UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG UFR DE CHIMIE

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Discipline : Chimie organique

par

Patrick NEUBERG

ISOLEMENT DE SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES D'INSECTES. SYNTHESE CHIMIQUE ET PREPARATION D'ANALOGUES STRUCTURAUX

Soutenue le 28 mai 2002 devant la commission d'examen :

| Professeur | J. C. BRAEKMAN | Rapporteur externe |
|------------|----------------|----------------------|
| Professeur | B. BODO | Rapporteur externe |
| Professeur | P. PALE | Rapporteur interne |
| Docteur | B. LUU | Directeur de thèse |
| Docteur | C. HETRU | Codirecteur de thèse |

A mes parents, Paul et Evelyne

Remerciements :

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles sous la direction du Docteur LUU Bang et au Laboratoire de la Réponse Immunitaire et du Développement de l'Insecte sous la direction du Docteur Charles HETRU.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma sympathie à mes deux directeurs de thèse. En particulier je remercie Monsieur le docteur Charles HETRU pour avoir défini mon sujet de thèse et Monsieur le docteur LUU Bang pour son aide dans la réalisation de ce travail dans un environnement scientifique favorable. Je désire vous témoigner toute ma gratitude pour votre disponibilité, vos conseils scientifiques et humains, vos encouragements et pour m'avoir accordé une grande liberté et confiance au cours de ce travail de thèse.

Je remercie très sincèrement les membres du jury d'avoir accepté de juger ce mémoire, conscient du travail que cela représente :

- Monsieur le Docteur Bernard BODO, directeur de recherches du CNRS au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris
- Monsieur le Professeur Jean-Claude BRAEKMAN, Professeur à l'Université Libre de Bruxelles
- Monsieur le Professeur Patrick PALE, Professeur à l'Université de Strasbourg.

Je suis très reconnaissant envers Monsieur le Professeur Jules A. HOFFMANN pour son engagement dans l'établissement de cette collaboration fructueuse entre les différents partenaires impliqués, et pour sa vision scientifique de la biologie de l'insecte.

Je tiens à remercier Dr. Jacques BRUN et Dr. André FERRAN de l'INRA d'Antibes pour la mise à notre disposition d'une grande quantité des coccinelles *Harmonia axyidis* Pallas, type *flightless*.

Je exprime ma gratitude envers la société ENTOMED SA (France) et la société MEIJI (Japon) pour le dépôt de trois brevets sur les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Je remercie tout particulièrement Dr. Jean-Luc DIMARCQ, directeur scientifique d'Entomed, Dr. Marc GUENNEUGUESS et Mlle Paula DECK pour leur aide dans la formulation des brevets et pour leurs conseils scientifiques. J'ai passé un temps magnifique dans mes deux laboratoires d'accueil, entouré de personnes hautement motivés par la science et pleins d'humanité. Ce fut pour moi une période pleine d'enrichissements personnels. Je remercie tous les gens que j'ai pu rencontrer pendant ma période de thèse. Je remercie tout particulièrement :

- Mme Martine SCHNEIDER pour son aide en microbiologie
- Nigel RIBEIRO pour son aide dans la préparation de la molécule THF-6
- Emilie BLANCHE pour sa motivation et sa rigueur dans la synthèse de molécules énoniques par synthèse parallèle
- Djalil COOWAR, Stéphane STREIFF, Thierry MÜLLER, Vincent SEMETEY, Nicolas HECK pour l'amitié, pour les longues discussions scientifiques, pour les soirées et les *Week-ends* passés ensemble au laboratoire
- Céline GIRLANDA-JUNGES et Stéphanie HENRIOT pour leur dynamisme et leur sympathie
- Delphine JACQUOT et Delphine TRANCARD pour leur amitié
- Dr. Laurent DESAUBRY, Dr. Elisabeth TRIFILIEFF, Dr. Gilles GUICHARD pour les conseils en chimie organique
- Dr. Philippe BULET et Dr. Laurence SABATIER pour tous les renseignements sur l'isolement de peptides cationiques
- Dr. Jean-Luc IMLER pour ses conseils pour la réalisation des tests cytotoxiques

Je suis particulièrement reconnaissant envers le GOUVERNEMENT FRANÇAIS pour le financement de mes études de thèse par l'attribution d'un aide financière par le Ministère de la Recherche et de Technologie.

J'ai une pensée pour mes professeurs antérieurs qui m'ont mis sur la bonne piste : Pr. Patrick PALE (stage de licence), Dr. Jean SUFFERT et Dr. Stéphane RAEPPEL (stage de DEA).

J'ai beaucoup de tendresse pour mes parents Paul et Evelyne qui m'ont aidé à faire mes études supérieures, et pour mon frère Jacques pour son soutien moral.

SOMMAIRE

| I. | Introduction générale | 1 |
|---------|--|----|
| 1.1. | La diversité chimique des métabolites secondaires des insectes | 3 |
| 1.1.1. | Composés polyoxygénés d'insectes | 4 |
| 1.1.2. | Molécules hétéroaromatiques azotées d'insectes | 8 |
| 1.1.3. | Alcaloïdes d'insectes | 10 |
| 1.2. | Composés antimicrobiens d'insectes | 15 |
| 1.3. | La réponse immunitaire et les peptides antimicrobiens des insectes | 18 |
| II. | Isolement de substances antibactériennes d'insectes | 27 |
| 2.1. | Caractérisation et identification d'une substance antibactérienne, antiGram(-) | |
| | chez Harmonia axyridis (Pallas) | 27 |
| 2.1.1. | Principe de l'isolement par pharmacoguidage | 27 |
| 2.1.2. | Extraction de Harmonia axyridis (Pallas) au dichlorométhane-méthanol et | |
| | fractionnement de l'extrait sur silice | 27 |
| 2.1.3. | Suivi de l'activité biologique | 28 |
| 2.1.4. | Fractionnement par SPE et par HPLC (C8) de la phase aqueuse | 28 |
| 2.1.5. | Fractionnement de la "fraction méthanolique" en HPLC | 30 |
| 2.1.6. | Séparation sur une cartouche de phase inverse | 34 |
| 2.1.7. | Analyse en chromatographie sur couche mince | 35 |
| 2.1.8. | Séparation typique pour les alcaloïdes par extraction différenciée | 36 |
| 2.1.9. | Chromatographie de la fraction "méthanolique" sur silice | 36 |
| 2.1.10. | Chromatographie sur silice en plus grande échelle | 37 |
| 2.1.11. | Détermination partielle de la structure de la substance active | |
| | par ¹ H-RMN | 37 |
| 2.1.12. | Spectroscopie de masse en Electrospray (ESI, tension : 50 V) | 39 |

| 2.1.13. | Identification de la substance active comme étant le |
|---------|---|
| | 1,17-diaminooctadéc-9-ène, appelé ''harmonine'' |
| | dans la littérature scientifique40 |
| 2.1.14. | La Spectrométrie de masse en Impact Electronique (EI) consolide la détermination de la structure de la substance active |
| 2.2. | Autres activités antimicrobiennes chez les insectes45 |
| III. | L'harmonine et ses analogues : synthèse chimique et activités antimicrobiennes |
| 3.1. | Objectifs de la synthèse de l'harmonine (Z-1,17-diaminooctadéc-9-ène)47 |
| 3.2. | Objectifs de la synthèse de diamines, analogues de l'harmonine47 |
| 3.3. | Synthèse chimique de l'harmonine et de ses analogues |
| 3.4. | Problèmes rencontrés au niveau de la synthèse de l'harmonine et de ses analogues |
| 3.5. | Tableau des activités antimicrobiennes de monoamines et de diamines60 |
| 3.6. | Résultats biologiques |
| 3.7. | Discussion sur l'activité des diamines |
| IV. | Polyamines : analogues de deuxième et de troisième générations de l'harmonine |
| 4.1. | Polyamines de deuxième génération, à squelette hydrocarboné ramifié67 |
| 4.1.1. | Objectifs de la synthèse de ces polyamines65 |
| 4.1.2. | Synthèse chimique des polyamines de deuxième génération67 |
| 4.1.3. | Problèmes rencontrés au niveau de la synthèse des tétra- et hexaamines71 |

| 4.1.4. | Activités antimicrobiennes des polyamines de deuxième génération74 |
|--------|---|
| 4.1.5. | Solubilité des polyamines de deuxième génération75 |
| 4.2. | Polyamines de troisième génération, |
| | basées sur un tétrahydrofurane tétrasubstitué76 |
| 4.2.1. | Objectifs de la synthèse des tétraamines de troisième géneration, |
| | basées sur un tétrahydrofurane tétrasubstitué76 |
| 4.2.2. | Objectifs de la synthèse de la tétraamines THF-cyclo, comportant |
| | des cyclohexanes dans ses chaînes latérales77 |
| 4.2.3. | Synthèse chimique des tétraamines basées sur un tétrahydrofurane |
| | tétrasubstitué79 |
| 4.2.4. | Préparation des chaînes latérales linéaires81 |
| 4.2.5. | Préparation des chaînes latérales du THF-cyclo85 |
| 4.2.6. | Activités antimicrobiennes des tétraamines centrées sur un THF tétrasubstitué |
| V. | Evaluation de la toxicité des polyamines synthétisées91 |
| 5.1. | Evaluation de la perméabilisation membranaire des |
| | érythrocytes (globules rouges) de singe (macaque) par les polyamines : test d'hémolyse |
| 5.2. | Evaluation de la cytotoxicité des polyamines sur des |
| | cellules cancéreuses humaines HeLa à l'aide du réactif XTT (Sigma)96 |
| 5.3. | Evaluation de la cytotoxicité des polyamines sur des cellules |
| | de Schneider S2 de drosophile par le XTT |
| 5.4. | Evaluation de la cytotoxicité des polyamines sur des cellules |
| | de Schneider S2 de drosophile à l'aide d'une coloration par |
| | ie violet de Gentiane100 |
| 5.4.1. | Série 1 : cellules S2 ; révélation au violet de Gentiane101 |
| 5.4.2. | Série 2 : cellules S2 ; révélation au violet de Gentiane103 |

| 5.5. | Tableau comparatif des diverses activités cytotoxiquesdes polyamines synthétisées104 |
|--------|---|
| 5.6. | Comparaison des résultats de l'évaluation de la cytotoxicité <i>in vitro</i> des polyamines105 |
| 5.7. | Evaluation de la toxicité des polyamines synthétisées sur des souris par injection intraveineuse (toxicité in vivo)108 |
| VI. | Antécédents : molécules polycationiques111 |
| 6.1. | Molécules cationiques naturelles111 |
| 6.1.1. | Molécules naturelles dicationiques à longue chaîne flexible |
| 6.1.2. | Molécules naturelles monocationiques à longue chaîne flexible112 |
| 6.1.3. | Molécules naturelles polycationiques, |
| | la famille des polyamines113 |
| 6.2. | Molécules cationiques antiseptiques de synthèse115 |
| 6.2.1. | Molécules dicationiques antiseptiques de synthèse115 |
| 6.2.2. | Molécules antiseptiques basés sur le squelette des polyamines116 |
| 6.3. | Antériorités par rapport à nos travaux sur des α,ω -diamines |
| | à longue chaîne117 |
| 6.3.1. | α, ω -diamines à longue chaîne |
| 6.3.2. | α, ω -diammoniums à longue chaîne |
| VII. | Conclusions générales : Résumé et Perspectives119 |
| 7.1. | Conclusions générales119 |

| 7.2. | Perspectives | 123 |
|------------------|--|-----|
| 7.2.1. | Perspectives au niveau de la chimie médicinale | 123 |
| 7.2.2. | Perspectives au niveau de l'interaction moléculaire | |
| | des polyamines avec des récepteurs biologiques | |
| 7.2.3. | Perspectives au niveau de l'interaction membranaire | |
| 7.2.4. | Perspectives au niveau de la synthèse organique | 126 |
| | | |
| VIII. Pa | rtie expérimentale | 127 |
| 8.1. Te | ests biologiques | 127 |
| 8.1.1. | Test d'évaluation de l'activité antimicrobienne et/ou antifongique | |
| 8.1.2. 8.1.3. | Test de cytotoxicité | |
| 8.2. Synt | hèse organique | 133 |
| 821 | Synthèse de l'harmonine (7-1 17-diaminooctadéc-9-ène) | 133 |
| 8.2.2. | Synthèse de diamines analogues de l'harmonine | |
| 8.2.3. | Synthèse de la triamine Tri-8 | 148 |
| 8.2.4. | Synthèse des hexaamines Hex-6 et Hex-4 | 156 |
| 8.2.5. | Synthèse de la tétraamine Tét-7 | 171 |
| 8.2.6. | Synthèse de la tétraamine THF-7 | 178 |
| 8.2.7. | Synthèse de la tétraamine THF-6 | |
| 8.2.8. | Synthese de la tetraamine THF-4 | |
| 0.2.9. | | 195 |
| IX. Bibl | iographie | 211 |
| X. Résu | mé de thèse / Summary / | |
| Keywor | ds | |

Objectifs du travail de thèse :

Ce travail de thèse s'inscrit dans le domaine de la recherche de substances naturelles comme nouvelles classes de composés antimicrobiens. Nous avons exploré les extraits de diverses espèces d'insectes pour isoler des substances actives par pharmacoguidage (''bioassay-guided isolation''). En effet, les insectes sont une source de produits naturels peu étudiée et représentent le groupe biologique le plus diversifié avec le plus grand nombre d'espèces¹⁻⁵. Les substances actives, que nous avons isolées, ont été resynthétisées pour confirmer leur structure et leurs propriétés biologiques. Nous avons préparé des molécules analogues afin d'optimiser les qualités pharmacologiques. L'analyse de la ''relation structure-activité'' a permis de dégager des éléments structuraux qui augmentent la sélectivité envers les cellules bactériennes, et cette analyse a abouti à la synthèse de molécules antibactériennes et non hémolytiques.

1. Introduction :

En santé humaine l'incidence des infections microbiennes opportunistes est en constante progression ces dernières années. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé plus de 95 % des souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* sont résistantes à la pénicilline et plus de 60% sont également devenues résistantes à son dérivé la méthicilline⁶. Cette résistance risque de s'étendre aux bactéries les plus pathogènes, et la recherche de nouvelles classes de composés antibactériens s'impose.

Les insectes sont connus pour leur forte résistance aux microorganismes, ce qui est principalement dû à leur réponse immunitaire innée efficace, mettant notamment en jeu différentes familles de peptides antimicrobiens⁷. Nous avons voulu isoler des substances antimicrobiennes non peptidiques qui complètent naturellement cette résistance aux infections.

