



ENSEIGNEMENT

LES TRAVAUX PRATIQUES

Vers la synthèse d'un antibiotique peptidophosphorylé, l'Alafosfaline

Synthèse et caractérisation d'un peptide modifié incorporant un motif phosphoré C-terminal

Claude Grison*, professeur, Corinne Comoy, maître de conférence et Philippe Coutrot, professeur

Summary Synthesis of peptide analogue including a C-phosphono moiety. Synthesis of N- and O-protected Alafosfaline
In the present article, a synthesis of N- and O-protected Alafosfaline was described. The expected C-phosphonopeptide was obtained by using a very efficient reactionnal way in good yield starting from 2-dialkylphosphonopropanoic acid. Analyses of intermediates and adducts were performed and involved the use of techniques such as Infra Red and NMR ^1H , ^{13}C or ^{31}P spectroscopies, thin layer chromatography [1].

Mots-clés Alafosfaline, phosphonopeptides, synthèse d'Arbuzov, réarrangement de Curtius, couplage peptidique.
Key-words Alafosfaline, phosphonopeptides, Arbuzov reaction, Curtius rearrangement, peptidic synthesis.

Il y a quelques dizaines d'années, la découverte dans des organismes vivants de certains acides aminophosphoniques et d'oligopeptides dérivés a ouvert de nouvelles perspectives dans le développement d'agents antibactériens et d'inhibiteurs d'enzymes protéolytiques. De nombreuses recherches ont ainsi été consacrées à la préparation et à l'étude biologique de composés associant un motif phosphoré et un peptide. Parmi les phosphopeptides suscitant un fort intérêt, les phosphonopeptides C-terminaux peuvent être cités [2]. Ce sont les analogues stricts des peptides naturels où une fonction acide phosphonique remplace une entité acide carboxylique. Certains d'entre eux ont déjà conduit à des essais cliniques très intéressants : il s'agit notamment des dérivés de l'acide 1-aminoéthylphosphonique et, en particulier, de l'Alafosfaline **1** (P-Ala-Ala) (*figure 1*) [3-4].

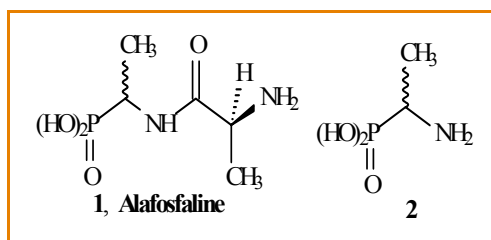
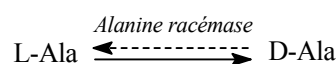


Figure 1 – L'Alafosfaline **1** et l'acide 1-aminoéthylphosphonique **2**.

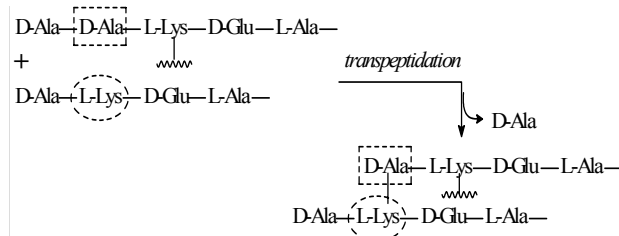
Ce dipeptide **1**, mime de Ala-Ala, est un antibiotique bloquant la biosynthèse du peptidoglycane qui est un constituant important de la paroi bactérienne. Son mécanisme d'action peut être résumé de la

façon suivante [5] : l'Alafosfaline est transportée dans la bactérie vers le cytoplasme où la liaison carboxamide est coupée pour donner l'acide 1-aminoéthylphosphonique **2** racémique (*figure 1*), analogue à la fois de D-Ala et L-Ala. Or, une bactérie qui s'accroît ou se divise utilise la L- et la D-alanine pour synthétiser du peptidoglycane. Ainsi, l'Alafosfaline est capable de bloquer cette biosynthèse en interférant avec trois étapes différentes :

- la production de D-alanine naturellement obtenue par racémisation de la L-alanine sous l'action de l'alanine racémase :



- la synthèse du dipeptide D-Ala-D-Ala nécessaire aux réactions de transpeptidation qui lient les fragments peptidiques du peptidoglycane, catalysée par la D-Ala-D-Ala synthétase :



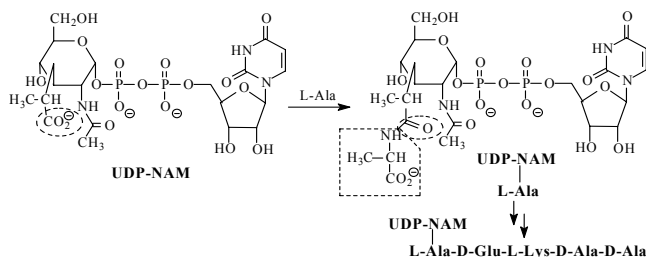
- la construction de l'UDP-N-acétylmuramyl-L-alanine qui repose sur la formation d'une liaison peptidique entre la fonction amine de L-Ala et le groupe carboxyle de l'acide N-acétylmuramique de l'UDP-NAM (uridine diphosphate-acide N-acétylmuramique). Cet aminoacide glucidique

* Laboratoire de chimie organique biomoléculaire, UMR7565, Institut Nancéen de Chimie Moléculaire, FRCNRS1742, Université Henri Poincaré, Nancy I, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex. Tél. : 03 83 91 20 33. Fax : 03 83 91 23 93.

ENSEIGNEMENT LES TRAVAUX PRATIQUES



activé est l'unité de départ pour l'élaboration de la chaîne peptidique du peptidoglycane :



Le sujet présenté ici s'adresse à des étudiants de second cycle universitaire, des élèves ingénieurs ou des étudiants préparant les concours du CAPES et l'agrégation, et s'inscrit dans le cadre du module de travaux pratiques de la maîtrise de chimie consacrés à l'initiation à la recherche qui se déroule généralement pendant deux semaines. Les procédures mises en œuvre sont issues de recherches menées par notre équipe [6]. Leur transposition en manipulations applicables en séances de travaux pratiques est particulièrement intéressante puisqu'elle permet une illustration directe des enseignements théoriques reçus par ces étudiants au cours de leur année universitaire, ainsi qu'une réelle utilisation des techniques d'analyse les plus employées en synthèse organique.

De plus, de tels sujets, liant étroitement la chimie organique à la biochimie ou la biologie (soit en permettant l'élaboration de composés possédant une activité thérapeutique comme dans le cas de l'Alafosfaline, soit en aidant à la compréhension de mécanismes biochimiques) ont l'avantage de provoquer une prise de conscience des étudiants concernant l'importance de connaissances pluridisciplinaires dans les divers domaines de la recherche appliquée.

La synthèse de l'Alafosfaline sous sa forme N- et O-protégée ici proposée est une séquence réactionnelle composée de six étapes (schéma 1).

