectrophotométrique. Un gel de silice de $63\ \mu\text{m}$ a été utilisé lors de purification par chromatographie éclair. Tous les R_f observés lors d'élutions des composés en chromatographie sur couche mince de gel de silice de type 60 F254 ($250\ \mu\text{m}$ d'épaisseur) ont été rapportés.

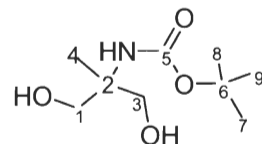
La détermination des excès énantiomères a principalement été effectuée par chromatographie en phase liquide à haute pression sur un chromatographe Agilent Technologies à détection UV muni d'une colonne chromatographique chirale Chiracel OD-H et Chiracel AD-H. Les excès énantiomères ont aussi été déterminés par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un chromatographe Agilent Technologies 6890N à détection par flamme ionisante (FID) muni d'une colonne chromatographique chirale Astec ChiralDEX (β -DM 120). Des composés racémiques ont été employés comme référence dans tous les cas. Les analyses chromatographiques font également mention des paramètres des méthodes développées.

La caractérisation des composés non-décrits dans la littérature a fait l'objet d'analyse de spectroscopie de masse. Les spectres de masse à haute résolution ont été réalisés par ionisation chimique (IC) à l'Université de Sherbrooke, tandis que ceux à basse résolution ont été réalisés par Electrospray ionisation (ESI) sur un appareil LC-MS Agilent Technologies au département de Génie Chimique de l'Université Laval.

5.2 Partie expérimentale relative au chapitre 2

5.2.1 Désymétrisation enzymatique du *N*-Boc-2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol

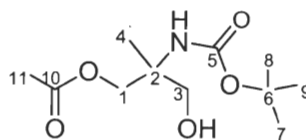
5.2.1.1 *Tert*-butyl 1,3-dihydroxy-2-méthylpropan-2-ylcarbamate (2)



2

Le 2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol **1** (2.45 g, 23.5 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans une solution de dichlorométhane anhydre (35 ml) sous agitation puis refroidi à 0°C. Une autre solution de dichlorométhane anhydre (15 ml) contenant l'anhydride de *tert*-butoxycarbonyle (5.65 g, 25.9 mmol, 1.1 eq) a été ajoutée goutte à goutte durant une période de dix minutes. Le mélange a été agité toute la nuit ou jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement gazeux de CO₂. La solution a ensuite été lavée avec trois portions d'acide chlorhydrique 2N (3 x 50 ml) et avec une portion d'eau distillée (1 x 50 ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée, concentrée *in vacuo*. Le produit brut a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice en employant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (25 : 75) pour générer le diol **2**¹²⁵ sous forme d'un solide blanc (3.36 g, 72%). P_f: 79-81°C. Formule brute: C₉H₁₉NO₄. Masse molaire: 205.25 g/mol. R_f: 0.33 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 3.75 (d, 2H, *J* = 11.6 Hz, **3**), 3.59 (d, 2H, *J* = 11.6 Hz, **1**), 3.20 (s, 3H, **OH** et **NH**), 1.41 (s, 9H, **7**, **8** et **9**), 1.14 (s, 3H, **4**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 156.7 (**5**), 80.4 (**6**), 67.9 (**1** et **3**), 57.3 (**2**), 28.5 (**7**, **8** et **9**), 20.6 (**4**). IR (NaCl): 3372 (élongations N-H et O-H), 2959 (élongations C-H aliphatiques), 1736 (élongations C=O), 1627 (déformation angulaire N-H), 1067 (élongation C-N).

5.2.1.2 L'acétate de 2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-hydroxy-2-méthylpropyle (3)



3

Dans un ballon de 10 ml, le diol **2** (200 mg, 0.99 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans 2 ml d'acétate de vinyle. Le mélange a été mis sous agitation magnétique et 50 mg de tamis moléculaire ainsi que 50 mg de lipase ont été ajoutés. L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie liquide à haute performance en phase chirale. La réaction a été arrêtée par filtration et concentration du milieu réactionnel lorsqu'il n'y avait plus d'avancement. Le mélange résiduel a été purifié par chromatographie éclair en employant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (75:25), pour séparer le diol **2**, le mono acétate **3** et le diacétate **4**. Le mono acétate **3**¹²⁵ obtenu sous forme d'huile translucide a été analysé par chromatographie liquide à haute performance en phase chirale afin d'évaluer l'excès énantiomère. Formule brute: C₁₁H₂₁NO₅. Masse molaire: 247.29 g/mol. R_f: 0.55 (Hexanes:AcOEt, 50:50) RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.86 (s, 2H, N-H et O-H), 4.20 (d, 1H, J = 11.2 Hz, **1**), 4.15 (d, 1H, J = 11.2 Hz, **1**), 3.61 (d, 1H, J = 11.8 Hz, **3**), 3.56 (d, 1H, J = 11.8 Hz, **3**), 2.07 (s, 3H, **11**), 1.40 (s, 9H, **7**, **8** et **9**), 1.21 (s, 3H, **4**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 171.4 (**10**), 156.1 (**5**), 80.3 (**6**), 67.3 (**1**), 66.5 (**3**), 56.6 (**2**), 28.5 (**7**, **8** et **9**), 21.1 (**11**), 20.3 (**4**). IR (NaCl): 3497 (élongations N-H et O-H), 2959 (élongations C-H aliphatiques), 1736 (élongations C=O), 1523 (déformation angulaire N-H), 1287 (élongations C-O), 1042 (élongation C-N).

Analyse HPLC-chirale

A) Méthode expérimentale

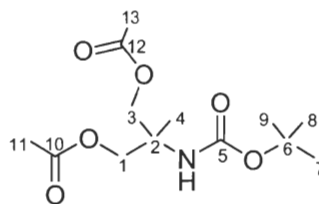
Injecteur : automatique
 Colonne : Chiracel AD-H
 Détecteur : UV / visible
 Longueur d'onde : 205 nm
 Phase mobile : Hexane / Isopropanol = 95/5
 Débit : 0.5 ml/min

B) Résultats expérimentaux

Temps de rétention des énantiomères ($t_{r(-)}$) et ($t_{r(+)}$), aires sous la courbe respective ($A_{(-)}$ et $A_{(+)}$), taux de conversion, taux de mono/(di+mono) et excès énantiomères mesurés (ee_3) pour l'analyse en chromatographie liquide à haute performance en phase chirale du mélange racémique (\pm)-**3** et du mono acétate **3**.

lipase	$t_{r(-)}$ (min)	$A_{(-)}$	$t_{r(+)}$ (min)	$A_{(+)}$	ee (%)	conversion (%)	taux de $\frac{\text{mono}}{\text{di+mono}}$ (%)
(\pm)- 3	21.2	5640	22.9	5625	0.1	-	-
PeS	21.3	1592	23.0	3946	42.5	20	99
CAL-B	21.2	17753	22.9	7810	38.9	99	73
CC	21.2	827	22.9	1250	20.4	7	99
CS	21.3	1508	23.0	2999	33.1	13	99

5.2.1.3 L'acétate de 2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-2-méthylpropane-1,3-diyle (**4**)

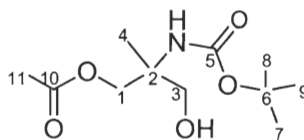


4

Le diol **2** (1.5 g, 7.46 mmol, 1.0 eq) a été dissous avec 15 ml de CH_2Cl_2 anhydre dans un ballon muni d'un septum qui a été préalablement chauffé sous courant continu d'argon sec et agitation magnétique. Le ballon a été par la suite refroidi à 0°C à l'aide d'un bain eau-glace sous atmosphère inerte. Un volume 2.39 ml de Et_3N anhydre (1.74 g, 17.15 mmol, 2.3 eq) a été ajouté avant d'enlever le courant d'argon sec. Un volume de 1.45 ml de chlorure d'acétyle (1.32 g, 16.78 mmol, 1.0 eq) a été finalement ajouté lentement. Le milieu réactionnel a été ramené à température de la pièce et l'avancement de la réaction a été suivi par CCM (R_{f4} : 0.73, $R_{f(\pm)\text{-}3}$: 0.55, R_{f2} : 0.26, éluant 50% Hexanes/50% AcOEt) jusqu'à disparition complète du diol **2** de départ. Après une période de 4 heures, la réaction a été arrêtée en lavant la phase organique avec trois portions d'eau déminéralisée avant d'être séché sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit résiduel a été purifié par chromatographie éclair en employant un mélange composé d'hexanes et

d'acétate d'éthyle (75:25), pour générer le diacétate **4**¹²⁵ sous forme d'huile translucide (1.88 g, 88%). Formule brute: C₁₃H₂₃NO₆. Masse molaire: 289.32 g/mol. R_f: 0.73 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.71 (s, 2H, N-H), 4.22 (d, 2H, J = 11.2 Hz, **3**), 4.12 (d, 2H, J = 11.2 Hz, **1**), 2.06 (s, 6H, **11** et **13**), 1.40 (s, 9H, **7**, **8** et **9**), 1.33 (s, 3H, **4**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 171.3 (**10** et **12**), 156.0 (**5**), 80.4 (**6**), 66.2 (**1** et **3**), 56.7 (**2**), 28.5 (**7**, **8** et **9**), 21.0 (**11** et **13**), 20.3 (**4**). IR (NaCl): 3497 (élongations N-H), 2959 (élongations C-H aliphatiques), 1726 (élongations C=O), 1523 (déformation angulaire N-H), 1225 (élongations C-O), 1042 (élongation C-N).

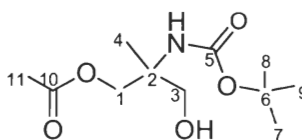
5.2.1.4 L'acétate de 2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-hydroxy-2-méthylpropyle ((±)-**3**)



(±)-**3**

Le diol **2** (200 mg, 0.99 mmol, 1.0 eq) a été dissous avec 15 ml de CH₂Cl₂ anhydre dans un ballon muni d'un septum qui a été préalablement chauffé sous courant continu d'argon sec et agitation magnétique. Le ballon a été par la suite refroidi à 0-5°C à l'aide d'un bain eau-glace sous atmosphère inerte. Un volume 152 µl de Et₃N anhydre (1.1 mmol, 1.1 eq) a été ajouté avant d'enlever le courant d'argon sec. Le chlorure d'acétyle (71 µl, 0.99 mmol, 1.0 eq) a été finalement ajouté lentement. Le milieu réactionnel a été ramené à température pièce et l'avancement de la réaction a été suivi par CCM (R_{f4} : 0.73, R_{f(±)-3} : 0.55, R_{f2} : 0.26, éluant 50% Hexanes/50% AcOEt) jusqu'à ce qu'il y ait une quantité suffisante de mono acétate formé. Après une période d'une demi heure, la réaction a été arrêtée en lavant la phase organique avec trois portions d'eau déminéralisée avant d'être séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit résiduel a été purifié par chromatographie éclair en employant un mélange composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle en proportions équivalentes (50:50), pour générer le mono acétate ((±)-**3**)¹²⁵ sous forme d'huile translucide (100 mg, 41%). Formule brute: C₁₁H₂₁NO₅. Masse molaire: 247.29 g/mol. R_f: 0.55 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir **5.2.1.2**. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir **5.2.1.2**. IR (NaCl): voir **5.2.1.2**.

5.2.1.5 L'acétate de 2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-hydroxy-2-méthylpropyle (3)



3

Dans un ballon de 25 ml, le diacétate **4** (100 mg, 0.35 mmol, 1.0 eq) a été émulsifié dans 2 ml d'eau déminéralisée sous agitation magnétique vigoureuse. La réaction a été démarrée par l'ajout de 25 mg de la lipase de *Candida antarctica* B (CAL-B) et le pH a été maintenu à 7.5 par l'ajout de NaOH 1N. L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie liquide à haute performance en phase chirale et par CCM (R_{f4} : 0.73, R_{f3} : 0.55, 50% Hexanes/50% AcOEt). La réaction a été arrêtée lorsqu'elle n'évoluait plus par extraction à l'aide de trois portions de CH_2Cl_2 (3 x 15 ml). La phase organique a alors été séchée sur MgSO_4 , filtrée puis concentrée sous pression réduite. Le mélange résiduel a été purifié par chromatographie éclair en employant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (75:25), pour séparer le diacétate **4** résiduel du mono acétate **3**¹²⁵ obtenu sous forme d'huile translucide. Ce dernier a été analysé par chromatographie liquide à haute performance en phase chirale afin d'évaluer l'excès énantiomère. Formule brute: $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{NO}_5$. Masse molaire: 247.29 g/mol. RMN ^1H (CDCl_3) δ : voir **5.2.1.2**. RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : voir **5.2.1.2**. IR (NaCl): voir **5.2.1.2**.

Analyse HPLC-chirale

A) Méthode expérimentale

Injecteur : automatique

Colonne : Chiracel AD-H

Détecteur : UV / visible

Longueur d'onde : 205 nm

Phase mobile : Hexane / Isopropanol = 95/5

Débit : 0.5 ml/min

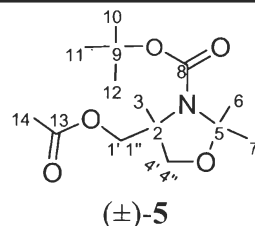
B) Résultats expérimentaux

Temps de rétention des énantiomères ($t_{r(-)}$) et ($t_{r(+)}$), aires sous la courbe respective ($A_{(-)}$ et $A_{(+)}$), taux de conversion, taux de mono/(di+mono) et excès énantiomères mesurés (ee_3) pour l'analyse en chromatographie liquide à haute performance en phase chirale du mélange racémique (\pm)-**3** et du mono acétate **3**.

Composé et lipase	$t_{r(-)}$ (min)	$A_{(-)}$	$t_{r(+)}$ (min)	$A_{(+)}$	ee (%)	conversion (%)	taux de mono (%)	mono di+mono
(\pm)- 3	22.1	5640	22,9	5625	0.1	-	-	-
PeS	22.1	3160	22,9	2832	5.5	48	23	23
CAL-B	22.2	1221	23	2396	32.5	30	99	99
CRL	22.2	1922	23	888	36.8	43	99	99
RSL	22.1	451	22,9	692	21.1	11	99	99
PLE	22.1	1347	22,9	189	75.4	44	99	99

5.2.2. Synthèse et dédoublement enzymatique du *N*-Boc-*N*,*O*-isopropylidène- α -méthylsérinol et de son ester correspondant

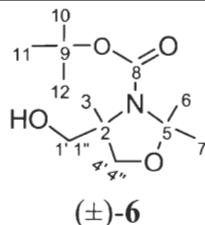
5.2.2.1 *Tert*-butyl 4-(acétoxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidine-3-carboxylate ((\pm)-**5**)



Le mono acétate (\pm)-**3** (1.03 g, 6.0 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans 15 ml d'acétone anhydre auquel 6.6 ml de DMP (5.590 g, 53.7 mmol, 9.0 eq) ont été ajoutés ainsi que 38 μ l de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Le mélange réactionnel a été agité magnétiquement pendant 2 heures et évaporé sous pression réduite. Le résidu a été repris avec 60 ml de CH_2Cl_2 et lavé avec 1 portion de ($\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$, 1:1, 1 x 30ml) et 1 portion de saumure (1 x 30ml). Le produit brut a été purifié par chromatographie éclair en employant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (75:25) pour générer l'acétate (\pm)-**3** (1.02 g, 61%). Formule brute: $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_5$. Masse molaire: 287.35 g/mol. Rf: 0.78 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 4.18 (s, 1H, **1''**), 4.08 (d, 0.5H, $J = 5.6$ Hz, **1'**), 4.04 (d, 0.5H, $J = 5.6$ Hz, **1'**) 3.91-3.80 (m, 1H, **4'**), 3.59-3.50 (m, 1H, **4''**), 1.98-1.91 (m, 3H, **14**), 1.45 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, **6**), 1.41 (s, 3H **7**), 1.36 (s, 9H, **10**, **11**, **12**), 1.32 et 1.25 (2 x s, 3H, **3**). RMN ^{13}C

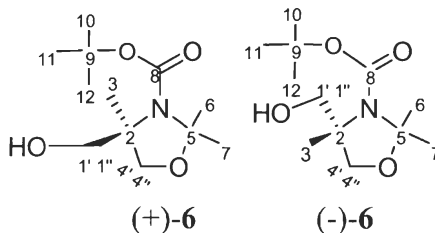
(CDCl₃) δ: 170.7 et 170.6 (**13**), 151.6 et 151.4 (**8**), 95.9 et 94.9 (**5**), 80.3 et 80.1 (**9**), 72.4 et 72.0 (**4**), 65.8 et 65.4 (**1**), 61.9 et 60.9 (**2**), 28.5 (**10, 11, 12**), 26.5 et 26.3 (**7**), 25.4 et 25.1 (**6**), 20.9 (**14**), 21.4 et 20.3 (**3**). IR (NaCl): 2971 (élongations C-H aliphatiques), 1742 et 1702 (élongations C=O), 1359 (élongations C-O), 1105 (élongation C-N). LRMS (ESI): 310.2 [M + Na]⁺.

5.2.2.2 Tert-butyl 4-(hydroxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidine-3-carboxylate ((±)-6)



L'ester (±)-**5** (300 mg, 1.04 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans 10 ml de méthanol auquel 216 mg de K₂CO₃ (1.56 mmol, 1.5 eq) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation magnétique pendant 2 heures et a été repris avec 35 ml d'eau déminéralisée. L'alcool résultant a été extrait de la phase aqueuse avec 3 portions de 50 ml de dichlorométhane. Les extraits combinés ont été lavés avec 3 portions d'eau déminéralisée (3 x 30 ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite afin de générer l'alcool (±)-**6** sous forme de solide blanc (234 mg, 91%). Formule brute: C₁₂H₂₃NO₄. Masse molaire: 245.16 g/mol. P_f: 57-59°C (litt.¹²⁴: 59-60°C). R_f: 0.58 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.07-3.91 et 3.69-3.49 (m, 4H, **1** et **4**), 1.53 (s, 3H **6** et 1H **7**), 1.46 (s, 2H, **7** et 9H, **10, 11, 12**), 1.39 (s, 3H, **3**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 153.6 (**8**), 95.5 (**5**), 81.2 (**9**), 72.4 (**4**), 67.9 (**1**), 64.8 (**2**), 28.6 (**10, 11, 12**), 27.3 (**7**), 25.9 (**6**), 19.8 (**3**). IR (NaCl): 3427 (élongations O-H), 2982 (élongations C-H aliphatiques), 1699 et 1657 (élongations C=O), 1396 (élongations C-O), 1104 (élongation C-N).

5.2.2.3 Tert-butyl 4-(hydroxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidine-3-carboxylate ((+)-6) et (-)-6



Dans un vial de 2 ml, l'ester (\pm)-5 (100 mg, 0.35 mmol) a été émulsifié dans 2 ml de solution tampon phosphate pH 7.5 par agitation magnétique vigoureuse. La réaction a été démarrée par l'ajout de 25 mg de lipase. La réaction a été suivie par CCM (Rf_5 : 0.78, Rf_6 : 0.58, éluant 50% Hexanes/50% AcOEt). Le mélange a été extrait de la phase aqueuse avec 3 portions de CH_2Cl_2 (3 x 10ml), séché sur MgSO_4 , filtré puis concentré sous pression réduite pour générer l'ester 5 et l'alcool 6. Le mélange a été analysé par chromatographie gazeuse en phase chirale afin d'évaluer les excès énantiomériques des deux composés obtenus.

Dans tous les cas, l'alcool 6 et l'acétate 5 ont été récupérés purs par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (75:25). Ainsi l'acétate 5 a pu être soumis à l'hydrolyse basique selon le mode opératoire 5.2.2.2 pour corrélérer l'excès énantiomère de son alcool correspondant. Formule brute: $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_4$. Masse molaire: 245.16 g/mol. P_f : 57-59°C (litt.¹²⁴: 59-60°C). R_f : 0.58 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ^1H (CDCl_3) δ : voir 5.2.2.2. RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : voir 5.2.2.2. IR (NaCl): voir 5.2.2.2.

Analyse GC-chirale

A) Méthode expérimentale

Injecteur : manuel
 température : 225°C
 solution d'injection : V = 1 μl , C = 10 mg/ml CH_2Cl_2

Colonne chirale : Astec ChiralDex (β -DM 120)

dimension : 30 m x 0.25mm
température : 125°C
débit : 2.5 ml/min
Détecteur : FID
température : 250°C

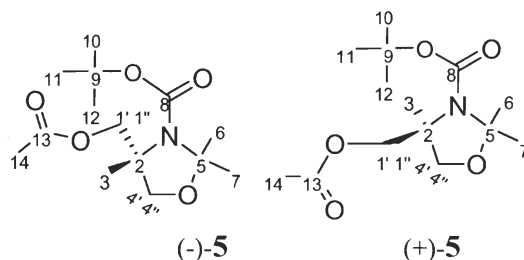
B) Résultats expérimentaux

Temps de réaction (h), taux de conversion (%), temps de rétention des énantiomères ($t_{r(+)}$) et ($t_{r(-)}$), aires sous la courbes respectives ($A_{(+)}$ et $A_{(-)}$), ratio énantiomérique (E) et excès énantiomères mesurés (ee) pour l'analyse en chromatographie liquide à haute performance en phase chirale du mélange racémique (\pm)-5 et (\pm)-6 ainsi que pour les produits d'hydrolyse enzymatique (+)-5, (-)-5, (+)-6 et (-)-6.

Composé et Lipase	temps de réaction (h)	conversion (%)	$t_{r(+)}$ (min)	$A_{(+)}$	$t_{r(-)}$ (min)	$A_{(-)}$	ee (%)	E
(\pm)-5	-	-	22.6	65.3	22.6	65.3	0	-
(\pm)-6	-	-	17.6	136.2	18.2	142.3	~0	-
PPL	60	77						<2
(-)-5							28.1**	
(-)-6			17.6	62.9	18.2	112.1	28.1	
(+)-6			17.5	122.1	18.1	104.3	7.8	
PCL	144	10						<2
(-)-5							4.0**	
(-)-6			17.6	16.7	18.2	18.1	4	
(+)-6			17.7	5.15	18.3	2.3	38.2	
GCL	24	16						<2
(+)-5							4.1**	
(+)-6			17.7	125.1	18.3	115.2	4.1	
(-)-6			17.8	102.4	18.4	144.5	17.1	
RSL	21	78						<2
(+)-5							7.8**	
(+)-6			17.6	133.4	18.2	127.6	2.2	
(-)-6			17.7	122.6	18.3	143.7	7.9	

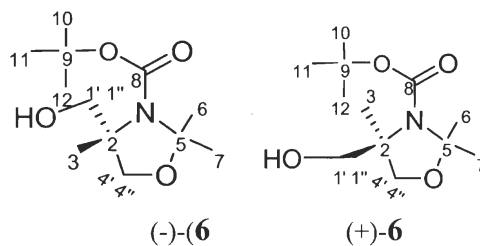
** déterminé par analyse du produit d'hydrolyse chimique (+)-6 et (-)-6

5.2.2.4 Tert-butyl 4-(acétoxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidine-3-carboxylate ((-)-5 et (+)-5)



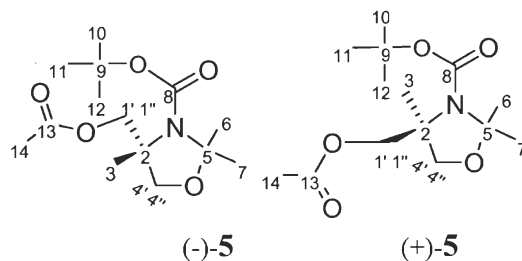
(voir 5.2.2.3 pour mode opératoire). Formule brute: $C_{14}H_{25}NO_5$. Masse molaire: 287.35 g/mol. R_f: 0.78 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN 1H ($CDCl_3$) δ : voir 5.2.2.1. RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : voir 5.2.2.1. IR (NaCl): voir 5.2.2.1. LRMS (ESI) : 310.2 [M + Na] $^+$.

5.2.2.5 Tert-butyl 4-(hydroxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidine-3-carboxylate ((-)-6 et (+)-6)



(voir 5.2.2.3 pour mode opératoire). Formule brute: $C_{12}H_{23}NO_4$. Masse molaire: 245.16 g/mol. P_f: 57-59°C (litt.¹²⁴: 59-60°C). R_f: 0.58 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN 1H ($CDCl_3$) δ : voir 5.2.2.2. RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : voir 5.2.2.2. IR (NaCl): voir 5.2.2.2.

5.2.2.6 Tert-butyl 4-(acétoxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidine-3-carboxylate ((-)-5 et (+)-5)



Dans un vial de 2 ml, le diol **2** (100 mg, 0.41 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans 2 ml d'acétate de vinyle. Le mélange a été mis sous agitation magnétique et 20 mg de tamis moléculaire ainsi que 25 mg de lipase ont été ajoutés. Après 168 heures, la réaction a pu être arrêtée par filtration sur papier filtre de 0.22 μ puis concentrée sous pression réduite pour

générer l'ester **5** et l'alcool **9**. Le mélange a été analysé par chromatographie gazeuse en phase chirale afin d'évaluer les excès énantiomères des deux composés obtenus.

Dans tous les cas, l'alcool **6** et l'acétate **5** ont été récupérés purs par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (75:25). Ainsi l'acétate **5** obtenu sous forme d'huile translucide a pu être soumis à l'hydrolyse basique selon le mode opératoire **5.2.2.2** pour corrélérer l'excès énantiomère de son alcool correspondant. Formule brute: $C_{14}H_{25}NO_5$. Masse molaire: 287.35 g/mol. Rf: 0.58 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN 1H ($CDCl_3$) δ : voir **5.2.2.1**. RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : voir **5.2.2.1**. IR (NaCl): voir **5.2.2.1**. LRMS (ESI) : 310.2 $[M + Na]^+$.