Les insectes sont connus pour produire des substances chimiques diverses telles que : des phéromones, qui servent à la communication entre individus d'une même espèce, ou des allomones, qui servent à la communication entre individus d'espèces différentes. Ces derniers servent entre autres à la défense contre les prédateurs (ex. venins et molécules de défense) ; leur présence est souvent signalée par des colorations aposématiques.

Nous allons illustrer dans un premier temps la diversité chimique des substances naturelles d'insectes par quelques exemples de structures complexes de ces métabolites secondaires. En effet, s'il n'est pas étonnant de trouver une grande diversité de structures chimiques chez les plantes, les champignons ou dans les organismes marins, souvent associés à un mode de vie sessile, peu de substances de structure originale ont été isolées chez des animaux terrestres. Les insectes semblent faire exception à cette règle de monotonie.

Nous allons montrer la diversité chimique des métabolites secondaires des insectes à l'aide de composés hétéroclites, qui de par leur structure, pourraient susciter un intérêt pharmacologique. Parmi ces composés, nous allons montrer ceux qui font partie de la défense chimique des insectes et qui, en cas d'attaque, sont sécrétés par des glandes spécifiques ou émis avec l'hémolymphe (''reflex-bleeding''). Les composés des sécrétions de défense présentent souvent des activités biologiques prononcées, même à faible dose.

Dans un deuxième temps nous allons montrer quelques rares exemples, de la littérature, de composés antimicrobiens isolés d'insectes.

Dans un troisième temps nous allons rappeler quelques caractéristiques des différentes familles de peptides antimicrobiens des insectes, ce qui va nous aider à dégager un certain

parallélisme entre ces peptides et les composés antimicrobiens amphiphiles et polycationiques qui seront décrits en détail dans ce présent travail de thèse.

1.1. La diversité chimique des métabolites secondaires des insectes

Les insectes représentent le groupe animal le plus diversifié d'un point de vue morphologique aussi bien que d'un point de vue écologique. Environ un million d'espèces d'insectes sont décrites et nommées jusqu'à maintenant, ce qui représente plus de la moitié de toutes les espèces animales réunies³. Certaines estimations prédisent encore un million d'espèces d'insectes à découvrir, d'autres évaluent que ce nombre pourrait aller jusqu'à trente millions (E. O. Wilson 1988)⁸. La ''dominance phylétique'¹⁸ des arthropodes s'explique d'abord par le fait que ces animaux étaient parmi les premiers à coloniser les continents il y a 400 millions d'années. L'imperméabilisation de l'exosquelette les protégeait de l'assèchement et conduisait au développement de tubes trachéens. L'exosquelette rigide permettait aux arthropodes de porter leur corps sur leurs pattes, ce qui constituait une première au niveau de l'évolution. Ce gain de mobilité facilitait largement leur expansion ainsi que la recherche active de milieux favorables. L'élaboration de pièces buccales spécialisées, rendait accessible une grande variété de nourriture. Le développement d'ailes chez l'adulte des insectes ptérygotes permettait l'exploration de biotopes nouveaux et la recherche des partenaires.

L'épiderme de l'insecte est essentiellement glandulaire pour former l'exosquelette chitineux. Ces glandes auraient pu se reprogrammer et se spécialiser dans la sécrétion d'autres substances naturelles et contribuer ainsi à la protection et à la défense chimique de l'insecte.⁸

La défense de l'insecte contre des prédateurs repose entre autres sur la sécrétion de substances leur conférant un goût ou une odeur désagréables. Ces substances sont souvent de structure très simple, ce qui est principalement dû à la nécessité d'être perçues comme odeur, condition qui limite leur poids moléculaire ainsi que le nombre des groupements polaires de leur structure chimique. Il s'agit essentiellement de composés simples, mais très variés, tels que : des hydrocarbures à longue chaîne (1-nonène, 3-méthylnonane, 4,7-tridécadiène, pentadécane) ou cycliques (toluène, α -pinène, β -pinène, limonène, camphène, terpinolène), des alcools gras (1-hexanol, 2-heptanol, 2-phényléthylalcool, (5-éthylcyclopent-1-ènyl)méthanol, citronellol, 1-undécanol, 2-tridécanol, 3,5,13-tétradécantrién-1-ol, eicosénol), des aldéhydes (acétaldédyde, n-propanal, 2-buténal, 2-éthylacroléine, benzaldéhyde, salicylaldéhyde, citral), des cétones (2-pentanone, 2-méthylcyclopentanone, 3-tétradécanone, 1,15-hexadécadién-3-one), des acides carboxyliques (acide formique, acide méthacrylique, butyrique, isovalérique, acide β -hydroxyoctanoïque, acide 10acide acide méthyldodécanoïque), des quinones (benzoquinone, hydroquinone, 6-n-propyl-1,4naphtoquinone), des esters (méthylsalicylate, n-butylbutyrate, 2-phényléthyloctanoate, nhexadécylacétate), des lactones (δ -D-gluconolactone, γ -dodécanelactone), des phénols (phénol, o/m/p-crésol, m/p-éthylphénol), des organosoufrés (diméthyldisulfure, diméthyltrisulfure), de l'ammoniaque, de l'acide cyanhydrique (produit à partir de glycosides, du mandélonitrile ou du cyanure de benzoyle).⁹

Cette énumération montre que les composés de la défense chimique des insectes sont souvent biologiquement très actifs (ex. HCN), mais dotés d'un potentiel pharmacologique faible, parce qu'ils sont chimiquement trop simples ou constitués d'un squelette hydrocarboné trop flexible. L'insecte accroît le potentiel de ces substances par l'utilisation de mélanges complexes où des effets coopératifs augmentent considérablement les activités des composants individuels. Ceci est vrai pour les métabolites secondaires de tous les arthropodes. Le cas le plus flagrant est la composition du venin des scorpions, ordre ancestral des arthropodes. Les scorpions de l'espèce *Mastigoproctus giganteus* projettent un mélange de 85 % d'acide acétique et 5 % d'acide caprylique vers un agresseur.⁸ L'acide caprylique facilite le transport de l'acide acétique à travers la cuticule d'un arthropode-assaillant ; ainsi l'adjonction d'un agent lipophile (acide caprylique) augmente l'efficacité d'un autre composé polaire bioactif (acide acétique).

La suite de ce chapitre va être consacrée à la présentation de molécules d'insectes polyfonctionnalisées et riches d'un point de vue pharmacologique.

1.1.1. Composés polyoxygénés d'insectes

Nous tenons à rappeler que l'oxygène est un accepteur de liaisons hydrogène. Les groupements hydroxyle sont des donneurs de liaisons-hydrogène. Ainsi la présence d'atomes d'oxygène dans une molécule peut fournir des ''points d'attache'' pour interagir avec des macromolécules biologiques. Des molécules polyfonctionnalisées ont de fortes chances d'être biologiquement actives, et leur géométrie, qui fixe l'orientation des accepteurs et donneurs de liaisons-H, détermine la spécificité d'interaction. Ceci est particulièrement vrai pour certains oxystéroïdes d'insectes, pour les phéromones dioxaspiroalcanes, pour la péderine, pseudopeptide d'insecte, ainsi que pour la cantharidine, toxine de coléoptère. Nous allons illustrer cette diversité par quelques structures de substances naturelles d'insectes polyoxygénées, qui présentent une certaine richesse du point de vue de la chimie médicinale.

Des fonctionnalités chimiques simples, comme des liaisons éther, peuvent donner lieu à des structures très compactes de type dioxaspiroalcane. Ces composés se caractérisent par la chiralité inhérente à la jonction spiro-cétal. L'introduction de petites modifications

structurales permet de créer des phéromones caractéristiques, ce qui va suffire aux individus d'espèces d'insectes proches pour se distinguer. Ces phéromones sont isolées de glandes rectales chez des diptères de la famille des Tephritidae.¹⁰ Les spirocétals **I-1** et **I-2** sont isolés de l'espèce *Bactrocera halfordiae*, accompagnés d'esters éthyliques en C12, C14 et C16, de linalool et de méthyl- et éthylpyrazines. Les dialkylspirocétals **I-3** et **I-4** sont des constituants minoritaires des glandes rectales de l'espèce *Bactrocera cucumis*. La dihydroxypyrone **I-5** fut caractérisée chez *Bactrocera dorsalis* accompagnant les dioxaspiroalcanes.¹⁰



Un composé dihydroxylé de structure polyconjuguée a été isolé des glandes pygidiales du coléoptère aquatique *Dytiscus marginalis* de la famille des dytiques. Il s'agit de la marginaline (E-(4', 5-dihydroxybenzal)-isocoumaranone) **I-6**, où une lactone est associée à deux fonctions phénoliques.¹¹



Des 3,6-dihydroxy-2-cyclohexénones substitués en position 2 par des chaînes alkyles sont sécrétées par les glandes sétales de "nymphes" de punaises des espèces *Corythucha ciliata* (**I-7**) et *Corythucha cydoniae* (**I-8**) de la famille des Tingidae.¹² Des analogues monohydroxylés (**I-9**) sont sécrétés par les glandes mandibulaires des larves d'*Ephestia kuehniella* de la famille des pyrales.¹² II est intéressant de noter que les sécrétions de défense de ce lépidoptère jouent également le rôle de "kairomone" envers les parasites de ces larves. Les kairomones sont des substances chimiques émises par des organismes et qui sont avantageuse pour l'espèce, qui les détecte. Ainsi c'est grâce aux kairomones que les prédateurs (ou parasites) repèrent leurs proies.

Le mylabris est de la poudre séchée de certains coléoptères broyés, utilisé depuis plus de 2000 ans en médecine traditionnelle chinoise.¹³ Ce remède traditionnel est préparé à partir

des espèces *Mylabris phalerata* et de *M. cichorii*, et contient comme principe actif la cantharidine **I-10**. Cette substance, polyoxygénée, contient une liaison éther cyclique formant un bicycle du type 7-oxa-bicyclo[2.2.1]heptane.¹⁴

La cantharidine est également présente dans le coléoptère européen Lytta vesicatoria d'Espagne), connu pour (Cantharide. mouche ses propriétés vésicatoire et aphrodisiaque (inductrice de priapisme).¹⁻⁴ De nouvelles études ont mis en évidence d'autres activités biologiques de cette substance naturelle de natures très diverses : elle possède des propriétés anticancéreuses, fait augmenter le nombre de leucocytes par stimulation de la moelle osseuse, et elle conduit à l'irritation des voies urinaires. L'analogue structural, synthétique, la norcantharidine (I-11), a montré des activités accrues contre l'hépatome dans des études cliniques; en même temps la norcantharidine est moins irritante pour les voies urinaires.¹³ Cet exemple montre que des substances naturelles isolées d'insectes peuvent donner lieu à de nouveaux principes actifs de structure originale.¹⁵



Une autre préparation, faite à partir d'un extrait d'insectes,¹⁶ fut décrite dans la pharmacopée chinoise par Ch'en dans l'année 739 après J.–C.. Des extractions de *Paederus fuscipes* (coléoptère de la famille des Staphilidae) avaient été utilisées pour enlever des tatouages des visages par décapage de la peau. Elles sont encore utilisées pour traiter certaines ecto-parasitoses ou bien pour enlever des polypes du nez. Le principe actif a été purifié en 1952, et l'élucidation de sa structure a nécessité 16 années. Il s'agit de la péderine (**I-12**), structure comportant des cycles tétrahydropyranes reliés par une liaison N-acylaminale.¹⁶ La péderine possède de fortes propriétés biologiques autres que ces activités vésicatoires. Elle conduit à l'inhibition de la mitose, au blocage de la synthèse protéique et de la biosynthèse de l'ADN. Elle possède également des activités antivirales *in vitro*.

Le rôle important des hormones stéroïdiennes dans le développement de l'insecte a été saisi très tôt dans les années 1950 (Butenandt, Karlson 1954).¹⁷ L'ecdysone **I-13** est transformé en ecdystérone dans le corps gras de l'insecte par hydroxylation en position 20 ; ce dernier est l'hormone qui déclenche la mue de l'insecte.

Des dérivés stéroïdiens sont également retrouvés dans les sécrétions de défense de certaines espèces des familles de Dytiscidae, (dytiques, coléoptères aquatiques), de Lampyridae (''vers luisants'') et de Chrysomelidae.⁹



La cybistérone **I-14** est un stéroïde unique dans le règne animal et comporte une diénone conjuguée.⁹ Elle est isolée des glandes prothoraciques de dytiques adultes (Cybister lateralimarginalis, C. limbata, Dyticus marginalis, Acilius sulcatus, famille des Dytiscidae, coléoptères de l'eau). La cortexone **I-15** est un autre stéroïde de défense largement répandu parmi les dytiques.⁹ Ce stéroïde est fortement narcotique pour les poissons d'eau douce et peut être présent à une concentration de 1 mg par individu (Cybister limbatus). Ces stéroïdes servent de défense contre des prédateurs vertébrés d'eau douce, l'eau facilitant leur diffusion.



Des cardiolipides (stéroïdes glycosylés, où la chaîne latérale est convertie en furanone) sont synthétisés de novo par des Chrysomelidae (à partir d'autres stéroïdes), et ne sont donc pas séquestrés à partir des plantes desquelles ces coléoptères se nourrissent.9 Ces glycosides sont sécrétés par des glandes localisées le long des bords des élytres et servent également de défense contre les prédateurs. Certains chrysomélides sécrètent un mélange composé des glycosides et des aglycones des cardiolipides. Chez Chrysolina dydimata les sécrétions ne contiennent que l'aglycone sarmentogénine (I-16), dans d'autres espèces d'autres aglycones comme la périplogénine et la bipindogénine sont trouvées à côté des conjugués xylosidés.9

Les Lampyridae (lucioles, vers luisants) produisent des stéroïdes polyhydroxylés (lucibufagines) structurellement proches des cardiolipides où la partie 5H-furan-2-one est remplacée par une pyran-2-one.⁹ Ces stéroïdes s'apparentent à la famille des bufalines, famille de toxines de crapauds venimeux . La bufaline (**I-18**) est toxique à une dose très faible, (la LD50 est de 0,137 mg par kg pour la souris). L'importance pharmacologique de la lucibufagine C (**I-17**), isolée de *Photinus pyralis*, réside dans sa forte activité antivirale.⁸ Cinq stéroïdes différents ont été isolés de *P. pyralis*, et diffèrent par les résidus esters (acétoxy, isobutyroxy ou propionyloxy) en positions 2 et 3 du squelette du stéroïde.