(a) Une réaction de Michaelis-Arbuzov permet la préparation du 2-diéthylphosphonopropanoate d'éthyle **3** à partir du triéthylphosphite et du 2-bromopropanoate d'éthyle [7]. Une attention

particulière doit être apportée à cette première étape afin d'éliminer par distillation le bromoéthane au fur et à mesure de sa formation. L'avancement de la réaction peut être suivi par spectroscopie RMN ¹H ou par pesée de la quantité de bromoéthane recueilli. La manipulation du 2-bromopropanoate d'éthyle, réactif particulièrement lacrymogène, doit être effectuée avec grand soin et en respectant toutes les règles élémentaires de sécurité. Toutefois, pour éviter les désagréments d'un tel dérivé halogéné, une alternative pour la préparation de **4** peut être envisagée par une réaction de carbonatation du carbanion α-lithié de l'éthylphosphonate de diéthyle **9** [8-9] (schéma 2).

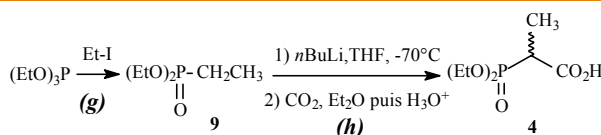


Schéma 2 - Synthèse du phosphonoacide **4**.

(b) La fonction ester carboxylique de **3** est ensuite hydrolysée chimiosélectivement pour conduire à l'acide 2-diéthylphosphonopropanoïque **4**.

(c et d) Les deux étapes suivantes de la séquence sont la transformation de l'acide **4** en chlorure d'acide **5** [10], réaction quantitative qui ne nécessite pas la purification du chlorure d'acide formé, puis en acylazide **6**, utilisant l'azoture de sodium fraîchement activé. Le suivi de ces deux réactions peut être effectué par spectroscopie IR.

(e) Un réarrangement de Curtius réalisé à partir de l'acylazide **6** se révèle l'étape clé de la synthèse puisqu'il permet l'accès, par hydrolyse de l'isocyanate intermédiaire, à l'aminophosphonate **7**, analogue phosphoré de l'alanine. La formation de l'isocyanate intermédiaire est très intéressante à suivre par spectroscopie IR.

(f) L'Alafosfaline N- et O-protégée **8** est ensuite obtenue par un couplage peptidique entre l'amine **7** et la N-Boc-L-alanine selon une procédure classique d'activation de l'acide carboxylique par le BOP (hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytris (diméthylamino)phospho-nium) [11].

La séquence de déblocage conduisant à l'Alafosfaline **1** qui peut être envisagée suivant différentes conditions opératoires (par exemple par action de bromure de triméthylsilyle au sein de méthanol [12]) n'est pas développée dans ce qui suit.

L'étude des spectres IR et RMN des différents produits obtenus au cours de cette synthèse est l'occasion de rappels

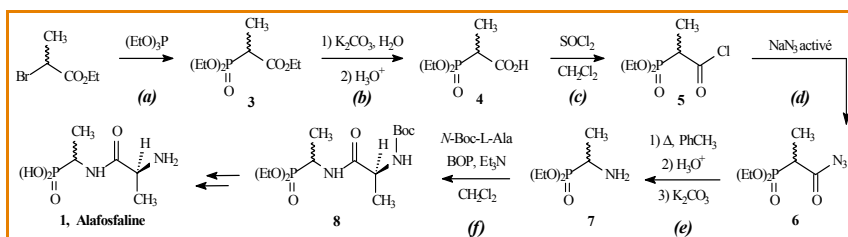


Schéma 1 - Synthèse de l'Alafosfaline **1**.



ENSEIGNEMENT

LES TRAVAUX PRATIQUES

et d'approfondissement de ces techniques d'analyse qui ne sont souvent connues que sur un plan théorique par les étudiants.

Partie expérimentale

(a) Synthèse du 2-diéthylphosphono- propanoate d'éthyle 3

Risques inhérents aux réactifs ou associés à la réaction : le 2-bromopropanoate d'éthyle est irritant et lacrymogène. La manipulation doit être effectuée, avec un soin particulier, sous une hotte ventilée et le port des gants est obligatoire. Le nettoyage de la verrerie est également à prévoir sous la hotte.

Le phosphonate **3** est préparé par une réaction de Michaelis-Arbuzov.

Le 2-bromopropanoate d'éthyle (0,100 mol, 1,0 éq) est placé dans un tétacol de 250 mL muni d'un thermomètre (prévoir un thermomètre permettant la lecture d'une température supérieure à 150 °C), d'un système d'agitation magnétique, d'une ampoule à introduction isobare de 50 mL et d'une colonne à distiller équipée d'un réfrigérant et d'un collecteur. Le réactif est préchauffé à 120 °C puis le triéthylphosphite ((EtO)₃P) (0,110 mol, 1,1 éq) est additionné. La vitesse d'addition doit être telle que la distillation du bromoéthane puisse être effectuée au fur et à mesure de sa formation. La réaction est exothermique, la température atteint 150 °C. Le mélange réactionnel est agité 6 h à cette température.

L'évolution de la réaction peut être suivie soit par spectroscopie RMN¹H, la description de cette analyse est rapportée dans le paragraphe de caractérisation par spectroscopie, soit par simple pesée de la masse de bromoéthane éliminé par distillation.

Lorsque la réaction est terminée et après refroidissement du mélange, l'excès de réactif est évaporé sous pression réduite à l'évaporateur rotatif.

La purification du phosphonate **3**, réalisée par distillation sous pression réduite (Eb_{12mmHg} = 143-144 °C), conduit à l'obtention d'un produit liquide pur avec un rendement de 85 %.

Caractérisation de l'ester 3 par spectroscopies IR et RMN¹H

*IR (film) ν (cm⁻¹) : 1730 (COOEt), 1250 (P=O).
RMN¹H δ (ppm) (CCl₄) : 1.00-1.60 (m, 12H, CHCH₃, (CH₃CH₂O)₂P(O), CH₃CH₂OCO), 2.55-3.10 (m, 1H, CHCH₃), 3.80-4.40 (m, 6H, (CH₃CH₂O)₂P(O), CH₃CH₂OCO).*

Le suivi de la réaction est réalisé sur un échantillon prélevé dans le milieu réactionnel et mis en solution

dans le tétrachlorure de carbone (CCl₄). La comparaison du spectre de RMN¹H ainsi obtenu avec celui du 2-bromopropanoate d'éthyle de départ permet d'évaluer le degré d'avancement de la réaction.

2-Bromopropanoate d'éthyle, RMN¹H δ (ppm) (CCl₄) : 1.21 (t, 3H, CH₃CH₂O, ³J_{HH} = 6.0 Hz), 1.77 (d, 3H, CH₃CH, ³J_{HH} = 7.0 Hz), 3.80-4.50 (m, 3H, CH₃CH, CH₃CH₂O).

(b) Synthèse de l'acide 2-diéthylphosphonopropanoïque 4

Risques inhérents aux réactifs ou associés à la réaction : si les conditions normales de sécurité sont respectées, cette préparation ne présente aucun risque particulier.

Le phosphonoacide **4** est obtenu par saponification de l'ester **3**.

Dans un tétacol de 250 mL muni d'un système d'agitation, d'un thermomètre et d'un réfrigérant, l'ester **3** (0,090 mol, 1,0 éq) est ajouté à une solution de carbonate de potassium (K₂CO₃) (0,120 mol, 1,3 éq) dissous dans un minimum d'eau. Le mélange réactionnel est porté à 100 °C pendant 10 minutes, sous vive agitation.