Analyse GC-chirale

A) Méthode expérimentale

Injecteur :	manuel
température :	225°C
solution d'injection :	V = 1 μ l, C = 10 mg/ml CH_2Cl_2
Colonne chirale :	Astec ChiralDEX (β -DM 120)
dimension :	30 m x 0.25mm
température :	125°C
débit :	2.5 ml/min
Détecteur :	FID
température :	250°C

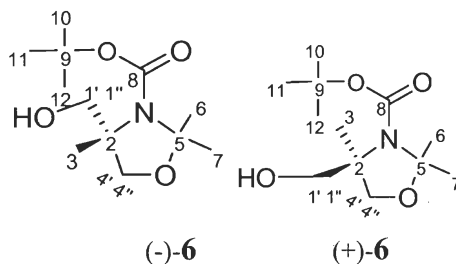
B) Résultats expérimentaux

Temps de réaction (h), taux de conversion (%), temps de rétention des énantiomères ($t_{r(+)}$) et ($t_{r(-)}$), aires sous les courbes respectives ($A_{(R)}$ et $A_{(S)}$), ratio énantiomérique (E) et excès énantiomères mesurés (ee) pour l'analyse en chromatographie liquide à haute performance en phase chirale du mélange racémique (\pm)-**5** et (\pm)-**6** ainsi que pour les produits d'acylation enzymatique (+)-**5**, (-)-**5**, (+)-**6** et (-)-**6**.

Composé et lipase	temps de réaction (h)	conversion (%)	tr ₍₊₎ (min)	A ₍₊₎	tr ₍₋₎ (min)	A ₍₋₎	ee (%)	E
(±)-5	-	-	22.6	65.3	22.6	65.3	0	-
(±)-6	-	-	17.6	136.2	18.2	142.3	~0	-
RSL	168	77						<2
(-)-5							28.2**	
(-)-6			17.5	75.4	18.1	134.6	28.2	
(+)-6			17.6	126.0	18.2	107.2	8.1	
GCL	168	51						<2
(-)-5							21.9**	
(-)-6			17.6	155.7	18.2	162.7	21.9	
(+)-6			17.5	135.8	18.2	129.7	22.9	
PCL	168	50						<2
(+)-5							25.6**	
(+)-6			17.5	98.4	18.1	93.5	25.6	
(-)-6			17.7	98.5	18.3	103.9	26.7	
PPL	168	5						<2
(+)-5							22.4**	
(+)-6			17.7	133.4	18.2	127.6	22.4	
(-)-6			17.6	199.0	18.2	122.3	1.4	

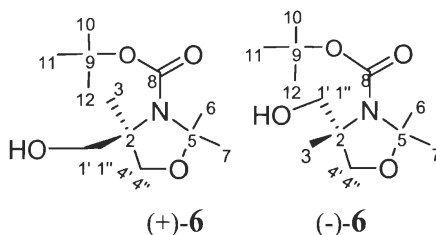
**déterminé par analyse du produit d'hydrolyse chimique (+)-(R)-6 et (-)-(S)-6

5.2.2.7 *Tert*-butyl 4-(hydroxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidine-3-carboxylate ((-)-6 et (+)-6)



(voir 5.2.2.6 pour mode opératoire). Formule brute: C₁₂H₂₃NO₄. Masse molaire: 245.16 g/mol. P_f: 57-59°C (litt.¹²⁴: 59-60°C). R_f: 0.58 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir 5.2.2.2. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir 5.2.2.2. IR (NaCl): voir 5.2.2.2.

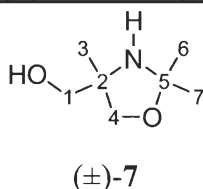
5.2.2.8 Tert-butyl 4-(hydroxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidine-3-carboxylate ((-)-6 et (+)-6)



(voir 5.2.2.6 pour mode opératoire). Formule brute: $C_{12}H_{23}NO_4$. Masse molaire: 245.16 g/mol. P_f: 57-59°C (litt.¹²⁴: 59-60°C). R_f: 0.58 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir 5.2.2.2. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir 5.2.2.2. IR (NaCl): voir 5.2.2.2.

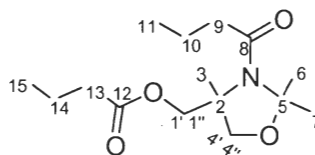
5.2.3 Synthèse et dédoublement enzymatique du 1-(4-(hydroxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidin-3-yl)butan-1-one et de son ester correspondant

5.2.3.1 (2,2,4-triméthylloxazolidin-4-yl)méthanol ((±)-7)¹³¹



Une solution de 2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol **1** (50.10 g, 476.5 mmol, 1.0 eq) et d'acide *p*-toluènesulfonique monohydrate (170 mg, 0.99 mmol, cat.) dans 150 ml de toluène est ajoutée goutte à goutte à une solution de 250 ml de toluène contenant 29 ml d'acétone (35.98 g, 619.5 mmol, 1.3 eq). Le mélange réactionnel a été agité magnétiquement et chauffé à reflux pendant 48 heures à l'aide d'un appareil de type Dean-Stark. La réaction a été arrêtée par l'ajout de K₂CO₃ et le mélange a été filtré puis concentré sous pression réduite. Le produit brute a été purifié par distillation sous vide en récoltant les fractions s'évaporant entre 40 et 55°C à 2-3 mmHg pour générer l'oxazolidine cible (±)-7 sous forme d'huile translucide qui cristallise sous forme d'un solide blanc (44.37 g, 64%). Formule brute: $C_7H_{15}NO_2$. Masse molaire: 145.20 g/mol. P_f: 45-47°C. R_f: 0.35 (AcOEt:MeOH, 85:15). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 3.76 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, **1**), 3.54 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, **1**), 3.41 (d, 1H, *J* = 10.6 Hz, **4**), 3.30 (d, 1H, *J* = 10.6 Hz, **4**), 2.35 (s, 1H, **OH**), 2.14 (s, 1H, **N-H**), 1.58 (s, 3H, **7**), 1.54 (s, 3H, **6**), 1.42 (s, 3H, **3**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 95.1 (**5**), 73.1 (**4**), 66.8 (**1**), 63.4 (**2**), 28.9 (**3**), 23.7 (**6** et **7**). IR (NaCl): 3425 (élongations N-H et O-H), 2940 (élongations C-H aliphatiques), 1645 (déformation angulaire N-H), 1237 et 1128 (élongations C-O), 1042 (élongation C-N).

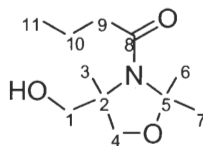
5.2.3.2 (3-Butyryl-2,2,4-triméthylloxazolidin-4-yl)méthyl butyrate((±)-8)



(±)-8

L'oxazolidine (±)-7 (1.00 g, 6.89 mmol, 1.0 eq) a été dissous avec 10 ml de CH₂Cl₂ anhydre dans un ballon muni d'un septum qui a été préalablement chauffé sous un courant continu d'argon sec. Le ballon a été par la suite refroidi entre 0°C et 5°C à l'aide d'un bain eau-glace sous atmosphère inerte. Un volume de 2.20 ml de Et₃N anhydre (1.60 g, 15.84 mmol, 2.3 eq) a été ajouté avant d'enlever le courant d'argon sec. Ensuite, 2.20 ml de chlorure de butyryle (1.65 g, 15.50 mmol, 2.25 eq) a été finalement ajouté lentement. Le milieu réactionnel a été ramené à température pièce et l'avancement de la réaction a été suivi par CCM ($R_{f(\pm)-8}$: 0.56, $R_{f(\pm)-7}$: 0.05, éluant 70% Hexanes/30% AcOEt) jusqu'à disparition complète de l'oxazolidine (±)-7 de départ. Après une période de 5 heures, la réaction a été arrêtée en lavant la phase organique avec trois portions d'eau déminéralisée avant d'être séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit résiduel a été purifié par chromatographie éclair en employant un mélange composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (70:30) pour générer l'ester (±)-8 sous forme d'huile translucide (1.37 g, 70%). Pour des quantités plus importantes, il est possible de purifier le composé (±)-8 par distillation sous pression réduite en récoltant les fractions s'évaporant entre 130°C et 142°C à 3-5 mmHg. Formule brute : C₁₅H₂₇NO₄. Masse molaire : 285.38 g/mol. R_f : 0.56 (Hexanes:AcOEt, 70:30). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.39 (d, 0.5H, J = 11.0 Hz, 1'), 4.34 (d, 0.5H, J = 11.0 Hz, 1''), 4.26 (d, 0.5H, J = 11.6 Hz, 1'''), 4.02 (d, 0.5H, J = 11.6 Hz, 1'''), 3.99 (d, 0.5H, J = 9.6 Hz, 4''), 3.90 (d, 0.5H, J = 9.2 Hz, 4'''), 3.66 (d, 0.5H, J = 9.6 Hz, 4'), 3.60 (d, 0.5H, J = 9.2 Hz, 4'''), 2.30-2.22 (m, 4H, 9 et 13), 1.70-1.61 (m, 4H, 10 et 14), 1.59 et 1.58 (2 x s, 6H, 6 et 7), 1.44 et 1.40 (2 x s, 3H, 3) 0.92-0.88 (m, 6H, 11 et 15). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 173.6 (8), 171.5 (12), 94.6 (5), 73.0 et 71.8 (4), 65.7 et 65.0 (1), 64.3 (2), 37.9 et 37.3 (9), 36.3 et 36.2 (13), 28.3 et 27.5 (7), 25.8 et 24.7 (6), 22.2 et 20.5 (3), 19.4 et 19.1 (10), 18.6 et 18.5 (14), 14.0 (11), 13.9 (15). IR (NaCl): 2959 (élongations C-H aliphatiques), 1725 et 1639 (élongations C=O), 1254 et 1209 (élongations C-O), 1086 (élongation C-N). LRMS (ESI): 308.2 [M + Na]⁺.

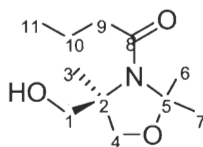
5.2.3.3 1-(4-(Hydroxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidin-3-yl)butan-1-one ((±)-9)



(±)-9

L'ester (±)-8 (1 g, 3.50 mmol, 1 eq) a été dissous dans 40 ml de méthanol auquel 726 mg de K_2CO_3 (5.26 mmol, 1.5 eq) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation magnétique pendant 2 heures et a été repris avec 75 ml d'eau déminéralisée. L'alcool résultant a été extrait de la phase aqueuse avec 3 portions de 100 ml de dichlorométhane et les extraits combinés ont été lavés avec 3 portions d'eau déminéralisée (3 x 100 ml). La phase organique a été séchée sur $MgSO_4$, filtrée et concentrée sous pression réduite afin de générer l'alcool (±)-9 sous forme d'huile translucide (543 mg, 72%). Formule brute: $C_{11}H_{21}NO_3$. Masse molaire: 215.29 g/mol. R_f : 0.33 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN 1H ($CDCl_3$) δ : 3.67-3.49 (m, 4H, **1** et **4**), 2.30-2.26 (m, 2H, **9**), 1.71-1.66 (m, 2H, **10**), 1.64 (s, 3H, **6**), 1.54 (s, 3H, **7**), 1.41 (s, 3H, **3**), 0.93-0.89 (m, 3H, **11**). RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 172.2 (**8**), 95.2 (**5**), 72.0 (**4**), 67.8 et 67.6 (**1**), 67.1 (**2**), 37.1 (**9**), 29.1 (**7**), 27.1 (**6**), 19.5 (**3**), 19.5 (**10**), 13.9 (**11**). IR (NaCl): 2934 (élongations C-H aliphatiques), 1639 (élongations C=O), 1231 (élongations C-O), 1067 (élongation C-N). LRMS (ESI): 238.1 $[M + Na]^+$.

5.2.3.4 1-(4-(Hydroxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidin-3-yl)butan-1-one ((-)-9)



(-)-9

Dans un ballon de 25 ml, l'ester (±)-8 (730 mg, 2.56 mmol) a été émulsifié dans 10 ml d'eau déminéralisée par agitation magnétique vigoureuse. Le pH a été maintenu à 7.5 par l'ajout de NaOH 1N tout au long de la réaction qui a été démarrée par l'ajout de 25 mg de la lipase de *Candida rugosa* (CRL). L'avancement de la réaction a été suivi par CCM (R_f (-)-8 : 0.91, R_f (-)-9 : 0.33, éluant 50% Hexanes/50% AcOEt). La réaction a été suivie par chromatographie sur couche mince. Le mélange a été extrait de la phase aqueuse avec 3

portions de CH_2Cl_2 (3 x 20ml), séchée sur MgSO_4 , filtrée puis concentrée sous pression réduite pour générer l'ester (-)-**8** et l'alcool (-)-**9**. Le mélange a été analysé par chromatographie gazeuse en phase chirale afin d'évaluer les excès énantiomères des deux composés obtenus.

Dans tous les cas, l'alcool (-)-**9** et l'ester (-)-**8** ont été récupérés purs par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'hexane et d'acétate d'éthyle (75:25). Ainsi l'ester (-)-**8** obtenu sous forme d'huile translucide a pu être soumis à l'hydrolyse basique selon le mode opératoire **5.2.3.6** pour corrélérer l'excès énantiomère de son alcool (+)-**8** correspondant. Formule brute: $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{NO}_3$. Masse molaire: 215.29 g/mol. R_f: 0.33 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ^1H (CDCl_3) δ : voir **5.2.3.3**. RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : voir **5.2.3.3**. IR (NaCl): voir **5.2.3.3**. LRMS (ESI): 238.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Analyse GC-chirale

A) Méthode expérimentale

Injecteur :	manuel
température :	225°C
solution d'injection :	V = 1 μl , C = 10 mg/ml CH_2Cl_2
Colonne chirale :	Astec ChiralDEX (β -DM 120)
dimension :	30 m x 0.25mm
température :	110°C
débit :	2.5 ml/min
Détecteur :	FID
température :	250°C

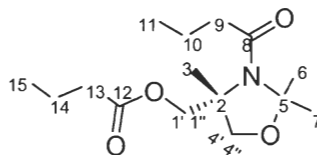
B) Résultats expérimentaux

Temps de réaction (h), taux de conversion (%), temps de rétention des énantiomères ($t_{r(-)}$) et ($t_{r(+)}$), aires sous la courbes respectives ($A_{(-)}$ et $A_{(+)}$), ratio énantiomérique (E) et excès énantiomères mesurés (ee) pour l'analyse en chromatographie liquide à haute performance en phase chirale du mélange racémique (\pm)-**8** et (\pm)-**9** ainsi que pour les produits d'hydrolyse enzymatique (-)-**8**, (+)-**9** et (-)-**9**

Composé, lipase et condition	Temps de réaction (h)	conversion (%)	tr ₍₋₎ (min)	A ₍₋₎	tr ₍₊₎ (min)	A ₍₊₎	ee (%)	E
(±)-8 (±)-9			65.0	139.2	68.0	141.3	0.7	-
à 22°C								
ANL	6.45	10					4.9**	
(-)-8								
(+)-9			65.2	106.1	68.1	117.0	4.9	3
(-)-9			64.9	214.8	68.2	84.1	43.7	3
CRL	29	75					46.5**	
(-)-8								
(+)-9			65.0	58.5	68.1	160.0	46.5	2
(-)-9			64.6	501.3	67.8	360.0	16.4	2
à 5°C								
CRL	7	43					59.0**	
(-)-8								
(+)-9			65.3	167.5	68.1	649.7	59.0	15
(-)-9			64.3	792.6	68.1	91.8	79.2	15
0.02M CaCl ₂	7	33					38.9**	
(-)-8								
(+)-9			65.0	42.5	68.0	96.7	38.9	11
(-)-9			65.0	909.8	68.1	114.4	77.7	11
0.08M CaCl ₂	7	40					50.7**	
(-)-8								
(+)-9			65.1	117.6	68.0	359.4	50.7	13
(-)-9			64.8	2274.3	67.9	284.9	77.7	13
0.1M CaCl ₂	7	38					47.2**	
(-)-8								
(+)-9			64.9	173.5	67.9	484.1	47.2	12
(-)-9			65.1	1164.4	68.1	142.8	78.2	12
0.5M CaCl ₂	7	22					23.3**	
(-)-8								
(+)-9			65.0	316.4	68.1	508.1	23.3	12
(-)-9			64.9	4593.1	68.0	465.2	81.6	12

** déterminé par analyse du produit d'hydrolyse chimique (+)-9

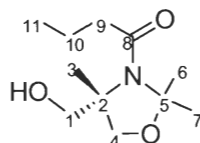
5.2.3.5 (3-Butyryl-2,2,4-triméthylloxazolidin-4-yl)méthyl butyrate((-)-8)



(-)-8

(voir 5.2.3.4 pour mode opératoire) Formule brute: C₁₅H₂₇NO₄. Masse molaire: 285.38 g/mol. R_f: 0.56 (Hexanes:AcOEt, 70:30). RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir 5.2.3.2. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir 5.2.3.2. IR (NaCl): voir 5.2.3.2. LRMS (ESI): 308.2 [M + Na]⁺.

5.2.3.6 1-(4-(Hydroxyméthyl)-2,2,4-triméthylloxazolidin-3-yl)butan-1-one ((+)-9)



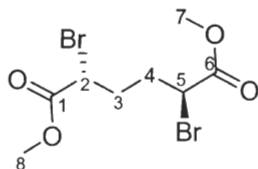
(+)-9

L'ester (-)-8 (133 mg, 0.47 mmol, 1 eq) a été dissous dans 10 ml de méthanol auquel 97 mg de K₂CO₃ (0.70 mmol, 1.5 eq) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation magnétique pendant 2 heures et a été repris avec 20 ml d'eau déminéralisé. L'alcool résultant a été extrait de la phase aqueuse avec 3 portions de 50 ml de dichlorométhane et les extraits combinés ont été lavés avec 3 portions d'eau déminéralisée (3 x 25 ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite afin de générer l'alcool (+)-9 sous forme d'huile translucide (90 mg, 90%). Formule brute: C₁₁H₂₁NO₃. Masse molaire: 215.29 g/mol. R_f: 0.33 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir 5.2.3.3. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir 5.2.3.3. IR (NaCl): voir 5.2.3.3. LRMS (ESI): 238.1 [M + Na]⁺.

5.3 Partie expérimentale relative au chapitre 3

5.3.1 Synthèse des pyrrolidines 2,5-disubstituées

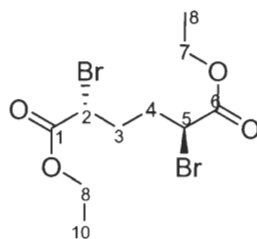
5.3.1.1 Diméthyl 2,5-dibromohexanedioate (11)



11

Un ballon tricol de 500 ml a été équipé d'une ampoule à additionner, d'un réfrigérant et d'un piège à HCl/HBr. Dans le tricol, 25.0 g d'acide adipique (171.1 mmol, 1.0 eq) ont été additionnés sous un courant d'argon continu ainsi que 31 ml de SOCl₂ (49.99 g, 420.2 mmol, 2.45 eq). Le milieu réactionnel a été chauffé à 65-70°C à l'aide d'un bain-marie pendant 2.5 heures. Lorsque le dégagement gazeux s'est arrêté, la température du mélange a été élevée à 85-95°C préalablement à l'addition du brome (22 ml, 68.6 g, 429.4 mmol, 2.5 eq) dans l'ampoule à additionner. Le mélange a été irradié sous une lampe halogène de 300 watts de puissance et le brome a été additionné aussi rapidement qu'il réagissait avec le chlorure d'acide (3 heures). Après l'addition complète du brome, le milieu réactionnel a été maintenu à une température de 85-95°C pendant une heure pour ensuite être refroidi jusqu'à température pièce. Le mélange a été versé avec extrême précaution dans un ballon de 250 ml contenant 125 ml de méthanol refroidi préalablement à 0°C. Sous agitation magnétique vigoureuse, le mélange a été ensuite refroidi à -78°C à l'aide d'un bain d'acétone-glace sèche. Après le premier jour d'agitation à -78°C, le mélange a été filtré à froid pour recueillir les cristaux jaunâtres. Cette manipulation a été répétée 7 fois sur une période de 7 jours. Les cristaux ont été recristallisés dans le méthanol pour générer le dibromo **11** sous forme d'un solide blanc (19.9 g, 35%). Formule brute: C₈H₁₂Br₂O₄. Masse molaire: 331.99 g/mol. P_f: 64-66°C (litt.¹⁵⁴ 65-66°C). R_f : 0.74 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.27-4.18 (m, 2H, **2** et **5**), 3.76 (s, 6H, **7** et **8**), 2.32-1.99 (m, 4H, **3** et **4**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 169.9 (**1** et **6**), 53.4 (**7** et **8**), 44.5 (**2** et **5**), 32.7 (**3** et **4**). IR (NaCl): 2975 (élongations C-H aliphatiques), 1742 (élongations C=O), 1237 1438 et 1213 (élongations C-O).

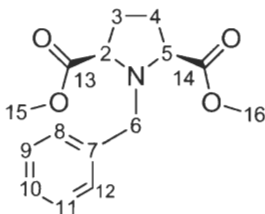
5.3.1.2 Diéthyl 2,5-dibromohexanedioate (**12**)



12

Afin de générer le composé **12**, le méthanol a été remplacé par de l'éthanol 95% dans le mode opératoire **5.3.1**. Ensuite les cristaux jaunâtres ont été recueillis par filtration à froid pendant une période de 7 jours et ils ont été recristallisés dans l'éthanol pour générer le dibromo **12** sous forme d'un solide blanc (24.8 g, 40%). Formule brute: C₁₀H₁₆Br₂O₄. Masse molaire: 360.04 g/mol. P_f: 64-66°C (litt.¹⁵⁴ : 65-66°C). R_f: 0.36 (Hexanes:AcOEt, 75:25). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.25-4.17 (m, 2H, **2**, **5**, **7** et **8**), 2.30-2.00 (m, 4H, **3** et **4**), 1.27 (s, 6H, *J* = 7.2 Hz, **9** et **10**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 169.4 (**1** et **6**), 62.5 (**7** et **8**), 44.9 (**2** et **5**), 32.6 (**3** et **4**), 14.1 (**9** et **10**). IR (NaCl): 2977 (élongations C-H aliphatiques), 1730 (élongations C=O), 1480 et 1268 (élongations C-O).

5.3.1.3 *Cis*-diméthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate¹⁵⁴ (*cis*-**13**)

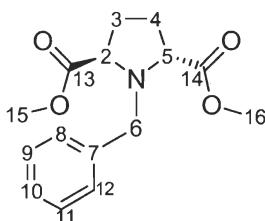


cis-**13**

Dans un ballon tricol de 250 ml surmonté d'un réfrigérant et d'une ampoule à additionner, le dibromo **12** (5.05 g, 15.2 mmol, 1.0 eq) a été ajouté sous un courant d'argon continu ainsi que 50 ml de benzène anhydre. Le mélange réactionnel a été chauffé à reflux sous agitation magnétique. Ensuite, l'apport de chaleur a été diminué afin d'ajouter la benzylamine (5.70 g, 53.2 mmol, 3.5 eq) goutte à goutte pour maintenir le reflux. Lorsque l'addition a été complétée, le mélange réactionnel a été chauffé à reflux durant toute une nuit. La température du mélange a été ramenée à 25°C avant d'être abaissée en dessous de 0°C. Ainsi, le mélange a pu être filtré à froid sur buchner afin d'éliminer le maximum de

sel d'hydrobromure de benzylamine. Le sel a été lavé avec 150 ml d'éther diéthylique et le filtrat a été concentré sous pression réduite. L'huile brute a été purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (80:20) pour générer le composé *cis*-**13** (3.04 g, 72%) et le composé *trans*-**13** (684 mg, 16%)(voir 5.3.1.4). Les deux composés ont été obtenus sous forme d'huiles. Formule brute: C₁₅H₁₉NO₄. Masse molaire: 277.32 g/mol. $R_{f\text{cis}}$: 0.32 (Hexanes:AcOEt, 70:30). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7.30-7.18 (m, 5H, **8**, **9**, **10**, **11** et **12**), 3.90 (s, 2H, **6**), 3.54 (s, 6H, **15** et **16**), 3.48-3.37 (m, 2H, **2** et **5**), 2.06-2.01 (m, 4H, **3** et **4**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 174.4 (**13** et **14**), 137.1 (**7**), 129.8 (**8** et **12**), 128.3 (**9** et **11**), 127.5 (**10**), 65.6 (**2** et **5**), 57.9 (**6**), 52.0 (**15** et **16**), 28.8 (**3** et **4**). IR (NaCl): 3028 (élongations C-H aromatiques), 2836 (élongations C-H aliphatiques), 1748 (élongations C=O), 1454 (élongations C-C aromatiques), 1281 (élongations C-N), 1177 (élongations C-O), 917 et 700 (déformations C-H hors plan).

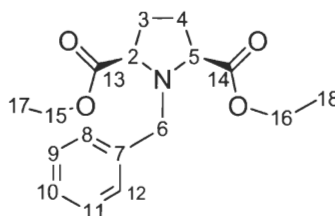
5.3.1.4 *Trans*-diméthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate¹⁵⁴ (*trans*-**13**)



trans-**13**

(voir 5.3.1.3 pour mode opératoire) Formule brute: C₁₅H₁₉NO₄. Masse molaire: 277.32 g/mol. $R_{f\text{trans}}$: 0.39 (Hexanes:AcOEt, 70:30). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7.33-7.21 (m, 5H, **8**, **9**, **10**, **11** et **12**), 4.06 (d, 1H, $J=13.0$ Hz, **6**), 3.85-3.82 (m, 2H, **2** et **5**), 3.70 (d, 1H, $J=13.0$ Hz, **6**), 3.64 (s, 6H, **15** et **16**), 2.37-2.26 et 1.97-1.89 (m, 4H, **3** et **4**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 174.8 (**13** et **14**), 138.9 (**7**), 129.2 (**8** et **12**), 128.5 (**9** et **11**), 127.5 (**10**), 63.6 (**2** et **5**), 54.3 (**6**), 51.8 (**15** et **16**), 28.6 (**3** et **4**). IR (NaCl): 3028 (élongations C-H aromatiques), 2837 (élongations C-H aliphatiques), 1742 (élongations C=O), 1436 (élongations C-C aromatiques), 1281 (élongations C-N), 1177 (élongations C-O), 917 et 700 (déformations C-H hors plan).