La présence de cette multitude de stéroïdes dans les insectes est remarquable, d'autant plus que des études ont montré que l'insecte est incapable de biosynthétiser le squelette stéroïdien, qui doit provenir sous forme de précurseur de leur nourriture (cholestérol ou phytostérols tels le sitostérol).

1.1.2. Molécules hétéroaromatiques azotées d'insectes

Du point de vue de la chimie médicinale les hétérocycles aromatiques sont d'une grande richesse de par leur géométrie et l'orientation donnée des hétéroatomes, responsables d'interactions biologiques. Le squelette de base est rigide, ce qui diminue le nombre de conformères possibles et ce qui augmente la sélectivité d'interaction. Nous allons montrer que nous retrouvons chez l'insecte des motifs bien connus de certaines classes de médicaments tel le noyau diazépine, constituant de pigments d'insectes et qui en même temps est la structure de base des benzodiazépines, tranquillisants de synthèse.

Les collemboles (''springtails'') font partie des ordres d'insectes les plus anciens, à savoir les aptérygotes (sous-classe des entotrophes), et existaient déjà au dévonien (350 Ma, quatrième période du paléozoïque).¹⁻³ Les sécrétions de défense de *Tetrodotophora bielanensis* (''Giant springtail'') contiennent une famille d'hétérocycles élaborés, à savoir les pyridopyrazines³ (**I-19, I-20, I-21**), et présentent une action répulsive envers certains coléoptères.¹⁸



Les fourmis des sous-familles des Dolichoderinae et des Myrmicinae produisent dans leurs glandes maxillaires des pyrazines trisubstituées (ex. **I-22**, **I-23**, **I-24**).¹⁹ Ces composés agissent comme phéromones d'alarme. Dans l'espèce *Odontomachus troglodytes* les mâles sont repoussés par une source artificielle de ces phéromones (ex. **I-22**, **I-24**) ; les ouvrières sont attirées par ces mêmes substances et montrent un comportement d'attaque. D'autres insectes, comme certaines guêpes, certains coléoptères ou même certains diptères, produisent des alkylpyrazines similaires.¹⁹



Deux classes de pigments de l'œil de la drosophile peuvent être distingués : d'une part ce sont les pigments bruns, les ommochromes, d'autre part ce sont les pigments rougeoranges, les drosoptérines, qui sont responsables de la coloration caractéristique en rouge des yeux des drosophiles.²⁰ Ces drosoptérines (**I-28** drosoptérine, **I-29** aurodrosoptérine) constituent des exemples de systèmes hétérocycliques pentacycliques.^{20, 21, 15} Leur biosynthèse passe par le triphosphate de la dihydronéoptérine (**I-25**), qui lors du départ des phosphates donne de la pyruvoyltétrahydroptérine (**I-26**). Cette dicétone se réarrange avec formation d'imine intracyclique et élargissement du cycle, ce qui conduit à la formation de l'acétylhomoptérine (**I-27**). Cette acétylhomoptérine constitue, ensemble avec les drosoptérines, les quelques rares exemples de diazépines trouvées dans le monde animal. Leur potentiel pharmacologique est très élevé vu que l'acétylhomoptérine peut interférer avec le métabolisme de la tétrahydroptérine, impliquée dans des maladies humaines du système nerveux central.



schéma I.1. : Biosynthèse de pigments de l'œil chez la drosophile

1.1.3. Alcaloïdes d'insectes

Nous tenons à rappeler que de nombreux alcaloïdes naturels sont dotés de fortes activités biologiques. Nous pouvons citer la nicotine, qui interagit spécifiquement avec des récepteurs cholinergiques, ou la colchicine qui dépolymérise les microtubules du cytosquelette. La plupart des alcaloïdes d'intérêt pharmacologique sont isolés de plantes. Les alcaloïdes d'insectes sont peu étudiés et leurs activités pharmacologiques sont inconnues pour la plupart. Ce groupe de substances naturelles d'insectes a la faculté de fournir de nouveaux motifs (leads) de substances pharmacologiquement actives et de structure originale. En premier lieu nous citons un cas intéressant où l'insecte se sert des alcaloïdes produits par les plantes pour sa propre défense.

Nous avons vu que les insectes doivent se servir de phytostérols contenus dans leur nourriture pour en synthétiser, après la modification du squelette stéroïdien, leurs propres stéroïdes. Une telle séquestration et métabolisation sont également observées pour les alcaloïdes de la famille des pyrrolizidines (PA) de plantes nourricières d'insectes phytophages. Des alcaloïdes de plante des familles *Apocynaceae*, *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Fabaceae* ou *Orchidaceae* appartiennent à cette famille de pyrrolizidines. Les chenilles de *Creatonotos transiens* de la famille des *Arctiidae* se nourissent des feuilles de ces plantes et ingèrent même activement les alcaloïdes de ces végétaux (pharmacophagie), ce qui leur procure une protection vis-à-vis des prédateurs.



schéma I.2.: Production d'une phéromone à partir d'un alcaloïde PA chez *Creatonotos transiens*

Les mâles de *C. transiens* métabolisent partiellement ces alcaloïdes en phéromones (schéma I.2.), dont la quantité sécrétée est directement proportionnelle à la concentration interne en alcaloïdes.²² Les femelles sont ainsi attirées par les mâles possédant le maximum d'alcaloïdes. Ces pyrrolizidines sont tranférées à la femelle lors de l'accouplement et vont servir à protéger la progéniture .



Les alcaloïdes phénanthroindolozidine (PIA) du papillon *Ideopsis similis* (famille des Danaidae) sont également séquestrés à partir d'une plante de l'espèce *Tylophora tanakae*.^{23, 24} Ces alcaloïdes, illustrés par **I-30**, ont des propriétés cytotoxiques sur des lignées cancéreuses humaines.

Les exemples d'alcaloïdes qui suivent semblent être biosynthétisés par l'insecte et sont d'origine endogène.

La chilocorine B **I-31** est un alcaloïde dimère isolé de *Chilocorus cacti* (Coccinellidae). Une liaison spirocyclique relie deux systèmes, dont la partie azaphénalène

ressemble à l'hippodamine, alcaloïde de *Hippodamia convergens* (autre espèce de coccinelle).²⁵

Un alcaloïde dimère heptacyclique **I-32** se trouve dans les glandes venimeuses d'une fourmi Africaine *Myrmicaria opaciventris*. Cet alcaloïde est très sensible à l'air, et sa structure fut déterminée par RMN sans purification préalable des sécrétions.²⁶

Les nymphes de coccinelles du genre *Epilachna* sont revêtues de poils glandulaires, qui portent à leur extrémité une gouttelette gluante, qui s'avère répulsive envers des insectes prédateurs. Dans l'espèce *Epilachna varivestis* (''Mexican bean beetle'') ces microsécrétions contiennent des azamacrolides, des macrolactones contenant un azote dans leur cycle comportant 13 à 16 membres ; **I-33**, **I-34**, **I-35**, **I-36** sont des exemples de cette série homologue. Ces alcaloïdes sont biosynthétisés à partir de la sérine et d'acides gras, tel l'acide oléique.^{27, 28, 29}



Les nymphes de *Epilachna borealis* semblent capables de synthétiser un grand arsenal de composés de défense par "chimie combinatoire" et d'en nantir leurs poils glandulaires.^{29,30} L'analyse directe par résonance magnétique nucléaire de ces sécrétions a montré qu'il s'agit d'esters et d'amides dérivés d'acides (ω -1)-(2-hydroxyéthylamino)-alcanoïques cyclisés de façon intramoléculaire. Une hydrolyse alcaline a fourni les trois monomères **I-37**, **I-38**, **I-39**, caractérisés par GC-MS ; une chromatographie sur silice a permis l'isolement du composé majoritaire, l'acide 10-(2-hydroxyéthylamino)undécanoïque **I-39**.



Ces monomères s'oligomérisent de façon non-spécifique par formation de liaisons esters. Ainsi sont formés des di- tri- tétra- penta- hexa- ou heptamères cycliques, appelés polyazamacrolides (PAM) ayant des cycles larges jusqu'à 98 membres. Un PAM-tétramère **I-40** est illustré dans le schéma I.3. (m, n, o, p peuvent varier indépendamment de 5 à 7). Les liaisons lactones se réarrangent facilement pour former des liaisons lactame (formation de **I-**

41 à partir de **I-40** dans le schéma I.3.), ce qui augmente la complexité des sécrétions de défense de cet insecte.³⁰



schéma I.3. : Réarragement chimique chez les alcaloïdes PAMs

Epilachna varivestis est non seulement protégé par des poils toxiques au stade de nymphe, mais contient également des alcaloïdes dans son hémolymphe à tous les autres stades de son développement.^{28, 30-33} Des extraits totaux, suivis d'une séparation spécifique des alcaloïdes, ont fourni des diamines à longue chaîne hydrocarbonée, où une des amines est engagée dans un groupe hydroxyéthylamine (**I-42, I-43, I-44**) tout comme chez les PAMs. Ces alcaloïdes contiennent des chaînes de longueur variable greffées sur le cycle d'une pyrrolidine. **I-44** et **I-45** sont les alcaloïdes majoritaires des œufs, des larves et des pupes d'*E. varivestris*. Au stade adulte leur concentration diminue au profit d'un autre alcaloïde, l'euphococcinine (**I-46**).²⁸



Les alcaloïdes pyrrolidines forment également le principe actif de venins de fourmis du genre *Monomorium*. La diversité en alcaloïdes pyrrolidines, substituées en position 2 et 5 et de configuration *trans*, est telle qu'elle peut servir de critère taxonomique à distinguer les espèces de ce genre. L'espèce *M. pharaonis* contient en plus de ses quatre dialkylpyrrolidines (ex. **I-47**) deux alcaloïdes indolizidines (**I-48, I-49**).^{19, 34c}



Les fourmis appartenant au genre *Solenopsis* produisent un venin riche en alcaloïdes et pauvre en protéines. Elles sont appelées fourmis-feu (''fire ants'') à cause de la puissance de leur venin, qui a des activités nécrotiques, hémolytiques, antibiotiques et cytotoxiques.

La majorité de ces alcaloïdes appartiennent au groupe des 2-alkyl-6-méthylpipéridines. Le substituant alkyle est formé d'un nombre impair d'atomes de carbone compris entre C7 et C15 (ex. **I-50** pour *S. invicta*). Le venin de *Solenopsis xyloni* contient une tétrahydropyridine (**I-51**) à côté d'autres 2-alkyl-6-méthylpipéridines.^{19, 34c}



Des fourmis du genre *Tetraponera*, dépourvue d'aiguillon, contiennent dans leur glande venimeuse un composé insecticide, la tétraponérine (**I-52**).^{34a, 34b} Cet alcaloïde décahydrodiazacyclopentanaphtalène est toxique envers des fourmis de l'espèce *Myrmica rubra* par application topique.

Les substances d'insectes ont parfois des activités biologiques si particulières qu'il y a même des prédateurs insectivores qui en tirent profit et qui séquestrent ces métabolites pour leur propre utilisation.³⁵

Certains alcaloïdes de la peau d'amphibiens proviennent de leur régime alimentaire, riche en arthropodes. Des pyrrolizidines (**I-53**) et des indolizidines (**I-54**) semblent être séquestrés à partir de fourmis, des coccinellines tricycliques (precoccinelline **I-55**) semblent provenir de coléoptères, et certaines oximes de pyrrolizidine (**I-56**) proviendraient de myriapodes.³⁵



1.2. Composés antimicrobiens d'insectes :

Comme notre recherche a pour but principal l'isolement de composés antimicrobiens par pharmacoguidage, nous allons rappeler les composés d'insectes dont les propriétés antimicrobiennes sont décrites dans la littérature scientifique.

Le venin de certaines fourmis contient des substances fortement antimicrobiennes telles les alcaloïdes 2-alkyl-6-méthylpipéridines ou encore l'acide formique, mais leur utilisation semble être limitée à la défense contre les prédateurs. Nous allons maintenant décrire des substances d'insectes qui sont principalement antimicrobiennes.



L'espèce *Atta sexdens rubropilosa* est une fourmi coupeuse de feuilles, et qui cultive des champignons sur ces débris de végétaux accumulés. Elle sécrète de l'acide indole acétique (**I-57**) par sa glande métapleurique, localisée dans son thorax. Cet acide est un facteur de croissance de plantes, et il stimule également la croissance des champignons desquels ces fourmis se nourrissent. La myrmicacine (**I-58**), l'acide 3-hydroxydécanoïque, est produite dans la même glande, or cette substance possède des activités antifongiques à haute concentration. Son activité biologique pourrait servir à limiter la croissance de mauvais germes de champignons dans les cultures de champignons des fourmis.¹⁹

Les insectes utilisent souvent des substances antibactériennes des plus simples, avec lesquels ils s'enduisent. Ils tirent donc avantage de l'imperméabilité de leur carapace, ce qui

leur permet d'utiliser des substances bactéricides, peu sélectives, pour nettoyer leur surface extérieure avant que les pathogènes éventuels ne la traversent.

De l'eau oxygénée (H_2O_2) est sécrétée à une concentration de 10 à 15 % par les glandes métasterniques de l'hémiptère aquatique *Plea leachi* et servirait de désinfectant contre les bactéries de surface.^{36, 37} Les espèces du genre *Plea* ont une face ventrale hydrophobe, où des poils hydrofuges retiennent une bulle d'air servant à la respiration. Le développement d'un film bactérien sur ces poils les rendrait hydrophiles et incapables à retenir l'air. Si l'insecte ne peut pas s'enduire de ses sécrétions, le développement bactérien est tel qu'il conduit à sa noyade et son étouffement.

Les coléoptères aquatiques ont également des glandes spécialisées dans la sécrétion de composés antiseptiques.³⁷ Les glandes pygidiales, situées à la base de l'abdomen, produisent des sécrétions visqueuses. Le dytique *Dytiscus marginalis* doit sortir de l'eau pour s'enduire avec ces sécrétions antibactériennes riches en phénols et en acide benzoïque. L'ester méthylique de l'acide p-hydroxybenzoïque (PHB) est très répandu parmi les espèces de coléoptères aquatiques. Malgré l'utilisation du PHB pendant des millions d'années par ces insectes, les microorganismes n'ont pas pu développer de résistance envers cet antiseptique.