Remarque : le rendement de la réaction dépend essentiellement de l'agitation qui doit être soutenue pour permettre cette réaction en milieu biphasique.

La solution aqueuse est ensuite lavée à l'éther de diéyle (Et₂O) (2 × 15 mL) puis acidifiée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 6N, jusqu'à pH = 2. L'acide **4** est alors extrait de la phase aqueuse à l'aide de dichlorométhane (CH₂Cl₂) (5 × 15 mL). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium (MgSO₄), filtrée et le solvant est éliminé par distillation sous pression réduite à l'évaporateur rotatif. L'acide **4** attendu est recueilli brut sous forme d'un solide avec un rendement quantitatif. Aucune purification de l'acide n'est nécessaire, il est utilisé brut dans l'étape suivante.

Caractérisation de l'acide 4 par son point de fusion et par spectroscopies IR et RMN¹H, ¹³C et ³¹P

*F = 45-46 °C.
IR (KBr) ν (cm⁻¹) : 3600-2500 (COOH), 1735 (COOH), 1230 (P=O).*

RMN¹H δ (ppm) (CDCl₃) : 1.30 (t, 6H, CH₃CH₂O, ³J_{HH} = 7.1 Hz), 1.47 (dd, 3H, CH₃, ³J_{HH} = 7.0 Hz, ³J_{HP} = 17.0 Hz), 3.01 (dq, 1H, P(O)CH, ³J_{HH} = 7.0 Hz, ²J_{HP} = 24.0 Hz), 4.28-4.40 (m, 4H, CH₃CH₂O), 12.00 (s large, 1H, COOH).

RMN³¹P δ (ppm) (CDCl₃) : 22.0 (s, 1P).

RMN¹³C δ (ppm) (CDCl₃) : 11.4 (d, 1C,

ENSEIGNEMENT

LES TRAVAUX PRATIQUES



P(O)CHCH_3 , $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz), 16.1 (d, 2C, OCH_2CH_3 , $^3J_{\text{CP}} = 5.6$ Hz), 33.7 (d, 1C, PCHCH_3 , $^1J_{\text{CP}} = 138.0$ Hz), 63.0 (d, 1C, OCH_2CH_3 , $^2J_{\text{CP}} = 7.5$ Hz), 63.1 (d, 1C, OCH_2CH_3 , $^2J_{\text{CP}} = 7.5$ Hz), 171.6 (s, 1C, COOH).

Deuxième proposition de synthèse de l'acide **4** :

(g) Synthèse de l'éthyle phosphonate de diéthyle **9**

Risques inhérents aux réactifs ou associés à la réaction : si les conditions normales de sécurité sont respectées, cette préparation ne présente aucun risque particulier. La manipulation doit être réalisée sous une hotte ventilée en raison de l'emploi de $(\text{EtO})_3\text{P}$, produit mal odorant, et de la toxicité de l'iodoéthane.

L'éthyle phosphonate de diéthyle **9** est préparé par une réaction de Michaelis-Arbuzov particulière qui est une isomérisation du triéthylphosphite catalysée par l'iodoéthane.

Dans un tétracol de 250 mL équipé d'un agitateur magnétique, d'un thermomètre, d'une ampoule à introduction isobare et d'un réfrigérant, sous atmosphère d'azote, l'iodoéthane (0,012 mol, 0,1 éq) est porté à ébullition puis $(\text{EtO})_3\text{P}$ (0,120 mol, 1,0 éq) est additionné rapidement. La réaction est exothermique, la température atteint 150-160 °C. Le mélange réactionnel est agité 3 h à cette température. L'évolution de la réaction peut être suivie par spectroscopie RMN ^{31}P ou ^1H , la description de cette analyse est rapportée dans le paragraphe de caractérisation par spectroscopie.

Lorsque la réaction est terminée et après refroidissement du mélange, l'iodoéthane est évaporé sous pression réduite à l'évaporateur rotatif. La purification du phosphonate **9**, réalisée par distillation sous pression réduite ($\text{Eb}_{15\text{mmHg}} = 80\text{-}81^\circ\text{C}$), conduit à l'obtention d'un produit liquide pur avec un rendement de 97 %.

Caractérisation du composé **9** par spectroscopies IR et RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P

IR (film) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1250 (P=O).

RMN ^1H $\delta(\text{ppm})$ (CDCl_3) : 1.09 (t, 6H, OCH_2CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz), 1.32 (dt, 3H, PCH_2CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 20.0$ Hz), 1.50 (dq, 2H, PCH_2CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^2J_{\text{HP}} = 18.0$ Hz), 3.78-3.95 (m, 4H, OCH_2CH_3).

RMN ^{31}P $\delta(\text{ppm})$ (CDCl_3) : 30.9 (s, 1P).

RMN ^{13}C $\delta(\text{ppm})$ (CDCl_3) : 6.1 (d, 1C, PCH_2CH_3 , $^2J_{\text{CP}} = 6.0$ Hz), 16.3 (d, 2C, OCH_2CH_3 , $^3J_{\text{CP}} = 5.0$ Hz), 18.3 (d, 1C, PCH_2CH_3 , $^1J_{\text{CP}} = 142.0$ Hz), 60.8 (d, 2C, OCH_2CH_3 , $^2J_{\text{CP}} = 6.0$ Hz).

Le suivi de la réaction est facilement réalisé en prélevant un échantillon du milieu réactionnel qui est ensuite mis en solution dans le chloroforme deutéré (CDCl_3). La comparaison des spectres de RMN ^{31}P ou ^1H ainsi obtenus avec ceux du triéthylphosphite $(\text{EtO})_3\text{P}$ de départ permet d'évaluer le degré d'avancement de la réaction.

Triéthylphosphite, RMN ^1H $\delta(\text{ppm})$ (CDCl_3) : 1.27 (t, 9H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz), 3.80-3.95 (m, 6H, CH_2) et RMN ^{31}P $\delta(\text{ppm})$ (CDCl_3) : -21.9 (s, 1P).

(h) Synthèse de l'acide **2-diéthylphosphonopropanoïque 4**

Risques inhérents aux réactifs ou associés à la réaction : l'emploi de n -butyllithium nécessite quelques précautions. La réaction doit être conduite sous atmosphère inerte (azote ou argon), la verrerie doit être parfaitement sèche et le tétrahydrofurane (THF) doit être anhydre (prévoir une distillation du THF sur sodium/benzophénone). La manipulation de n -butyllithium doit être effectuée avec grand soin sous la surveillance des enseignants en raison de la sensibilité de ce lithien à l'humidité. Toutefois si ces conditions de manipulation sont respectées, la procédure proposée ci-dessous est tout à fait réalisable en travaux pratiques.

Prévoir également de l'azote liquide pour l'obtention d'un bain réfrigérant à -70°C et de la carboglace (une bouteille de CO_2 munie d'une pastilleuse à carboglace peut être une solution de remplacement).

L'acide **4** est obtenu par réaction de carbonatation du carbanion lithié généré à partir du phosphonate **9**. La réaction classique de carbonatation consistant à faire barboter du CO_2 gaz dans le milieu réactionnel entraîne l'énolisation du produit formé ce qui se traduit par un rendement en acide inférieur à 50 %. Pour palier ce problème, la procédure mise au point consiste à piéger le carbanion lithié **9** en l'ajoutant d'un coup à un large excès de CO_2 , ce qui permet d'éviter l'énolisation.