5.3.1.5 *Cis*-diéthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate¹⁶² (*cis*-14)

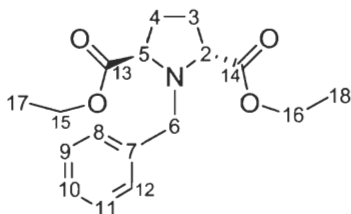


cis-14

(Voir mode opératoire 5.3.1.3)

Le diméthyl 2,5-dibromo-adipate **11** a été remplacé par le diéthyl 2,5-dibromo-adipate **12**. Le résidu résultant de la réaction a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (80:20) pour générer le composé *cis*-**14** (3.49 g, 82%) et le composé *trans*-**14** (voir 5.3.5) (511 mg, 12%). Les deux composés ont été obtenus sous forme d'huile jaunâtre. Formule brute : C₁₇H₂₃NO₄. Masse molaire : 305.37 g/mol. Rf_{cis} : 0.53 (Hexanes:AcOEt, 75:25). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7.31-7.18 (m, 5H, **8**, **9**, **10**, **11** et **12**), 4.02-3.94 (m, 4H, **15** et **16**), 3.90 (s, 2H, **6**), 3.42-3.35 (m, 2H, **2** et **5**), 2.06-2.00 (m, 4H, **3** et **4**), 1.15 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz, **17** et **18**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 173.6 (**13** et **14**), 138.0 (**7**), 129.7 (**8** et **12**), 128.2 (**9** et **11**), 127.4 (**10**), 65.8 (**2** et **5**), 60.8 (**6**), 58.0 (**15** et **16**), 28.9 (**3** et **4**), 14.3 (**17** et **18**). IR (NaCl): 3031 (élongations C-H aromatiques), 2981 (élongations C-H aliphatiques), 1747 (élongations C=O), 1455 (élongations C-C aromatiques), 1273 (élongations C-N), 1182 (élongations C-O), 905 et 701 (déformations C-H hors plan).

5.3.1.6 *Trans*-diéthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate¹⁶² (*trans*-14)

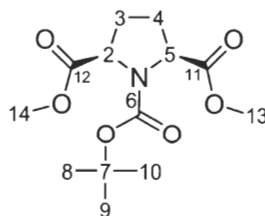


trans-14

(voir 5.3.1.5 pour mode opératoire). Formule brute : C₁₇H₂₃NO₄. Masse molaire : 305.37 g/mol. Rf_{trans} : 0.43 (Hexanes:AcOEt, 75:25). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7.31-7.18 (m, 5H, **8**, **9**, **10**, **11** et **12**), 4.02-3.94 (m, 4H, **15** et **16**), 3.90 (s, 2H, **6**), 3.42-3.35 (m, 2H, **2** et **5**), 2.06-2.00 (m, 4H, **3** et **4**). 1.15 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz, **17** et **18**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 173.5 (**13** et

14), 138.6 (7), 129.2 (8 et 12), 128.0 (9 et 11), 127.8 (10), 63.5 (2 et 5), 60.7 (6), 54.6 (15 et 16), 28.8 (3 et 4), 14.6 (17 et 18). IR (NaCl): 3037 (élongations C-H aromatiques), 2983 (élongations C-H aliphatiques), 1730 (élongations C=O), 1438 (élongations C-C aromatiques), 1213 (élongations C-N), 1140 (élongations C-O), 900 et 696 (déformations C-H hors plan).

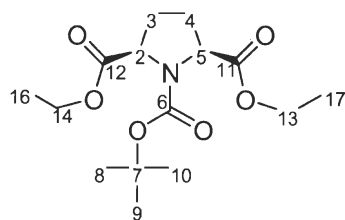
5.3.1.7 *Cis*-1-*tert*-butyl 2,5-diméthyl pyrrolidine-1,2,5-tricarboxylate (*cis*-15)



cis-15

Le diester *cis*-13 (3.16 g, 11.4 mmol, 1.0 eq) et l'anhydride de *tert*-butoxycarbonyle (2.73 g, 12.5 mmol, 1.1 eq) ont été dissous dans 30 ml de méthanol préalablement versé dans un récipient à hydrogénation. Sous un courant continu d'azote, le catalyseur Pd(OH)₂/C 20% wt. (54 mg) a été ajouté avec précaution. Le système a été placé sous pression réduite et purgé avec de l'hydrogène gazeux à deux reprises. L'hydrogénation s'est déroulée sous une pression de 54 psi d'hydrogène et l'avancement de la réaction a été suivi par CCM ($R_{f\text{cis-13}}$: 0.32, $R_{f\text{cis-15}}$: 0.19, éluant 70% Hexanes/30% AcOEt) jusqu'à disparition complète du composé *cis*-13. Après 24 heures, le mélange a été repris avec 75 ml d'AcOEt et lavé avec 3 portions d'acide chlorhydrique 1N (3 x 75 ml), 3 portions de NaHCO₃ (3 x 75 ml) et une portion de saumure (1 x 75 ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. L'huile brute a été purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (70:30) pour générer le diester méthylique *cis*-15 sous forme d'huile translucide (3.25 g, quantitatif). Formule brute: C₁₃H₂₁NO₆. Masse molaire: 287.31 g/mol. P_f: 67-70°C. R_f : 0.19 (Hexanes:AcOEt, 70:30). RMN ¹H ¹⁵⁸ (CDCl₃) δ: 4.38-4.23 (m, 2H, 2 et 5), 3.71 (s, 6H, 13 et 14), 2.21-2.05 (m, 4H, 3 et 4), 1.37 (s, 9H, 8, 9 et 10). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 172.8 et 172.3 (11 et 12), 153.9 (6), 81.0 (7), 60.2 et 59.7 (13 et 14), 52.4 et 52.3 (2 et 5), 29.7 et 29.0 (3 et 4), 28.4 (8, 9 et 10). IR (NaCl): 2983 (élongations C-H aliphatiques), 1748 et 1687 (élongations C=O), 1365 (élongations C-O), 1158 (élongations C-N).

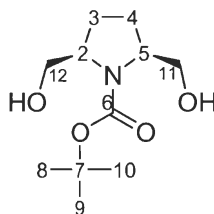
5.3.1.8 Cis-1-tert-butyl 2,5-diméthyl pyrrolidine-1,2,5-tricarboxylate (cis-16)



cis-16

(voir 5.3.1.7 pour mode opératoire) Le diester méthylique *cis-13* a été remplacé par le diester éthylique *cis-14*. Formule brute : C₁₅H₂₅NO₆. Masse molaire : 315.36 g/mol. R_f: 0.33 (Hexanes:AcOEt, 70:30). RMN ¹H ¹⁵⁸ (CDCl₃) δ: 4.34-4.18 (m, 2H, **2** et **5**), 4.17-4.08 (m, 4H, **13** et **14**), 2.19-2.02 (m, 4H, **3** et **4**), 1.37 (s, 9H, **8**, **9** et **10**), 1.34-1.17 (m, 6H, **16** et **17**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 172.1 et 171.9 (**11** et **12**), 153.7 (**6**), 80.8 (**7**), 61.1 et 61.0 (**13** et **14**), 60.3 et 60.0 (**2** et **5**), 29.8 et 28.9 (**3** et **4**), 28.4 (**8**, **9** et **10**), 14.4 et 14.3 (**16** et **17**). IR (NaCl): 2981 (élongations C-H aliphatiques), 1764 et 1700 (élongations C=O), 1352 (élongations C-O), 1036 (élongations C-N).

5.3.1.9 Cis-tert-butyl 2,5-bis(hydroxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate²⁶⁰ (cis-17)

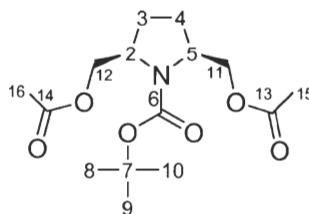


cis-17

Dans un ballon de 250 ml préalablement séché à la flamme, ont été déposés sous un courant d'azote continu 718 mg de LiAlH₄ (18.9 mmol, 2.0 eq) et 100 ml de THF fraîchement distillé. La suspension a été amenée à 0°C avec un bain de glace. Le diester **16** (3 g, 9.45 mmol, 1 eq) a été dissous dans 100 ml de THF fraîchement distillé et cette solution a été canulée à la suspension de LiAlH₄ à 0°C. La réaction a été agitée magnétiquement durant 20 heures. L'arrêt de la réaction s'est effectué par l'ajout de 75 ml de NH₄Cl_{sat.} et l'ajout de 100ml AcOEt. La phase organique a été lavée avec 3 portions de HCl 3N (3 x 100ml) et une portion de saumure (1 x 100ml), séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (30:70) pour fournir le diol *cis-17* sous

forme d'huile translucide (1.84 g, 84%). Formule brute: $C_{11}H_{21}NO_4$. Masse molaire: 231.29 g/mol. R_f : 0.58 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN 1H ($CDCl_3$) δ : 4.02-3.70 (m, 4H, **11** et **12**), 3.86 (s, 2H, **OH**), 3.52-3.48 (m, 2H, **2** et **5**), 2.00-1.72 (m, 4H, **3** et **4**), 1.45 (s, 9H, **8**, **9** et **10**). RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 156.6 (**6**), 80.9 (**7**), 66.4 (**12**), 63.6 (**11**), 60.8 (**2** et **5**), 28.7 (**8**, **9** et **10**), 27.1 (**3** et **4**). IR (NaCl): 3397 (élongations O-H), 2970 (élongations C-H aliphatiques), 1657 (élongations C=O), 1396 (élongations C-O), 1043 (élongations C-N).

5.3.1.10 *Cis-tert*-butyl 2,5-bis(acétoxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate (*cis*-18)



cis-18

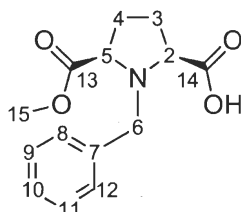
Le diol **17** (400 mg, 1.74 mmol, 1.0 eq) a été dissous avec 15 ml de CH_2Cl_2 anhydre dans un ballon muni d'un septum qui a été préalablement chauffé sous courant continu d'argon sec et agitation magnétique. Le ballon a été par la suite refroidi à 0-5°C à l'aide d'un bain eau-glace sous atmosphère inerte. Un volume 266 μ l de Et_3N anhydre (1.9 mmol, 1.1 eq) a été ajouté avant d'enlever le courant d'argon sec. Le chlorure d'acétate (248 μ l, 1.74 mmol, 1.0 eq) a été finalement ajouté lentement. Le milieu réactionnel a été ramené à température pièce et l'avancement de la réaction a été suivi par CCM (R_{f18} : 0.79, 0.59, R_{f17} : 0.27, éluant 50% Hexanes/50% AcOEt) jusqu'à disparition du diol **17**. Après une période de deux heures, la réaction a été arrêtée en lavant la phase organique avec trois portions d'eau déminéralisée avant d'être séchée sur $MgSO_4$, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit résiduel a été purifié par chromatographie éclair en employant un mélange composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle en proportion équivalente (50:50), pour générer le diacétate **18** sous forme d'huile translucide (480 mg, 87%). Formule brute: $C_{15}H_{25}NO_6$. Masse molaire: 317.36 g/mol. R_f : 0.80 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN 1H ($CDCl_3$) δ : 4.19-3.96 (m, 6H, **2**, **5**, **11** et **12**), 2.06 (s, 6H, **15** et **16**), 2.03-1.74 (m, 4H, **3** et **4**), 1.45 (s, 9H, **8**, **9** et **10**). RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 171.1 (**13** et **14**), 154.7 (**6**), 80.4 (**7**), 65.1 (**11** et **12**),

56.9 (**2** et **5**), 28.6 (**8**, **9** et **10**), 27.7 (**3**), 26.8 (**4**), 21.1 (**15** et **16**). IR (NaCl): 2916 (élongations C-H aliphatiques), 1742 et 1657 (élongations C=O), 1359 (élongations C-O), 1036 (élongations C-N). HRMS (IE) : $[M+H]^+$ 316.1760, expérimental 316.1765.

5.3.2 Désymétrisation du *cis*-diméthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate

5.3.2.1 L'acide 2-carboxylique (2*S*,5*R*)-1-benzyl-5-(méthoxycarbonyl) pyrrolidine¹⁷¹

(+)-(2*S*,5*R*)-19



(+)-(2*S*,5*R*)-19

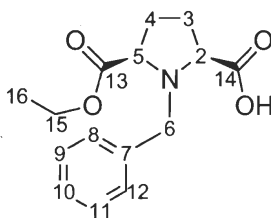
Dans un ballon de 25 ml, le diester **13** (500 mg, 1.8 mmol) a été émulsifié dans 10 ml de tampon tris-HCl 0.25M par agitation magnétique vigoureuse. La réaction a été démarrée par l'ajout de 50 mg de l'esterase de foie de porc (PLE) et le pH a été maintenu à 7.5 par l'ajout de NaOH 1N tout au long de la réaction. L'avancement de la réaction a été suivi par CCM (Rf_{13} : 0.91, $Rf_{(+)-19}$: 0.33-0.00, éluant 90% AcOEt/10% MeOH). Après une période de 24 heures la réaction a été arrêtée par l'extraction de l'acide avec du CH_2Cl_2 (3 x 75 ml). La phase organique a alors été séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis concentrée sous pression réduite. L'huile brute a été purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice (AcOEt:MeOH, 90:10) pour générer le monoacide (2*S*,5*R*)-**19** sous forme de solide jaune (341 mg, 72%). Formule brute: $C_{14}H_{17}NO_4$. Masse molaire: 263.29 g/mol. P_f: 63-64°C (litt.¹⁷¹ : 67-68°C). $[\alpha]_D^{22} = +13.5^\circ$ (C = 0.65, $CHCl_3$). ee: 82% (litt.¹⁷¹: $[\alpha]_D^{21} = +16.6^\circ$, ee: 99%). RMN ¹H ($CDCl_3$) δ : 7.31-7.21 (m, 5H, **8**, **9**, **10**, **11** et **12**), 3.85 (s, 2H, **6**), 3.68-3.63 (m, 2H, **2** et **5**), 3.59 (s, 3H, **15**), 2.25-2.03 (m, 3H, **3** et **4**), 1.86-1.76 (m, 1H, **4**). RMN ¹³C ($CDCl_3$) δ : 175.2 (**14**), 175.1 (**13**), 136.2 (**7**), 129.5 (**8** et **12**), 129.0 (**9** et **11**), 128.4 (**10**), 66.8 (**2**), 66.5 (**5**), 59.1 (**6**), 52.8 (**15**), 30.7 (**3**), 30.5 (**4**). IR (NaCl): 3445 (élongations O-H), 3032 (élongations C-H aromatiques), 2953 (élongations C-H aliphatiques), 1740 et 1638 (élongations C=O), 1450 (élongations C-C aromatiques), 1220 (élongations C-N), 1171 (élongations C-O), 750 et 704 (déformations C-H hors plan).

La détermination de l'excès énantiomérique s'est effectuée par l'analyse RMN ^1H de l'amide **21** suivant le procédé ci-dessous.

Dans un ballon de 10 ml, le monoacide (2*S*,5*R*)-**19** (15 mg, 0.06 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans 2 ml de CH_2Cl_2 anhydre sous un courant d'azote continu. Une quantité catalytique de DMAP (2 mg, 0.02 mmol) et d'agent de couplage EDC.HCl (15 mg, 0.08 mmol, 1.25 eq) ont été ajoutés au milieu réactionnel qui a été laissé sous agitation magnétique pendant 30 minutes. La (*R*)-phényléthylamine (8 mg, 0.07 mmol, 1.25 eq) a alors été ajoutée et l'avancement de la réaction a été suivi par CCM (R_{f21} : 0.53, $R_{f(+)-19}$: 0.17-0.00, éluant 90% AcOEt/10% MeOH) jusqu'à disparition complète du monoacide (+)-**19**. Le mélange a été repris avec 20 ml d'acétate d'éthyle et lavé avec 3 portions d'acide chlorhydrique 3N (3 x 20 ml), une portion de NaHCO_3 (1 x 20 ml) et une portion de saumure (1 x 20 ml). La phase organique a ensuite été séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous pression réduite pour générer l'amide **21**. L'excès énantiomère a été mesuré à partir des doublets du groupement méthyle situé en position alpha de l'azote et à partir des singulets de l'ester méthylique. (*S, R, R*)-**21**: RMN ^1H (CDCl_3) δ : 3.50 (s, 0.45H), 3.47 (s, 2.55H), 1.40 (d, 0.45H, $J = 6.6$ Hz), 1.29 (d, 2.55H, $J = 6.6$ Hz). *rac*-**21**: RMN ^1H (CDCl_3) δ : 3.50 (s, 1.5H), 3.47 (s, 1.5H), 1.40 (d, 1.5H, $J = 6.6$ Hz), 1.29 (d, 1.5H, $J = 6.6$ Hz).

5.3.3 Désymétrisation du *cis*-diéthyl 1-benzylpyrrolidine-2,5-dicarboxylate

5.3.3.1 L'acide 2-carboxylique (2*S*,5*R*)-1-benzyl-5-(éthoxycarbonyl) pyrrolidine ((+)-*(2S,5R)*-20)



(+)-*(2S,5R)*-20

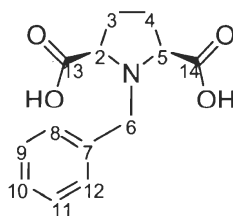
Dans un ballon de 25 ml, le diester **14** (500 mg, 1.64 mmol) a été émulsifié dans 10 ml d'eau déminéralisée par agitation magnétique vigoureuse. La réaction a été démarrée par l'ajout de 50 mg de la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B) et le pH a été maintenu à 7.5 par l'ajout de NaOH 1N tout au long de la réaction. L'avancement de la réaction a été suivi par CCM (R_{f14} : 0.90, $R_{f(+)-20}$: 0.33, éluant 90% AcOEt/10% MeOH). Après une période de 28 heures la réaction a été arrêtée par l'extraction de l'acide avec du CH₂Cl₂ (3 x 75 ml). La phase organique a alors été séchée sur MgSO₄, filtrée puis concentrée sous pression réduite. L'huile brute a été purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice (AcOEt:MeOH, 90:10) pour générer le monoacide (+)-*(2S,5R)*-**20** sous forme de solide jaunâtre (302 mg, 67%). Formule brute: C₁₅H₁₉NO₄. Masse molaire: 277.32 g/mol. P_f: 66-69°C. CAL-B: $[\alpha]_D^{22} = +18.3^\circ$ (C = 1.25, CHCl₃), ee :99%. PLE: $[\alpha]_D^{22} = +8.9^\circ$ (C = 1.0, CHCl₃), ee: 50%. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7.31-7.23 (m, 5H, **8**, **9**, **10**, **11** et **12**), 4.05 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, **15**), 3.89 (dd, 2H, $J = 15.8, 13.0$ Hz, **6**), 3.69-3.63 (m, 2H, **2** et **5**), 2.26-2.08 (m, 3H, **3** et **4**), 1.86-1.78 (m, 1H, **4**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 175.1 (**14**), 174.6 (**13**), 136.3 (**7**), 129.5 (**8** et **12**), 129.0 (**9** et **11**), 128.4 (**10**), 67.0 (**2**), 66.7 (**5**), 61.9 (**15**), 59.2 (**6**), 30.8 (**3**), 30.5 (**4**), 14.3 (**15**). IR (NaCl): 3510 (élongations O-H), 3051 (élongations C-H aromatiques), 2981 (élongations C-H aliphatiques), 1740 et 1643 (élongations C=O), 1455 (élongations C-C aromatiques), 1240 (élongations C-N), 1181 (élongations C-O), 906 et 700 (déformations C-H hors plan). HRMS (IE) : $[M + H]^+$ 278.1392, expérimental 278.1386.

La détermination de l'excès énantiomère s'est effectuée par l'analyse RMN ¹H de l'amide **22** préalablement préparé. (voir 5.3.2.1 pour mode opératoire).

La réaction a été suivie par CCM (R_{f22} : 0.65, $R_{f(+)-20}$: 0.17-0.00, éluant 90% AcOEt/10% MeOH) jusqu'à disparition complète du monoacide (+)-**20**. L'excès énantiomère a été mesuré à partir des doublets du groupement méthyle situé en position alpha de l'amide. (*S*, *R*, *R*)-**22**: RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1.40 (d, 0.01H, $J = 7.0$ Hz), 1.29 (d, 2.98H, $J = 7.0$ Hz). *rac*-**22**: RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1.40 (d, 1.5H, $J = 7.0$ Hz), 1.29 (d, 1.5H, $J = 7.0$ Hz).

5.3.4 Synthèse des monoacides racémiques *N*-Bn (\pm)-*cis*-**19** et (\pm)-*cis*-**20**

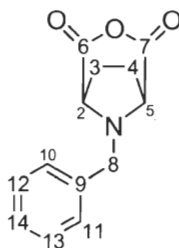
5.3.4.1 L'acide *cis*-2,5-dicarboxylique 1-benzylpyrrolidine¹⁵⁷ (*cis*-**23**)



cis-**23**

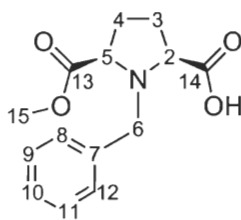
Dans un ballon de 100 ml, le diester **13** (1.0 g, 3.61 mmol) a été émulsifié dans 30 ml d'acide chlorhydrique concentré. Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation pendant 3 heures, pour ensuite être évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu a été trituré à l'aide d'un mélange d'acétone et d'éther diéthylique. Le solide a ensuite été recristallisé avec 30 ml d'éthanol et 20 ml d'eau déminéralisée pour générer le diacide *cis*-**23** sous forme d'un solide blanc (626 mg, 70%). Formule brute: $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_4$. Masse molaire: 249.26 g/mol. P_f : 252-254°C (litt.¹⁵⁷ : 254-258°C). R_f : 0.01 (AcOEt:MeOH, 90:10). RMN ^1H (CD_3OD) δ : 7.29-7.21 (m, 5H, **8**, **9**, **10**, **11** et **12**), 3.86 (s, 2H, **6**), 3.50-3.47 (m, 2H, **2** et **5**), 2.09-1.73 (m, 4H, **3** et **4**). RMN ^{13}C (CD_3OD) δ : 175.5 (**13** et **15**), 136.3 (**7**), 129.9 (**8** et **12**), 128.9 (**9** et **11**), 128.1 (**10**), 67.1 (**2** et **5**), 57.9 (**6**), 29.8 (**3** et **4**). IR (NaCl): 3482 (élongations O-H), 3013 (élongations C-H aromatiques), 2855 (élongations C-H aliphatiques), 1730 (élongations C=O), 1451 (élongations C-C aromatiques), 1273 (élongations C-N), 1181 (élongations C-O).

5.3.4.2 8-Benzyl-3-oxa-8-aza-bicyclo[3.2.1]octane-2,4-dione¹⁵⁷ (**24**)

**24**

Le diacide **23** (616 mg, 2.66 mmol) a été dissous dans 35 ml d'anhydride acétique sous agitation magnétique. Le mélange réactionnel a été chauffé à reflux (~100°C) jusqu'à ce que tout le diacide soit dissous et que la couleur du mélange soit devenue brune foncée (10-30 min). L'anhydride acétique a ensuite été coévaporé avec de l'hexane sous pression réduite. Le résidu obtenu a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (Hexanes:AcOEt, 75:25) pour générer l'anhydride **24** sous forme d'un solide blanc (510 mg, 86%). Formule brute: C₁₁H₁₅NO₅. Masse molaire: 231.25 g/mol. P_f: 235-240°C déc. R_f: 0.34 (Hexanes:AcOEt, 75:25). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7.35-7.23 (m, 5H, **10**, **11**, **12**, **13** et **14**), 3.89-3.86 (m, 2H, **2** et **5**), 3.77 (s, 2H, **8**), 2.39-2.31 et 2.04-1.99 (m, 4H, **3** et **4**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 167.8 (**6** et **7**), 136.1 (**9**), 129.0 (**10** et **11**), 128.9 (**12** et **13**), 128.4 (**14**), 61.3 (**2** et **5**), 54.1 (**8**), 26.4 (**3** et **4**). IR (NaCl): 3018 (élongations C-H aromatiques), 2910 (élongations C-H aliphatiques), 1608 (élongations C=O), 1432 (élongations C-C aromatiques), 1174 (élongations C-N), 1030 (élongations C-O).

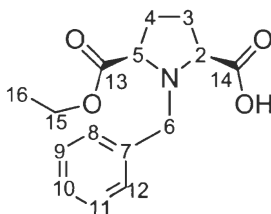
5.3.4.3 L'acide *cis*-2-carboxylique 1-benzyl-5-(méthoxycarbonyl) pyrrolidine ((±)-*cis*-**19**)

((±)-*cis*-**19**)

L'anhydride **24** (200 mg, 0.85 mmol) a été dissous dans 30 ml de méthanol anhydre et laissé sous agitation magnétique pendant 4 jours. Ensuite l'alcool a été évaporé sous

pression réduite pour générer le monoacide (\pm)-*cis*-**19** sous forme d'un solide jaunâtre (190 mg, 85%). Formule brute: C₁₄H₁₇NO₄. Masse molaire: 263.29 g/mol. P_f: 63-64°C (litt.¹⁷¹ : 67-68°C). R_f : 0.00-0.33 (AcOEt:MeOH, 90:10). RMN ¹H (CDCl₃) δ : voir **5.3.2.1**. RMN ¹³C (CDCl₃) δ : voir **5.3.2.1**. IR (NaCl): voir **5.3.2.1**.

5.3.4.4 L'acide *cis*-2-carboxylique 1-benzyl-5-(éthoxycarbonyl) pyrrolidine ((\pm)-*cis*-20)

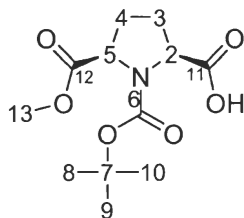


(\pm)-*cis*-**20**

L'anhydride **24** (200 mg, 0.85 mmol) a été dissous dans 30 ml de éthanol anhydre et laissé sous agitation magnétique pendant 4 jours. Ensuite l'alcool a été évaporé sous pression réduite pour générer le monoacide (\pm)-**20** sous forme d'un solide jaunâtre (193 mg, 82 %). Formule brute: C₁₅H₁₉NO₄. Masse molaire: 277.32 g/mol. P_f: 66-69°C. R_f: 0.33 (AcOEt : MeOH, 90 : 10). RMN ¹H (CDCl₃) δ : voir **5.3.3.1**. RMN ¹³C (CDCl₃) δ : voir **5.3.3.1**. IR (NaCl): voir **5.3.3.1**.