La glande prothoracique sécrète, comme décrit précédemment, des stéroïdes de défense contre les prédateurs vertébrés. Or l'ouverture de cette glande vers le milieu aqueux risque d'être une porte d'entrée pour des microorganismes. Le coléoptère *Ilbius fenestratus* produit dans ses glandes, en même temps que les stéroïdes, un composé antibactérien, le 8-hydroxyquinoline-2-carboxylate de méthyle (**I-59**) antibactérien, pour éviter les infections.³⁷



La cuticule de la mite *Rhizoglyphus robini* contient un composé antifongique, le 2formyl-3-hydroxybenzoate d'hexyle (**I-60**). Cet ester est très actif contre *Fusarium oxysporum* et contre *Aspergillus niger*.³⁸

Le citral (3,7-diméthyl-2,6-octadiénal) est utilisé par des mites de la famille des *Astigmatidae* comme phéromone d'alarme. Il possède des propriétés antifongiques

comparables à l'amphotéricine B. Parmi les phéromones de *Caloglyphus polyphyllae* se trouvent deux composés antifongiques, l' α - et le β -acaridial. L' α -acaridial (**I-61**) est des dizaines de fois plus actif que le citral.³⁹⁻⁴¹

Des orthoptères (sauterelles, criquets) transmettent un échantillon de leurs bactéries endosymbiontes à leurs œufs lors de la ponte. Un antibiotique peptidique est produit par une entérobactérie de la sauterelle *Nilaparvata lugens* (''brown planthopper'') qui se nourrit de plants du riz. Ces bactéries ont pu être isolées des œufs de cette sauterelle. Un milieu de culture spécifique a permis d'isoler les bactéries synthétisant l'antibiotique andrimide (**I**-**62**).⁴² L'andrimide présente une activité très spécifique contre le phytopathogène *Xanthomonas campestris pv. oryzae* du plant du riz. Certains autres antibiotiques produits par des endosymbiontes pourraient renforcer la défense de l'insecte envers des microorganismes pathogènes.



La propolis est une gomme rougeâtre que les abeilles recueillent sur les écailles de bourgeons d'arbres. Cette substance est mélangée par l'insecte à de la cire et est utilisée pour obturer les fentes dans les ruches où elle s'accumule sur les parois. La propolis est beaucoup consommée au Japon comme additif alimentaire ou dans les infusions pour ses vertus bénéfiques sur la santé humaine. Une substance à forte activité antimicrobienne fut isolée de la propolis originaire du Brésil par pharmacoguidage et fut identifiée comme l'acide 3,5-diprényl-4-hydroxycinnamique (**I-63**).⁴³ Cet acide, également appelé artepilline C, présente une activité antimicrobienne à large spectre d'action contre *Microsporum gypseum*, *Arthroderma benhamiae* (2 champignons dermatophytes), *Bacillus cereus, Enterococcus aerogenes* et *Pseudomonas aeruginosa*.



Des mouches de l'espèce *Sarcophaga peregrina*, immunisées artificiellement par injection de bactéries, produisent une substance antibactérienne appelée 5-S-GAD (N-β-alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphénylalanine, **I-64**).⁴⁴ Le 5-S-GAD est probablement biosynthétisé, avec participation d'une phénoloxydase, à partir du dipeptide β-Ala-Tyr (sarcophagine) par conjugaison au glutathion réduit, après hydroxylation préalable. Le composé n'est pas présent dans des mouches non immunisées ; il est seulement produit suite à l'infection. L'activité antibactérienne envers des bactéries ''Gram positives'' et ''Gram négatives'' s'expliquerait par action indirecte de la substance (S.Natori, 1996)⁴⁴. De l'eau oxygénée serait formée par les groupes hydroxy vicinaux du système 1,2-hydroquinone (DOPA) ; en effet, l'adjonction de catalase au milieu de culture des bactéries a aboli l'activité antibactérienne du 5-S-GAD. La formation de radicaux oxygénés conduirait à l'activation de facteurs de transcription, responsables de l'expression de peptides antimicrobiens, responsables de la réponse immunitaire de l'insecte.⁴⁴

1.3. La réponse immunitaire et les peptides antimicrobiens des insectes ^{45, 46}

Nous allons consacrer un chapitre entier aux peptides antimicrobiens d'insectes. Ces peptides, issus du métabolisme primaire par définition, sont synthétisés lors de l'infection par des microorganismes et circulent librement dans l'hémolymphe de l'insecte.

Nous insisterons en particulier sur leur caractère polycationique et sur leur nature amphiphile.

Les insectes sont protégés de l'infection, causée par des microorganismes, en premier lieu par leur cuticule, leur exosquelette. Si cette barrière est rompue par blessure, d'autres mécanismes de défense se mettent en place. Des cascades protéolytiques conduisent à la coagulation et à la mélanisation à l'endroit de l'invasion, ce qui limite la propagation de l'infection. Des hémocytes capables de phagocytose sont activés et attirés sur la zone d'infection.^{47,48}

Un second mécanisme inductible se met en place et aboutit à la synthèse de peptides antimicrobiens par le corps gras (organe de l'insecte équivalent du foie des vertébrés). Ces peptides font partie de la réponse immunitaire innée de l'insecte ; ils peuvent être synthétisés rapidement par l'organisme au moment de l'infection à faible coût métabolique.⁴⁵ Ils se caractérisent la plupart du temps par leur caractère amphipathique et leur nature polycationique. Ils sont souvent de petite taille de 2 à 30 kDa. Ils présentent une diversité fantastique composée de plusieurs centaines de peptides antimicrobiens isolés à ce jour. Une fois synthétisés, ces composés sont sécrétés dans l'hémolymphe de l'insecte où ils peuvent agir sur une large gamme de microorganismes. Leur spectre d'activité s'étend des bactéries ''Gram(+)'' et ''Gram(-)'' aux champignons filamenteux ainsi qu'aux levures.

Quatre familles de peptides antimicrobiens peuvent être distinguées : (a) des peptides linéaires exempts de cystéines adoptant une structure sous forme d'hélice α en contact de membranes lipidiques, (b) des peptides possédant une ou plusieurs liaisons disulfures, composés essentiellement de structures en brins β antiparallèles, (c) des peptides linéaires riches en prolines, pouvant être substitués par des résidus osidiques sur les thréonines, (d) des peptides riches en glycines pouvant également porter des polyoses dans quelques cas rares.^{45,46}

a) Les peptides en hélice- α forment le groupe le plus étudié de ces peptides antimicrobiens.^{49, 50} Les membres les plus connus de ce groupe sont les cécropines. La cécropine A fut initialement isolée de pupes diaposantes du lépidoptère *Hyalophora cecropi*. D'autres membres de cette famille de peptides sont isolés des lépidoptères *Antheraea pernyi, Manduca sexta, Bombyx mori* et des diptères *Drosophila melanogaster, Sarcophaga peregrina, Ceratitis capitata.*⁴⁵ Les cécropines de lépidoptères forment une hélice amphipathique (côté N-terminal) et une hélice hydrophobe (côté C-terminal), séparées par un coude (G-P-A) comportant une proline. Leur terminaison carboxy-terminale est très souvent amidée.

Les cécropines portent plusieurs charges positives et présentent un moment hydrophobe prononcé (dégagement d'un côté hydrophobe, qui est opposé géométriquement à un côté polaire), ce qui induit leur conformation en hélice- α en milieu hydrophobe.⁵¹ Le mode d'action de ces peptides ne semble pas lié à la liaison à un récepteur biologique spécifique, mais l'activité antibactérienne résulterait plutôt d'interactions de type peptide-lipide au niveau des membranes cellulaires. En effet, les énantiomères de ces peptides, composés entièrement d'acides aminés-D, ont la même activité biologique que les peptides naturels. Leur spectre d'activité est dirigé principalement contre des bactéries Gram(-).⁴⁹

L'hélice amphipathique, induite en contact de bicouches lipidiques, peut être représentée par la projection en roue selon Schiffer et Edmundson (''wheel projection'' ; l'hélice est ''regardée'' le long de son axe principal comme représenté sur la figure I.1.).⁴⁹



figure I.1. : Représentation schématique de l'hélice α amphiphile des cécropines

Sur cette ''roue'' deux résidus d'acides amines se succédant dans la séquence primaire sont éloignés de 100°, de façon à ce qu'il y ait 3,6 résidus par tour d'hélice, ce qui correspond au pas de l'hélice- α des protéines.⁴⁹ On distingue alors nettement une face hydrophobe et une face hydrophile chargée positivement. Les résidus polaires et chargés sont mis en évidence dans la figure par un trait foncé. Dans la Cécropine A seulement la première hélice présente un moment hydrophobe prononcé (l'autre hélice étant essentiellement hydrophobe, avec répartition homogène des résidus hydrophobes) ; nous avons donc représenté uniquement les résidus 1 à 22, ce qui correspond aux 6 tours complets de cette première hélice.

Les séquences des 3 cécropines de Hyalophora cecropia sont les suivantes : ⁴⁵

Cécropine A de *Hyalophora cecropia* : <u>K¹WKLFKKIEKVGQNIRDGIIKA</u>²²GPA²⁵VAVVGQATQIAK-NH₂

Cécropine B de *Hyalophora cecropia* : <u>K¹WKVFKKIEKMGRNIRNGIVKA</u>²²GPA²⁵IAVLGEAKAL-NH₂

Cécropine D de *Hyalophora cecropia* : WNP F^{4} KELEKVGQRVRDAVISA²¹GPA²⁴VATVAQATALK-NH₂

La représentation selon Schiffer et Edmundson des hélices N-terminales des Cécropines B et D (résidus soulignés dans les séquences) révèle également un côté hydrophobe ainsi qu'un côté hydrophile pour chacune des 2 hélices (figure I.2.) :



figure I.2.

b) Le deuxième groupe des peptides antimicrobiens est formé par les peptides stabilisés par des ponts disulfures. La défensine de drosophile et la drosomycine sont deux exemples de ce groupe. Les défensines d'insectes ((a) figure I.3.) comportent plusieurs dizaines d'isoformes et sont retrouvés dans la plupart des ordres d'insectes. Leur structure

tertiaire est organisée en une hélice- α centrale amphipathique, reliée à deux brins- β antiparallèles par trois ponts disulfures. Ce motif particulier est appelé CS $\alpha\beta$ "cysteine stabilized α , β structure".⁵² Le spectre d'activité des défensines est dirigé principalement contre des bactéries Gram(+).

La drosomycine ((**b**) figure I.3.) est un peptide de structure similaire aux défensines, mais son activité biologique est antifongique avant tout. Elle comporte un brin- β supplémentaire du côté amino-terminal, qui est relié à l'extrémité carboxy-terminale par un pont disulfure. La structure de la drosomycine est alors refermée sur elle-même ce qui lui confère une résistance très forte aux protéases.⁴⁵



(a) défensine d'insecte

(**b**) drosomycine de drosophile

figure I.3.

La tachyplésine (*Tachypleus tridentatus*, limule), la thanatine (*Podisus maculiventris*, diptère) et l'androctonine (*Androctonus australis*, scorpion) forment un groupe de peptides constitués de deux brins- β antiparallèles et reliés par un ou deux ponts disulfures. Le feuillet- β donne lieu à un coude- β constitué d'acides aminés conservés et de charge positive. La thanatine constitue le peptide antimicrobien ayant le spectre d'activité le plus étendu, étant à la fois antibactérien et antifongique. Plusieurs mécanismes devraient concourir à son activité : son énantiomère "tout-D" perd l'activité contre les bactéries Gram(-) tout en conservant la même activité antifongique et la même activité anti-Gram(+) que l'énantiomère naturel.⁵²

c) Les familles des peptides antimicrobiens enrichies en un type donné d'acides aminés sont très hétérogènes. Nous nous limitons à citer l'exemple de la drosocine, peptide antibactérien de la drosophile riche en prolines. La drosocine présente un mécanisme d'action stéréospécifique. Son activité bactéricide ne se manifeste qu'après 6 heures d'exposition ; ceci la distingue nettement des défensines, qui eux provoquent la mort des bactéries en moins d'une minute. La drosocine est glycosylée sur un résidu thréonine par un motif

disaccharidique (N-acétylgalactosamine-galactose). Elle représente donc un nouveau type de peptides antibiotiques naturels, les peptides O-glycosylés.⁴⁵

Tous les peptides antimicrobiens d'insectes sont de nature amphiphile et polycationique.⁵³ Ils semblent tous présenter des mécanismes d'action très proches. En effet ils sont supposés interagir directement avec les membranes lipidiques des bactéries, en les perméabilisant. Cette perturbation membranaire annule les gradients ioniques transmembranaires, indispensables à la survie des bactéries.