Le montage est constitué d'un tétracol de 250 mL parfaitement sec équipé d'un agitateur mécanique, d'un thermomètre basse température et d'une ampoule à introduction isobare 100 mL. Le n -butyllithium ($n\text{-BuLi}$) (0,121 mol d'une solution de $n\text{-BuLi}$ 1,6 M dans l'hexane, 1,04 éq) est ajouté lentement au THF anhydre (80 mL) placé au préalable dans le tétracol, à -65°C et sous atmosphère d'azote. Une solution du phosphonate **9** (0,116 mol, 1,0 éq) dans le THF anhydre (20 mL) est alors ajoutée, goutte à goutte, à -65°C et sous



ENSEIGNEMENT

LES TRAVAUX PRATIQUES

agitation. Le mélange est ensuite agité pendant 30 minutes à $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ avant d'être versé d'un coup dans un dewar contenant une solution de Et_2O anhydre saturé en carboglace (600 mL). Le mélange ainsi obtenu est alors transvasé dans un bécher et agité pendant environ 2 h, durée suffisante pour un retour à température ambiante.

Après hydrolyse à l'eau (100 mL), la phase étherée est lavée à l'aide d'une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) ($2 \times 25\text{ mL}$). Les phases aqueuses sont réunies et lavées à Et_2O ($2 \times 60\text{ mL}$) avant d'être acidifiées jusqu'à $\text{pH} = 1$ par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 6N. La phase aqueuse résultante est alors saturée en chlorure de sodium (NaCl) pour permettre une meilleure extraction de l'acide par CH_2Cl_2 ($3 \times 60\text{ mL}$). La phase organique récupérée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et le solvant est évaporé. L'acide **4** est obtenu sous forme d'un solide avec un rendement de 80 %.

(c) Synthèse du chlorure de l'acide 2-diéthylphosphonopropanoïque **5**

Risques inhérents aux réactif ou associés à la réaction : le chlorure de thionyle est très corrosif et très irritant pour la peau, les yeux et les muqueuses. La manipulation est obligatoirement réalisée sous une hotte ventilée et avec soin.

Le chlorure d'acide **5** est obtenu selon la méthode classique mettant en réaction le chlorure de thionyle et l'acide carboxylique **4**.

Le chlorure de thionyle (SOCl_2) fraîchement distillé (0,140 mol, 2,0 éq) est placé dans un bicol de 100 mL équipé d'un réfrigérant surmonté d'un tube à chlorure de calcium et d'une ampoule à introduction isobare. Une solution du phosphonoacide **4** (0,070 mol, 1,0 éq) dilué dans un minimum de CH_2Cl_2 est alors additionnée. Le mélange réactionnel est agité à $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 5 h.

Le suivi de la réaction est réalisé par spectroscopie IR.

Après élimination du solvant et de l'excès de réactif par évaporation, le chlorure d'acide attendu **5** est obtenu quantitativement sous forme d'une huile. Il est engagé sans purification et rapidement dans l'étape suivante pour éviter sa dégradation. Un échantillon analytique permet une caractérisation de ce composé.

Caractérisation du composé **5** par spectroscopies IR et RMN ^1H

IR (film) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1790 (CO), 1265 (P=O).

RMN ^1H δ (ppm) (CCl_4) : 1.10-1.80 (m, 9H,

OCH_2CH_3 , CHCH_3), 3.20-4.70 (m, 5H, CHCH_3 , OCH_2CH_3).

(d) Synthèse de l'azoture de l'acide 2-diéthylphosphonopropanoïque **6**

Risques inhérents aux réactifs ou associés à la réaction : l'azoture de sodium est un produit toxique, l'hydrazine utilisée pour l'activation de l'azoture de sodium est également toxique et ses vapeurs sont corrosives et irritantes. La manipulation doit être réalisée sous une hotte ventilée.

Activation de l'azoture de sodium

L'azoture de sodium (NaN_3) (0,300 mol) et une solution aqueuse d'hydrazine à 85 % (1 mL) sont broyés dans un mortier. Après avoir laissé reposer ce mélange pendant 12 h, celui-ci est dissous dans l'eau chaude (60 mL). De l'acétone froide (500 mL) est alors ajoutée, le mélange est agité 1 h puis le solide est filtré, lavé à l'acétone ($4 \times 80\text{ mL}$) et séché à l'air.

A une solution de NaN_3 activé (0,200 mol, 4,0 éq) dissous dans l'eau (35 mL), placée dans un bicol de 250 mL muni d'un thermomètre et d'une ampoule à introduction isobare de 100 mL, est ajoutée, à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, une solution du chlorure d'acide **5** (0,050 mol, 1,0 éq) dans Et_2O (100 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à cette température.

Le suivi de la réaction est réalisé par spectroscopie IR.

La phase étherée est ensuite lavée à l'eau froide puis séchée sur MgSO_4 avant d'être évaporée, à froid, sous pression réduite. L'acylazoture **6** est obtenu sous forme d'une huile avec un rendement de 81 %. Il est engagé rapidement et sans purification dans l'étape suivante.

Il est à noter qu'il est indispensable de conserver cet acylazoture **6** à une température inférieure à $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour limiter les risques de réarrangements. Un échantillon analytique permet la caractérisation de ce composé.

Caractérisation du composé **6** par spectroscopies IR et RMN ^1H

IR (film) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 2120 (N_3), 1710 (CO).

RMN ^1H δ (ppm) (CCl_4) : 1.20-1.60 (m, 9H, OCH_2CH_3 , CHCH_3), 2.60-3.10 (m, 1H, CHCH_3), 3.80-4.50 (m, 4H, OCH_2CH_3).

(e) Synthèse du (1-amino)éthylphosphonate de diéthyle **7**

Risques inhérents aux réactifs ou associés à la réaction : si les conditions normales de sécurité

ENSEIGNEMENT

LES TRAVAUX PRATIQUES



sont respectées, cette préparation ne présente aucun risque particulier.

Synthèse du (1-isocyanato)éthylphosphonate de diéthyle intermédiaire

Le réarrangement de Curtius permet d'obtenir directement l'isocyanate intermédiaire attendu à partir de l'acylazide **6** par simple chauffage dans le toluène.

Dans un tricol de 250 mL muni d'un thermomètre et d'un réfrigérant, le dérivé **6** (0,045 mol) est dilué dans le toluène (100 mL). La solution réactionnelle est portée à reflux pendant 2 h.

Le suivi de la réaction est réalisé par spectroscopie IR.

L'isocyanate n'est pas isolé et est utilisé rapidement afin d'éviter la formation d'urée. Un échantillon analytique est toutefois recueilli après évaporation du solvant pour permettre sa caractérisation.

Caractérisation du (1-isocyanato)éthylphosphonate de diéthyle intermédiaire par spectroscopies IR et RMN¹H

IR (film) ν (cm⁻¹) : 2230-2240 (N = C = O).