5.3.5 Désymétrisation du *cis*-1-*tert*-butyl 2,5-diméthyl et diéthyl pyrrolidine-1,2,5-tricarboxylate

5.3.5.1 L'acide (2*S*,5*R*)-2-carboxylique 1-(*tert*-butoxy)-5-(méthoxycarbonyl) pyrrolidine ((2*S*,5*R*)-(+)-25)



(+)-(2*S*,5*R*)-**25**

Dans un vial de 2 ml, le diester **15** (103 mg, 0.37 mmol) a été émulsifié dans 10 ml d'eau déminéralisée par agitation magnétique vigoureuse. La réaction a été démarrée par l'ajout

de 30 mg de l'estérase de foie de porc (PLE) et le pH a été maintenu à 7.5 par l'ajout de NaOH 1N tout au long de la réaction. L'avancement de la réaction a été suivi par CCM (R_{f15} : 0.80, $R_{f(+)-25}$: 0.26, éluant 90% AcOEt/10% MeOH). Puisque la réaction n'évolue plus après une période de 48 heures, elle a été arrêtée par l'extraction de l'acide avec du CH_2Cl_2 (3 x 75 ml). La phase organique a alors été séchée sur MgSO_4 , filtrée puis concentrée sous pression réduite. L'huile brute a été purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice (AcOEt:MeOH, 90:10) pour générer le monoacide (2*S*,5*R*)-**25** sous forme d'huile translucide (76 mg, 75%). Formule brute : $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_6$. Masse molaire : 273.28 g/mol. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +12.2^\circ$ (C = 2.0, MeOH). ee : 99%. R_f : 0.26 (AcOEt:MeOH, 90:10). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 4.87 (s, 1H, OH), 4.37-4.23 (m, 2H, **2** et **5**), 3.72 (s, 3H, **13**), 2.30-1.98 (m, 4H, **3** et **4**), 1.40 (s, 9H, **8**, **9** et **10**). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 177.9 (**11**), 172.7 (**12**), 153.2 (**6**), 82.7 (**7**), 61.5 (**13**), 59.9 (**2**), 54.0 (**5**), 30.0 (**3**), 29.2 (**4**), 28.3 et 28.2 (**8**, **9** et **10**). IR (NaCl): 3408 (élongations O-H), 2983 (élongations C-H aliphatiques), 1705 (élongations C=O), 1389 (élongations C-N), 1140 (élongations C-O). LRMS (ESI) : 296.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Le diester **16** a été désymétrisé selon la même procédure (voir **5.3.17**).

Analyse HPLC-chirale

A) Méthode expérimentale

Injecteur : automatique

Colonne : Chiracel OD-H

Détecteur : UV / visible

Longueur d'onde : 205 nm

Phase mobile : Hexane / Isopropanol = 90 / 10 + 0.4% TFA

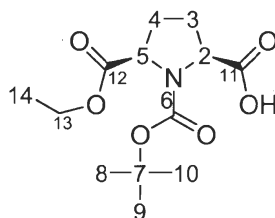
Débit : 0.8 ml/min

B) Résultats expérimentaux

Temps de rétention des énantiomères 2*S*,5*R* ($t_{r(2S,5R)}$) et 2*R*,5*S* ($t_{r(2R,5S)}$) aires sous la courbes respectives ($A_{(2S,5R)}$ et $A_{(2R,5S)}$), rendements et excès énantiomères mesurés (ee) pour l'analyse en chromatographie liquide à haute performance en phase chirale des mélanges racémiques (\pm)-**25** et (\pm)-**26** et des monoacides (+)-**25** et (+)-**26**.

composé et lipase	$t_{r(2S,5R)}$ (min)	$A_{(2S,5R)}$	$t_{r(2R,5S)}$ (min)	$A_{(2R,5S)}$	ee (%)
(\pm)- 25	10.2	3829	11.3	3816	0
(\pm)- 26	9.4	1302	10.2	1308	0
PLE					
(+)- 25	10.2	2148	11.3	0.01	>99
PLE					
(+)- 26	9.4	6471	10.2	0.01	>99
CAL-B					
(+)- 25	10.1	2057	11.2	0.01	>99
CAL-B					
(+)- 26	9.3	4783	10.3	0.01	>99

5.3.5.2 L'acide (2*S*,5*R*)-2-carboxylique 1-(*tert*-butoxy)-5-(éthoxycarbonyl) pyrrolidine ((+)-**26**)

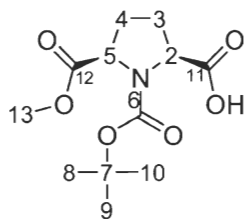


(+)-(2*S*,5*R*)-**26**

(Voir mode opératoire **5.3.5.1**) Rendement : 75%. Formule brute: C₁₃H₂₁NO₆. Masse molaire: 287.31 g/mol. Aspect : huile translucide. $[\alpha]_D^{22} = +16.0^\circ$ (C = 1.65, CHCl₃). ee: 99%. R_f: 0.33 (AcOEt:MeOH, 90:10). RMN ¹H (CDCl₃) δ : 4.53-4.51 et 4.35-4.31 (m, 2H, **2** et **5**), 4.41 (s, 1H, OH), 4.29-4.24 (m, 2H, **13**), 2.40-1.97 (m, 4H, **3** et **4**), 1.40 et 1.38 (2 x s, 9H, **8**, **9** et **10**), 1.30-1.24 (m, 3H, **14**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 177.3 (**11**), 172.9 (**12**), 153.3 (**6**), 82.4 (**7**), 63.4 (**13**), 60.2 (**2**), 59.8 (**5**), 29.4 (**3**), 29.2 (**4**), 28.3 et 28.2 (**8**, **9** et **10**), 14.1 (**14**). IR (NaCl): 3196 (élongations O-H), 2935 (élongations C-H aliphatiques), 1766 et 1705 (élongations C=O), 1383 (élongations C-N), 1160 (élongations C-O). LRMS (ESI) : 310.1 [M+Na]⁺.

5.3.6 Synthèse des monoacides racémiques *N*-Boc (\pm)-*cis*-25 et (\pm)-*cis*-26

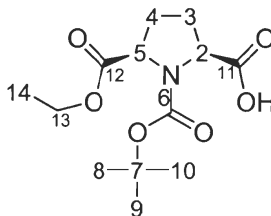
5.3.6.1 L'acide *cis*-2-carboxylique 1-(*tert*-butoxy)-5-(méthoxycarbonyl) pyrrolidine (*cis*-(\pm)-25)



(\pm)-*cis*-25

Le monoacide (\pm)-*cis*-19 (100 mg, 0.38 mmol, 1.0 eq) et l'anhydride de *tert*-butoxycarbonyle (84 mg, 0.42 mmol, 1.1 eq) ont été dissous dans 20 ml de méthanol préalablement versé dans un récipient à hydrogénation. Sous un courant continu d'azote, le catalyseur Pd(OH)₂/C 20% wt. (20 mg) a été ajouté avec précaution. Le système a été placé sous pression réduite et purgé avec de l'hydrogène gazeux à deux reprises. L'hydrogénation s'est déroulé sous une pression de 54 psi d'hydrogène et l'avancement de la réaction a été suivi par CCM ($R_{f(\pm)-19}$: 0.32, $R_{f(\pm)-25}$: 0.26, éluant 90% AcOEt/10% MeOH) jusqu'à disparition complète du composé (\pm)-*cis*-19. Après 24 heures, le mélange a été repris avec 50 ml d'AcOEt et lavé avec 3 portions d'acide chlorhydrique 1N (3 x 50 ml), 3 portions de NaHCO₃ (3 x 50 ml) et une portion de saumure (1 x 50 ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. L'huile brute a été purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'acétate d'éthyle et de méthanol (90:10) pour générer le monoacide (\pm)-*cis*-25 sous forme d'huile translucide (100 mg, quantitatif). Formule brute: C₁₂H₁₉NO₆. Masse molaire: 273.28 g/mol. R_f : 0.26 (AcOEt:MeOH, 90:10). RMN ¹H (CDCl₃) δ : voir 5.3.5.1. RMN ¹³C (CDCl₃) δ : voir 5.3.5.1. IR (NaCl): voir 5.3.5.1.

5.3.6.2 L'acide *cis*-2-carboxylique 1-(*tert*-butoxy)-5-(éthoxycarbonyl) pyrrolidine ((±)-*cis*-26)



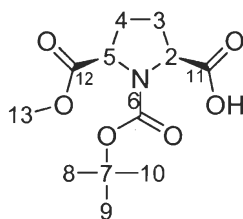
(±)-*cis*-26

(Voir mode opératoire 5.3.6.1) Rendement : quantitatif. Rf: 0.33 (AcOEt:MeOH, 90:10).

RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir 5.3.5.2 RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir 5.3.5.2. IR (NaCl): voir 5.3.5.2.

5.3.7 Détermination de la configuration absolue des acides ((+)-(2*S*,5*R*)-25 et ((+)-(2*S*,5*R*)-26)

5.3.7.1 L'acide (2*S*,5*R*)-2-carboxylique 1-(*tert*-butoxy)-5-(méthoxycarbonyl) pyrrolidine ((+)-(2*S*,5*R*)-25)

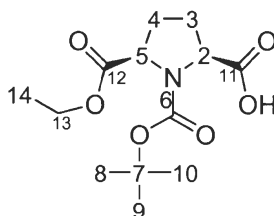


(+)-(2*S*,5*R*)-25

L'acide (+)-(2*S*,5*R*)-19 (112 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq) et l'anhydride de *tert*-butoxycarbonyle (93 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq) ont été dissous dans 15 ml d'éthanol préalablement versée dans un récipient à hydrogénation. Sous un courant continu d'azote, le catalyseur Pd(OH)₂/C 20% wt. (25 mg) a été ajouté avec précaution. Le système a été placé sous pression réduite et purgé avec de l'hydrogène gazeux à deux reprises. L'hydrogénation s'est déroulé sous une pression de 54 psi d'hydrogène jusqu'à disparition complète de l'acide (+)-(2*S*,5*R*)-19. Après 24 heures, le mélange a été repris avec 50 ml d'AcOEt et lavé avec 3 portions d'acide chlorhydrique 1N (3 x 20 ml), 3 portions de NaHCO₃ (3 x 20 ml) et une portion de saumure (1 x 20 ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite pour générer l'acide (+)-(2*S*,5*R*)-25 sous forme d'un solide blanc (117 mg, quantitatif). Formule brute: C₁₂H₁₉NO₆. Masse molaire: 273.28 g/mol. [α]_D²² = +11.24° (C

= 1.2, MeOH). ee: 82%. Rf: 0.26 (AcOEt:MeOH, 90:10). RMN ^1H (CDCl_3) δ : voir 5.3.5.1. RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : voir 5.3.5.1. IR (NaCl): voir 5.3.5.1.

5.3.7.2 L'acide (2*S*,5*R*)-2-carboxylique 1-(*tert*-butoxy)-5-(éthoxycarbonyl) pyrrolidine ((+)-26)

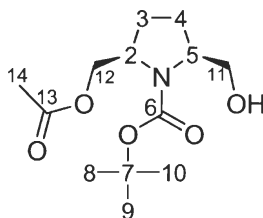


(+)-(2*S*,5*R*)-26

(Voir mode opératoire 5.3.7.1) L'acide (2*S*,5*R*)-19 a été remplacé par l'acide (2*S*,5*R*)-20. Rendement : quantitatif. Formule brute: $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_6$. Masse molaire: 287.31 g/mol. Aspect : solide blanc. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +15.8^\circ$ (C = 1.5, CHCl_3). Rf: 0.33 (AcOEt:MeOH, 90:10). RMN ^1H (CDCl_3) δ : voir 5.3.5.2 RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : voir 5.3.5.2. IR (NaCl): voir 5.3.5.2.

5.3.8 Désymétrisation du *tert*-butyl 2,5-bis(hydroxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate

5.3.8.1 (2*R*,5*S*)-*Tert*-butyl 2-(acétoxyméthyl)-5-(hydroxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate ((-)- 2*R*,5*S*)-27



(-)-(2*R*,5*S*)-27

Dans un ballon de 25 ml, le diol 17 (1.5 g, 6.49 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans 15 ml d'acétate de vinyle. Le mélange a été mis sous agitation magnétique et 250 mg de tamis moléculaire ainsi que 240 mg de lipase ont été ajoutés. L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie liquide à haute performance en phase chirale et il a permis d'arrêter la réaction après 36 heures par filtration et concentration du milieu réactionnel sous pression réduite. Le résidu brute (-)-27 a ensuite été soumis à l'oxydation. (voir 5.3.7.1). Formule brute: $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_5$. Masse molaire: 273.33 g/mol. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -10.8^\circ$ (C = 1.6, CHCl_3). $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -10.8^\circ$ (C = 1.6, CHCl_3). ee: 97%. Rf: 0.5 (Hexanes:AcOEt, 25 :75).

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 4.20-3.99 (m, 3H, **2** et **12**), 3.98-3.89 (m, 1H, **5**), 3.76-3.65 (m, 1H, **11**), 3.50-3.46 (m, 1H, **11**), 2.04 (s, 3H, **14**), 2.01-1.50 (m, 4H, **3** et **4**), 1.44 (s, 9H, **8**, **9** et **10**). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 171.1 (**13**), 154.6 (**6**), 81.2 (**7**), 67.5 (**12**), 65.3 (**11**), 61.7 (**2**), 57.7 (**5**), 28.6 (**8**, **9** et **10**), 27.2 (**4**), 27.0 (**3**), 21.1 (**14**). IR (NaCl): 3397 (élongations O-H), 2922 (élongations C-H aliphatiques), 1657 (élongations C=O), 1395 (élongations C-O), 1042 (élongations C-N). HRMS (IE) : $[\text{M} + \text{H}]^+$ 274.1654, expérimental 274.1649.

Pour ce qui des autres essais, des quantités de 100 mg de substrat et de 20 mg d'enzyme ont été utilisées dans 2 ml d'acétate de vinyle. L'arrêt des réactions s'est effectué par filtration de l'enzyme et l'évaporation de l'acétate de vinyle sous pression réduite. Les réactions ont été analysées par chromatographie liquide à haute performance en phase chirale afin d'évaluer l'excès énantiomère du monoacétate **27** obtenu avec chaque enzyme.

A) Méthode expérimentale

Injecteur : manuel
température : 225°C
solution d'injection : V = 1 μl , C = 10 mg/ml CH_2Cl_2

Colonne chirale : Astec ChiralDEX (β -DM 120)
dimension : 30 m x 0.25mm
température : 150°C
débit : 2.5 ml/min

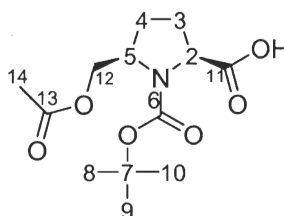
Détecteur : FID
température : 250°C

B) Résultats expérimentaux

Temps de rétention des énantiomères (*2S,5R*) $t_{r(2S,5R)}$ et (*2R,5S*) ($t_{r(2R,5S)}$), aires sous la courbes respectives ($A_{(2S,5R)}$ et $A_{(2R,5S)}$), taux de conversion, taux de mono/(di+mono) et excès énantiomères mesurés (ee_{27}) pour l'analyse en chromatographie gazeuse en phase chirale du mélange racémique (\pm)-**27** et du mono acétate **27**.

enzyme	$[\alpha]_D$	$t_{r(2S,5R)}$ (min)	$A_{(2S,5R)}$	$t_{r(2R,5S)}$ (min)	$A_{(2R,5S)}$	ee_{27} (%)	Taux de conversion (%)	mono/(diol+mono) (%)
(\pm)- 27		28.9	228.8	29.8	244.1	0	-	-
CAL-B	-	29.3	1.4	30.2	92.1	97	95	70
CRL	+	29.0	924.0	29.9	76.0	85	83	100
ROL	+	29.2	227.9	30.1	88.6	76	55	100
PCL	+	29.1	153.1	30.0	24.9	72	92	100
PPL	+	29.0	154.3	29.9	138.8	5	13	100

5.3.8.2 L'acide 2-carboxylique (*2S,5R*)-5-(acétoxyméthyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pyrrolidine ((+)-(*2S,5R*)-**28**)



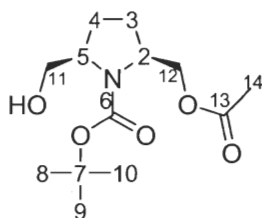
(+)-(*2S,5R*)-**28**

Le produit brut de la réaction enzymatique (-)-**27** (1.92 g) a été dissous dans un mélange d'acétonitrile (10 ml), de CCl_4 (10 ml) et de H_2O (15 ml). À cette solution ont été ajoutés successivement 4.1 eq. de $NaIO_4$ (5.48 g, 25.6 mmol) et 0.022 eq. de $RuCl_3 \cdot H_2O$ (31 mg, 0.15 mmol). Le mélange a été agité durant une période de 12 heures. La réaction a été arrêtée en ajoutant une solution de $NaCl$ saturée (20 mL) et d'eau (80 mL). Ensuite, le mélange a été dilué dans 100 mL de CH_2Cl_2 . La phase aqueuse a été extraite avec trois portions de CH_2Cl_2 (3 x 100 ml). Les phases organiques combinées ont été séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit obtenu a été lavé dans 150 mL d'acétate d'éthyle et 75 mL d'eau auquel 1.2 eq. de K_2CO_3 (1.09 g, 7.85 mmol) a été ajouté. La phase aqueuse a été acidifiée avec 3.4 eq. de HCl concentré (12 molaire, 2 ml),

extrait avec trois portions d'acétate d'éthyle (3 x 100 ml), séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite. L'acide (+)-**28** se présente sous forme d'huile translucide violette (1.21 g, 65%) et il a été obtenu à partir du diol **17** (2 étapes). Formule brute: C₁₃H₂₁NO₆. Masse molaire: 287.31 g/mol. R_f: 0.37 (Hexanes:AcOEt, 25:75). [α]_D²² = +4.96° (C = 1.25, CHCl₃). LRMS (ESI) : 310.2 [M+Na]⁺. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.41-3.95 (m, 3H, **2**, **5** et **12**), 2.26-1.79 (m, 4H, **3** et **4**), 2.03 (s, 3H, **14**), 1.46 et 1.39 (2 x s, 9H, **8**, **9** et **10**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 178.2 (**11**), 171.5 (**13**), 155.5 (**6**), 81.1 (**7**), 64.6 (**12**), 60.5 (**2**), 57.1 (**5**), 28.5 (**8**, **9** et **10**), 28.1 (**4**), 27.6 (**3**), 21.2 (**14**). IR (NaCl): 3445 (élongations O-H), 2983 (élongations C-H aliphatiques), 1742 et 1681 (élongations C=O), 1395 et 1368 (élongations C-O), 1040 (élongations C-N).

5.3.9 Désymétrisation du *tert*-butyl 2,5-bis(acétoxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate

5.3.9.1 (2*S*,5*R*)-*Tert*-butyl 2-(acétoxyméthyl)-5-(hydroxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate ((+)-(2*S*,5*R*)-**27**)



(2*S*,5*R*)-(+)-**27**

Dans un vial de 2 ml, le diacétate **18** (100 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq) a été émulsifié dans 2 ml de solution tampon phosphate pH 7.5. La réaction a été démarrée par l'ajout de 25 mg d'enzyme. L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie liquide à haute performance en phase chirale. La réaction a été arrêtée lorsqu'elle n'évoluait plus, par extraction à l'aide de trois portions de CH₂Cl₂ (3 x 15 ml). La phase organique a alors été séchée sur MgSO₄, filtrée puis concentrée sous pression réduite. Le mélange a été analysé par chromatographie liquide à haute performance en phase chirale afin d'évaluer l'excès énantiomère. Formule brute: C₁₃H₂₃NO₅. Masse molaire: 273.33 g/mol. [α]_D²² = +10.6° (C = 1.6, CHCl₃). R_f: 0.5 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir **5.3.8.1**. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir **5.3.8.1**. IR (NaCl): voir **5.3.8.1**.

A) Méthode expérimentale

Injecteur : manuel
 température : 225°C
 solution d'injection : V = 1 µl, C = 10 mg/ml CH₂Cl₂

Colonne chirale : Astec Chiraldex (β-DM 120)
 dimension : 30 m x 0.25mm
 température : 150°C
 débit : 2.5 ml/min

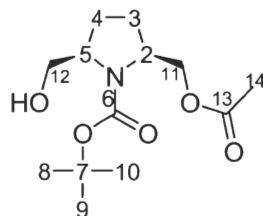
Détecteur : FID
 température : 250°C

B) Résultats expérimentaux

Temps de rétention des énantiomères (2*S*,5*R*)(*t_r*(2*S*,5*R*)) et (2*R*,5*S*)(*t_r*(2*R*,5*S*)), aires sous la courbes respectives (*A*(2*S*,5*R*) et *A*(2*R*,5*S*)), taux de conversion, taux de mono/(di+mono) et excès énantiomères mesurés (*ee*₂₇) pour l'analyse en chromatographie gazeuse en phase chirale du mélange racémique (±)-**27** et du mono acétate **27**.

enzyme	[α] _D	<i>t_r</i> (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>) (min)	<i>A</i> (2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	<i>t_r</i> (2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>) (min)	<i>A</i> (2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)	<i>ee</i> ₂₇ (%)	Taux de conversion (%)	mono/(di+mono) (%)
(±)- 27		28.9	228.8	29.8	244.1	0	-	-
CRL	+	28.8	149.9	29.6	14.9	94	94	30
PLE	+	29.0	127.8	29.9	18.2	75	100	15
PPL	+	28.9	158.1	29.8	38.5	61	50	100
CAL-B	-	29.2	6.3	30.1	25.1	30	30	100

5.3.9.2 *Cis-tert*-butyl 2-(acétoxyméthyl)-5-(hydroxyméthyl)pyrrolidine-1-carboxylate
((±)-*cis*-27)



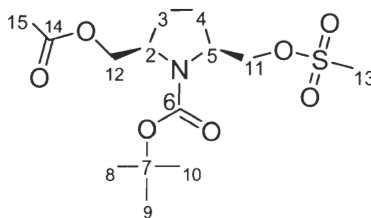
(±)-*cis*-27

Le diol **17** (200 mg, 0.87 mmol, 1.0 eq) a été dissous avec 15 ml de CH₂Cl₂ anhydre dans un ballon muni d'un septum qui a été préalablement chauffé sous courant continu d'argon sec et agitation magnétique. Le ballon a été par la suite refroidi à 0-5°C à l'aide d'un bain eau-glace sous atmosphère inerte. Un volume 133 µl de Et₃N anhydre (0.95 mmol, 1.1 eq) a été ajouté avant d'enlever le courant d'argon sec. Le chlorure d'acétyle (62 µl, 0.87 mmol, 1.0 eq) a été ajouté lentement. Le milieu réactionnel a été ramené à température pièce et l'avancement de la réaction a été suivi par CCM (R_{f18} : 0.79, $R_{f(\pm)-27}$: 0.59, R_{f17} : 0.27, éluant 50% Hexanes/50% AcOEt) jusqu'à ce qu'il y ait une quantité suffisante de mono acétate formé. Après une période d'une demi-heure, la réaction a été arrêtée en lavant la phase organique avec trois portions d'eau déminéralisée avant d'être séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit résiduel a été purifié par chromatographie éclair en employant un mélange composé d'hexane et d'acétate d'éthyle (50:50), pour générer le mono acétate (±)-*cis*-**27** sous forme d'huile translucide (115 mg, 48%). Formule brute: C₁₃H₂₃NO₅. Masse molaire: 273.33 g/mol. R_f : 0.5 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir **5.3.8.1**. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir **5.3.8.1**. IR (NaCl): voir **5.3.8.1**.

5.3.10 Détermination de la configuration absolue du monoacétate (-)-(2*R*,5*S*)-27

5.3.10.1 (2*R*,5*S*)-*Tert*-butyl 2-(acétoxyméthyl)-5-

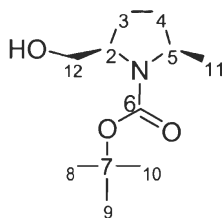
((méthylsulfonyloxy)méthyl)pyrrolidine-1-carboxylate ((+)-(2*R*,5*S*)-29)



(+)-(2*R*,5*S*)-29

Le monoacétate (-)-(2*R*,5*S*)-27 a été dissous dans 10 ml de CH₂Cl₂ anhydre auquel 263 μ l Et₃N (190 mg, 1.89 mmol, 4.0 eq) a été ajouté. Le mélange a été refroidi à 0°C à l'aide d'un bain de glace sous un courant d'azote continu. Le chlorure de mésyle, (146 μ l, 216 mg, 1.89 mmol, 4.0 eq), a ensuite été additionné et la réaction a été laissée sous agitation pendant 2 heures. Ensuite, 30 ml d'AcOEt a été ajouté à la phase organique qui a été lavée avec 3 portions de NaHCO₃ (3 x 20ml), 3 portions de HCl 1N (3 x 20ml) et une portion de saumure (1 x 20ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair en employant un mélange composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (50:50), pour générer le mésylate (2*R*,5*S*)-29 (166 mg, quantitatif). Formule brute: C₁₄H₂₅NO₇S. Masse molaire : 351.42 g/mol. $[\alpha]_D^{22} = +13.5^\circ$ (C = 1.64, CHCl₃). R_f: 0.76 (Hexanes:AcOEt, 25:75). HRMS (IC) : [M + H]⁺ 352.1430, expérimental 352.1433. RMN ¹H (CDCl₃) δ : 4.31-4.28 (m, 2H, **2** et **5**), 4.19-3.97 (m, 4H, **11** et **12**), 3.00 (s, 3H, **13**), 2.06 (s, 3H, **15**), 2.02-1.78 (m, 4H, **3** et **4**), 1.45 (s, 9H, **8**, **9** et **10**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 171.0 (**14**), 154.3 (**6**), 80.9 (**7**), 69.5 (**12**), 65.0 (**11**), 57.2 (**2**), 57.1 (**5**), 37.3 (**13**), 28.6 (**8**, **9** et **10**), 27.4 (**4**), 26.8 (**3**), 21.2 (**15**). IR (NaCl): 2977 (élongations C-H aliphatiques), 1742 et 1688 (élongations C=O), 1383 (élongations C-O), 1347 et 1164 (élongations S=O), 1042 (élongations C-N).