Deux mécanismes de perméabilisation des membranes sont proposés. Pour une part il s'agit du ''carpet like mechanism'' où des monomères de ces peptides recouvrent d'abord toute la membrane des bactéries. A une concentration critique leur insertion induit une déstabilisation et une solubilisation du feuillet externe de la bicouche lipidique, et l'induction d'une pression positive de courbure (''curvature'') conduit au repliement du feuillet externe vers le feuillet interne des bicouches lipidiques par formation de structures en tore.^{49, 54} Pour l'autre part il s'agit du méchanisme de type ''barrel-stave'' où des hélices protéiques forment des agrégats organisés qui vont s'insérer dans les membranes pour la traverser de part et d'autre sous forme de canal.⁴⁹

La sélectivité des peptides antimicrobiens envers les microorganismes est délicate à expliquer d'autant plus que toutes les cellules vivantes ont des membranes lipidiques constitués de phospholipides. Or la nature des têtes polaires des phospholipides est variable ; la répartition des différents phospholipides est spécifique pour chaque type de tissus, et elle varie d'un organisme à l'autre. Le feuillet externe de la membrane cytoplasmique de cellules de mammifères est essentiellement constitué de phospholipides ''zwitterioniques'', tels la phosphatidylcholine ou les sphingomyélines. Les phospholipides chargés négativement, comme la phosphatidylsérine, sont confinés au feuillet intracellulaire.⁵⁴

Les bactéries, elles, contiennent des phospholipides négativement chargés comme la phophatidylglycérine.⁵⁴ Comme tous les peptides antimicrobiens sont chargés positivement (leurs résidus basiques étant protonés à pH neutre), cette affinité prononcée pour les membranes procaryotiques semblerait se réduire simplement à une différence d'attraction électrostatique pour les différents types de membranes. En plus, les membranes de mammifères, contrairement à celle des bactéries, contiennent du cholestérol, qui est un renforçateur membranaire et qui leur confère une plus forte stabilité lors d'une perturbation par interaction avec des amphiphiles.⁵¹

La charge positive des peptides antimicrobiens les nantit d'une sélectivité pour les membranes de bactéries. La charge négative de la paroi bactérienne est encore accentuée par la présence de deux autres molécules anioniques, constituants essentiels de la bactérie.⁴⁹

Les bactéries à coloration Gram-négative ont des lipopolysaccharides (LPS) ancrés dans la membrane par le lipide A, qui est polyphosphorylé. L'acidité des phosphates rend le lipide A fortement anionique à pH neutre (schéma I.4.).^{55, 56}



schéma I.4. : La structure du LPS de *E. coli*

Les bactéries à coloration Gram-positive ont une paroi bactérienne constituée de polysaccharides acides tels les acides téichoïques, qui portent une forte densité de charges négatives à cause de la présence d'un grand nombre de phosphates.⁴⁹

L'acide ribitol-téïchoique comporte des unités répétées de D-ribitol liées par des liaisons 1,5-phosphodiesters. Ces unités ribitols peuvent être estérifiées en position 2 par des résidus de D-alanine et substituées en position 4 par des glycides, comme la N-acétylglucosamine (α ou β) chez *Staphylococcus aureus* ou le glucose chez *Bacillus subtilis W23* (schéma I.5.). ^{57, 58}



R = N-acétyl-glucosaminyl ou glucosyl



L'acide glycérol-téïchoique comporte des unités répétées de glycérol liées par des liaisons 1,3-phosphodiesters. Ces unités de glycérols peuvent être estérifiées en position 2 par des résidus de D-alanine ou substitués par un sucre (schéma I.6.).^{57, 58}



R = alanyl ou glycosyl

schéma I.6. : L'acide glycérol-téïchoique

Ces acides teïchoïques et le LPS présentent donc des ''points d'attache'' aux peptides antimicrobiens cationiques, ce qui conduit à leur accumulation au niveau des membranes, et favorisent l'insertion des peptides dans la bicouche lipidique. Il est à noter cependant que des peptides dépourvus d'un côté hydrophobe peuvent bien se lier à la paroi bactérienne sans pour autant conduire à la perméabilisation membranaire.

II. Isolement de substances antibactériennes d'insectes
2.1. Caractérisation et identification d'une substance antibactérienne, antiGram(-) chez *Harmonia axyridis (Pallas)*.

Les coléoptères de la famille des Coccinellidae sont connus pour leur richesse en métabolites secondaires.²⁸ Nous n'avons pas voulu nous concentrer uniquement sur une classe spécifique de substances naturelles, tels les alcaloïdes. Afin de disposer d'un éventail plus large de substances naturelles, nous avons débuté notre isolement par pharmocoguidage avec un extrait total de ces insectes, obtenu par extraction poussée au dichlorométhane-méthanol.

2.1.1. Principe de l'isolement par pharmacoguidage :

Le principe de l'isolement par pharmacoguidage (*bioassay-guided isolation*) consiste à mener en parallèle les tests antimicrobiens et l'isolement à tous les stades de fractionnement des extraits naturels. Cette démarche permet de se focaliser spécifiquement sur des substances naturelles présentant l'activité biologique ciblée lors de l'isolement.

L'activité antimicrobienne des différentes fractions a été testée en milieu liquide dans des plaques à 96 puits. La sensibilité des tests a permis de consommer un minimum de produit, a assuré une efficacité maximale et a permis de démultiplier les tests (cf. partie expérimentale, 8.1.).

A chaque stade d'isolement nous avons évalué quelles sous-fractions ont présenté le plus grand intérêt biologique. Ces sous-fractions ont été repurifiées afin de faire correspondre *in fine* l'activité biologique à un seul composé naturel.

2.1.2. Extraction de *Harmonia axyridis (Pallas)* au dichlorométhaneméthanol et fractionnement de l'extrait sur silice :

Des coccinelles de l'espèce Harmonia axyridis (Pallas), issus d'un élevage, nous ont été fournies en grande quantité par Dr. Jacques BRUN et Dr. André FERRAN de l'INRA d'Antibes.

100 g de coléoptères (poids du matériel frais) ont été broyés dans un mélange de dichlorométhane-méthanol et extraits pendant 12 heures avec 800 ml de ce même mélange de solvants organiques. Cette opération a été répétée une fois à température ambiante et deux fois

à chaud (reflux du dichlorométhane). Les phases organiques furent filtrées sur verre fritté, et les solvants organiques des filtrats ont été évaporés dans un évaporateur rotatif. L'extrait brut résultant a été fractionné par chromatographie sur colonne de silice (5 x 15 cm) avec un gradient d'acétate d'éthyle (AE) dans l'hexane (0 %, 10 %, 30 %, 50 %, 80 % AE / hexane, 100 % AE et des volumes de 750 ml par palier) puis lavage de la colonne avec du méthanol (750 ml). Des fractions organiques de polarité croissante ont été récupérées, la fraction qui correspond au lavage de la colonne a été appelée de façon simplifiée "fraction méthanolique (M)".

Le résidu solide de la filtration a été extrait deux fois à l'eau stérile (eau MilliQ) à température ambiante. Les phases aqueuses ont été centrifugées à 3000 g pendant 15 minutes et séparées du culot. Elles ont été réunies, congelées et lyophilisées. Cet extrait a été appelé "<u>extrait aqueux (W)</u>".

2.1.3. Suivi de l'activité biologique :

Des tests antimicrobiens préliminaires ont montré que l'<u>extrait aqueux (W)</u> et la <u>fraction méthanolique (M)</u> présentaient des activités antimicrobiennes fortes et à large spectre d'activité, inhibant la croissance des bactéries Gram(+) (*Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus*), des bactéries Gram(-) (*Escherichia coli*) ainsi que la croissance des champignons filamenteux (*Neurospora crassa*). L'expérience de notre laboratoire dans l'isolement de substances actives (peptides antimicrobiens) à partir de phases aqueuses (hémolymphe des insectes), nous a conduits à analyser d'abord l'extrait aqueux purgé des molécules solubles dans des solvants organiques non polaires. Afin d'isoler les substances actives, nous avons décidé d'appliquer les mêmes méthodes qui sont décrites pour isoler des peptides antimicrobiens, à savoir des extractions en phase solide (C18) (SPE-18), la chromatographie haute performance en phase inverse (HPLC, C-8) couplée à un détecteur en UV à 225 nm, et le rassemblement manuel des fractions correspondant à des "pics" en absorbance UV.

2.1.4. Fractionnement par SPE et par HPLC (C8) de la phase aqueuse :

2,43 g (correspondant à 50 g d'insecte) de l'<u>extrait aqueux (W)</u> lyophilisé furent repris dans 25 ml d'eau acidifiée (0,05 % TFA), ultrasoniqués et centrifugés. Le surnageant fut placé sur une cartouche de phase inverse C-18 de type ''Sep-Pak'' de 5 g (lavée avec du méthanol et conditionnée avec de l'eau acidifiée). Un volume d'eau de 25 ml a servi à entraîner les substances très polaires. Des paliers de 25 ml de 10 % d'acétonitrile (ACN) dans l'eau (0,05 % TFA) puis de 40 % (30 ml) et de 80 % d'acétonitrile dans l'eau (30 ml) suivi de 100 % d'acétonitrile (30 ml) acidifiée ont servi à éluer suivant des degrés d'hydrophobicité croissants. Des fractions de 3 ml ont été récupérées. Pour chaque éluant nous avons alors récupéré 10 fractions. Nous avons noté les fractions successives W-x%-n (ex. la première fraction éluant avec 40 % d'ACN / eau a été notée (W-40%-1). Les fractions éluant avec l'eau pure, avec 10 % d'acétonitrile dans l'eau et avec 100 % acétonitrile dans l'eau ont été actives, avec un maximum d'activité pour les fractions éluant avec 40 % d'ACN dans l'eau. Le volume de ces fractions a été réduit pour évaporer l'acétonitrile, et elles furent reprises dans 1 ml d'eau.

Les fractions (W-40%-1) à (W-40%-10) ont été analysées par injection de 100 μ l de l'échantillon en HPLC phase inverse C-8 analytique (4,6 mm de diamètre, 250 mm de longueur, 5 μ m de granulométrie, 300 Å de porosité). La chromatographie a été réalisée avec un gradient d'acétonitrile dans l'eau de 15 à 50 % (avec 0,05% TFA) pendant une 60 minutes avec un flux de solvants de 1 ml par minute.

L'intensité des différents "pics" d'élution différèrent progressivement suivant les fractions (W-40%-n), les dernières fractions étant plus riches en substances peu polaires et d'élution lente. Des sous-fractions correspondant aux différents pics d'absorbance à 225 nm furent collectées et leur activité biologique a été évaluée.

Pour illustrer comment nous avons fait correspondre l'activité antimicrobienne avec les ''pics'' en HPLC nous montrons l'analyse de la fraction (W-40%-5) et celle de la fraction (W-40%-9) (schéma II.1.) :

Les sous-fractions (W-40%-5-9) à (W-40%-5-17) de la fraction (W-40%-5) ont présenté des activités antibactériennes antiG(+) et antiG(-). L'activité antifongique s'est retrouvée dans l'intervalle des sous-fraction de (W-40%-5-10) à (W-40%-5-17). L'activité relative des sous-fractions a été évaluée par dilutions 2 à 2 (après évaporation des solvants d'élution et reprise dans 100 μ l d'eau). L'activité maximale s'est située dans les sous-fractions (W-40%-5-10) et (W-40%-5-11) :

| sous-fractions de la fraction (W-40%-5) | W-40%-5-9 | W-40%-5-10 | W-40%-5-11 | W-40%-5-12 | W-40%-5-13 | W-40%-5-14 | W-40%-5-15 | W-40%-5-16 | W-40%-5-17 |
|--|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| activité relative <i>E. coli</i> (dilution maximale gardant l'activité) | 1 | 64 | 32 | 4 | 8 | 8 | 4 | 4 | 2 |
| activité relative <i>N. crassa</i> (dilution maximale gardant l'activité) | 1 | 32 | 16 | 2 | 4 | 4 | 1 | 2 | 1 |

tabeau II.1. :Activités antimicrobiennes relatives des fractions obtenues après
séparation en HPLC phase inverse de la fraction W-40%-5 (sur
Escherichia coli et Neurospora crassa)

L'analyse de la fraction (W-40%-9) (schéma II.1.) a montré qu'également ici l'activité biologique se trouvait dans la même zone d'élution comportant les sous-fractions (W-40%-9-11) à (W-40%-9-19) avec un maximum d'activité pour la sous-fraction (W-40%-9-13). Les activités antibactériennes et antifongiques ont semblé confondues dans la même région d'activité maximale. Or il n'y a pas eu de détection UV dans la région d'activité maximale (à 225 nm).

2.1.5. Fractionnement de la "fraction méthanolique (M)" en HPLC :

Parallèlement nous avons traité la "**fraction méthanolique (M)**" de la même manière que l'<u>extrait aqueux (W)</u>. Ici la séparation grossière sur cartouche de phase inverse d'un aliquot de cette <u>fraction (M)</u> a fourni, comme pour la fraction aqueuse (W), une fraction très active éluant avec 40 % d'acétonitrile dans l'eau. Nous avons rassemblé toutes les sousfractions éluant avec 40 % d'ACN dans l'eau. L'ensemble de ces fraction réunies a été noté (M-40%). L'analyse en HPLC de (M-40%) a donné un profil d'élution qui sembla différer complètement de celui des sous-fractions de l'extrait aqueux (W-40%-n) (schéma II.2.). Dans cette fraction (M-40%) le maximum d'activité biologique correspond à un maximum d'absorbance en UV.

II. Isolement de substances antibactériennes d'insectes

La fraction correspondant à ce "pic" détecté après 24,5 minutes d'élution, et qui contient les molécules actives, d'activité biologique maximale, fut concentrée et réinjectée une deuxième fois en HPLC (schéma II.2.). Nous avons collecté des fractions en dehors du "pic" de la substance absorbant en UV, ainsi qu'une petite fraction qui correspond à la sortie de la substance détectée en UV. Toutes les fractions "en dehors du pic" furent réunies et évaporées. Leur activité biologique a été comparée à l'activité biologique du "pic" de la substance détectée en UV. L'activité biologique se trouva très réduite au niveau du pic d'absorbance, mais elle s'est retrouvée dans les fractions entourant la substance détectée en UV. Comme pour la phase aqueuse nous avons à nouveau été confrontés à une substance active qui n'absorbe pas en UV à 225 nm et qui n'a pas été résolue dans les conditions de séparation utilisées.

Comparaison des fraction W-40%-5 et W-40%-9 et localisation des activités antibactériennes



Schéma II.1. Conditions de HPLC : colonne C8 (25cm, 4,6 mm, 5µm, 300A) Gradient : 15 à 50 % ACN / H₂O pendant 60 minutes ; débit : 1ml / minute.

Fraction méthanolique (H-40%) de *H. axyridis* ; analyse du pic actif



Schéma II.2.Conditions de HPLC : colonne C8 (25cm, 4,6 mm, 5μm, 300A)Gradient : 15 à 60 % ACN / H2O pendant 60 minutes ; débit : 1ml / minute.

Dans le schéma suivant (schéma II.3.) nous essayons d'expliquer la perte d'activité du pic d'absorbance en UV lors de la deuxième injection en HPLC. Si nous supposons que le composé actif n'est que peu résolu en HPLC, sa sortie de la colonne suit un profil représenté par le trait pointillé dans le schéma. La réunion des fractions sortant de 0 à x' et de y' à la fin du gradient de chromatographie permet de recueillir une quantité plus importante de la substance active que de limiter la collecte à l'intervalle très restreint entre x' et y'. Cet intervalle restreint correspondant bien au maximum d'élution, mais le volume d'élution ne contient en somme que peu de substance active.



schéma II.3. : Dispersion d'une substance lors de sa chromatographie sur phase inverse

2.1.6. Séparation sur une cartouche de phase inverse :

Afin d'avancer dans la caractérisation du produit actif nous avons eu besoin d'obtenir des quantités plus importantes, et nous avons décidé de faire une chromatographie gravitationnelle en phase inverse par l'utilisation d'une cartouche de "Sep-Pak" de 5 grammes, par l'application d'un gradient très progressif d'acétonitrile dans l'eau acidifiée et en déposant l'échantillon dissous dans un minimum de solvant.