RMN¹H δ (ppm) (CCl₄) : 1.35 (t, 6H, OCH₂CH₃, ³J_{HH} = 7.0 Hz), 1.52 (d, 3H, PCHCH₃, ³J_{HH} = 8.0 Hz), 3.45-3.75 (dq, 1H, PCHCH₃, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ²J_{HP} = 20.0 Hz), 3.90-4.40 (m, 4H, OCH₂CH₃).

*Synthèse de l' α -aminophosphonate **7***

Ce dérivé **7** est obtenu par hydrolyse de l'isocyanate préparé ci-dessus.

Dans le tricol de 250 mL muni d'un thermomètre et d'un réfrigérant dans lequel se trouve la solution d'isocyanate (0,045 mol) dans le toluène à reflux, est introduite, *via* une ampoule à introduction isobare, une solution d'acide chlorhydrique 12N (8 mL). Après 1 h à reflux puis retour à température ambiante, la phase aqueuse est basifiée par ajout de K₂CO₃ puis l'aminophosphonate **7** est extrait au CH₂Cl₂ (3 \times 25 mL) après relargage par NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée sous pression réduite. L'amine **7** est obtenue sans purification sous forme d'une huile avec un rendement de 62 % à partir du dérivé **6**.

Caractérisation du composé **7** par spectroscopies IR et RMN¹H

IR (film) ν (cm⁻¹) : 3600-3200 (NH₂).

RMN¹H δ (ppm) (CCl₄) : 1.00-1.45 (m, 9H, OCH₂CH₃, PCHCH₃), 1.95 (s large, 2H, NH₂), 2.70-3.10 (dq, 1H, PCHCH₃, ³J_{HH} = 4.0 Hz, ²J_{HP} = 19.0 Hz), 3.80-4.20 (m, 4H, OCH₂CH₃).

*(f) Synthèse du 1-(t-butyloxycarbonyl-L-alanyl-amino)éthylphosphonate de diéthyle **8***

Risques inhérents aux réactifs ou associés à la réaction : le trichlorure de phosphore (POCl₃) est un réactif très irritant pour la peau, les yeux et les muqueuses, ses vapeurs sont également toxiques. L'hexaméthylphosphotriamide (HMPT) est toxique. La réaction doit être réalisée sous une hotte ventilée et la manipulation des réactifs doit être effectuée avec beaucoup de soins.

Le dérivé **8**, forme N- et O-protégée de l'Alafosfaline, est préparé par couplage entre l'aminophosphonate **7** et la N-Boc-L-alanine suivant une procédure d'activation de la fonction carboxylique par le BOP.

Préparation du réactif BOP

Il est à noter que ce réactif est commercialisé mais que son coût reste élevé.

Une solution de POCl₃ (0,075 mol, 1,0 éq) dans CH₂Cl₂ anhydre (12 mL) est placée dans un tétrocol de 250 mL équipé d'un système d'agitation magnétique, d'un thermomètre et d'une ampoule à introduction isobare de 100 mL et refroidie à 0 °C à l'aide d'un bain de glace. Une solution de HMPT (0,082 mol, 1,1 éq.) dans CH₂Cl₂ anhydre (12 mL) est ajoutée avec une vitesse d'addition telle que la température n'excède pas 20 °C. Au mélange visqueux ainsi obtenu, maintenu dans le bain de glace, est additionnée la triéthylamine (Et₃N) (0,075 mol, 1,0 éq) dans CH₂Cl₂ anhydre (12 mL) : la température ne doit pas excéder 10 °C, la solution prend une coloration jaune-brun. Un mélange composé d'hydroxybenzotriazole anhydre (HOBt) (0,075 mol, 1,0 éq, préalablement séché par distillation azéotropique avec du toluène) et de Et₃N (0,112 mol, 1,5 éq) dans CH₂Cl₂ anhydre (45 mL) est alors ajouté à une température inférieure à 20 °C. Le mélange est aussitôt versé dans une solution d'eau froide (60 mL) et de Et₃N (0,075 mol, 1,0 éq) puis est agité vigoureusement pendant quelques minutes. Après séparation des phases, le produit est à nouveau extrait de la phase organique par de l'eau (2 \times 60 mL). Les phases aqueuses sont réunies, lavées avec Et₂O (30 mL) et versées dans une solution d'hexafluorophosphate de potassium (KPF₆) (0,075 mol, 1,0 éq) dans l'eau (30 mL). Le précipité blanc jaunâtre formé est essoré sur verre fritté. Le produit est alors dissous dans CH₂Cl₂ (100 mL) et la phase organique est séchée sur MgSO₄ (après décantation de l'eau résiduelle éventuelle). Après filtration du desséchant, la phase organique est concentrée à 50 % de son volume et la



ENSEIGNEMENT

LES TRAVAUX PRATIQUES

crystallisation du produit est complétée par addition de Et_2O . Les cristaux obtenus sont essorés et lavés à Et_2O puis séchés au dessiccateur sur pentaoxyde de phosphore (P_2O_5). Le BOP est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 70 %.

Caractérisation du BOP par son point de fusion et par spectroscopie RMN ^1H

$F = 146-148\text{ }^\circ\text{C}$.

RMN ^1H δ (ppm) (CDCl_3): 2.91 (d, 18H, $(\text{CH}_3)_2\text{NP}$, $^3J_{\text{HP}} = 13.0\text{ Hz}$), 7.20-8.00 (m, 4H, H_{arom}).

Couplage peptidique

A une solution d'aminophosphonate de diéthyle 7 (0,016 mol, 1,0 éq) dans CH_2Cl_2 (15 mL) sont successivement ajoutées, à température ambiante, dans un tricol équipé d'un système d'agitation magnétique et d'une ampoule à introduction isobare, une solution de Et_3N (0,016 mol, 1,0 éq) dans CH_2Cl_2 (10 mL), une solution de BOP (0,016 mol, 1,0 éq) dans CH_2Cl_2 (10 mL) et enfin une solution de N-Boc-L-alanine (0,016 mol, 1,0 éq) dans CH_2Cl_2 (20 mL). Un pH légèrement basique est maintenu par addition progressive de triéthylamine. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 45 minutes.

Le suivi de la réaction est réalisé par chromatographie sur couche mince (éluant : AcOEt , révélateur : I_2).

Le mélange réactionnel est lavé par une solution de HCl 1N ($3 \times 10\text{ mL}$), puis par une solution aqueuse saturée en NaCl (10 mL), puis par une solution saturée de NaHCO_3 ($3 \times 10\text{ mL}$) et enfin par une solution saturée en NaCl (10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis évaporée. La purification du produit brut s'effectue par chromatographie sur gel de silice [13] (éluant : AcOEt , révélateur : I_2). Le phosphonopeptide 8 est obtenu sous forme d'une huile avec un rendement de 81 %. Le composé 8 ainsi préparé est un mélange de deux diastéréoisomères non différenciés en spectroscopie RMN ^1H .

Caractérisation du phosphonopeptide 8 par R_f et spectroscopies IR et RMN ^1H

$R_f = 0,40$ (éluant : AcOEt).

IR (film) ν (cm^{-1}): 3500-3200 (NH), 1710 (NHCOOtBu), 1680 (NHCOCH).