5.3.10.2 (2*R*,5*R*)-Tert-butyl 2-(hydroxyméthyl)-5-méthylpyrrolidine-1-carboxylate

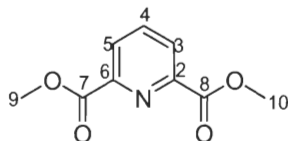


(+)-(2*R*,5*R*)-30

Dans un ballon de 25 ml préalablement séché à la flamme, ont été déposés sous un courant d'azote continu 52 mg de LiAlH₄ (1.37 mmol, 3.0 eq) et 5 ml de THF fraîchement distillé. La suspension a été amenée à 0°C avec un bain de glace. Le mésylate (+)-**29** (160 mg, 0.46 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans 5 ml de THF fraîchement distillé et cette solution a été canulée à la suspension de LiAlH₄ à 0°C. La réaction a été agitée magnétiquement durant 5 heures. L'arrêt de la réaction s'est effectué par l'ajout de 10 ml de NH₄Cl_{sat.} et l'ajout de 50 ml AcOEt. La phase organique a été lavée avec 3 portions de HCl 3N (3 x 20ml) et une portion de saumure (1 x 20ml), séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (50:50) pour générer l'alcool (+)-(2*R*,5*R*)-**30** sous forme d'huile translucide (30 mg, 30%). Formule brute: C₁₁H₂₁NO₃. Masse molaire: 215.29 g/mol. [α]_D²² = +9.6° (C = 1.0, CHCl₃) (litt.²⁰² : 2*R*, 5*R* [α]_D²² = +9.95° (C = 1.3, CHCl₃)). R_f: 0.25 (Hexanes:AcOEt, 25:75). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.04-3.95 (m, 1H, **2**), 3.86-3.78 (m, 1H, **5**), 3.75 (dd, *J* = 2.8 Hz, 0.6H, **12**), 3.55 (dd, *J* = 5.2 Hz, 1.4H, **12**), 2.19 (s, 3H, **11**), 2.02-1.78 (m, 4H, **3** et **4**), 1.49 (s, 9H, **8**, **9** et **10**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 156.9 (**6**), 81.2 (**7**), 72.2 (**12**), 60.9 (**2**), 57.3 (**5**), 37.3 (**13**), 28.7 (**8**, **9** et **10**), 28.6 (**3**), 27.2 (**4**), 21.1 (**11**). IR (NaCl): 2916 et 2855 (élongations C-H aliphatiques), 1645 (élongations C=O), 1407 (élongations C-O), 1092 (élongations C-N).

5.3.11 Préparation de l'acide *cis*-2-carboxylique 6-(acétoxyméthyl)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)pyridine

5.3.11.1 Diméthyl pyridine-2,6-dicarboxylate²⁶¹ (31)

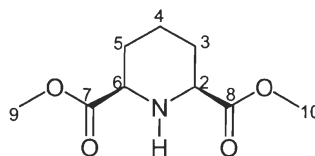


31

À une suspension d'acide 2,6-dicarboxylique pyridine (186.1 g, 1.11 mol) dans 200 mL de MeOH absolu, ont été ajoutés 1.3 L de 2,2 diméthoxypropane et 95 mL d'HCl concentré (12 molaire). Le mélange a été chauffé à reflux pour une période de 5 heures avec un tube asséchant de CaCl₂. Par la suite, la solution a été agitée magnétiquement à température ambiante pendant 12 heures. Le solvant a été évaporé et 1 L d'éther a été ajouté. La suspension obtenue a été agitée pendant 10 minutes et filtrée sur verre fritté pour générer le diester **31** sous forme d'un solide blanc (193 g, 0.83 mol, 75%).

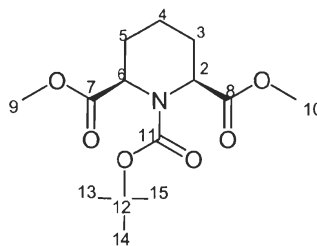
Pour fin de caractérisation, la pyridine libre **31** a été obtenue comme suit : 100 mg d'hydrochlorure a été ajouté à 50 mL de CH₂Cl₂ et 20 mL de NaHCO₃ saturée. Le tout a été agité durant 10 minutes. La pyridine a été extraite trois fois avec 25 mL de CH₂Cl₂, séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite. Le solide a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt/Ether de pétrole, 1:1). Formule brute : C₉H₉NO₄. Masse molaire : 231.63 g/mol. P_f: 120-122°C. R_f: 0.29 (Éther de pétrole:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 8.24 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, **3** et **5**), 7.98 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, **4**), 3.94 (s, 6H, **9** et **10**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 164.8 (**7** et **8**), 148.8 (**2** et **6**), 128.2 (**3** et **5**), 127.8 (**4**), 52.9 (**9** et **10**). IR (NaCl): 3050 (élongations C-H aromatiques), 2960 (élongations C-H aliphatiques), 1740 (élongations C=O), 1570 (élongations C-N), 1240 et 1160 (élongations C-O).

5.3.11.2 *Cis*-diméthyl pipéridine-2,6-dicarboxylate²⁶¹ (*cis*-32)

*cis*-32

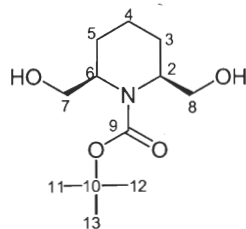
Au diester.HCl **31**, ont été ajoutés 180 g de K_2CO_3 , 400 mL d'eau et 1 L d'acétate d'éthyle. Le mélange a été laissé sous agitation magnétique durant 10 minutes. La phase organique a ensuite été extraite, séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis concentrée sous pression réduite. Dans une bombe à hydrogénation le diester **31** (161.9 g, 0.83 mol) et 6 g de catalyseur Pd/C ont été mis en suspension dans 125 mL d'eau fraîchement dégazée et 100 mL d'acétate d'éthyle. L'hydrogénation a été effectuée à 58 psi pour une période de 3 jours à température ambiante. Par la suite 500 mL d'AcOEt a été ajouté et les phases ont été séparées. La phase organique a été séchée sur $MgSO_4$ puis filtrée sous vide sur un lit de celite. Le diester hydrogéné a été purifié par recristallisation dans 500 mL de dichlorométhane et 1 L d'hexanes. Les cristaux ont été filtrés et rincés à l'hexanes froid. Le diester *cis*-**32** a été obtenu sous la forme d'un solide blanc (138.4 g, 83%). Formule brute : $C_9H_{15}NO_4$. Masse molaire : 201.22 g/mol. P_f: 89-92°C. R_f: 0.2 (CH_2Cl_2 :AcOEt, 50:50). RMN 1H ($CDCl_3$) δ : 3.74 (s, 6H, **9** et **10**), 3.41 (dd, 2H, $J = 12.4, 2.1$ Hz, **2** et **6**), 2.38 (s, 1H, **1**), 2.03-1.97 (m, 3H, **3** et **5** éq, **4** éq), 1.57-1.39 (m, 3H, **3** et **5** ax, **4** ax) RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 172.7 (**7** et **8**), 58.2 (**9** et **10**), 51.8 (**2** et **6**), 28.5 (**3** et **5**), 23.9 (**4**). IR (KBr) 3340 (élongations N-H aromatiques), 2980-2800 (élongations C-H aliphatiques), 1730 (élongations C=O), 1240 et 995 (élongations C-O).

5.3.11.3 *Cis*-1-*tert*-butyl 2,6-diméthyl piperidine-1,2,6-tricarboxylate²⁶¹ (*cis*-33)

*cis*-33

L'amine secondaire *cis*-**32** (138.37 g, 0.687 mol, 1.0 eq) a été mise en suspension dans 300 mL de THF fraîchement distillé sous un courant continu d'azote et (165,1g 0.756mol, 1.1 eq) l'anhydride de di-*tert*-butoxycarbonyl a été ajouté. La solution a été agitée magnétiquement et chauffée à reflux pendant 24h. L'avancement de la réaction a été suivi par CCM (éluant 50% Hexanes/50% AcOEt) en employant un éluant composé de 25 % d'AcOEt et 75 % de CH₂Cl₂. Le diester *cis*-**33** a été obtenu sous forme d'huile translucide (207.2 g, quantitattif). Formule brute: C₁₄H₂₃NO₆. Masse molaire: 301.34 g/mol. R_f: 0.25 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.76 (m, 2H, **2** et **6**), 3.66 (s, 6H, **9** et **10**), 2.14-2.10 (m, 2H, **4**), 1.72-1.50 (m, 4H, **3** et **5**), 1.44 (s, 9H, **13**, **14** et **15**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 172.3 (**7** et **8**), 155.6 (**11**), 81.0 (**12**), 52.7 (**2** et **6**), 52.0 (**9** et **10**), 28.4 (**13**, **14** et **15**), 27.6 (**4**), 16.8 (**3** et **5**). IR (NaCl): 2975 (élongations C-H aliphatiques), 1738 et 1700 (élongations C=O), 1225 et 995 (élongations C-O). HRMS (IC): [M + H]⁺ 302.1603, expérimental 302.1609.

5.3.11.4 *Cis-tert*-butyl 2,6-bis(hydroxyméthyl)pipéridine-1-carboxylate (*cis*-**34**)

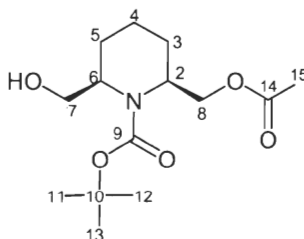


cis-**34**

Le diester *cis*-**33** (207.2 g 0.687 mol) a été dissous dans 300 mL THF fraîchement distillé sous un atmosphère d'azote à 0°C. Ensuite, LiBH₄ (63.1 g, 2.896 mol, 4.0 eq) a été ajouté et le bain de glace a été retiré. La réaction a été suivie par CCM. Après 5 heures, la solution a été versée dans un mélange d'AcOEt (300-400 mL) et NaHCO₃ sat. (100 mL) préalablement refroidi avec un bain de glace. Le mélange a été agité vigoureusement durant 10 à 15 minutes. Les phases ont été séparées et la phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite pour générer le diol obtenu *cis*-**34** sous forme d'un solide blanc (133.1 g, 0.543 mol, 79%). Formule brute: C₁₂H₂₃NO₄. Masse molaire: 245.32 g/mol. P_f: 99-100°C. R_f: 0.18 (Hexanes:AcOEt, 25:75). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.38-4.35 (m, 2H, OH), 3.60-3.57 (t, 4H, *J* = 7.8 Hz, **7** et **8**), 3.26-3.23 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz, **2** et **6**), 1.60-1.47 (m, 6H, **3**, **4** et **5**), 1.43 (m, 9H, **11**, **12** et **13**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 158.3 (**9**),

80.7 (**10**), 60.5 (**7** et **8**), 50.9 (**2** et **6**), 28.5 (**11**, **12** et **13**), 24.7 (**3** et **5**), 15.2 (**4**). IR (KBr) 3405 (élongations O-H), 2975 (élongations C-H aliphatiques), 1688 (élongations C=O), 1225 (élongations C-O). HRMS (IE) : $[M + H]^+$ 246.1705, expérimental 246.1709.

5.3.11.5(2R,6S)-tert-butyl-2-(acétoxyméthyl)-6-(hydroxyméthyl)pipéridine-1-carboxylate ((-)-(2R,6S)-35)



(-)-(2R,6S)-35

Le diol *cis*-**34** (25.24 g, 102.9 mmol) a été dissous dans 75 mL d'acétate de vinyle. À cette solution, a été ajouté 1.53 g de lipase de *Candida antarctica* et 5.02 g de tamis moléculaire 3Å. Le mélange a été agité à température ambiante pendant 4 jours. L'avancement de la réaction a été suivi par CCM (R_{f36} : 0.86, R_{f35} : 0.54, R_{f34} : 0.23, éluant 50% Hexanes/50% AcOEt) et arrêtée à la disparition du diol. La solution a été filtrée pour enlever l'enzyme en suspension et concentrée à sec sous pression réduite pour générer l'acétate (-)-(2R,6S)-**35** sous forme d'une huile jaunâtre (23.36g, 79%). Pour fin de caractérisation, une petite quantité a été purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice (AcOEt/Éther de pétrole, 2:3). Formule brute: $C_{14}H_{25}NO_5$. Masse molaire : 287.36 g/mol. $[\alpha]_D^{22}$: -5.3° (c = 1.0, benzene). ee : 97%. R_f : 0.71 (Hexanes:AcOEt, 25:75). RMN 1H ($CDCl_3$) δ : 4.31-4.16 (m, 1H, OH), 4.03-4.00 (m, 1H, **8**), 3.99-3.96 (m, 1H, **8**), 3.92-3.87 (m, 1H, **2**), 3.51-3.43 (m, 2H, **7**), 2.83-2.72 (m, 2H, **6**), 1.97 (s, 3H, **15**), 1.74-1.42 (m, 6H, **3**, **4** et **5**), 1.38 (s, 9H, **11**, **12** et **13**). RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : 170.9 (**14**), 156.2 (**9**), 80.4 (**10**), 64.7-64.6 (**8** et **7**), 51.5 (**6**), 48.6 (**2**), 28.5 (**11**, **12** et **13**), 25.1-24.7 (**3** et **5**), 21.1 (**4**), 14.8 (**15**). IR (NaCl): 3465 (élongations O-H), 2975 (élongations C-H aliphatiques), 1744-1690 (élongations C=O), 1232 (élongations C-O). HRMS (IE) : $[M + H]^+$ 288.1811, expérimental 288.1818.

A) Méthode expérimentale

Injecteur : manuel
 température : 225°C
 solution d'injection : V = 1 µl, C = 10 mg/ml CH₂Cl₂

Colonne chirale : Astec Chiraldex (β-DM 120)
 dimension : 30 m x 0.25mm
 température : 150°C
 débit : 2.5 ml/min

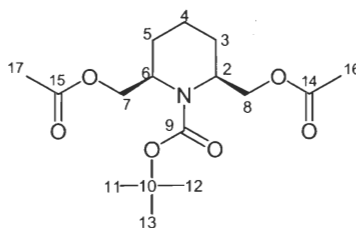
Détecteur : FID
 température : 250°C

B) Résultats expérimentaux

Temps de rétention des énantiomères (2*S*,6*R*)(*t*_{r(2*S*,6*R*)}) et (2*R*,5*S*)(*t*_{r(2*R*,6*S*)}), aires sous les courbes respectives (*A*_(2*S*,6*R*) et *A*_(2*R*,6*S*)) et excès énantiomères mesurés (*ee*₃₅) pour l'analyse en chromatographie gazeuse en phase chirale du mélange racémique (±)-**35** et du mono acétate **35**.

enzyme	[α] _D	<i>t</i> _{r(2<i>S</i>,6<i>R</i>)} (min)	<i>A</i> _(2<i>S</i>,6<i>R</i>)	<i>t</i> _{r(2<i>R</i>,6<i>S</i>)} (min)	<i>A</i> _(2<i>R</i>,6<i>S</i>)	<i>ee</i> ₃₅ (%)
(±)- 35		29.6	178.3	30.7	181.1	0
CAL-B	-	29.5	2.5	30.6	165.3	97

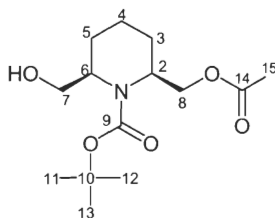
5.3.11.6 *Cis-tert*-butyl-2,6-bis(acétoxy-méthyl)pipéridine-1-carboxylate (*cis*-**36**)



cis-**36**

Le diacétate *cis*-**36** a été généré sous forme d'huile translucide lors de l'acylation enzymatique du diol **34** (voir mode opératoire 5.3.11.1). Formule brute: C₆H₂₇NO₆. Masse molaire: 329.40 g/mol. R_f: 0.32 (Hexanes:AcOEt, 25:75). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.36 (m, 1H, **7** et **8**), 4.14-4.09 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, **7** et **8**), 3.90-3.86 (m, 2H, **2** et **6**), 2.08 (s, 6H, **16** et **17**), 1.71-1.45 (m, 6H, **3**, **4** et **5**), 1.43 (s, 9H, **11**, **12** et **13**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 170.9 (**14** et **15**), 155.2 (**9**), 80.4 (**10**), 64.6 (**7** et **8**), 48.1 (**2** et **6**), 28.5 (**11**, **12** et **13**), 25.1 (**3** et **5**), 21.1 (**4**), 14.7 (**16** et **17**). IR (NaCl): 2972-2874 (élongations C-H aliphatiques), 1750 (élongations C=O), 1322-1038 (élongations C-O). HRMS (IE) : [M + H]⁺ 330.1916, expérimental 330.1891.

5.3.11.7 *Cis-tert*-butyl-2-(acétoxyméthyl)-6-(hydroxyméthyl)pipéridine-1-carboxylate ((±)-**35**)

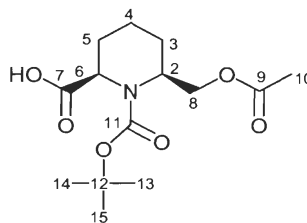


(±)-*cis*-**35**

Le diol *cis*-**34** (200 mg, 0.82 mmol, 1.0 eq) a été dissous avec 15 ml de CH₂Cl₂ anhydre dans un ballon muni d'un septum qui a été préalablement chauffé sous courant continu d'argon sec et agitation magnétique. Le ballon a été par la suite refroidi à 0-5°C à l'aide d'un bain eau-glace sous atmosphère inerte. Un volume 124 μl de Et₃N anhydre (0.90 mmol, 1.1 eq) a été ajouté avant d'enlever le courant d'argon sec. Le chlorure d'acétyle (59 μl, 0.82 mmol, 1.0 eq) a été finalement ajouté lentement. Le milieu réactionnel a été ramené à température pièce et l'avancement de la réaction a été suivi par CCM (R_{f36}: 0.86, R_{f35}: 0.54, R_{f34}: 0.23, éluant 50% Hexanes/50% AcOEt) jusqu'à ce qu'il y ait une quantité suffisante de mono acétate formé. Après une période d'une demi-heure, la réaction a été arrêtée en lavant la phase organique avec trois portions d'eau déminéralisée avant d'être séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit résiduel a été purifié par chromatographie éclair en employant un mélange composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (50:50) pour générer le mono acétate *cis*-(±)-**35** sous forme d'huile translucide (110 mg, 46%). Formule brute: C₁₄H₂₅NO₅. Masse molaire : 287.36 g/mol. R_f:

0.71 (Hexanes:AcOEt, 25:75). RMN ^1H (CDCl_3) δ : voir **5.3.11.2**. RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : voir **5.3.11.2**. IR (NaCl): voir **5.3.11.2**. HRMS (IE): $[\text{M} + \text{H}]^+$ 288.1811, expérimental 288.1818.

5.3.11.8 L'acide 2-carboxylique (2R,6S)-6-(acétoxyméthyl)-1-(tert-butoxycarbonyl)pipéridine ((+)-37)

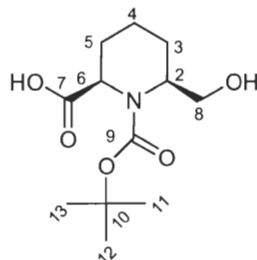


(+)-(2R,6S)-37

Le produit brut de la réaction enzymatique (-)-(2R,6S)-**35** (35.4 g) a été dissous dans un mélange d'acétonitrile (200 mL), de CCl_4 (200 mL) et de H_2O (300 mL). A cette solution ont été ajoutés successivement 4.1 eq. de NaIO_4 (101 g, 472.2 mmol) et 0.022 eq. de $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (562 mg, 2.71 mmol). Le mélange a été agité durant une période de 12 heures. La réaction a été arrêtée en ajoutant une solution de NaCl saturée (100 mL) et d'eau (400 mL). Ensuite, le mélange a été dilué dans 500 mL de CH_2Cl_2 . La phase aqueuse a été extraite deux fois dans 1 L de CH_2Cl_2 . Les fractions organiques ont été combinées puis séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit obtenu a été lavé dans 500 mL d'acétate d'éthyle et dans 250 mL d'eau et 1.2 eq. de K_2CO_3 (20 g, 144.7 mmol) sont ajoutés. La phase aqueuse a été acidifiée avec 3.4 eq. de HCl concentré (12 molaire, 35 ml), extrait avec trois portions d'acétate d'éthyle (3 x 300 ml), séchée sur MgSO_4 et évaporée sous pression réduite. L'acide (+)-(2R,6S)-**37** se présente sous forme d'huile translucide violette (21.2 g, 69%) et il a été obtenu à partir du diol *cis*-**34** (2 étapes). Formule brute: $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_6$. Masse molaire: 301.34 g/mol. $[\alpha]_D^{22}$: +22.05° (c = 1.0, CHCl_3). Rf: 0.49 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 4.77 (m, 1H, **6**), 4.36 (m, 1H, **8**), 4.15-4.05 (m, 2H, **2** et **8**), 2.30-1.50 (m, 6H, **3**, **4** et **5**), 2.04 (s, 3H, **10**), 1.48 (s, 9H, **13**, **14** et **15**). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 177.3 (**7**), 171.3 (**9**), 81.2 (**12**), 63.7 (**8**), 53.4 et 52.4 (**6**), 49.5 et 48.4 (**2**), 28.4 (**13**, **14** et **15**), 24.9 (**3**), 21.2 (**5**), 16.0 (**4**). IR (NaCl): 3295-3090 (élongations COOH), 2972-2940 (élongations C-H aliphatiques), 1750 et 1700 (élongations C=O), 1370-1230 (élongations C-O). LRMS (ESI) : 324.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

5.3.12 Détermination de la configuration absolue de l'acide (+)-(2*R*,6*S*)-37

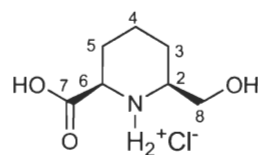
5.3.12.1 L'acide (2*R*,6*S*)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-6-(hydroxyméthyl)pipéridine-2-carboxylique ((-)-38)



((-)-(2*R*,6*S*)-38

L'acide (+)-(2*R*,6*S*)-37 (300 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans 20 mL de dichlorométhane, suivi de l'addition de K₂CO₃ (160 mg, 1.16 mmol, 1.16 eq). Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation pendant 30 minutes. La phase organique a été lavée avec 3 portions d'HCl 1N (3 x 5 mL), séchée sur MgSO₄, filtrée puis concentrée sous pression réduite pour générer l'alcool (-)-(2*R*,6*S*)-38 sous forme d'huile translucide (223 mg, 86%). Formule brute: C₁₂H₂₁NO₅. Masse molaire: 259.3 g/mol. [α]_D²²: -10.24° (c = 4.4, MeOH). R_f: 0.12 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 5.39 (s, 2H, **OH** et **COOH**), 4.68-4.52 (m, 1H, **6**), 4.36-4.19 (m, 1H, **2**), 3.59-3.38 (m, 2H, **8**), 2.26-2.02 (m, 2H, **5**), 1.65-1.40 (m, 4H, **3** et **4**), 1.36 (s, 9H, **11**, **12** et **13**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 171.5 (**7**), 153.2 (**9**), 80.7 (**10**), 63.0 (**8**), 53.9 (**6**), 51.7 (**2**), 28.5 (**11**, **12** et **13**), 26.3 (**3**), 25.0 (**5**), 17.0 (**4**). IR (NaCl): 3427 (élongations N-H et O-H), 2924-2853 (élongations C-H aliphatiques), 1693 et 1572 (élongations C=O), 1395-1265 (élongations C-O), 1048 (élongations C-N). LRMS (ESI) : 282.1 [M+Na]⁺.

5.3.12.2 L'hydrochlorure de (2*R*,6*S*)-2-carboxy-6-(hydroxyméthyl)pipéridine ((+)-(2*R*,6*S*)-39)



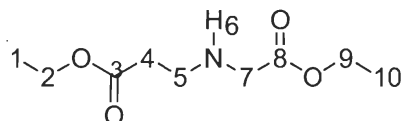
(+)-(2*R*,6*S*)-39

L'acide (-)-(2*R*,6*S*)-**38** (213 mg, 0.82 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans 4 mL de d'acétate d'éthyle, suivi de l'addition d'HCl_{conc.} (1.25 mL, 15.0 mmol, 18.3 eq). Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation pendant 30 minutes. La phase organique a été concentrée à sec sous pression réduite pour générer la pipéridine (+)-(2*R*,6*S*)-**39** sous forme d'un solide blanc (170 mg, quantitatif). Formule brute: C₇H₁₄ClNO₃. Masse molaire: 195.64 g/mol. P_f: 224-230°C (litt.²⁰⁰: 225-230°C). [α]_D²²: +35.88° (c = 1.0, H₂O) (litt.¹⁹⁹: 2*R*, 6*S* [α]_D²²: +34.5° (c = 1.14, H₂O)). R_f: 0.11 (AcOEt:MeOH, 70:30). RMN ¹H (D₂O) δ: 3.95-3.81 (m, 1H, **6**), 3.85-3.69 (m, 1H, **8**), 3.62 (m, 1H, **8**), 3.24 (m, 1H, **2**), 2.27 (m, 1H, **4**), 2.01-1.82 (m, 2H, **4** et **5**), 1.60 (m, 2H, **3** et **5**), 1.42 (m, 1H, **3**). RMN ¹³C (D₂O) δ: 174.2 (**7**), 64.2 (**8**), 60.9 (**6**), 60. (**2**), 28.3 (**3**), 26.4 (**5**), 24.1 (**4**). IR (NaCl): 3512 (élongations N-H et O-H), 2940-2715 (élongations C-H aliphatiques), 1742 (déformations angulaire N-H), 1632 (élongations C=O), 1400 et 1201 (élongations C-O), 1024 (élongations C-N).