Un aliquot de la <u>"fraction méthanolique (M)</u>" fut prépurifié à l'aide d'une cartouche "Sep-pak" de 0,5 g. La fraction de 40 % d'ACN/H₂O fut asséchée et reprise dans 300 µl d'eau acidifiée (M-40%). Cette fraction fut déposée sur une cartouche "Sep-pak" de 5 g (lavée avec du méthanol et conditionnée avec 15 % d'acétonitile dans de l'eau contenant 0,05 % de TFA). Elle a été éluée avec un gradient progressif de 12,5 à 60 % d'acétonitrile dans de l'eau acidifiée. L'augmentation progressive de 2,5 % d'acétonitrile par palier de concentrations. La récupération de 5 sous-fractions de 3 ml par concentration ont fourni 60 sous-fractions dont l'activité antibactérienne a été évaluée. Ces fractions sont notées (M-40%-SP-1) à (M-40%-SP-60). L'activité biologique se retrouva dans les fractions (M-40%-SP-33) à (M-40%-SP-51), ce qui correspondait à l'intervalle des concentrations allant de 27,5 à 32,5 % acétonitrile dans l'eau. Toutes les fractions actives ont été réunies et notées (M-40%-SP-33*51). Cette méthode a permis d'obtenir le produit actif en quantité du milligramme et de corréler optiquement la quantité visible de produit des fractions évaporées avec l'activité biologique. Les tubes contenant le plus de matériel ont également été les plus actives.

2.1.7. Analyse en chromatographie sur couche mince :

Ces fractions actives (M-40%-SP-33*51) ont été analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) en phase normale. Le produit majoritaire des fractions fut révélé à la vanilline acide (aucune détection à l'UV), mais laissa une forte traînée non résolue sur plaque lors de cette méthode de chromatographie par l'élution avec des solvants polaires neutres. L'utilisation d'éluants basiques contenant de l'ammoniaque (40 % aqueux) a augmenté fortement la résolution. (Les plaques CCM doivent être chauffées à 180°C pendant quelques minutes pour chasser les traces d'ammoniaque avant de procéder à la révélation chimique). Le produit majoritaire a migré avec un indice de rétention (Rf) de 0,10 lors de l'élution avec un mélange contenant 10 % (v/v) d'ammoniaque dans l'éthanol, et il présenta un facteur de rétention frontale de 0,25 avec un mélange de 20 % (v/v) d'ammoniaque dans l'éthanol.

L'analyse en CCM a montré que la substance naturelle était pratiquement pure et qu'elle devrait comporter des groupements basiques, ce qui pourrait expliquer son comportement lors des purifications.

3 mg du produit purifiés sur la cartouche en phase inverse (M-40%-SP-33*51) ont permis de l'analyser en RMN du proton et d'établir sa structure partielle. Nous allons y revenir en détail à la fin de ce chapitre.

2.1.8. Séparation typique pour les alcaloïdes par extraction différenciée :

Une séparation typique d'alcaloïdes, composés naturels basiques, utilise l'affinité différente des amines ou bien pour des phases organiques ou bien pour des phases aqueuses suivant leur état de protonation, qui dépend du pH de la phase aqueuse. Une telle partition entre une phase organique et une phase aqueuse a servi à séparer un aliquot du brut actif (M-40%-SP-33*51). 2 mg de ce brut actif obtenu lors de la dernière purification ont été repris dans 20 ml d'eau acidifiée avec 0,05 % de TFA. Une première extraction de cette phase aqueuse acide a été faite avec du dichlorométhane (extrait organique ORG1 ; 20 ml). La phase aqueuse fut alors rendue basique avec 100 µl d'ammoniaque (40 %), et a été extraite une deuxième fois au CH₂Cl₂ (extrait organique ORG2 ; 20 ml). Ensuite 1 ml d'ammoniaque ont été rajoutés à la phase aqueuse, ce qui a été suivi d'une extraction au dichlorométhane, puis au diéthyléther, puis à l'acétate d'éthyle (extrait organique ; ORG3 à ORG5). 10 ml d'ammoniaque ont enfin été rajoutés, et la phase aqueuse a été extraite avec du dichlorométhane, de l'éther et de l'acétate d'éthyle (extrait organique ; ORG6 à ORG8). L'activité biologique a été évaluée sur *E. coli* et elle se retrouva dans les premiers extraits organiques basiques basiques (ORG2 et ORG3).

Ce comportement de la substance active montre donc qu'elle contient en effet des groupements basiques et qu'elle possède une partie hydrophobe permettant la solubilisation dans les phases organiques sous sa forme neutre.

2.1.9. Chromatographie de la fraction "méthanolique" sur silice :

Le brut actif (1-3 mg) obtenu après purification sur la cartouche de 5 g de phase inverse (M-40%-SP-33*51) a été chromatographié sur une colonne de silice (4,5 g de silice, colonne de 7 mm de diamètre interne) avec un mélange d'élution de 20 % d'ammoniaque dans de l'éthanol. Des fractions de 4 ml ont été collectées. Les fractions furent trop diluées pour que l'élution ait pu être suivie directement par chromatographie sur couche mince (révélation à la vanilline acide ou à l'iode). Les fractions ont été évaporées individuellement et soumises à des tests biologiques (activité antibactérienne sur *E. coli*). Les fractions 7 à 12 furent révélées actives, la substance naturelle recherchée a donc élué avec un volume égal à 5 fois celui de la colonne, ce qui montre que les conditions de chromatographie sont bien adaptées à la séparation du produit naturel actif, et que nous devrions pouvoir appliquer les mêmes conditions à la séparation en plus grande échelle en partant d'un brut d'extraction.

2.1.10. Chromatographie sur silice en plus grande échelle :

Nous avons montré qu'il est possible d'isoler la substance active directement de la "<u>fraction méthanolique (M)</u>" par chromatographie sur silice sans passage par la phase inverse. L'élution s'est faite avec un mélange de solvants contenant de l'ammoniaque. Le mélange éthanol-ammoniaque utilisé pour la chromatographie sur la petite colonne est très visqueux ; il n'a pas été approprié pour la séparation à une échelle supérieure. Une quantité plus importante de produit actif (15 mg) a été purifiée par chromatographie sur colonne de 1 cm de diamètre (10 cm de haut) avec un mélange de méthanol-dichlorométhaneammoniaque(40 %) (60-40-6).

L'isolement de la diamine en grande quantité nous a permis d'estimer que ce composé est présent à une concentration d'environ 1 mg par gramme d'insecte soit à une concentration de 0,05 mg par individu (50 mg).

2.1.11. Détermination partielle de la structure de la substance active par ¹H-RMN :

Le spectre RMN du proton de la substance active isolée par phase inverse (M-40%-SP-33*51) montre la présence d'une longue chaîne hydrocarbonée par un important signal sous forme de singulet à 1,13 ppm (intégration de nombreux CH₂ confondus). La présence d'une liaison vinylique se trahit par un triplet à 5,27 ppm. Le signal des protons vinyliques est sous forme de triplet, ce qui montre que les protons vinyliques ne se couplent qu'avec les protons allyliques ; ceci laisse prévoir une certaine symétrie autour de cette double liaison. Un multiplet sous forme de quadruplet se trouve à 3,25 ppm, et il correspond à un proton si l'intégration du signal vinylique correspond à 2 protons. Un triplet correspondant à 2 protons et d'un déplacement chimique de 2,78 ppm indique la présence d'un méthylène en position α d'une fonctionnalité électronégative, et la multiplicité indique que ce méthylène est voisin d'un autre CH₂. Deux autres massifs à 1,85 et 1,41 ppm intègrent chacun pour 4 protons. Le signal des protons aliphatiques à 1,13 ppm correspond alors à environ 21 protons (18 + 3 H). A droite du signal précédent. Nous observons l'absence de signal d'un méthyle typique pour les chaînes grasses (p. ex. acides gras, lipides).

L'échantillon obtenu par chromatographie sur colonne de silice avec des éluants basiques diffère au niveau des déplacements chimiques de certains signaux, le solvant de RMN étant le CDCl₃ et l'échantillon étant déprotoné cette fois-ci. Le signal qui a été superposé au signal aliphatique s'en détache sous sa forme neutre et se révèle être un doublet intégrant pour 3 protons. Donc nous sommes en présence d'un composé comportant un méthyle voisin d'un CH, porteur d'un groupe électronégatif. Un autre signal sous forme de singulet, et intégrant pour 4 protons, apparaît à 2,17 ppm. Ce signal correspond aux protons échangeables, qui deviennent visibles uniquement dans des solvants aprotiques. Leur nombre est estimé à quatre protons.

La position exacte de la double liaison à l'intérieur de la molécule ne peut pas être déduite par analyse RMN.

Structures partielles visibles en ¹H-RMN

; x ; ; H₃C

vers le milieu de la molécule

- 4 H sur X et Y

- chaîne hydrocarbonée

| déplacements | multiplicité | constante de | intégration | attribution des |
|--------------------|--------------|----------------|-------------|---|
| chimique en | | couplage : | (nombre de | signaux |
| ¹ H-RMN | | $\mathbf{J} =$ | protons) | |
| 5,27 ppm | triplet | 4,7 Hz | 2 H | 2 protons vinyliques |
| 3,25 ppm | multiplet | | 1 H | proton en α de Y |
| 2,78 ppm | triplet | 7,8 Hz | 2 H | CH_2 en α de X |
| 2,17 ppm | singulet | | 4 H | 4 H échangeables |
| 1,85 ppm | multiplet | | 4 H | 2 CH ₂ allyliques |
| 1,41 ppm | multiplet | | 4 H | $1 \text{ CH}_2 \text{ en } \beta \text{ de } X$ et 1 CH ₂ en β de Y |
| 1,13 ppm | multiplet | | 18 H | 9 CH ₂ de la chaîne |
| 1,07 ppm | doublet | J = 6,6 Hz | 3 H | $1 \text{ CH}_3 \text{ en } \beta' \text{ de } Y$ |

tableau II.2. :Résumé des signaux en RMN du proton (dans le méthanol deutérié), et
leur interprétation partielle

2.1.12. Spectroscopie de masse en Electrospray (ESI, 50 V) :

L'analyse par spectrométrie de masse de type Electrospray (ESI) permet de déterminer le poids moléculaire de la molécule par la présence d'un signal pour (M+H⁺). Cette technique d'analyse nécessite la présence de groupements protonables au sein de la molécule pour l'analyse en flux d'ions positifs. Normalement cette technique d'ionisation n'entraîne pas de fragmentation de la molécule analysée. Dans notre cas néanmoins, la molécule s'est partiellement fragmentée, avec perte d'ammoniac. Un pic à 283,3 uma (unités de masse atomique) (M+1) montre que le poids moléculaire de la substance naturelle est de 282,3. Le nombre pair du poids moléculaire peut indiquer l'absence d'atome d'azote ou bien la présence de deux fonctions azotées au sein de la molécule. La perte d'une molécule d'ammoniac (-17 uma) à partir de la molécule ionisée indique que la substance analysée est une diamine ; la deuxième fonction amine est responsable de la protonation de la molécule (mono-)désaminée pour donner des ions positifs détectables. La molécule dichargée donne un signal en spectrométrie de masse à 142,2 uma, ce qui correspond au signal $(M + 2 H^{+}) / 2$.

Ions positifs détectés lors de l'analyse de la substance active en ESI :

- 284,3 ; moyen (12 % intensité) ; $M' + H^+$ (pic isotopique)
- 283,3 ; fort (50 % intensité) ; $M + H^+$: <u>pic moléculaire</u>
- 267,2 ; moyen (18 % intensité) ; $M' + H^+$ NH_3 (pic isotopique)
- 266,2 ; fort (maximum 100 % intensité) ; $M + H^+$ NH_3
- 142,2 ; fort (96 % intensité): molécule dichargée ; $(M + 2 H^{+}) / 2$

2.1.13. Identification de la substance active comme étant le Z-1,17diaminooctadéc-9-ène, appelé "harmonine" dans la littérature scientifique :

Le poids moléculaire de la substance active (déterminé par spectrométrie de masse en Electrospray), ainsi que la structure partielle (établie par RMN du proton) nous ont permis de caractériser le produit actif isolé comme étant l'harmonine, alcaloïde à longue chaîne hydrocarbonée, isolé des coccinelles *Harmonia leis conformis* et de *Hippodamia convergens*. Cet alcaloïde, appelé harmonine était décrit pour la première fois par l'équipe de J. C. Braekman en 1985.^{59,60} L'harmonine a été caractérisé comme étant le *Z*-1,17-diaminooctadéc-9-ène ; aucune activité pharmacologique n'avait jamais été décrite pour cette molécule.



1,17-diaminooctadéc-9-ène = harmonine

La synthèse asymétrique de cette diamine a été rapportée par le groupe de D. Enders en 1991.⁶¹ Le composé de synthèse, énantiomériquement pur (ee > 97 %), leur a permis de déterminer sans ambiguïté que le centre chiral de la molécule est de configuration R. Ils ont déterminé le pouvoir rotatoire de l'alcaloïde (R) sous sa forme neutre dans le benzène : $[\alpha]_D^{23} = -3,95$ (c = 1,04, C₆H₆).

L'alcaloïde bioactif que nous avons isolé par chromatographie sur colonne de silice n'a pas montré de pouvoir rotatoire à une concentration de 1 mg / ml dans le benzène. Est-ce que le même alcaloïde, présent sous forme d'un seul énantiomère dans l'espèce *Harmonia leis* *conformis*, pourrait se trouver sous forme racémique chez *Harmonia axyridis*? Une racémisation suite à nos méthodes d'extraction paraît peu plausible. Nous n'avons pas poursuivi nos recherches sur l'abondance relative des énantiomères dans l'insecte. La confirmation de cette observation nécessiterait l'isolement à partir du matériel biologique frais, tout en évitant le stockage des fractions intermédiaires (à -20° C). La présence des deux énantiomères optiques en quantités équivalentes pourrait donner des indications sur la biosynthèse de la diamine et sur le fonctionnement des enzymes impliqués.

Le spectre ¹H-RMN et le spectre de la fragmentation en spectrométrie de masse en Electrospray de la substance active sont identiques avec ceux du (*rac*)-*Z*-1,17diaminooctadéc-9-ène que nous avons obtenu par synthèse chimique, et dont nous allons détailler la préparation dans les <u>chapitres III et VIII</u>.