RMN ^1H δ (ppm) (CDCl_3): 1.25-1.45 (m, 12H, OCH_2CH_3 , PCHCH_3 , CHCH_3), 1.50 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 4.10-4.30 (m, 5H, OCH_2CH_3 , PCHCH_3), 4.40-4.55 (m, 1H, CHCH_3), 5.25 (s large, 1H, NHCOOtBu), 6.95 (s large, 1H, NHCOCH).

Proposition d'organisation des réactions au cours de ces travaux pratiques

1^{ère} journée

Préparation du phosphonopropanoate d'éthyle 3. Distillation et caractérisation du composé 3.

Première partie de l'activation de NaN_3 .

2^e journée

Préparation et caractérisation du phosphonoacide 4. Distillation de SOCl_2 .

Dernière partie de l'activation de NaN_3 .

3^e journée

Préparation et caractérisation du chlorure d'acide 5.

Préparation et caractérisation de l'acylazide 6.

4^e journée

Préparation et caractérisation de l'aminophosphonate 7.

5^e journée

Préparation et caractérisation du BOP.

6^e journée

Couplage du dérivé 7 et de la N-Boc-L-Alanine.

7^e journée

Purification et caractérisation du phosphonopeptide 8.

Étude des spectres IR

La synthèse qui vient d'être développée présente la particularité de proposer la préparation de produits phosphorylés dont la plupart possède une fonction dérivée d'acide facilement localisable et identifiable en spectroscopie infrarouge : $-\text{COOEt}$, $-\text{COOH}$, $-\text{COCl}$, $-\text{CON}_3$, $-\text{CONH}$. Ces vibrateurs $\text{C}=\text{O}$ se situent dans une région comprise entre 1600 et 2500 cm^{-1} qui est généralement facile à interpréter. Il leur correspond des constantes de force k_F élevées, ce qui les distingue des liaisons simples du carbone C-O , C-N , C-X , C-C .

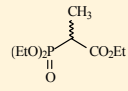
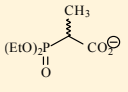
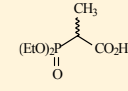
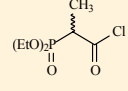
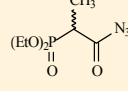
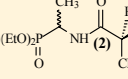
Une approximation fréquemment réalisée consiste à admettre que la fréquence de vibration de valence de la double liaison $\text{C}=\text{O}$ dépend essentiellement de son environnement. Ce dernier peut avoir des incidences mécaniques et électroniques sur la variation du nombre d'onde observé. Si, dans une seconde approximation il est admis que les effets mécaniques s'exerçant sur les différents vibrateurs $\text{C}=\text{O}$ des composés préparés sont très voisins, il est alors possible de relier directement les effets électroniques subis par les liaisons $\text{C}=\text{O}$ à la variation du nombre d'onde [14-15]. Les résultats obtenus sont particulièrement démonstratifs (tableau 1, figure 2).

ENSEIGNEMENT

LES TRAVAUX PRATIQUES

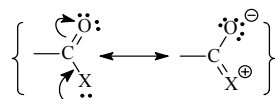


Tableau I - Nombres d'onde de vibration de valence de la double liaison C = O des composés 3-8.

	$\nu(\text{C}=\text{O})$ en cm^{-1}
 3	1 730
 4'	1 614
 4	1 735
 5	1 790
 6	1 710
 8	1 710 (1) 1 680 (2)

Chacun de ces vibreurs C = O subit deux types d'effets électroniques :

- un effet mésomère donneur du doublet non liant de l'hétéroatome X (O, Cl, N) vers la liaison double C = O :



- un effet inductif attracteur de l'hétéroatome vis-à-vis du carbone du motif carbonyle :



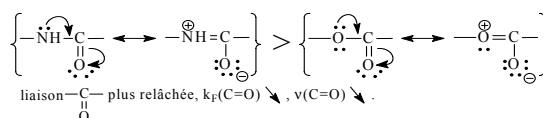
Si l'on utilise le nombre d'onde de l'ester **3** comme valeur de référence, il est possible de rétablir l'importance relative de ces deux effets électroniques sur chacun des dérivés d'acides étudiés en observant le sens du déplacement du nombre d'onde $\nu(\text{C}=\text{O})$.

Il y a ainsi deux types de composés :

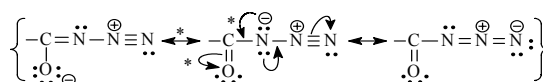
- ceux dont $\nu(\text{C}=\text{O})$ est supérieur à $1\,730\text{ cm}^{-1}$. La liaison du motif carbonyle présente alors une constante de force k_F plus élevée que celle des esters correspondants. L'augmentation de k_F traduit un effet inductif attracteur prédominant du groupe X.

- ceux dont $\nu(\text{C}=\text{O})$ est inférieur à $1\,730\text{ cm}^{-1}$. Cette baisse du nombre d'onde correspond à une diminution de la constante de force k_F qui est due à une liaison C = O plus relâchée que dans le cas des esters. Ce phénomène est la conséquence d'un effet mésomère donneur supérieur à l'effet inductif attracteur. La conjugaison importante n- π entre le doublet non liant de l'hétéroatome et le motif C = O fait perdre un peu du caractère π à la double liaison C = O. C'est pourquoi le vibreur C = O est observé dans une situation intermédiaire entre celui d'un C = O dont le caractère π est pur et celui d'un C-O simple.

Les dérivés phosphorés **6**, **8** et **4'** (**4'** représentant la forme carboxylate de l'acide **4**) illustrent ce dernier cas de figure. Il s'agit d'exemples dont les hétéroatomes appartiennent à la même ligne de la classification périodique (N, O), c'est-à-dire de tailles comparables. La différence observée entre les nombres d'onde de l'ester **3** et l'amide **8** reflète parfaitement la différence d'électronégativité existant entre un oxygène et un azote. L'azote étant moins électronégatif que l'oxygène, la délocalisation du doublet non liant de l'atome d'azote est supérieure à celle de l'atome d'oxygène. La liaison C = O de l'amide est donc plus relâchée que celle de l'ester, sa constante de force k_F est plus faible et son nombre d'onde est plus bas :



Dans le cas de l'acylazide **6**, la fréquence de vibration du C = O n'est pas aussi basse que dans le cas de l'amide **8**. Ce résultat s'explique facilement par les effets électroniques comparés des deux atomes d'azote liés au carbonyle, selon qu'il s'agit d'un environnement $-\text{C}(\text{O})\text{NH}$ ou $-\text{C}(\text{O})\text{N}_3$. En effet, dans le cas de l'acylazide, la délocalisation du doublet non apparié de l'azote vers le C = O est de plus faible importance que pour un groupe amide, dans la mesure où cet atome est déjà engagé en résonance avec le motif N_3 , l'effet sur la constante k_F et $\nu(\text{C}=\text{O})$ est donc amoindri :



La valeur très basse du nombre d'onde observé pour l'ion carboxylate **4'** ($1\,614\text{ cm}^{-1}$) peut être à nouveau justifiée par l'examen de la répartition des électrons de type p dans le motif $-\text{COO}^-$. Il est en effet bien connu que l'ion carboxylate a une forte