5.4 Partie expérimentale relative au projet 4

5.4.1 Synthèse du 1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate

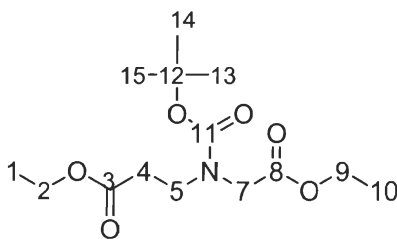
5.4.1.1 Éthyl 3-(2-éthoxy-2-oxoéthylamino)propanoate²⁵⁰ (40)



40

L'hydrochlorure d'éthyle ester de glycine (39.19 g, 280.8 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans l'éthanol 95% (660 ml) à température de la pièce. L'acrylate d'éthyle (33.38 ml, 308.1 mmol, 1.1 eq) a été ensuite additionné, suivi de l'addition de triéthylamine (39.03 ml, 280.8 mmol, 1.0 eq). L'agitation du milieu réactionnel s'est effectuée à la température de la pièce. La réaction s'est poursuivie jusqu'à disparition complète du sel hydrochlorure sur chromatographie sur couche mince (2 à 3 jours). Le mélange a été concentré *in vacuo* et le résidu repris avec 200 ml d'eau distillée. La phase aqueuse a été extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 200 ml). La phase organique a été lavée trois fois avec une solution de chlorure de sodium saturée (3 x 150 ml), séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée *in vacuo*. Le produit brut a été purifié par distillation sous vide en récoltant les fractions s'évaporant à 94-120°C à <1.0 mm Hg (litt.²⁵⁰ 84-90°C à 0.4 mm Hg) pour générer le composé cible **40** sous forme d'huile incolore (39.95 g, 70%). Formule brute: C₉H₁₇NO₄. Masse molaire: 203.24 g/mol. Rf : 0.33 (AcOEt). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.11 (q, 2H, J = 7.2 Hz, **9**), 4.07 (q, 2H, J = 7.2 Hz, **2**), 3.33 (s, 4H, **7**), 2.83 (t, 2H, J = 6.6 Hz, **5**), 2.43 (t, 2H, J = 6.6 Hz, **4**), 1.85 (s, 1H, **6**), 1.20 (t, 3H, J = 7.2 Hz, **10**), 1.19 (t, 3H, J = 7.2 Hz, **1**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 172.6 (**8**), 172.4 (**3**), 60.9 (**9**), 60.6 (**2**), 51.0 (**7**), 45.0 (**5**), 35.1 (**4**), 14.4 (**10**), 14.1 (**1**). IR (NaCl): 3439 (élongations N-H), 2983 (élongations C-H aliphatiques), 1736 (élongations C=O), 1456 (déformation angulaire N-H), 1201 (élongation C-O).

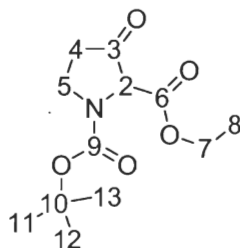
5.4.1.2 Éthyl 3-(*tert*-butoxycarbonyl(2-éthoxy-2-oxoéthyl)amino)propanoate²⁵⁰ (41)



41

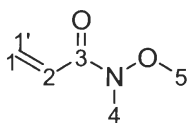
Dans une solution de dichlorométhane anhydre (60 ml) sous agitation à 0°C, le diester **40** (20.4 g, 100.4 mmol, 1.0 eq) et la triéthylamine (14.65 ml, 103.3 mmol, 1.05 eq) ont été dissous. Une autre solution de dichlorométhane anhydre (40 ml) contenant l'anhydride de *tert*-butoxycarbonyle (24.14 g, 110.6 mmol, 1.1 eq) a été ajouté goutte à goutte durant une période de quinze minutes. Le mélange a été agité durant toute la nuit ou jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement de CO₂. La solution a ensuite été lavée avec trois portions d'acide chlorhydrique 2N (3 x 50 ml) et une portion d'eau distillée (1 x 50 ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée *in vacuo*. L'huile brute a été purifiée par distillation sous vide en récoltant les fractions s'évaporant à 82-106°C à <1.0 mm Hg (litt.²⁵⁰ 123-128°C à 0.15 mm Hg) afin de procurer le composé **41** attendu sous forme d'huile incolore (27.4 g, 90 %). Formule brute: C₁₄H₂₅NO₆. Masse molaire: 303.35 g/mol. Rf: 0.67 (Hexanes:AcOEt, 75:25). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.10-3.99 (m, 4H, **2** et **9**), 3.92 et 3.86 (2 x s, 2H, **7**), 3.48-3.42 (m, 2H, **5**), 2.55-2.49 (m, 2H, **4**), 1.38 et 1.31 (2 x s, 9H, **13**, **14** et **15**), 1.18 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **10**), 1.16 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **1**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 172.5 et 172.2 (**8**), 170.4 et 170.3 (**3**), 155.6 et 155.2 (**11**), 80.6 et 80.4 (**12**), 61.1 et 61.0 (**9**), 60.7 et 60.6 (**2**), 51.0 et 50.2 (**7**), 45.0 et 44.9 (**5**), 34.3 et 33.9 (**4**), 28.5 et 28.3 (**13**, **14** et **15**), 14.4 (**10**), 14.3 et 14.2 (**1**). IR (NaCl): 3448 (élongations N-H), 2980 (élongations C-H aliphatiques), 1742 et 1702 (élongations C=O), 1161 (élongation C-O).

5.4.1.3 1-*Tert*-butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate²⁵⁰ (42)

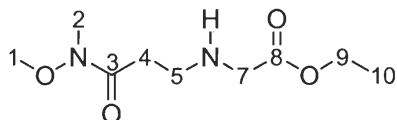


42

Une suspension de *tert*-butoxide de potassium (2.33 g, 20.8 mmol, 1.5 eq) dans le toluène anhydre (50 ml), sous atmosphère d'argon, a été refroidie à 0°C à l'aide d'un bain de glace et de NaCl (-6 à -8 °C). Un agitateur mécanique a été utilisé afin d'obtenir une agitation vigoureuse tout au long de la réaction. Une solution de toluène (8 ml) contenant le diester (4.2 g, 13.8 mmol, 1.0 eq) a été canulée au milieu réactionnel durant une période de 10 minutes. Le mélange réactionnel a été agité pendant 90 minutes. Par la suite la réaction a été arrêtée par l'ajout d'acide acétique (1.5 ml) suivi de l'ajout d'une solution tampon de NaH₂PO₄ · H₂O 20% (87 ml) à 0°C. Les phases ont été séparées et la phase aqueuse a été extraite avec 2 portions de chloroforme (2 x 150 ml). La phase organique a été lavée avec 2 portions de solution tampon au phosphate à pH 7 (2 x 20ml), séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée *in vacuo* pour fournir les deux isomères attendus. Afin d'éliminer le maximum de 1,3-dicarboxylate de 1-*tert*-butyl 3-éthyl 4-oxopyrrolidine du mélange, le résidu a été repris avec 250 ml de toluène suivi de 10 extractions à l'aide d'une solution tampon au carbonate de sodium à pH 10 (10 x 125 ml) et d'un lavage à l'eau distillée (1 x 50 ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée *in vacuo*. Le produit brut a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice en employant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (75:25) pour générer le composé **42** sous forme d'huile translucide (1.24 g, 35%). Formule brute: C₁₂H₁₉NO₅. Masse molaire: 257.28 g/mol. R_f: 0.72 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.52 et 4.43 (2 x s, 1H, **2**), 4.24-4.18 (m, 2H, **7**), 3.91-3.74 (m, 2H, **5**), 2.65 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, **4**), 1.46 et 1.40 (2 x s, 9H, **11**, **12** et **13**), 1.27 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **8**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 204.9 (**3**), 166.5 (**6**), 154.1 (**9**), 81.3 (**10**), 66.0 et 65.6 (**2**), 62.3 (**7**), 41.8 et 42.4 (**5**), 37.3 et 36.6 (**4**), 28.5 et 28.4 (**11**, **12** et **13**), 14.4 et 14.3 (**8**). IR (NaCl): 2977 (élongations C-H aliphatiques), 1772 et 1742 (élongations C=O), 1639 (élongation C=O).

5.4.1.4 *N*-méthoxy-*N*-méthylacrylamide²⁶² (44)**44**

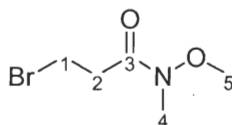
Dans un ballon de 1L, le chlorure d'acryloyle (16.7 g, 184.5 mmol, 1.2 eq) et l'hydrochlorure de *N,O*-diméthylhydroxylamine (15.0g, 153.8 mmol, 1.0 eq) ont été dissous dans 550 ml de CHCl₃ exempt d'éthanol. Ensuite, 27.26 ml de pyridine (26.76 g, 338.3 mmol, 2.2 eq) ont été ajoutés goutte à goutte à 0°C. À la fin de l'addition, le milieu réactionnel a été mis sous agitation magnétique pendant 30 minutes à température pièce et il a été transféré dans une ampoule à extraction afin de laver la phase organique avec 2 portions d'acide chlorhydrique 3N (2 x 200 ml). Le CHCl₃ a été ensuite évaporé sous pression réduite avec précaution afin de générer le composé cible **44** sous forme d'huile jaunâtre très volatile (10.62 g, 60%). Formule brute: C₅H₉NO₂. Masse molaire: 115.13 g/mol. R_f : 0.60 (AcOEt). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 6.67 (dd, 1H, *J* = 16.0, 10.4 Hz, **2**), 6.37 (dd, 1H, *J* = 16.0, 2.1 Hz, **1**), 5.69 (dd, 1H, *J* = 10.4, 2.1 Hz, **1'**), 3.65 (s, 3H, **5**), 3.21 (s, 3H, **4**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 166.5 (**3**), 129.2 (**1**), 126.1 (**2**), 62.0 (**5**), 32.3 (**4**). IR (NaCl): 3397 (élongations N-H), 2963 (élongations C-H aliphatiques), 1651 (élongations C=O), 1425 (déformations N-H), 1106 (élongation C-N).

5.4.1.5 L'acétate d'éthyle de (3-(méthoxy(méthyl)amino)-3-oxopropyl)amino (45)**45**

L'hydrochlorure d'éthyle ester de glycine (9.92 g, 71.06 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans l'éthanol 95% (180 ml) à température de la pièce. L'acrylamide **44** (9.0 g, 78.17 mmol, 1.1 eq) a été ensuite additionné, suivi de l'addition de triéthylamine (10.87 ml, 78.17 mmol, 1.1 eq). L'agitation du milieu réactionnel s'est effectuée à la température pièce. La réaction s'est poursuivie jusqu'à disparition complète du sel hydrochlorure sur chromatographie sur couche mince (2 à 5 jours). Le mélange a été par la suite concentré sous pression réduite et le résidu repris avec 300 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique a été lavé trois fois avec

une solution d'acide chlorhydrique 1N (3 x 150 ml), séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée *in vacuo* pour générer le composé **45**²⁵⁹ sous forme d'huile jaunâtre (12.41 g, 80 %). Pour des fins d'analyse spectrale, une partie du produit a été purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'acétate d'éthyle et de méthanol (70:30). Formule brute: C₉H₁₈N₂O₄. Masse molaire: 218.25 g/mol. R_f : 0.43 (AcOEt:MeOH, 70:30). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.12 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, **9**), 3.63 et 3.62 (2 x s, 3H, **1**), 3.36 et 3.35 (2 x s, 2H, **7**), 3.11 et 3.10 (2 x s, 3H, **2**), 2.85 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, **5**), 2.59 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, **4**), 2.05 (s, 1H, **6**), 1.21 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **10**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 172.4 (**8**), 171.9 (**3**), 61.4 (**1**), 60.9 (**9**), 51.3 (**7**), 49.6 (**5**), 44.8 (**2**), 32.5 (**4**), 14.4 (**10**). IR (NaCl): 3445 (élongations N-H), 2983 et 2934 (élongations C-H aliphatiques), 1736 et 1648 (élongations C=O), 1456 (déformation angulaire N-H), 1201 (élongation C-O).

5.4.1.6 3-Bromo-*N*-méthoxy-méthylpropanamide²⁶³ (**46**)

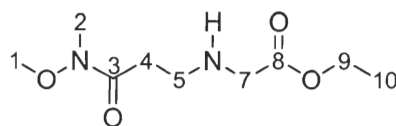


46

Une solution d'hydrochlorure de *N,O*-diméthylhydroxylamine (1.19 g, 15.15 mmol, 1.1 eq) et de chlorure de 3-bromopropionyle (1.89 g, 11.05 mmol, 1.0 eq) dans 170 ml de CHCl₃ a été mise sous agitation magnétique vigoureuse à 0°C. Un volume de 1.96 ml de pyridine anhydre (1.92 g, 24.04 mmol, 2.2 eq) a été additionné goutte à goutte durant une période de 20 minutes. Après l'ajout de la base, le mélange a été laissé sous agitation à température pièce pendant 1 heure et a ensuite été lavé avec 3 portions d'acide chlorhydrique 3N (3 x 100 ml) et une portion de chlorure de sodium saturée (1 x 100 ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice en employant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (25:75) pour générer le composé **46** sous forme d'huile jaunâtre (1.61 g, 74%). Formule brute: C₅H₁₀BrNO₂. Masse molaire: 196.04 g/mol. R_f: 0.69 (AcOEt). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 3.79 (t, 0.2H, *J* = 7.0 Hz, **1**), 3.70 (s, 3H, **5**), 3.62 (t, 1.8H, *J* = 7.0 Hz, **1**), 3.19 (s, 3H, **4**), 3.03 (t, 1.8H, *J* = 7.0 Hz, **2**), 2.91 (t, 0.2H, *J* = 7.0 Hz, **2**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 174.2 (**3**), 61.6 (**5**), 35.5 (**2**), 32.3 (**4**), 26.8 (**1**). IR (NaCl): 3425 (élongations N-

H), 2963 (élongations C-H aliphatiques), 1645 (élongations C=O), 1425 (élongations C-O), 1176 (élongation C-N).

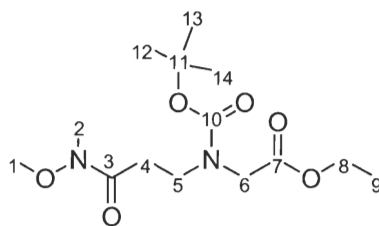
5.4.1.7 L'acétate d'éthyle de (3-(méthoxy(méthyl)amino)-3-oxopropyl)amino (45)



45

(voir mode opératoire 5.4.1.5) L'acrylamide **44** a été remplacé par le 3-bromo-*N*-méthoxy-méthylpropanamide **46** pour générer l'amine secondaire **45**²⁵⁹ sous forme d'huile jaunâtre. Rendement: 25%. Formule brute: C₉H₁₈N₂O₄. Masse molaire: 218.25 g/mol. R_f : 0.43 (AcOEt:MeOH, 70:30). IR (NaCl): voir 5.4.1.5. RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir 5.4.1.5. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir 5.4.1.5.

5.4.1.8 L'acétate d'éthyle de ((*tert*-butoxycarbonyl) (3-(méthoxy(méthyl)amino)-3-oxopropyl)amino (47)

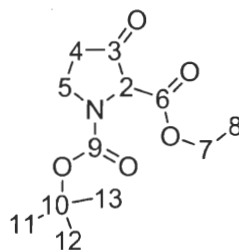


47

Dans une solution de dichlorométhane anhydre (300 ml) sous agitation à 0°C, l'amide **45** (15.1 g, 69.19 mmol, 1.0 eq) et la triéthylamine (10.58 ml, 76.11 mmol, 1.1 eq) ont été dissous. Une autre solution de dichlorométhane anhydre (200 ml) contenant l'anhydride de *tert*-butoxycarbonyle (16.61 g, 76.11 mmol, 1.1 eq) a été ajouté goutte à goutte durant une période de quinze minutes. Le mélange a été agité durant toute la nuit ou jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement gazeux de CO₂. La solution a ensuite été lavée avec trois portions d'acide chlorhydrique 2N (3 x 150 ml), une portion d'eau distillée (1 x 150 ml) et une portion de chlorure de sodium saturée (1 x 150 ml), séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite afin de générer le composé **47**²⁵⁹ sous forme d'huile translucide (20.4 g, 93%). Formule brute: C₁₄H₂₆N₂O₆. Masse molaire: 318.37 g/mol. R_f :

0.78 (AcOEt:MeOH, 80:20). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 4.08 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, **5**), 3.96 et 3.92 (2 x s, 2H, **6**), 3.62-3.60 (2 x s, 3H, **1**), 3.09 et 3.08 (2 x s, 3H, **2**), 2.69-2.64 (m, 2H, **4**), 1.40 et 1.33 (2 x s, 9H, **12**, **13** et **14**), 1.20-1.15 (m, 3H, **9**). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 175.3 et 175.2 (**3**), 170.7 et 170.4 (**7**), 155.8 et 155.4 (**10**), 80.4 et 80.2 (**11**), 61.4 (**1**), 61.0 et 60.9 (**8**), 51.3 et 50.4 (**10**), 44.8 (**5**), 32.3 (**2**), 32.9 et 32.7 (**4**), 28.6 et 28.4 (**12**, **13** et **14**), 14.4 et 14.3 (**9**). IR (NaCl): 3437 (élongations N-H), 2977 (élongations C-H aliphatiques), 1751, 1698 et 1656 (élongations C=O), 1464 (déformation angulaire N-H), 1165 (élongation C-O).

5.4.1.9 1-Tert-butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate (**42**)

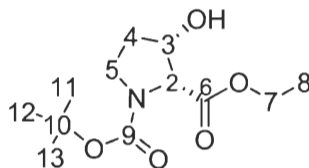


42

Une solution (1M/THF) de LiHMDS (76.89 ml, 76.9 mmol, 1.2 eq) a été ajoutée, sous un courant d'azote continu, à 250 ml de THF anhydre préalablement refroidi à -78°C à l'aide d'un bain d'acétone-glace sèche. L'amide **47** (20.4 g, 64.1 mmol, 1.0 eq) a été dissous et refroidi à -78°C dans 35 ml de THF anhydre, pour ensuite être canulé à la solution de THF contenant la base. Le milieu réactionnel a été laissé sous agitation magnétique pendant 2 heures sous un courant d'azote continu. La réaction a ensuite été arrêtée avec l'ajout d'une solution de $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$. La phase organique a été lavée avec trois portions de HCl 1N (3 x 75 ml), une portion d'eau déminéralisée (1 x 75ml) et une portion de saumure (1 x 75ml) avant d'être séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice en employant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (75:25) pour générer le composé **42**²⁵⁹ sous forme d'huile translucide (13,84 g, 70%). Formule brute: $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_5$. Masse molaire: 257.28 g/mol. Rf: 0.72 (Hexanes:AcOEt, 50:50). IR (NaCl): voir **5.4.1.3**. RMN ^1H (CDCl_3) δ : voir **5.4.1.3**. RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : voir **5.4.1.3**.

5.4.2 Bioréduction du 1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate

5.4.2.1 (2*R*,3*S*)-1-*Tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate ((+)- (2*R*,3*S*)-49)



(+)-(2*R*,3*S*)-49

Dans un erlenmeyer de 250 ml contenant le 3-oxopyrrolidine (3.0 g, 11.75 mmol, 1.0 eq), 240 ml d'eau distillée y a été ajoutée ainsi que du sucrose (45.06 g, 131.6 mmol, 11.2 eq). Lorsque la dissolution du sucrose a été complétée, la levure a été ajoutée (29.956 g). Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation à 34°C jusqu'à disparition complète de la cétone de départ (~36h), observable à 200 nm par chromatographie liquide à haute performance. La celite comme agent de filtration a ensuite été ajoutée au milieu réactionnel afin de filtrer le tout sur un verre fritté sous pression réduite. Le résidu sur le verre fritté a été lavé avec 200 ml d'eau distillée et le filtrat résultant a été saturé à l'aide du chlorure de sodium. Cette phase aqueuse a été extraite avec 5 portions d'éther (5 x 100 ml) et les extraits ont été lavés avec 2 portions d'eau distillée (2 x 75 ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄ puis concentrée *in vacuo* pour fournir l'alcool (+)-(2*R*,3*S*)-49 sous forme d'huile translucide (2.11 g, 70%). L'alcool a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice en employant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (75:25). L'alcool a de plus été filtré sur papier filtre de 0.22 μ, afin d'effectuer l'analyse par chromatographie liquide à haute performance en phase chirale et l'analyse par chromatographie gazeuse en phase chirale. Formule brute: C₁₂H₂₁NO₅. Masse molaire: 259.30 g/mol. [α]_D²⁵ = +25.8° (C = 1.65, CH₂Cl₂) (litt.²⁵⁰ [α]_D²⁵ = +19.0° (C = 1.21, CH₂Cl₂)). ee: 91%. Rf: 0.33 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.59-4.54 (m, 1H, **3**), 4.36 et 4.29 (2 x d, 1H, *J* = 6.6 Hz, **2**), 4.24-4.16 (m, 2H, **7**), 3.63-3.43 (m, 2H, **5**), 2.09-1.94 (m, 2H, **4**), 1.42 et 1.38 (2 x s, 9H, **11**, **12** et **13**), 1.26 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, **8**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 170.6 et 170.5 (**6**), 154.4 et 154.0 (**9**), 80.4 (**10**), 72.6 et 71.7 (**3**), 64.1 et 63.6 (**2**), 61.4 (**7**), 44.4 et 44.0 (**5**), 33.0 et 32.5 (**4**), 28.6 et 28.5 (**11**, **12** et **13**), 14.5 et 14.4 (**8**). IR (NaCl): 3445 (élongations O-H), 2983 (élongations C-H aliphatiques), 1730 et 1663 (élongations C=O), 1407 et 1164 (élongation C-O).

Analyse HPLC-chiraleA) Méthode expérimentale

Injecteur : automatique

Colonne : Chiracel OD-H

Détecteur : UV / visible

Longueur d'onde : 200 nm

Phase mobile : Hexane / Isopropanol = 95 / 5

Débit : 0.8 ml/min

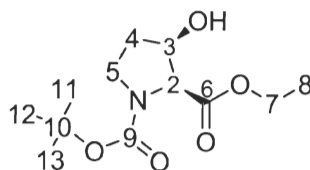
B) Résultats expérimentaux

Temps de rétention des énantiomères ($2S,3R$)($t_{r(2S,3R)}$) et ($2R,3S$)($t_{r(2R,3S)}$), aires sous la courbes respectives ($A_{(2S,3R)}$ et $A_{(2R,3S)}$), concentrations du substrat (g/l), temps de réaction (h) et excès énantiomères mesurés (de) pour l'analyse en chromatographie liquide à haute performance en phase chirale du mélange racémique (\pm)-**49** ainsi que pour le produit de la réduction ($2R,3S$)-**49** lors de la bioréduction avec diverses levures.

Composé	Levures	Conc. du substrat (g/l)	temps de réaction (h)	$t_{r(2S,3R)}$ (min)	$A_{(2S,3R)}$	$t_{r(2R,3S)}$ (min)	$A_{(2R,3S)}$	ee (%)
(\pm)- 49				15.9	16241	17.9	16323	0.3
$(2R,3S)$ - 49	Levée rapide	12	36	15.9	877	18.0	8019	68
	Traditionnelle	12	36	15.8	673	17.8	3542	68
	Aldrich	12	21	15.9	741	17.9	4217	70
	Four à pain	12	36	16.0	458	18.0	5236	84
	"	20	36	15.8	837	17.8	5623	74
"	5	36	15.9	329	17.9	7359	91	

5.4.3 Séparation des isomères *cis* et *trans* N-Boc-(±)-3-hydroxyproline par lactonisation

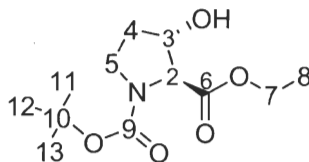
5.4.3.1 *Cis*-(±)-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate ((±)-*cis*-49)



(±)-*cis*-49

À une solution d'eau (400 ml) a été ajoutée la cétone **42** (19.15 g, 75.0 mmol, 1.0 eq). Parallèlement, à une solution d'éthanol 95% (200 ml) a été ajouté l'agent réducteur NaBH₄ (2.84 g, 75.0 mmol, 4.0 eq). Le mélange a par la suite été versée à la solution aqueuse préalablement refroidie à 0°C à l'aide d'un bain de glace. La réaction a été laissée sous agitation pendant une période de 2 heures, période après laquelle l'éthanol a été évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse a été ensuite acidifiée à pH 3-4 avec de l'acide chlorhydrique 3N, afin de permettre l'extraction de l'alcool à l'aide de 3 portions d'acétate d'éthyle (3 x 250 ml). Les extraits organiques ont été séchés sur MgSO₄ puis évaporés sous pression réduite pour générer le mélange de diastéréoisomères *cis/trans* des alcools (±)-**49**²⁵⁰ (18.33 g, 71 mmol). Ces alcools ont été séparés en majeure partie par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (75:25) pour fournir l'alcool (±)-*trans*-**49** (10.49 g, 57%)(voir 5.4.3.2.) et le (±)-*cis*-**49** (7.0 g, 36%). Formule brute: C₁₂H₁₉NO₅. Masse molaire: 259.30 g/mol. IR (NaCl): voir 5.4.2.1. RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir 5.4.2.1. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir 5.4.2.1.

5.4.3.2 *Trans*-(±)-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate ((±)-*trans*-49)

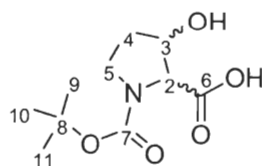


(±)-*trans*-49

(voir 5.4.3.1 pour mode opératoire) (±)-*trans*-**49** (10.49 g, 57%). Formule brute: C₁₂H₁₉NO₅. Masse molaire: 259.30 g/mol. Aspect: huile translucide. R_f*trans*: 0.37 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 4.38-4.37 (m, 1H, **2**), 4.23 (m, 1H, **3**), 4.20-

4.07 (m, 2H, **7**), 3.63-3.51 (m, 2H, **5**), 2.88 (s, 1H, OH), 2.08-1.83 (m, 2H, **4**), 1.41 et 1.36 (2 x s, 9H, **11**, **12** et **13**), 1.25-1.20 (m, 3H, **8**). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 171.3 (**6**), 154.1 (**9**), 80.3 (**10**), 75.6 et 74.5 (**3**), 68.4 et 68.2 (**2**), 61.4 (**7**), 44.7 et 44.3 (**5**), 32.8 et 32.4 (**4**), 28.6 et 28.5 (**11**, **12** et **13**), 14.5 et 14.3 (**8**). IR (NaCl): 3432 (élongations O-H), 2983 (élongations C-H aliphatiques), 1736 et 1681 (élongations C=O), 1407 et 1164 (élongation C-O). HRMS (IE) : $[\text{M} + \text{H}]^+$ 259.1420, expérimental 259.1414.