2.1.14. La Spectrométrie de masse en Impact Electronique (EI) consolide la détermination de la structure de la substance active :

Le spectre de fragmentation de l'harmonine (Z-1,17-diaminooctadéc-9-ène) en Impact Electronique (EI) est décrite par le groupe de J. C. Braekman ⁶⁰ et se caractérise par les fragments suivants : 282 (22) ; 267 (17) ; 250 (12) ; 239 (62) ; 236 (3) ; 224 (7) ; 222 (4) ; 196 (16).

Nous avons analysé notre composé actif par cette même méthode de fragmentation en spectrométrie de masse ; son spectre est semblable à celui décrit pour l'harmonine. Les différences au niveau de l'intensité de certains fragments s'expliquent par des conditions expérimentales différentes (température du filament, tension appliquée). Le pic moléculaire est retrouvé à 282 uma (unités de masse atomique) avec une intensité relative de 24 % et sera noté 282,1 (24). Les signaux correspondant à la fragmentation de la molécule sont les suivants :

266,1 (35); 250,1 (72); 239,1 (100); 210,1 (29); 196,1 (40); 182,1 (77); 169,2 (27); 168,1 (52); 154,1 (93); 140,1 (23); 114,1 (66); 100,2 (24); 96,2 (26); 95,2 (38); 86,0 (29); 82,2 (36); 81,0 (60); 70,2 (45); 69,2 (42); 67,1 (53); 56,3 (55); 55,3 (57)

Le pic à 239,1 est le pic majoritaire. Les intensités relatives des autres pics sont calculés par rapport à ce pic principal. Les rapports d'intensités sont exprimés en pourcentages (entre parenthèses).

Une grande partie des fragments peuvent être expliqués par rupture homolytique des liaisons carbone-carbone tout au long du squelette hydrocarboné (schéma II.4.):



schéma II.4. : Fragments moléculaires de l'harmonine obtenus par fragmentation par spectrométrie en impact électronique (EI) dus à des coupures homolytiques des liaisons carbone-carbone

L'analyse des ions de masse paire, issus de la fragmentation, montre que la double liaison se trouve vers le centre de la molécule. Or la présence de l'ion 140 pourrait signifier que la double liaison se trouve en position 10 et non en position 9 de la diamine. La présence de cet ion peut s'expliquer par une migration thermique de la double liaison précédant la fragmentation (schéma II.5.) :



schéma II.5. :Le fragment de 140 uma en EI est potentiellement issu d'une coupure
homolytique après migration préalable de la double liaison

L'ion de base (le plus abondant) à 239 unités de masse atomique peut résulter de l' α -fragmentation de la diamine monoprotonée (schéma II.6.) :



schéma II.6. : Fragmentation de l'harmonine en position α de la fonction amine

L'ion à 267 unités de masse atomique peut s'expliquer par une α -fragmentation de la diamine neutre (schéma II.7.).



schéma II.7. : Fragmentation de l'harmonine en position α ' de la fonction amine

Le pic très abondant à 250 uma peut correspondre à un fragment ayant perdu un méthyle et une molécule d'ammoniac. Cette perte d'une molécule d'ammoniac pourrait se faire après une α -fragmentation préliminaire (schéma II.8.) :



schéma II.8. : La perte d'une molécule d'ammoniac, après une α-fragmentation préliminaire, pourrait expliquer l'apparition d'un fragment à 250 uma

Nous avons choisi de ne pas refaire d'autres analyses de détermination de structure, ni de transformer la substance isolée par microdérivatisation chimique. Ainsi nous avons pu garder un maximum de matériel pour réaliser des tests biologiques. La présence du même alcaloïde dans l'espèce de coccinelle très apparentée *Harmonia leis conformis*, ainsi que la répartition de cet alcaloïde dans d'autres genres de coccinelles (*Adonia, Semiadalia, Hippodamia*) ne fait que conforter la caractérisation de l'harmonine comme étant identique à la substance isolée de *Harmonia axyridis* dans notre procédure d'isolement par pharmacoguidage.

2.2. Recherche d'autres composés antimicrobiens à partir d'insectes :

Au cours de ce travail de thèse nous avons été amenés à évaluer l'activité antimicrobienne d'un grand nombre d'extraits d'insectes. C'est seulement après comparaison de l'activité relative des différents extraits que nous avons pu nous focaliser sur les extraits ayant les activité les plus prometteuses. Très vite nous nous sommes focalisés sur *Harmonia axyridis*, parce que cet extrait a présenté une activité antibactérienne anti-Gram(-) et anti-Gram(+). Les activités antimicrobiennes des autres extraits d'insectes ont présenté des spectres d'activités plus restreints, souvent limitées aux souches bactériennes Gram(+).

Nous avons voulu déterminer quel mode de fractionnement permettrait le plus fiablement d'enrichir les fractions en molécules actives. Nous avons toujours opté pour une extraction poussée au dichlorométhane-méthanol. Cet extrait brut a été traité suivant différentes méthodes : a) fractionnement grossier de l'extrait total sur silice, b) partition entre solvants de polarité croissante (hexane-méthanol pour enlever les lipides) avant de procéder à le chromatographie sur silice, c) fractionnement par chromatographie sur couche mince de fractions ''délipidées''. Chez certaines espèces nous avons également ciblé une classe spécifique de substances naturelles, à savoir les alcaloïdes (chez *Rhagonycha fulva* et chez *Pomacea bridgesi*).

Nous avons caractérisé différents composés actifs par leur comportement spécifique lors des différents étapes de purification. Maintenant beaucoup de ces molécules doivent être identifiés chimiquement et leur structure reste à être déterminée. Comme ce travail va être repris par la société EntoMed (SA) nous n'allons pas décrire plus en détail l'isolement de ces substances. Différentes espèces d'insectes ont été extraites au cours de travail de thèse :

Drosophila melanogaster (diptère) Aedes aegyptii (diptère) Formica rufa (hyménoptère) Formica rufa [sécrétions] (hyménoptère) Thaumetopoea processionea (lépidoptère) Geotrupes stercorosus (coléoptère) Zophobas atratus (coléoptère) Tenebrio molitor (coléoptère) Dlochrysa fastuosa (coléoptère) Phyllopertha horticola (coléoptère) Rhagonycha fulva (coléoptère)

Pomacea bridgesi [gastéropode, (œufs)]

Ce travail d'isolement par pharmacoguidage nous a permis d'isoler et de caractériser des molécules antimicrobiennes autres que l'harmonine.

Dans un grand nombre d'espèces d'insectes se trouvent des concentrations élévées d'acides gras non estérifiés. Dans *Drosophila melanogaster* nous avons pu caractériser l'acide linoléique comme étant une molécule fortement antibactérienne (anti-Gram(+)) dans les extraits totaux.

Nous avons pu isoler un composé diphénolique chez *Phyllopertha horticola*, qui a des propriétés anti-Gram(+). Il s'agit du 2-(3,4-dihydroxyphényl-)éthanol. Ce composé a déjà été isolé d'huiles de plantes, et son activité antibactérienne a été décrite.⁶² Afin de vérifier l'identité du composé nous avons synthétisé ce composé par une synthèse chimique décrite dans la littérature.⁶³ Cette préparation comprenait la simple réduction de l'acide 3,4-dihydroxyphényl-acétique par l'aluminohydrure de lithium.



III. L'harmonine et ses analogues : synthèse chimique et activités antimicrobiennes

3.1. Objectifs de la synthèse de l'harmonine (Z-1,17-diaminooctadéc-9ène) :

Pour aboutir à la démonstration rigoureuse que la structure caractérisée est bien correcte et que l'activité biologique observée est bien due à la molécule identifiée, il est nécessaire de réaliser une synthèse de la substance naturelle en question.

Nous avons préparé l'harmonine (Z-1,17-diaminooctadéc-9-ène) par synthèse organique pour démontrer que l'activité biologique de la substance isolée est identique à celle de la diamine synthétisée. Ceci permet de vérifier que l'activité biologique n'est pas conférée par un contaminant peu abondant ayant le même comportement physico-chimique lors des différentes étapes de purification. Le produit synthétisé permet la confirmation de la structure chimique établie, et ceci par identification des diverses propriétés spectrales. Une caractérisation supplémentaire a pu être réalisée par analyse en électrophorèse capillaire, le produit naturel ayant le même temps de migration que le produit de synthèse (détection UV à 205 nm).

3.2. Objectifs de la synthèse de diamines, analogues de l'harmonine :

Point de vue de la chimie médicinale :

L'objectif de la synthèse d'analogues structuraux est de déterminer les éléments de structure qui sont essentiels à l'activité biologique de ces diamines à longue chaîne. Cette étude met en évidence les liens qui président la relation structure-activité. La distribution géométrique des éléments structuraux détermine le ''pharmacophore'', structure de base minimalisée gardant les propriétés pharmacologiques.

Le but d'une recherche de la relation structure-activité est généralement l'optimisation des propriétés biologiques de composés analogues, dont la synthèse chimique est parfois facilitée par l'abolition d'éléments de structure superflus présents dans les substances naturelles.

Nous remarquons néanmoins que l'harmonine est essentiellement constituée d'une chaîne grasse hautement flexible, lui permettant d'adopter un nombre très élevé de conformations distinctes. Cette flexibilité risque de rendre la molécule peu sélective, les différents conformères pouurant potentiellement interagissant avec des cibles biologiques différentes. Cette diamine reste un candidat pauvre pour démarrer une optimisation de structure par chimie médicinale. L'approche classique consisterait à rigidifier la chaîne hydrocarbonée par l'introduction formelle d'une série d'hétérocycles aromatiques qui agissent comme espaceurs rigides (''spacers''), afin de diminuer les degrés de liberté de rotation à l'intérieur des molécules.

Point de vue de la chimie des substances naturelles :

La démarche, que nous avons adoptée met le poids sur le rôle physiologique des produits existant dans la nature. Rappelons-nous que l'harmonine est en effet présente à une concentration très élevée dans l'insecte (~1 mg / g d'insecte). Tout être vivant est soumis à une pression de sélection naturelle garantissant uniquement la survie et la reproduction aux individus les mieux adaptés. La pression de sélection du ''survival of the fittest'' darwinien devrait se répercuter de façon identique sur le métabolisme secondaire des insectes, favorisant les espèces contenant ou produisant les substances naturelles leur procurant un avantage évolutif. La production de substances endogènes antimicrobiennes serait d'un fort avantage biologique. Notre hypothèse de travail consiste à considérer les substances à activité antimicrobienne comme étant issues d'un processus d'optimisation naturelle.

La synthèse chimique de diamines de structures très proches de l'harmonine devrait nous éclairer sur l'importance des divers éléments de structure de la substance naturelle. Pourquoi la diamine naturelle contient-elle une double liaison, et pourquoi contient-elle un carbone chiral ? Souvent une substance naturelle peut paraître chimiquement complexe, même si elle est biosynthétisée en peu d'étapes à faible coût métabolique à partir de précurseurs biologiques. Il s'agit donc de distinguer les élements de structure essentiels à l'activité biologique des éléments de structure reflétant simplement leur origine biosynthétique.

Conception de diamines-analogues pour établir la relation de structure-activité :

Pour répondre aux questions précédentes, nous avons entrepris de synthétiser des molécules de structure de plus en plus simplifiée et de comparer leurs activités biologiques spécifiques. Un déplacement formel de la fonction amine de la position 17 à l'extrémité de la chaîne (position 18) crée une diamine symétrique, le *cis*-1,18-diaminooctadéc-9-ène, exempte de centre chiral. Le composé naturel contient deux fonctions amines, dont une se trouve dans un environnement encombré par un méthyle. L'absence du méthyle dans le *cis*-1,18-diaminooctadéc-9-ène permet d'évaluer la contribution de cet alkyle pour l'activité biologique.

Les autres analogues sont tous de symétrie C2 et comportent des modifications au niveau de la partie centrale. Le remplacement de la double liaison va modifier la géométrie, ainsi que d'un certain degré la polarisabilité du squelette hydrocarboné (schéma III.1.).

Cette démarche, consistant à simplifier le squelette hydrocarboné des diamines, nous a conduits à synthétiser des analogues où la double liaison est remplacée par une liaison simple carbone-carbone. Ces analogues saturés, de par cette liaison sp^3-sp^3 , gagnent une fois de plus au niveau de la flexibilité intramoléculaire.



schéma III.1. : Simplification successive du squelette de l'harmonine

Afin de compléter l'analyse de structure-activité, nous avons inclus dans nos tests biologiques des monoamines à longue chaîne hydrocarbonée commercialisées. L'oléylamine a le même squelette de base que l'harmonine (schéma III.2.). Les propriétés antimicrobiennes de l'hexadécanamine et de la dodécanamine sont décrites dans la littérature.⁶⁴ L'incorporation de ces monoamines dans notre analyse de structure-activité permettra de situer les activités biologiques des diamines par rapport à des structures connues. Les monoamines agissent en premier lieu comme détergents conduisant à la perturbation et à la perméabilisation des membranes biologiques. Un niveau d'activité biologique comparable des mono- et diamines indiquerait un mode d'action similaire.



schéma III.2. : Passage formel des diamines vers des monoamines à longue chaîne

3.3. Synthèse chimique de l'harmonine et de ses analogues :

Pour synthétiser l'harmonine, identifiée comme substance antimicrobienne naturelle de *Harmonia axyridis*, nous nous sommes largement inspirés des deux synthèses décrites dans la littérature scientifique, d'une part par l'équipe de Braekman (synthèse du racémique)⁶⁰ et d'autre part par l'équipe d'Enders (synthèse chirale)⁶¹. Même si nous avons voulu synthétiser l'harmonine sous sa forme racémique, nous avons suivi les premières étapes de la voie de synthèse décrite par Enders, et nous l'avons raccourcie pour obtenir le composé désiré sous forme de mélange des deux énantiomères. Le passage par l'intermédiaire clé **III-8** à 17 carbones nous a réservé l'option de la synthèse chirale de l'harmonine à partir de ce même intermédiaire.