ENSEIGNEMENT LES TRAVAUX PRATIQUES

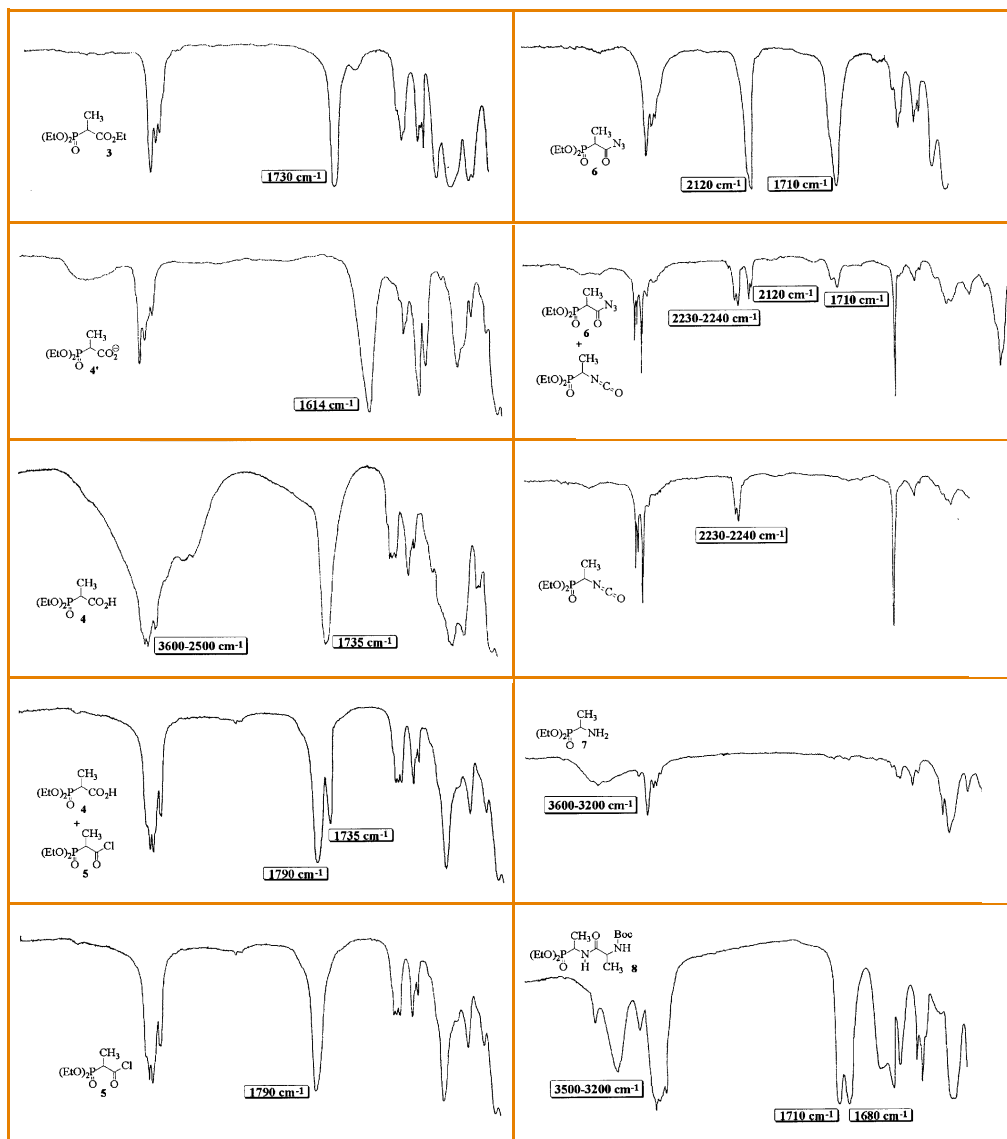
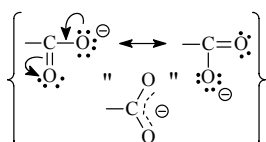


Figure 2 - Spectres IR des composés 3-8.

énergie de résonance puisque les formules résonantes sont équivalentes entre elles :



Cette équivalence de structure est considérée comme l'un des meilleurs critères de résonance, les deux liaisons C=O deviennent indiscernables, de longueur identique, à mi-chemin entre une liaison double C=O et une liaison simple C-O. La constante de force k_F de ces deux liaisons est donc elle-même intermédiaire entre ces deux situations

extrêmes, c'est pourquoi le nombre d'onde de l'ion carboxylate est observé entre celui d'un C=O pur (entre 1710-1730 cm^{-1}) et celui d'un C-O simple (entre 1000-1100 cm^{-1}). En conclusion, le motif carbonyle subissant l'effet mésomère le plus puissant est celui dont le k_F est le plus faible et dont $\nu(\text{C}=\text{O})$ est le plus bas.

Le cas du chlorure d'acide 5 est également un exemple intéressant et particulier, puisque seul ce vibrateur C=O est supérieur à celui des esters. Ce résultat suppose que l'atome de chlore exerce un effet inductif attracteur déterminant sur le C=O, qui renforce k_F . En effet, la taille de l'atome de chlore étant bien plus grande que celle d'un atome

ENSEIGNEMENT

LES TRAVAUX PRATIQUES



de carbone, la résonance entre les doublets non liants de l'hétéroatome et le carbone s'établit mal et ne compense pas l'effet inductif. Il s'agit donc du seul groupement carbonyle appauvri en électron par un effet inductif attracteur prédominant qui contribue à l'augmentation de k_F et donc de $\nu(C=O)$.

L'ensemble de ces exemples fait ressortir de façon très démonstrative qu'il est possible d'établir des corrélations simples entre les effets électroniques inductifs et mésomères et les variations des fréquences IR des vibrations de valence de groupe tels que le carbonyle.

Au-delà de ces corrélations, l'étude spectroscopique IR des composés **3-8** préparés au cours de la synthèse de l'Alafosfaline permet l'identification de fonctions très caractéristiques : acide carboxylique, azoture, isocyanate, carbamate ou amine.

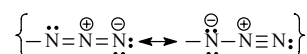
La différenciation, sur un spectre IR, de la structure d'un ester de celle d'un acide carboxylique ne peut pas être réalisée sur la seule observation de cette bande $\nu(C=O)$ en raison du recouvrement observé (les bandes à 1 730 et 1 735 cm^{-1} se confondent). En revanche, les vibrations d'élongation de la liaison O-H de l'acide carboxylique, très caractéristiques de celui-ci, permettent de l'identifier (bande large et intense de 3 600 à 2 500 cm^{-1}). La largeur et l'intensité de cette bande $\nu(OH)$ sont dues à l'existence de fortes liaisons hydrogène qui provoquent l'association des acides sous forme de dimères cycliques, en solution concentrée ou à l'état liquide, ou de chaînes, à l'état solide. La bande d'élongation $\nu(OH)$ d'un acide « libre », c'est-à-dire non associé, ne peut être observée qu'en solution très diluée. Sous l'effet des ponts hydrogène (ici entre le groupe C=O et l'hydrogène de OH) qui modifient la constante de force k_F des groupes mis en jeu, la bande subissant la plus forte variation est celle d'élongation de la liaison O-H qui se trouve déplacée vers les basses fréquences, de plus son intensité ainsi que sa largeur sont accrues. Les bandes d'élongation du groupe C=O et de déformation angulaire du groupe O-H sont également modifiées mais de façon beaucoup moins significative.