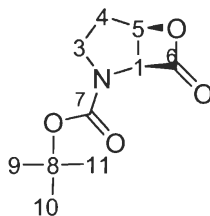
5.4.3.3 L'acide 2-carboxylique *cis/trans*-(\pm)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-hydroxypyrrolidine ((\pm)-*cis/trans*-50**)**



(\pm)-*cis/trans*-**50**

Un mélange des esters (\pm)-*cis/trans*-**49** (1.914 g, 7.4mmol, 1 eq) a été mis sous agitation magnétique dans 35 ml de THF. À cette solution, a été ajouté 35 ml d'eau déminéralisée dans laquelle se trouvait 595 mg de NaOH (14.9 mmol, 2 eq). Le mélange a été laissé sous agitation durant une période de 24 heures. Le tétrahydrofurane a été évaporé *in vacuo* et 50 ml de dichlorométhane a été ajouté. La phase aqueuse a été ensuite acidifiée à pH 3 à l'aide de l'acide chlorhydrique 1N puis extraite à l'aide de 10 portions de AcOEt (10 x 50 ml). Les extraits ont été séchés sur MgSO_4 , filtrés et concentrés sous pression réduite pour générer le mélange brut (\pm)-*cis/trans*-**50**²⁵² (1.810 g, 95%) sous forme d'un solide blanc. Ce mélange brut a ensuite transformé (voir **5.4.3.4**) sans purification préalable. Formule brute: $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_5$. Masse molaire: 231.25 g/mol. Rf: 0.34 (MeOH:AcOEt, 30:70). *Cis*: RMN ^1H (CDCl_3) δ : voir **5.4.4.5**. RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : voir **5.4.4.5**. IR (NaCl): voir **5.4.4.5**.

5.4.3.4 *Cis-tert-butyl 7-oxo-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylate ((±)-cis-51*

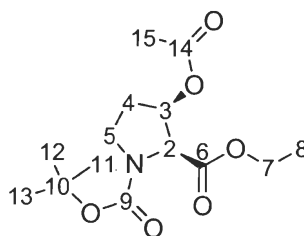


(±)-*cis-51*

Le mélange brut d'acide (±)-*cis/trans-50* (142 mg, 0.62 mmol, 1.0 eq) (voir 5.4.3.3) a été dissous dans 10 ml de CH₂Cl₂ anhydre préalablement refroidi à 0°C à l'aide d'un bain de glace. L'agent de couplage EDC·HCl (178 mg, 0.92 mmol, 1.5 eq) a ensuite été additionné au mélange suivi du catalyseur DMAP (15 mg, 0.12 mmol, cat.). Le milieu réactionnel a été amené à la température de la pièce et laissé sous agitation pendant 24 heures. Le mélange a été repris avec 50 ml d'acétate d'éthyle et a été lavée avec 2 portions d'acide chlorhydrique 1N (2 x 25 ml), 2 portions de carbonate de sodium (2 x 25 ml) et 2 portions de saumure (2 x 25 ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice en employant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (50:50) pour générer le composé (±)-*cis-51* (30 mg, 23%) sous forme de cristaux blanc. Formule brute: C₁₀H₁₅NO₄. Masse molaire: 213.23 g/mol. R_f: 0.59 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 5.64-5.37 (m, 1H, **5**), 5.14-5.11 (m, 1H, **1**), 4.11-3.95 (m, 1H, **3''**), 3.35-3.27 (m, 1H, **3'**), 2.30-2.25 (m, 1H, **4''**), 1.99-1.85 (m, 1H, **4'**), 1.45 (s, 9H, **9**, **10** et **11**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 171.5 (**6**), 152.9 (**7**), 81.6 (**8**), 70.0 (**5**), 60.7 (**1**), 43.6 (**3**), 30.0 (**4**), 28.4 (**9**, **10** et **11**). IR (NaCl):: 2989 (élongations C-H aliphatiques), 1749 (élongations C=O), 1168 (élongation C-O), 1103 (élongations C-N). LRMS (ESI) : 236.1 [M+Na]⁺.

5.4.4 Dédoublement cinétique du (\pm)-cis-1-tert-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate par acylation et hydrolyse enzymatique

5.4.4.1 (2*S*,3*R*)-1-Tert-butyl 2-éthyl 3-acétoxy pyrrolidine-1,2-dicarboxylate ((+)-(2*S*,3*R*)-52)



(+)-(2*S*,3*R*)-52

Dans un ballon de 50 ml, l'alcool (\pm)-**49** (100 mg, 0.17 mmol) a été dissous dans 40 ml d'acétate de vinyle sous agitation magnétique et 20 mg de tamis moléculaire ont été ajoutés. L'acylation enzymatique a été démarrée par l'ajout de 20 mg de la lipase. L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie liquide à haute performance en phase chirale. L'arrêt de la réaction s'est effectué par filtration du mélange réactionnel sur verre fritté et l'acétate de vinyle a été évaporé sous pression réduite pour générer l'acétate (+)-(2*S*,3*R*)-**52** et l'alcool résiduel (+)-(2*R*,3*S*)-**49**. Le mélange a été analysé par chromatographie liquide à haute performance en phase chirale. Lors d'un essai avec PCL et 5 g de substrat, l'alcool (+)-(2*R*,3*S*)-**49** (2.34 g, 47%) (voir **5.4.4.3**) et l'acétate (+)-(2*S*,3*R*)-**52** (2.38g, 41%) ont été récupérés purs sous forme d'huiles translucides par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (75:25). Formule brute: C₁₄H₂₃NO₆. Masse molaire: 301.34 g/mol. $[\alpha]_D^{25} = +13.55^\circ$ (C = 2.0, CHCl₃). R_f : 0.60 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ : 5.43-5.38 (m, 1H, **3**), 4.51 et 4.45 (2 x d, 1H, $J = 7.0$ Hz, **2**), 4.21-4.10 (m, 2H, **7**), 3.66-3.42 (m, 2H, **5**), 2.16-2.04 (m, 2H, **4**), 2.00 (s, 3H, **15**), 1.43 et 1.37 (2 x s, 9H, **11**, **12** et **13**), 1.23-1.21 (m, 3H, **8**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 169.5 (**14**), 166.8 (**6**), 157.1 (**9**), 80.6 (**10**), 73.1 (**3**), 72.4 (**2**), 61.3 et 61.2 (**7**), 44.3 et 43.7 (**5**), 30.2 et 29.2 (**4**), 28.6 et 28.4 (**11**, **12** et **13**), 21.0 (**15**), 14.6 (**8**). IR (NaCl): 2954 (élongations C-H aliphatiques), 1755 et 1694 (élongations C=O), 1407 et 1231 (élongation C-O). HRMS (IC): $[M + H]^+$ 302.1603, expérimental 302.1613.

Analyse HPLC-chirale

A) Méthode expérimentale

Injecteur : automatique
 Colonne : Chiracel OD-H
 Détecteur : UV / visible
 Longueur d'onde : 200 nm
 Phase mobile : Hexane / Isopropanol = 95 / 5
 Débit : 0.8 ml/min

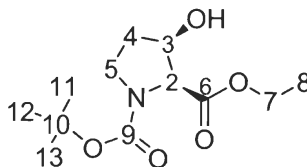
B) Résultats expérimentaux

Temps de rétention des énantiomères ($2R,3S$)($t_{r(2R,3S)}$) et ($2S,3R$)($t_{r(2S,3R)}$), aires sous la courbes respectives ($A_{(2R,3S)}$ et $A_{(2S,3R)}$) et excès énantiomères mesurés (ee) pour l'analyse en chromatographie liquide à haute performance en phase chirale des mélanges racémiques (\pm)-**52** et (\pm)-**49** ainsi que pour les produits d'acylation enzymatique ($2S,3R$)-**49**, ($2S,3R$)-**52** et ($2R,3S$)-**49**.

Composé et lipase	$t_{r(2R,3S)}$ (min)	$A_{(2R,3S)}$	$t_{r(2S,3R)}$ (min)	$A_{(2S,3R)}$	ee (%)
(\pm)- <i>cis</i> - 52	9.7	6420	9.7	6420	indéterminé
(\pm)- <i>cis</i> - 49	16.1	2305	18.9	2349	~0
PCL					
($2S,3R$)- 52	-	-	-	-	>99*
($2S,3R$)- 49	16.4	56	19.1	2673	>99
($2R,3S$)- 49	16.0	3514	18.9	0.1	95.9
CAL-B					
($2S,3R$)- 52	-	-	-	-	>99*
($2S,3R$)- 49	16.2	2021	19.0	0.1	>99
($2R,3S$)- 49	16.2	334	18.4	6669	90.5
PPL					
($2S,3R$)- 52	-	-	-	-	>99*
($2S,3R$)- 49	16.2	1693	18.8	0.01	>99
($2R,3S$)- 49	16.2	1694	18.6	3939	39.8
CRL					
($2S,3R$)- 52	-	-	-	-	>99*
($2S,3R$)- 49	16.1	1512	18.9	0.01	>99
($2R,3S$)- 49	16.1	753	18.9	3873	67.4
CCL					
($2S,3R$)- 52	-	-	-	-	>99*
($2S,3R$)- 49	16.2	1182	19.0	0.01	>99
($2R,3S$)- 49	16.1	2207	18.9	2931	14.1

*déterminé par analyse du produit d'hydrolyse chimique ($2S,3R$)-**49**

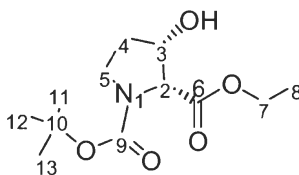
**5.4.4.2 (2*S*,3*R*)-1-*Tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate((-)-
(2*S*,3*R*)-49)**



(-)-(2*S*,3*R*)-49

L'acétate (+)-(2*S*,3*R*)-52 (51 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq) a été dissous dans une solution de 5 ml d'éthanol à laquelle 35 mg de K₂CO₃ (0.26 mmol, 1.5 eq) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été laissé sous agitation magnétique pendant 2 heures et a été repris avec 20 ml d'eau déminéralisée. L'alcool résultant a été extrait de la phase aqueuse avec 3 portions de 25 ml de dichlorométhane et les extraits combinés ont été lavés avec 3 portions d'eau déminéralisée (3 x 25 ml). La phase organique a été séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite afin de générer l'alcool (-)-(2*S*,3*R*)-49²⁵⁵ sous forme d'huile translucide (35 mg, 80%). $[\alpha]_D^{22} = -23.2^\circ$ (C = 1.35, CH₂Cl₂). ee: 99%. R_f: 0.33 (Hexanes : AcOEt, 50 : 50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir 5.4.2.1. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir 5.4.2.1. IR (NaCl): voir 5.4.2.1.

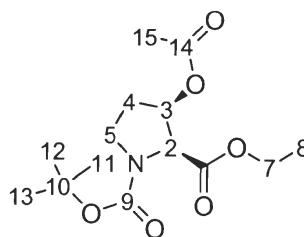
**5.4.4.3 (2*R*,3*S*)-1-*Tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate ((+)-(2*R*,
3*S*)-49)**



(+)-(2*R*,3*S*)-49

(voir 5.4.4.1 pour mode opératoire) Aspect: huile translucide. Rendement: 47%. Formule brute: C₁₂H₂₁NO₅. Masse molaire: 259.30 g/mol. $[\alpha]_D^{22} = +32.8^\circ$ (C = 1.17, CH₂Cl₂) (litt.²⁵⁰ $[\alpha]_D^{25} = +19.0^\circ$ (C = 1.21, CH₂Cl₂)). R_f: 0.33 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir 5.4.2.1. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir 5.4.2.1. IR (NaCl): voir 5.4.2.1.

5.4.4.4 *Cis*-(±)-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-acétoxy pyrrolidine-1,2-dicarboxylate ((±)-*cis*-52)

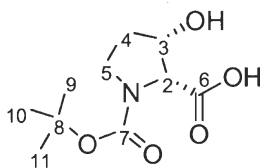


(±)-*cis*-52

L'alcool (±)-*cis*-49 (30 mg, 0.12 mmol, 1 eq) a été dissous avec 3 ml de CH₂Cl₂ anhydre dans un ballon muni d'un septum qui a été préalablement chauffé sous courant continu d'argon sec et agitation magnétique. Le ballon a été par la suite refroidi à 0-5°C à l'aide d'un bain eau-glace sous atmosphère inerte. Un volume de 8.3 µl de Et₃N anhydre (0.13 mmol, 1.1 eq) a été ajouté avant d'enlever le courant d'argon sec. Le chlorure d'acétyle a été finalement ajouté lentement. Le milieu réactionnel a été ramené à température pièce et l'avancement de la réaction a été suivi par CCM (R_f(±)-*cis*-52 : 0.60, R_f(±)-*cis*-49 : 0.33, éluant 50% Hexane/50% AcOEt) jusqu'à disparition complète de l'alcool de départ (±)-*cis*-49. Après un période de 24 heures, la réaction a été arrêtée en lavant la phase organique avec trois portions d'eau déminéralisée avant d'être séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le produit résiduel a été purifié par chromatographie éclair en employant un mélange composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle en proportions équivalentes (50:50), pour générer l'acétate (±)-*cis*-52 sous forme d'huile translucide (29 mg, quantitatif). Formule brute: C₁₄H₂₃NO₆. Masse molaire: 301.34 g/mol. R_f: 0.33 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir 5.4.4.1. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir 5.4.4.1. IR (NaCl): voir 5.4.4.1.

5.4.4.5 L'acide 2-carboxylique (2*R*,3*S*)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-hydroxypyrrolidine

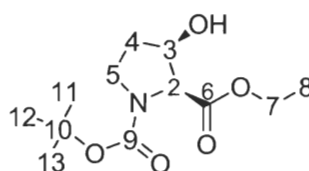
((+)-(2*R*,3*S*)-50)



(+)-(2*R*,3*S*)-50

Dans un vial de 2 ml, l'ester (\pm)-**49** (100 mg, 0.39 mmol) a été émulsifié dans 2 ml d'eau déminéralisé par agitation magnétique vigoureuse. La réaction a été démarrée par l'ajout de 30 mg de l'estérase de foie de porc (PLE) et le pH a été maintenu à 7.5 par l'ajout de NaOH 1N tout au long de la réaction. L'avancement de la réaction a été suivi par CCM ($R_{f(\pm)\text{-49}}$: 0.77, $R_{f(+)\text{-50}}$: 0.34, éluant 70% AcOEt/30% MeOH). La réaction a été arrêtée après une période de 6 jours, par l'extraction de l'acide avec du CH_2Cl_2 (3 x 75 ml). La phase organique a alors été séchée sur MgSO_4 , filtrée puis concentrée sous pression réduite. L'huile obtenue a été purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice (AcOEt:MeOH, 90:10) pour générer l'acide (+)-(2*R*,3*S*)-**50** sous forme d'un solide blanc (17 mg, 20%).
 Formule brut: $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_5$. Masse molaire: 231.25 g/mol. P $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +70.8^\circ$ (C = 1.17, CH_2Cl_2), (litt.²⁵² : $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = +100.3^\circ$ (C = 1.4, CH_2Cl_2)). ee: 71%. Rf: 0.34 (MeOH:AcOEt, 30:70). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 7.63 (large s, 2H, OH et COOH), 4.72-4.56 (m, 1H, **3**), 4.44-4.28 (m, 1H, **5**), 3.68-3.42 (m, 2H, **2**), 2.10-1.95 (m, 2H, **4**), 1.45 et 1.41 (2 x s, 9H, **11**, **12** et **13**). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 174.3 et 173.5 (**6**), 156.0 et 154.7 (**7**), 81.5 et 81.1 (**8**), 72.7 et 71.5 (**3**), 64.7 et 63.5 (**2**), 45.1 et 44.4 (**5**), 32.5 (**4**), 28.5 et 27.2 (**9**, **10** et **11**). IR (NaCl): 3427 (élongations O-H), 2977 (élongations C-H aliphatiques), 1711 (élongations C=O), 1407 et 1359 (élongation C-O), 1158 (élongation C-N).

5.4.4.6 (2*R*,3*S*)-1-Tert-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate((-)-(2*S*,3*R*)-49**)**

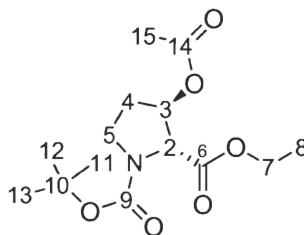


(-)-(2*S*,3*R*)-49****

(voir **5.4.4.5** pour mode opératoire) Aspect: huile translucide. Rendement: 80%. Formule brute: $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_5$. Masse molaire: 259.30 g/mol. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -6.4^\circ$ (C = 1.35, CH_2Cl_2). ee: 29 % (évalué par HPLC selon le mode opératoire **5.4.4.1**). Rf: 0.33 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ^1H (CDCl_3) δ : voir **5.4.2.1**. RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : voir **5.4.2.1**. IR (NaCl): voir **5.4.2.1**.

5.4.5 Dédoublage cinétique du *trans*-(±)-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate par acylation et hydrolyse enzymatique

5.4.5.1 (2*R*,3*R*)-1-*Tert*-butyl 2-éthyl 3-acétoxy pyrrolidine-1,2-dicarboxylate ((2*R*,3*R*)-(-)-52)



(-)-(2*R*,3*R*)-52

Dans un ballon de 10 ml, l'alcool (±)-*trans*-49 (120 mg, 0.40 mmol) a été dissous dans 5 ml d'acétate de vinyle sous agitation magnétique et 50 mg de tamis moléculaire ont été ajoutés. L'acylation enzymatique a été démarrée par l'ajout de 50 mg de la lipase de *Candida antarctica* (CAL-B). L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie gazeuse en phase chirale et l'arrêt de la réaction s'est effectué par filtration du mélange réactionnel sur verre fritté. L'acétate de vinyle a été évaporé sous pression réduite pour générer l'acétate (-)-(2*R*,3*R*)-52 et l'alcool résiduel (-)-(2*S*,3*S*)-49. Le mélange a été analysé par chromatographie gazeuse en phase chirale. L'alcool (-)-(2*S*,3*S*)-49 (2.34 g, 9.1 mmol, 47%) (voir 5.4.5.1) et l'acétate (-)-(2*R*,3*R*)-52 (2.38g, 8.0 mmol, 41%) ont été récupérés purs sous forme d'huiles translucides par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant un éluant composé d'hexanes et d'acétate d'éthyle (75:25). Formule brute: C₁₄H₂₃NO₆. Masse molaire: 301.34 g/mol. $[\alpha]_D^{25} = -9.88^\circ$ (C = 0.85, CHCl₃). ee: 31%. R_f : 0.47 (Hexanes:AcOEt, 70:30). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 5.29-5.25 (m, 1H, 3), 4.35 et 4.22 (2 x s, 1H, 2), 4.27-4.13 (m, 2H, 7), 3.75-3.58 (m, 2H, 5), 2.25-1.93 (m, 2H, 4), 2.08 (s, 3H, 15), 1.47 et 1.41 (2 x s, 9H, 11, 12 et 13), 1.32-1.22 (m, 3H, 8). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 171.1 (14), 170.5 (6), 158.2 (9), 80.6 (10), 76.8 et 75.8 (3), 65.6 et 65.2 (2), 61.9 et 61.8 (7), 44.7 et 44.5 (5), 30.7 et 29.9 (4), 28.6 et 28.5 (11, 12 et 13), 21.3 (15), 14.5 et 14.3 (8). IR (NaCl): 2989 (élongations C-H aliphatiques), 1748 et 1706 (élongations C=O), 1398 et 1234 (élongation C-O). HRMS (IE) : [M + H]⁺ 302.1603, expérimental 302.1613.

Pour des fins d'analyse, le (-)-(2*R*,3*R*)-52 a été hydrolysé en (+)-(2*R*,3*R*)-49 selon le mode opératoire 5.4.4.2.

Analyse GC-chiraleA) Méthode expérimentale

Injecteur :	manuel
température :	225°C
solution d'injection :	V = 2 µl, C = 10 mg/ml CH ₂ Cl ₂
Colonne chirale :	Astec (B-DM 120)
dimension :	30 m x 0.25mm
température :	140°C
débit :	2.5 ml/min
Détecteur :	FID
température :	250°C

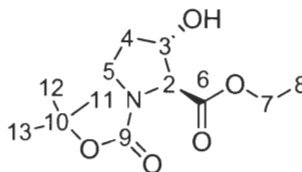
B) Résultats expérimentaux

Temps de rétention des énantiomères (2*R*,3*R*)(*t*_(2*R*,3*R*)) et (2*S*,3*S*)(*t*_(2*S*,3*S*)), aires sous la courbes respectives (*A*_(2*R*,3*R*) et *A*_(2*S*,3*S*)) et excès énantiomères mesurés (ee) pour l'analyse en chromatographie gazeuse en phase chirale des mélanges racémiques (±)-*trans*-**52** et (±)-*trans*-**49** ainsi que pour les produits de l'acylation enzymatique (2*R*,3*R*)-**49** et (2*S*,3*S*)-**49**.

Composé	<i>t</i> _(2<i>R</i>,3<i>R</i>) (min)	<i>A</i> _(2<i>R</i>,3<i>R</i>)	<i>t</i> _(2<i>S</i>,3<i>S</i>) (min)	<i>A</i> _(2<i>S</i>,3<i>S</i>)	ee (%)
(±)- <i>trans</i> - 52	39.4	47.4	40.0	48.2	0.8
(±)- <i>trans</i> - 49	52.4	70.9	55.9	71.0	0.1
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)- 52	-	-	-	-	30.5*
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)- 49	39.3	37.5	40.0	20.0	30.5
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)- 49	52.4	66.4	55.9	80.3	9.5

*déterminé par analyse du produit d'hydrolyse chimique (2*R*,3*R*)-**49**

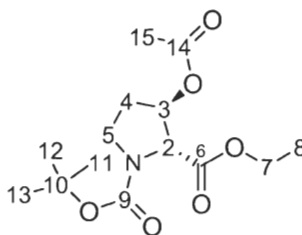
5.4.5.2 (2*S*,3*S*)-1-*Tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate ((-)-(2*S*,3*S*)-49)



(-)-(2*S*,3*S*)-49

(voir 5.4.5.1 pour mode opératoire) Aspect: huile translucide. Rendement: 47%. Formule brute: C₁₂H₂₁NO₅. Masse molaire: 259.30 g/mol. $[\alpha]_D^{25} = -2.45^\circ$ (C = 1.4, CH₂Cl₂). ee: 8%. $R_{f\text{trans}}$: 0.37 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir 5.4.3.2. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir 5.4.3.2. IR (NaCl): voir 5.4.3.2.

5.4.5.3 *Trans*-(±)-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-acétoxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate ((±)-52)

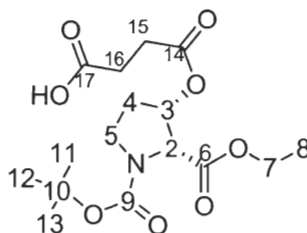


(±)-*trans*-52

(voir 5.4.4.4 pour mode opératoire) L'alcool *cis*-(±)-49 a été remplacé par l'alcool (±)-*trans*-47. Aspect: huile translucide. Rendement: 92%. Formule brute: C₁₄H₂₃NO₆. Masse molaire: 301.34 g/mol. $R_{f\text{trans}}$: 0.51 (Hexanes:AcOEt, 70:30). RMN ¹H (CDCl₃) δ: voir 5.4.4.5. RMN ¹³C (CDCl₃) δ: voir 5.4.4.5. IR (NaCl): voir 5.4.4.5.

5.4.6 Préparation du (2*R*,3*S*)-1-*tert*-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate

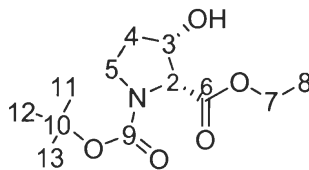
5.4.6.1 L'acide 4-((2*R*,3*S*)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-2-(éthoxycarbonyl)pyrrolidin-3-yloxy)- 4-oxobutanoïque ((+)-(2*R*,3*S*)-53)



(+)-(2*R*,3*S*)-53

Le mélange (2.76 g, 95:5) d'alcool (+)-(2*R*,3*S*)-49 et d'acétate (+)-(2*R*,3*S*)-53 a été dissous dans 50 ml de CH₂Cl₂. Ensuite, l'anhydride succinique (1,18 g, 11.79 mmol, 1.1 eq) a été ajouté, suivi du DMAP (130 mg, 1.06 mmol) et de 1.64 ml de triéthylamine (1.19 g, 11.78 mmol, 1.1 eq). Le mélange a été agité pendant 36 heures. La réaction a été arrêtée par l'extraction de l'acide (+)-(2*R*,3*S*)-53 avec 3 portions de NaOH 1N (3 x 100ml). Les extraits ont été combinés et acidifiés avec du HCl pour ensuite être extraits avec 7 portions de CH₂Cl₂ (7 x 100ml). Les extraits organiques ont été séchés sur MgSO₄, filtrés et évaporés ou pression réduite pour générer l'acide (+)-(2*R*,3*S*)-53 sous forme d'huile translucide (2.36 g, 90%). Formule brute: C₁₆H₂₅NO₈. Masse molaire: 359.37 g/mol. [α]_D²⁵ = -2.45° (C = 1.4, CH₂Cl₂). R_f: 0.00-0.48 (Hexanes:AcOEt, 25:75). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 5.50-5.47 (m, 1H, **3**), 4.49 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, **2**), 4.21-4.12 (m, 2H, **7**), 3.53-3.47 (m, 2H, **5**), 2.56-2.49 (m, 4H, **15** et **16**), 2.18-2.01 (m, 2H, **4**), 1.43 et 1.38 (2 x s, 9H, **11**, **12** et **13**), 1.27-1.22 (m, 3H, **8**). RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 174.4 (**17**), 171.7 (**14**), 165.9 et 165.6 (**6**), 154.9 et 154.5 (**9**), 80.7 (**10**), 73.7 et 72.9 (**3**), 62.0 et 61.7 (**2**), 61.3 (**7**), 44.3 et 43.8 (**5**), 30.0 et 29.3 (**4**), 28.8 (**16**), 28.3 (**15**), 27.5 et 27.3 (**11**, **12** et **13**), 13.5 et 13.4 (**8**). IR (NaCl): 3427 (élongations O-H), 2983 (élongations C-H aliphatiques), 1705 et 1651 (élongations C=O), 1389 (élongation C-O), 1140 (élongation C-N). LRMS (ESI) : 382.1 [M + Na]⁺.

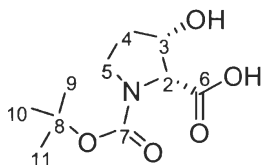
5.4.6.2 (2R,3S)-1-Tert-butyl 2-éthyl 3-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate((2R, 3S)-49)



(+)-(2R,3S)-49

(voir mode opératoire 5.4.4.2) Aspect: huile translucide. (1.62 g , 95%). Formule brute: $C_{12}H_{21}NO_5$. Masse molaire: 259.30 g/mol. $[\alpha]_D^{22} = +20.21^\circ$ (C = 1.65, $CHCl_3$). ee: 98% (évalué par HPLC selon le mode opératoire 5.4.2.1). Rf: 0.33 (Hexanes:AcOEt, 50:50). RMN 1H ($CDCl_3$) δ : voir 5.4.2.1. RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : voir 5.4.2.1. IR (NaCl): voir 5.4.2.1.

5.4.6.3 L'acide 2-carboxylique (2R,3S)-1-(tert-butoxycarbonyl)-3-hydroxypyrrolidine ((+)-(2R,3S)-50)



(+)-(2R,3S)-50

(voir mode opératoire 5.4.3.3). Aspect: solide blanc. (1.334 g, 87%). Formule brut: $C_{10}H_{17}NO_5$. Masse molaire: 231.25 g/mol. P_f: 101-102°C. $[\alpha]_D^{22} = +106.5^\circ$ (C = 1.0, CH_2Cl_2) (litt.²⁵² $[\alpha]_D^{22} = +100.3^\circ$ (C = 1.4, CH_2Cl_2)). Rf: 0.34 (MeOH:AcOEt, 30:70). RMN 1H ($CDCl_3$) δ : voir 5.4.4.5. RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ : voir 5.4.4.5. IR (NaCl): voir 5.4.4.5.

Bibliographie

1. Faber, K.; Kroutil, W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 181.
2. Abramowicz, D. A. *Biocatalysis*; Van Nostrand Reinhold, **1990**.
3. Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R.J. *Hydrolases in Organic Synthesis*; Wiley-VCH, **1999**.
4. Drauz, K.; Waldmann, H. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*; Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
5. Bommarius, A. S.; Riebel, B.R. *Biocatalysis*; Wiley-VCH, **2004**.
6. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5th ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2004**.
7. Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1071.
8. Koeller, K. M.; Wong, C.-H. *Nature* **2001**, *409*, 232.
9. Kazlauskas, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2727.
10. Hauer, B.; Roberts, S.M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 103.
11. Yagasaki, M.; Ozaki, A. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **1998**, *4*, 1.
12. Rozzell, J. D. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2253.
13. Sime, J. T. *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 1658.
14. Wandrey, C.; Liese, A.; Kihumbu, D. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4*, 289.
15. Zaks, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 130.
16. Schimd, A.; Dordick, J.S.; Haeur, A.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature* **2001**, *409*, 258.
17. Thomas, S. M.; DiCosimo, R.; Nagarajan, V. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 238.
18. Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M.G. *Catal.* **2003**, *299*, 1694.
19. Shaw, N. M.; Robins, K.T.; Kiener, A. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 425.
20. Ikunaka, M. *Catal. Today* **2004**, *96*, 93.
21. Gerhartz, W. *Enzymes in Industry - Production and Applications*; VCH Publishers: New York, **1990**.
22. Godfrey, T.; West, S.I. *Industrial Enzymology*, 2nd ed.; Stockton Press, **1996**.
23. Zaks, A.; Dodds, D.R. *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 513.
24. Yazbeck, D. R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2757.
25. Patel, R. N. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 587.
26. Patel, R. N. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 527.
27. Johnson, C. R.; Yanping, X. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3291.
28. Hauer, B.; Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Kebeler, M.; Stürmer, R.; Zelinski, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 788.
29. Liese, A.; Villela Filho, M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 595.
30. Wubbolts, M. G.; Schulze, B. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 609.
31. Blaser, H. U.; Spindler, F.; Studer, M. *App. Cat. A: General* **2001**, *221*, 119.
32. Straathof, A. J.; Panke, S.; Schimd, A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548.
33. Wubbolts, M.; Held, M.; Panke, S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 272.
34. Kazlauskas, R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 195.
35. Davis, B. G.; Boyer, V. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 618.
36. Davis, B. G. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. B, Org. Chem.* **2002**, *98*, 91.
37. Chênevert, R.; Pelchat, N.; Jacques, F. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1067.

38. Csuk, R. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 49.
39. May, S. W. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 370.
40. Stewart, J. D. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 363.
41. Leonida, M. D. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 345.
42. Kadereit, D., Waldmann, H. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3367.
43. Holland, H. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 22.
44. Holland, H. L.; Weber, H.K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *11*, 547.
45. Schnell, B.; Faber, K.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 653.
46. Drauz, K.; Waldmann, H. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*; Wiley-VCH; Weinheim, **2002**; Vol. 1; pp. 6.
47. Bornscheuer, U. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 3336.
48. Cao, L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 217.
49. Roy, J.J.; Abraham, T.E. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3705.
50. *Enzyme nomenclature*; IUB-Academic Press: Amsterdam, **1992**.
51. Schomburg, D.; Schomburg, I. *Enzyme Handbook*, 2nd ed.; Springer: New York, **2001**.
52. Purich, D. L.; Allison, R.D. *The enzyme reference: a comprehensive guidebook to enzyme nomenclature*; Academic Press: Amsterdam, **2002**.
53. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2004**; pp. 22.
54. Barnett, J. A.; Payne, R.W.; Yarrow D. *Yeast: Characteristics and Identification*, 2nd ed.; Cambridge University Press: New York, **1990**.
55. Reetz, M. T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 145.
56. Lloyd, R. C.; Lloyd, M.C.; Smith, M.E.B.; Holt, K.E.; Swift, J.P.; Keene, P.A.; Taylor, S.J.C.; McCague, R. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 717.
57. Carrea, G.; Riva, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 2226.
58. Theil, F. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2905.
59. Rantwijk, F. V.; Hacking, M.A.P.J.; Sheldon, R.A. *Monatsh. Chem.* **2000**, *131*, 549.
60. Theil, F. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2203.
61. Ghanem, A.; Aboul-Enein, H.Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3331.
62. Ghanem, A.; Aboul-Enein, H.Y. *Chirality* **2005**, *17*, 1.
63. Schimid, R. D.; Verger, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608.
64. Klibanov, A. M. *Nature* **2001**, *409*, 241.
65. Prelog, V. *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119.
66. Cohen, S. G. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* **1969**, *31*, 705.
67. Schubert-Wright, C. *J. Mol. Biol.* **1972**, *67*, 151.
68. Ema, T.; Okada, R.; Fukumoto, M.; Jittani, M.; Ishida, M.; Furuie, K.; Yamaguchi, K.; Sakai, T.; Utaka, M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4367.
69. Ema, T. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2003**, *22*, 181.
70. Toone, E. J.; Werth, M.J.; Jones, J.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4946.
71. Provencher, L.; Wynn, H.; Jones, J.B. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 2025.
72. Provencher, L.; Jones, J.B. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2729.
73. Hultin, P. G.; Jones, J.B. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1399.
74. Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A.N.E.; Rappaport, A.T.; Cuccia, L.A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656.
75. Ahmed, S. N.; Kazlauskas, R.J.; Morinville, A.H.; Grochulski, P.; Schrag, J.D.; Cygler, M. *Biocatalysis* **1994**, *9*, 209.

76. Grochulski, P.; Bouthillier, F.; Kazlauskas, R.J.; Serreqi, A.N.; Schrag, J.D.; Ziomek, E.; Cygler, M. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3494.
77. Franssen, M. R. C.; Jongejan, H.; Kooijman, H.; Spek, A.L.; Camacho Mondril, N.L.F.L.; Boavida dos Santos, P.M.A.C.; de Groot, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 497.
78. Uppenberg, J.; Hansen, M.T.; Patkar, S.; Jones, T.A. *Structure* **1994**, *2*, 293.
79. Lutz, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2743.
80. Naemura, K.; Fukuda, R.; Murata, M.; Konishi, M.; Hirose, K.; Tobe, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2385.
81. Weissfloch, A. N. E.; Kazlauskas, R. J. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6959.
82. Theil, F.; Lemke, M.; Lemke, K. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6268.
83. Tuomi, W. V.; Kazlauskas, R.J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2638.
84. Faber, K.; Griengl, H.; Hoenig, H.; Zuegg, J. *Biocatalysis* **1994**, *9*, 227.
85. Schrag, J. D.; Cygler, M. *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 575.
86. Brady, L.; Brzozowski, A.M.; Derewenda, Z.S.; Dodson, E.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turnkenberg, J.P.; Christiansen, L.; Hugel-Jensen, B.; Norskov, L.; Thim, L.; Menge, V. *Nature* **1990**, *343*, 767.
87. Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R.J.; *Hydrolases in Organic Synthesis*; Wiley-VCH, **1999**; pp. 88.
88. Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R.J.; Schrag, J.D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreqi, A.N.; Gupta, A.K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180.
89. Mohr, P.; Waespe-Sarcevic, N.; Tamm, C.; Gawronski, J.K.; *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 2501.
90. Hirose, Y.; Kariya, K.; Sasaki, I.; Kurono, Y.; Ebiike, H.; Achiwa, K. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7157.
91. Klibanov, A. M.; Fitzpatrick, P.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3166.
92. Rubio, E.; Fernandez-Mayorales, A.; Klibanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 695.
93. Hanefeld, U. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2405.
94. Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294.
95. Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812.
96. Sih, C. J.; Wu, S.-H. Resolution of enantiomers via biocatalysis. In *Topics in stereochemistry*; Eliel, E.L., W., S.H. Ed.; John Wiley and Sons: New York, **1989**; Vol. 19; pp. 63.
97. Ward, R. S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1475.
98. Huerta, F. F.; Minidis, A.B.E.; Backvall, J.-E. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 321.
99. Faber, K. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5005.
100. Pellissier, H. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8291.
101. Turner, N. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 114.
102. Pamies, O.; Backvall, J.-E. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 130.
103. Ebbers, E. J.; Ariaans, G.J.A.; Houbiers, J.P.M.; Bruggink, A.; Zwanenburg, B. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9417.
104. Schoffers, E.; Golebiowaki, A.; Johnson, C.R. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3769.
105. Gotor, V.; Garcia-Urdiales, E.; Ignacio, A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313.
106. Garner, P. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 5855.

107. Garner, P.; Park, J.M. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2361.
108. Garner, P.; Park, J.M. *Org. Synth.* **1991**, *70*, 18.
109. Mckillop, A.; Taylor, R.J.K.; Watson, R.J.; Lewis N. *Synthesis* **1994**, 31.
110. Roush, W. R.; Hunt, J.A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 798.
111. Dondoni, A.; Peronne, D.; Merino, P. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 8074.
112. Meffre, P.; Durand, P.; Branquet, E.; LeGoffic, F. *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 2147.
113. Dondoni, A.; Peronne, D. *Synthesis* **1997**, 527.
114. Avenoza, A.; Cativiela, C.; Corzana, F.; Peregrina, J.M.; Zurbano, M.M. *Synthesis* **1997**, 1146.
115. Ohfuné, Y.; Kurokawa, N. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1071.
116. Datta, A.; Kumar, J.S.R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6779.
117. Avenoza, A.; Cativiela, C.; Peregrina, J.M.; Zurbano, M.M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1555.
118. Mori, K.; Muto, S.; Takikawa, H. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3141.
119. Garner, P.; Yoo, J.U.; Sarabu, R.; Kennedy, V.O.; Youngs, W.J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9303.
120. Datta, A.; Kumar, J.S.R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 473.
121. Ageno, G.; Banfi, L.; Cascio, G.; Guanti, G.; Manghisi, E.; Riva, R.; Rocca, V. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8121.
122. Avenoza, A.; Cativiela, C.; Corzana, F.; Peregrina, J.M.; Zurbano, M.M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8220.
123. Hatekayama, S.; Matsumoto, H.; Fukuyama, H.; Makugi, Y.; Irie, H. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2275.
124. Avenoza, A.; Cativiela, C.; Corzana, F.; Peregrina, J.M.; Sucunza, D.; Zurbano, M.M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 949.
125. Nishi, T.; Takemoto, T.; Iio, Y.; Tsuji, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3139.
126. Avenoza, A.; Cativiela, C.; Corzana, F.; Peregrina, J.M.; Zurbano, M.M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2195.
127. Avenoza, A.; Cativiela, C.; Peregrina, J.M.; Sucunza, D.; Zurbano, M.M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 4653.
128. Williams, J. M. J.; Neri, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2197.
129. Williams, J. M. J.; Neri, C. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 835.
130. Wirz, B.; Barner, R.; Hübscher, J. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3980.
131. Chaouni-Benabdallah, A.; Subra, G.; Bonnet, P.A.; Fernandez, J.P.; Chapat, J.P. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 12923.
132. Higashio, Y.; Shoji, T. *App. Cat. A: General* **2004**, *260*, 251.
133. Pinder, A. R. *Nat. Prod. Rep.* **1987**, *4*, 527.
134. Pinder, A. R. *Nat. Prod. Rep.* **1989**, *6*, 515.
135. Pinder, A. R. *Nat. Prod. Rep.* **1992**, *9*, 17.
136. Plunkett, A. O. *Nat. Prod. Rep.* **1994**, *11*, 581.
137. Enders, D.; Thiebes, C. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 573.
138. Bates, R. W.; Sa-Ei, K. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5957.
139. Pyne, S. G.; Davis, A.S.; Gates, N.J.; Hartley, J.P.; Lindsay, K.B.; Machan, T.; Tang, M. *Synlett* **2004**, *15*, 2670.
140. Mitchinson, A.; Nadin, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **2000**, 2862.
141. Murakami, S.; Takemoto, T.; Shimizu, Z. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1953**, *73*, 1026.
142. Hanessian, S.; Ninkovic, S. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5418.

143. Morita, Y.; Tokuyama, H.; Fukuyama, T. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4337.
144. Harris, C. M.; Harris, M.T. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5685.
145. Donohue, T. J.; Sintim, H.O. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2003.
146. Donohue, T. J.; Sintim, H.O.; Hollinshead, J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7297.
147. Daly, J. W.; Edwards, M.W.; Garraffo, H.M. *Synthesis* **1994**, 1167.
148. Chênevert, R.; Dickman, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3332.
149. Fujita, T.; Hada, T.; Higashino, K. *Clin. Chim. Acta* **1999**, 287, 145.
150. Pearson, M. S. M.; Mathé-Allainmat, M.; Fargeas, V.; Lebreton, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2159.
151. Dhavale, D.D.; Matin, M.M. *ARKIVOC* **2005**, 110.
152. Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Niida, T. *J. Antibiot.* **1966**, *19*, 288.
153. Pichon, M.; Figadère, B. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 927.
154. Cignarella, G.; Nathansohn, G. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 1500.
155. Blackman, S. W.; Baltzly, R. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2750.
156. Schipper, E.; Boehme, W.R. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 3599.
157. Sturn, P. A.; Henry, D.W.; Thompson, P.E.; Zeigler, J.B.; Mc Call, J.W. *J. Med. Chem.* **1974**, *17*, 481.
158. Kemp, D.S.; Curran, T.P. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5729.
159. Kemp, D.S.; Curran, T.P.; Davis, W.M.; Boyd, J.G.; Muendel, C. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6672.
160. Shi, M.; Masaki, Y. *J. Chem. Res., Synop.* **1995**, *1*, 40.
161. Guenoun, F.; Zair, T.; Lamaty, F.; Pierrot, M.; Lazaro, R.; Viallefont, P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1563.
162. Fraenkel, G.; Duncan, J.H.; Wang, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 432.
163. Einhorn, J.; Einhorn, C.; Ratajczak, F.; Pierre, J.-L. *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 1837.
164. Willstätter, R.; Lessing, R. *Ber.* **1902**, *35*, 2066.
165. Le Seuer, H. R. *J. Chem. Soc.* **1909**, *95*, 275.
166. Ingold, C. K. *J. Chem. Soc.* **1921**, *119*, 967.
167. Braun, J. V.; Seeman, J. *Chem. Ber.* **1923**, *56B*, 1840.
168. Kurihara, M.-A.; Kamiyama, K.; Kobayashi, K.; Ohno, M. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 5831.
169. Björkling, F.; Boutelje, J.; Hjalmarsson, M.; Hult, K.; Norin, T. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1041.
170. Björkling, F.; Boutelje, J.; Gatenbeck, S.; Hult, K.; Norin, T.; Szmulik, P. *Bioorg. Chem.* **1986**, *14*, 176.
171. Boutelje, J.; Hjalmarsson, M.; Hult, K.; Lindbäck, M.; Norin, T. *Bioorg. Chem.* **1988**, *16*, 364.
172. Colombo, L.; Di Giacomo, M.; Belvisi, L.; Manzoni, L.; Scolastico, C. *Gazz. Chim. Ital.* **1996**, *126*, 543.
173. Morimoto, Y.; Terao, Y.; Achiwa, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 2266.
174. Sibi, M. P.; Lu, J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4915.
175. Kawanami, Y.; Moriya, H.; Goto, Y. *Chem. Lett.* **1994**, 1161.
176. Kawanami, Y.; Moriya, H.; Goto, Y.; Tsukao, K.; Hashimoto, M. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 565.
177. Kawanami, Y.; Iizuna, N.; Maekawa, K.; Maekawa, K.; Takahashi, N.; Kawada, T. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3349.

178. Donohoe, T. J. R., C.L.; Thomas, R.E.; Nieuwenhuys, W.F.; Bhatti, F.L.; Cowley, A.R.; Bhalay, G.; Linney, I.D. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6298.
179. Shi, M.; Satoh, Y.; Makihara, T.; Masaki, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2109.
180. Shi, M.; Satoh, Y.; Masaki, Y. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1998**, 2547.
181. Kawanami, Y.; Ito, Y.; Kitagawa, T.; Taniguchi, Y.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 857.
182. Aggarwal, V. K.; Sandrinelli, F.; Charmant, J.P.H. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 87-93.
183. Baliah, V.; Jeyaraman, R.; Chandrasekaran, L. *Chem. Rev.* **1983**, *83*, 379.
184. Bailey, P.D.; Millwood, P.A.; Smith, P.D. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1998**, 633.
185. Laschat, S.; Dickner, T. *Synthesis* **2000**, 1781.
186. Weintraub, P. M.; Sabol, J.S.; Kane, J.M.; Borcherdig, D.R. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2953.
187. Buffat, M.G.P. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1701.
188. Adkins, H.; Kuick, L.F.; Farlow, M.; Wojcik, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 2425.
189. Chênevert, R.; Dickman, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 1021.
190. Chênevert, R.; Dickman, M.; Morin, M.P. *Preparative Biotransformations* **1995**, 16.
191. Chênevert, R.; Ziarani, G.M.; Morin, M.P., Dasser, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 3117.
192. Persson, B.A.; Huerta, F.F.; Bäckvall, J.-E. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5237.
193. Watanabe, L. A.; Haranaka, S.; Jose, B.; Yoshida, M.; Kato, T.; Moriguchi, M.; Soda, K.; Nishino, N. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 903.
194. Hou, D.-R.; Hung, S.-Y.; Hu, C.-C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3858.
195. Germann, U.A.; Shlyakhter, D.; Mason, V.S.; Zelle, R.E.; Duffy, J.P.; Galullo, V.; Armistead, D.M.; Saunders, J.O.; Boger, J.; Harding, M.W. *Anticancer Drugs* **1997**, *8*, 125.
196. Tanaka, H.; Kuroda, A.; Marusawa, H.; Hatanaka, H.; Kino, T.; Goto, T.; Hashimoto, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5031.
197. Adger, B.; Dyer, U.; Hutton, G.; Woods, M. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6399.
198. Cheong, P.H.-Y.; Zhang, H.; Thayumanavan, R.; Tanaka, F.; Houk, K.N.; Barbas III, C.F. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 811.
199. Chênevert, R.; Morin, M.P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2161.
200. Chênevert, R.; Morin, M.P. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3178.
201. Chênevert, R.; Jacques, F.; Giguère, P.; Dasser, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1333.
202. Andrés, J.M.; Herraiz, I.; Pedrosa, R.; Pérez-Encabo, A. *Synlett* **2004**, 2016.
203. Ogle, J.D.; Arlinghaus, R.B.; Logan, M.A. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1961**, *94*, 85.
204. Ogle, J. D.; Arlinghaus, R.B.; Logan, M.A. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 117.
205. Irreverre, F.; Morita, K.; Robertson, A.V.; Witkop, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1962**, *8*, 453.
206. Irreverre, F.; Morita, K.; Robertson, A.V.; Witkop, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2824.

207. Tschesche, R.; Samuel, T.D.; Uhlendorf, J.; Fehlhaber, H.W. *Chem. Ber.* **1972**, *105*, 3106.
208. Seehan, J.C.; Withney, J.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 3980.
209. Seehan, J.C.; Withney, J.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3863.
210. Seehan, J.C.; Mania, D.; Nakamura, S.; Stock, J.A.; Maeda, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 462.
211. Kumar, N. G.; Urry, D.W. *Biochemistry* **1973**, *12*, 4392.
212. Shibasaki, T.; Mori, H.; Ozaki, A. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2000**, *64*, 746.
213. Chakraborty, T. K.; Srinivasu, P.; Vengal Rao, R.; Kumar, S.K.; Kunwar, A.C. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7399.
214. Taylor, C. M.; Hardré, R.; Edwards, P.J.B. *J. Org. Chem.* **2004**, *70*, 1306.
215. Degrado, W. F. *Adv. Protein Chem.* **1988**, *39*, 51.
216. Hodges, J. A.; Raines, R.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15923.
217. Mauger, A. B. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1205.
218. Gardiner, R. A.; Rinehart, K.L.; Snyder, J.J.; Broquist, H.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5639.
219. Rinehart, K.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2879.
220. Hohenschutz, L. D.; Bell, E.A.; Jewess, P.J.; Leworthy, D.P.; Pryce, R.J.; Arnold, E.; Clardy, J. *J. Phytochem.* **1981**, *20*, 811.
221. Kankinuma, K.; Otake, N.; Yonehara, H. *Tetrahedron Lett.* **1972**, 2509.
222. Fleet, G.W.J.; Son, J.C. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2637.
223. Sardina, F. J.; Rapaport, H. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1825.
224. Nash, R. J.; Bell, E.A.; Fleet, G.W.J.; Jones, R.H.; Williams, J.M. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 738.
225. Wieland, T.; Schnabel, H.W. *Liebigs Ann. Chem.* **1962**, *657*, 225.
226. Adams, E.; Frank, L. *Ann. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 1006.
227. Mauger, A.B.; Witkop, B. *Chem. Rev.* **1966**, *66*, 47.
228. Roemmele, R.C.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1866.
229. Kubo, A.; Nakai, T.; Koizumi, Y.; Kitahara, Y.; Saito, N.; Micami, Y.; Yazawa, K.; Uno, J. *Heterocycles* **1996**, *42*, 195.
230. Durand, J.-O.; Larchevêque, M.; Petit, Y. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5743.
231. Huang, P.-Q.; Huang, H.-Y. *Synth. Commun.* **2004**, *34*, 1377.
232. Cooper, J.; Gallagher, P.T.; Knight, D.W. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1993**, 1313.
233. Jurczak, J.; Prokopowicz, P.; Golebiowski, A. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7107.
234. Dell'Uomo, N.; Di Giovanni, M.C.; Misiti, D.; Zappia, G.; Delle Monache, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 181.
235. Poupardin, O.; Greck, C.; Genêt, J.-P. *Synlett* **1998**, 1279.
236. Takahata, H.; Banba, Y.; Tajima, M.; Momose, T. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 240.
237. Steiner, A.; Wessig, P.; Polborn, K. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1843.
238. Griffart-Brunet, D.; Langlois, N. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 119.
239. Herdeis, C.; Hubmann, H.P.; Lotter, H. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 119.
240. Mulzer, M.A.; Meier, A.; Bushmann, J.; Luger, P.J. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 566.
241. Lee, J.H.; Kang, J.E.; Yang, M.S.; Kang, K.Y.; Park, K.H. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 10071.
242. Gryko, D.; Prokopowicz, P.; Jurczak, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1103.
243. Blake, J.; Willson, C.D.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5293.
244. Kuhn, R.; Osswald, K. *Ber.* **1956**, *89*, 1423.

245. Cooper, J.; Gallagher, P.T.; Knight, D.W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 509.
246. Knight, D.W.; Sibley, A.W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1997**, 2179.
247. Sibi, M. P.; Christensen, J.W. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6434.
248. St-Denis, Y.; Chan, T.H. *Can. J. Chem.* **2000**, *78*, 776.
249. Shieh, W.-R.; Gopalan, A.S.; Sih, C.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2993.
250. Williams, R.M.C.; Tsujishima, H.; Cox, R.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12172.
251. Bhide, R.; Mortezaei, R.; Scilimati, A.; Sih, C.J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4827.
252. Götschi, E.; Jenny, C.-J.; Reindl, P.; Ricklin, F. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2219.
253. Sundram, H.; Jonhson, C.R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6975.
254. Geissman, T. A.; Waiss, A.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *27*, 139.
255. Knight, D.W.; Sibley, A.W. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6607.
256. Bellettini, J. R.; Miller, M.J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 167.
257. Remuzon, P. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13803.
258. Poisson, J.-F.; Orellana, A.; Greene, A.E. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*.
259. Sibi, M. P.; Christensen, J.W.; Kim, S.-G.; Eggen, M.; Stessman, C.; Oien, L. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6209.
260. Sasaki, N.A.; Sagnard, I. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7093.
261. Knoop, C.A.; Studer, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16327.
262. Corminboeuf, O.; Renaud, P. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1735.
263. Jacobi, P.A.; Blum., C.A.; DeSimone, R.W.; Udodong, U.E.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5384.