En plus de contribuer à l'identification des fonctions organiques, la spectroscopie IR s'est avérée un outil très utile pour le suivi de l'avancement des réactions, et en particulier lors de la préparation de composés fragiles tels que le chlorure d'acide **5**, l'acylazide **6** et l'isocyanate intermédiaire.

L'étude des spectres IR obtenus au cours du suivi de la synthèse du chlorure d'acide **5** permet d'observer

l'apparition progressive de la bande de vibration d'élongation de la liaison C=O à 1 790 cm^{-1} caractéristique de **5**, qui a été présentée précédemment, et la disparition dans le même temps de celle de l'acide **4** à 1 735 cm^{-1} (cf figure 2).

Une étude tout à fait comparable peut être réalisée pour le suivi de la formation de l'acylazide **6** à partir de **5**. Une première observation peut être basée sur la comparaison des bandes d'élongation des liaisons C=O à 1 790 cm^{-1} pour **5** et 1 710 cm^{-1} pour **6**. De plus, l'apparition de la bande $\nu(C=O)$ de **6** s'accompagne de celle d'une bande à 2 120 cm^{-1} soulignant la forme de résonance des liaisons doubles cumulées et de la triple liaison du motif azoture :



Le réarrangement de Curtius peut être suivi par disparition du motif acylazide et la formation de l'isocyanate intermédiaire qui est caractérisé par l'apparition de la bande à 2 230-2 240 cm^{-1} due à l'élongation des doubles liaisons cumulées N=C=O.

L'aminophosphonate **7** présente un spectre IR conforme à ce que l'on peut attendre avec une bande de vibration d'élongation N-H à 3 600-3 200 cm^{-1} , somme des élongations symétriques et asymétriques de la liaison N-H. Comme dans le cas de l'acide carboxylique, la bande apparaît large et de plus basse fréquence dans ce spectre de l'amine **7** à l'état pur en raison des liaisons hydrogène générant une association des molécules entre elles.

Le dernier composé dont le spectre est étudié est l'Alafosfaline sous sa forme protégée **8**. Des bandes multiples de 3 500 à 3 200 cm^{-1} résultent du cumul des bandes d'élongation des liaisons N-H de l'amide secondaire (bande A) et de la fonction carbamate doublé de l'effet des liaisons hydrogène pouvant exister entre deux molécules et conduisant à des formes associées.

Le motif C=O du groupe *tert*-butyloxy-carbonyle, Boc, qui a été choisi comme protection N-terminale, est également facilement repéré. Sa fréquence de vibration située à 1 710 cm^{-1} , valeur intermédiaire entre celle d'un ester et d'un amide, permet de le distinguer de façon univoque du motif C=O de la liaison peptidique (bande amide I à 1 680 cm^{-1}).

Cette étude IR est donc très riche en informations. Complétée par la spectroscopie RMN, elle permet un bon contrôle des structures des produits de réaction, un suivi précis de l'avancement des séquences réactionnelles les plus délicates et l'établissement de corrélations existant entre l'évolution du spectre d'une fonction chimique et les effets électroniques qu'elle subit.



ENSEIGNEMENT

LES TRAVAUX PRATIQUES

Conclusion

Cette synthèse multi-étape de l'Alafosfaline est l'illustration d'une évolution actuelle de la chimie organique qui se positionne de plus en plus au carrefour d'autres disciplines scientifiques.

L'intérêt du produit préparé est l'occasion de rappeler que les principes de l'antibiothérapie reposent sur des mécanismes moléculaires que les chimistes organiciens savent très bien rationaliser. L'explication des mécanismes d'action de l'Alafosfaline ne peut qu'encourager les étudiants à entreprendre cette synthèse de manière motivée et enthousiaste.

Les modes opératoires proposés sont des adaptations de travaux publiés par notre équipe et sont mentionnés dans la partie bibliographique. Ils décrivent des méthodes expérimentales efficaces et facilement reproductibles. L'expérimentateur pourra confronter ses propres résultats à ceux mentionnés qui ont été obtenus par des étudiants de la maîtrise de chimie de l'université de Nancy I.

Enfin, les différentes réactions décrites utilisent des techniques de purification variées et font appel à une exploitation approfondie de diverses techniques spectroscopiques telles que la RMN ^1H , ^{13}C , ^{31}P et l'infrarouge, incontournables en synthèse organique.

Références et notes

[1] a) Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer 580B (sous forme de film pour les produits

liquides ou les suivis de réaction et sous forme de dispersion dans des pastilles de bromure de potassium (KBr) pour les solides). Les nombres d'onde sont donnés en cm^{-1} ; b) Les spectres RMN sont enregistrés sur des appareils Bruker WP80 ou Bruker AM400. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au solvant ou au tétraméthylsilane (TMS) (référence interne) pour les spectres RMN ^1H , au solvant (référence interne) pour les spectres RMN ^{13}C et par rapport à l'acide phosphorique à 80 % (référence externe) pour les spectres RMN ^{31}P . Les constantes de couplages (J) sont exprimées en hertz (Hz) et la multiplicité des signaux est indiquée par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet) et m (massif); c) Les chromatographies sur couche mince (CCM) sont réalisées sur plaques de silice Kieselgel 60F₂₅₄ neutre (Merck).

- [2] Kafarski P., Mastarlez P., *Aminophosphonates. Natural occurrence, biochemistry and biological properties*, Beiträge zur Wirkstoffforschung, Berlin, **1984**, 21.
- [3] Atherton F.R., Hassal C.H., Lambert R.W., *J. Med. Chem.*, **1986**, 29, p. 29.
- [4] Atherton F.R., Hall M.J., Hassal C.H., Lambert R.W., Lloyd W.J., Ringrose P.S., *Antimicrob. Agent & Chemother.*, **1979**, 15, p. 696.
- [5] Michel-Briand Y., *Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques – Biologie moléculaire 6*, Masson, Paris, **1986**, IV.
- [6] Coutrot P., Grison C., Charbonnier-Gérardin C., *Tetrahedron*, **1992**, 48, p. 9841.
- [7] Teulade N., Savignac P., Aboujaoude E.E., Collignon N., *J. Organomet. Chem.*, **1986**, 312, p. 283.
- [8] Coutrot P., Snoussi M., Savignac P., *Synthesis*, **1978**, p. 133.
- [9] Coutrot P., Ghribi A., *Synthesis*, **1986**, p. 790.
- [10] Coutrot P., Ghribi A., *Synthesis*, **1986**, p. 661.
- [11] Castro B., Dormoy J.R., Evin G., Selve C., *Tetrahedron Lett.*, **1975**, p. 1219.
- [12] Coutrot P., Grison C., Tabyaoui M., Tabyaoui B., Dumarçay S., *Synlett.*, **1999**, p. 792.
- [13] Les chromatographies sur colonne de silice sont réalisées à pression normale avec la silice Kieselgel 60 (Merck).
- [14] Wojtkowiak B., Chabanel M., *Spectrochimie moléculaire*, Tech & Doc, Paris, **1977**.
- [15] Silverstein R.M., Basler G.C., Morill T.C., *Identification spectrométrique de composés organiques*, 5^e éd., DeBoeck Université, Paris-Bruxelles, **1998**.