L'avantage de la synthèse de Enders pour construire le squelette carboné de l'harmonine réside dans l'utilisation du complexe éthylenediamine-acétylure de lithium,^{61,65} qui nous évite la préparation *in situ* de l'acétylure de lithium à partir de l'acétylène-gaz et de lithium métallique dans l'ammoniac liquide. Les différentes étapes de la synthèse de **III-8** étaient bien reproductibles, et elles sont illustrées dans le schéma III.3. avec les rendements avec lesquels nous avons obtenu les différents intermédiaires.



schéma III.3. : Synthèse de l'intermédiaire de synthèse III-8

L'alcyne **III-8** a été hydrogénée sur du palladium de Lindlar dans l'hexane en présence d'un poison du palladium, le 2,2'-(éthylènedithio)diéthanol, qui assure une hydrogénation en cis.⁶⁶ Le couplage d'un méthyl-Grignard sur l'aldéhyde **III-12**, obtenu après

déprotection du dioxolane **III-11** dans l'acétone en présence d'acide, a donné l'alcool secondaire **III-13**.⁶¹ Cet alcool fut activé par mésylation et converti en azoture à l'aide d'azoture de sodium dans le diméthylformamide à 65 °C. La fonction chlorure à l'autre extrémité de la chaîne hydrocarbonée a été convertie en azoture lors de cette même étape. Le diazoture organique **III-15** a été réduit en diamine par la réaction de Staudinger, utilisant la réduction de l'azoture par de la triphénylphosphine en présence d'un équivalent d'eau.⁶⁷⁻⁷¹ La diamine obtenue a été précipitée sous forme de chlorhydrate par l'action de gaz chlorhydrique sur une solution de l'amine dans du dichlorométhane. L'harmonine précipitée et récupérée par filtration sur du papier-filtre n'avait plus besoin d'être purifiée davantage.



schéma III.4. : Synthèse chimique de l'harmonine racémique à partir de III-8

L'analogue le plus proche de l'harmonine, le Z-1,18-diaminooctadéc-9-ène, a été préparé à partir du 1-tétrahydropyranyloxy-8-chlorooctane **III-16** suivant la même stratégie de synthèse, illustrée dans le schéma III.5.. Cette diamine sera abrégée **18-2N-cis**.



schéma III.5. : Synthèse de la diamine 18-2N-cis

Comme la synthèse de l'amine précédente 18-2N-cis passe par des intermédiaires à triple liaison, nous avons choisi de nous servir de l'intermédiaire **III-18** pour synthétiser une diamines contenant une triple liaison en son centre, comme illustré dans le schéma III.6.. Le 1,18-diaminooctadéc-9-yne sera noté **18-2N-triple**.



schéma III.6. : Synthèse de la diamine 18-2N-triple

Les α, ω -diamines à chaîne hydrocarbonée saturée ont également été synthétisées à partir de précurseurs communs des synthèses précédentes. Le 1,18-octadéc-9-ynediol sert à l'élaboration du 1,18-octadécanediol après réduction de la triple liaison par hydrogénation sur du palladium sur charbon. En effet il n'existe aucun réactif commercialisé à 18 carbones α, ω -bifonctionnalisé qui pourrait faciliter la synthèse lourde de ce diol saturé à 18 carbones. Le rendement faible de l'hydrogénation de **III-23** a partiellement été dû à l'hydrogénolyse de la fonction hydroxy (CH₂OH \rightarrow CH₃).

L'adjonction de nitrite de sodium au milieu réactionnel (100 mg de NaNO₂ pour 30 mg de Pd/C) a rendu le catalyseur plus sélectif et a évité cette déshydroxylation réductive.

La faible solubilité du diol saturé **III-25** a conduit à des pertes du produit lors de sa purification. En particulier, nous avons dû prendre soin de bien laver le papier filtre avec un mélange de méthanol-dichlorométhane lors de la séparation de ce diol saturé du catalyseur par filtration.

Le manque de solubilité du diol a également conduit à des pertes lors de sa chromatographie sur silice ; même si une large fraction du produit élue comme attendu (avec un mélange d'élution établi suivant la rétention du diol en chromatographie sur couche mince, à savoir 75 % éther dans l'hexane), une autre fraction du diol reste accrochée sur la silice, et elle ne peut être récupérée qu'après élution avec des solvants polaires (méthanol). Le rendement de 61 % reflète cette perte sur la colonne de silice. Une filtration sur silice avec un mélange d'élution plus polaire (diéthyléther pur) donnait des rendements supérieurs à 90 %.

Le 1,20-diaminoeicosane a été préparé suivant le même schéma de synthèse que le 1,18-octadécane et avec des rendements similaires.

III. L'harmonine et ses analogues : synthèse chimique et activités antimicrobiennes



schéma III.7. : Synthèse de la diamine 18-2N-sat

La préparation des diamines saturées à 14 et 16 carbones a été facilitée par l'utilisation des diacides à longue chaîne, l'acide hexadécanedioïque et l'acide tétradécanedioïque comme réactifs de départ. Les diacides ont été réduits avec de l'aluminohydrure de lithium (LAH) dans du tétrahydrofurane. Après formation des sels dicarboxylates à 0°C, la réduction exhaustive s'est fait à reflux pendant 6 heures avec 3 équivalents de LAH par molécule de diacide. La purification sur colonne de silice a également entraîné des pertes des diols saturés. Les conversions des fonctions alcools en amines ont été réalisées comme décrit précédemment, avec les rendements indiqués dans le schéma III .8..

| acide hexa- décanedioïque | 59 % | 1,16-hexa- décanediol | 80 % | 1,16-diazido- hexadécane | 76 % | 1,16-diamino- hexadécane |
|-------------------------------|------|---------------------------|------|------------------------------|------|------------------------------|
| acide tétra- décanedioïque | 80 % | 1,14-tétra- décanediol | 58 % | 1,14-diazido- tétradécane | 54 % | 1,14-diamino- tétradécane |

| schéma III.8. | Sy | vnthèse | des | diamines | 16 | -2N-sat | et | 14-2N-sat |
|---------------|----|---------|-----|----------|----|---------|----|-----------|
|---------------|----|---------|-----|----------|----|---------|----|-----------|

3.4. Problèmes rencontrés au niveau de la synthèse de l'harmonine et de ses analogues :

Nous allons nous intéresser dans ce paragraphe à quelques problèmes rencontrés au niveau de la synthèse de l'harmonine et des diamines-analogues, qui ont nécessité un travail d'optimisation. Des produits secondaires, qui limitent le rendement des réactions utilisées, vont être détaillées ici. Nous allons classer ces réactions en deux groupes, ceux concernant l'élaboration du squelette hydrocarboné des molécules, et ceux concernant la fonctionnalisation de ces molécules. Nous allons ainsi revenir dans un premier temps sur les problèmes du couplage carbone(sp)-carbone(sp³) et sur l'hydrogénation catalytique des triples liaisons. Dans un deuxième temps nous allons revenir sur la déprotection d'une fonction dioxolane et sur la conversion de la fonction alcool en amine.

Problèmes au niveau de l'élaboration du squelette hydrocarboné :

-couplage carbone(sp)-carbone(sp³):

Le couplage de l'acétylure de lithium (complexé à l'éthylènediamine) sur les chlorures ou bromures d'alkyle s'est fait avec des rendements élevés (≈ 80 %).^{61,65}

Le deuxième couplage des alcynes vrais sur des chlorures ou des bromures d'alkyles fut délicate par contre, et donnait des rendements inférieurs à 50 %. La raison de cette diminution de la réaction de couplage réside dans le fait que l'anion dérivé de l'alcyne vrai réagit en partie comme base sur les halogénures d'alkyles, et l'élimination de HX conduit à la formation d'alcènes terminaux comme produits secondaires.



schéma III.9. : Action de l'anion alcynure sur des bromures d'alkyle

-hydrogénation des alcynes au palladium de Lindlar

L'hydrogénation des α, ω -*bis*-tétrahydroxypyranyloxy-alcynes au palladium de Lindlar pour obtenir des alcènes de configuration Z n'était guère sélective à 23°C dans l'éthanol. Même si aucune formation de simple liaison n'a été détectable, les alcènes formés se sont trouvés dans les deux configurations, ''Z'' et ''E'' dans la proportion de 2 à 1. La composition de ce mélange a pu être évaluée directement par dosage en chromatographie en phase gazeuse, ainsi qu'indirectement d'après les intensités des signaux vinyliques en RMN ¹H (et en RMN ¹³C).

L'hydrogénation des α, ω -alcynediols au catalyseur de Lindlar dans l'éthanol par contre donnait exclusivement les alcènes de configuration Z. Ce comportement différent des alcynes-diols par rapport aux tétrahydropyranyloxy-alcynes dans les mêmes conditions d'hydrogénation est remarquable.

La sélectivité de l'hydrogénation peut être augmentée par rajout de poisons du catalyseur, tel le 2,2'-(dithioéthylene)-diéthanol ou la quinoline.⁶⁶ D'après H. Lindlar, le rajout de traces de ce sulfure (en quantité de 1 à 0,1 % par rapport au poids du catalyseur), ou la présence de quinoline (en quantité de 5 %) rendraient les hydrogénations sélectives.⁶⁶

10 % de 2,2'-(dithioéthylene)-diéthanol par rapport au poids du catalyseur ont inhibé complètement la réaction d'hydrogénation. Même 0,5 % de ce sulfure étaient encore suffisants à empêcher la réaction. Du poison, à 0,1 % par rapport à la masse du palladium, conduisait à la réduction sélective des tétrahydropyranyloxy-alcynes (dans l'hexane comme solvant). Le suivi de la réduction des tétrahydropyranyloxy-alcynes était largement facilité par rapport au suivi de la réduction des alcyne-diols, parce qu'en chromatographie sur couche mince les tétrahydropyranyloxy-alcènes présentaient un indice de rétention nettement inférieur à celui des alcynes-précurseurs. La forte polarité des diols correspondants est telle qu'une faible différence de polarité de leur squelette hydrocarboné (double/triple liaison) ne s'exprime plus au niveau de leur indice de rétention. Les alcyne-diols et les alcène-diols coéluent en chromatographie sur couche mince.

Les conditions optimales que nous avons retenues pour la réduction d'1 mmole de 1,18-bis- tétrahydropyranyloxy-octadéc-9-yne sont : 10 mg de palladium de Lindlar (5 % de Pd sur carbonate de calcium, contaminé avec du plomb), 0,01 mg de 2,2'-(dithioéthylene)-diéthanol (dissous dans 12 μ l d'éthanol), en présence de 10 ml d'hexane. La réduction se fait donc avec 0,47 mol% de Pd contaminé et 0,0055 mol% de 2,2'-(dithioéthylene)-diéthanol.

Problèmes liés à la fonctionnalisation des squelette des diamines -déprotection du dioxolane

La fonction aldéhyde de **III-12** s'est trouvé sous forme de dioxolane dans l'intermédiaire de synthèse **III-11**. Ce groupement protecteur est stable en milieu basique, et il a été déprotégé en milieu acide. En général, une telle déprotection est facilitée par la présence de carbonyles compétiteurs, qui peuvent former des cétals avec l'éthylèneglycol libéré. La déprotection d'un dioxolane avec de l'acétone en présence d'acide chlorhydrique est décrite dans l'article de la synthèse de l'harmonine par Enders.⁶¹ Nous avons utilisé la même méthode de déprotection pour la molécule **III-11** ; la déprotection s'est avérée difficile et nous avons récupéré un produit secondaire de faible abondance, mais se révélant fortement à la vanilline en chromatographie sur couche mince. Nous avons décidé d'arrêter la réaction

après 4 heures à reflux en présence de 10 % v/v de HCl 1N dans l'acétone. Ainsi nous avons récupéré, après chromatographie sur silice, 12 % de dioxolane de départ, que nous avons soumis à une nouvelle réaction de déprotection. L'arrêt de la réaction avant sa terminaison nous a permis d'éviter une trop forte dégradation de l'aldéhyde formé. En présence d'acide, cet aldéhyde s'aldolise par réaction avec une molécule d'acétone ; l'aldol s'est déshydraté pour former une cétone α,β -insaturée. Cette "crotonocétone" a été isolée et caractérisée comme produit secondaire dans une proportion de 6 % (schéma III.10.).



schéma III.10. : Déprotection du dioxolone III-11 avec de l'acétone

-conversion des fonctions alcools en fonctions amines

Nous avons choisi de passer par la formation d'azotures pour obtenir des amines à partir des fonctions alcools activées par mésylation. La mésylation des fonctions alcools se faisait sans problème avec de faibles excès de chlorure de mésyle (3,5 équivalents par molécule de diol) et de triéthylamine (4 équivalents par molécule de diol).

La transformation des groupes mésylates en azotures par SN_2 s'est faite avec un bon taux de conversion dans le DMF à 65°C pendant 18 heures. Par peur de favoriser des réactions d'élimination à haute température, nous avons réalisé les premières réactions à 23°C dans le DMSO ; cependant un temps de réaction de plusieurs jours jusqu'à deux semaines était nécessaire pour donner des conversions totales. Nous n'avons jamais observé de produits d'élimination lors des réactions de substitution, ni dans les divers solvants utilisés (DMSO, DMSO + eau, DMF), ni aux diverses températures de réaction allant de 20°C à 75°C.

La réduction des azotures en amines s'est révélée être délicate. Une réduction des fonctions azotures par hydrogénation sur palladium en même temps que l'hydrogénation de la triple liaison^{74,75} donnait trop de produits secondaires pour être utilisable :



schéma III.11. : Difficulté d'hydrogénation des diazotures avec le palladium de Lindlar

La longue chaîne hydrocarbonée des diazotures leur confère de l'inertie chimique, ce qui se manifeste aussi lors de la réduction des azotures par la réaction de Staudinger. Le chauffage du milieu réactionnel à reflux dans le THF (10 ml pour 1 mmole)⁷⁴ n'a donné que des rendements moyens (60 %). L'augmentation de la concentration des réactifs et du substrat par diminution du volume du solvant de la réaction est un autre moyen de limiter l'inertie du système.

L'optimisation de cette réaction à l'aide d'un autre substrat à longue chaîne hydrocarbonée à savoir le 1-azido-*n*-décane nous a permis de constater qu'aucune réaction (dégagement gazeux de N_2) n'est observable si le substrat est dilué dans le milieu réactionnel à une concentration de 1 mmole par ml de THF. Le solvant a ensuite été évaporé par un flux d'argon sur la surface du milieu réactionnel jusqu'au démarrage de la réaction. La réaction a commencé alors qu'il n'est resté que 300 μ l de solvant. Les conditions optimales pour réduire le 1-azido-n-décane sont 200 μ l de THF comme solvant de la réaction par mmole d'azoture.

Les diazotures ont été un peu plus réactifs que ce monoazoture à longue chaîne hydrocarbonée, et un volume de 1,0 ml de THF par mmole de diazoture semblait être un bon compromis entre la solubilité des réactifs et leur réactivité chimique. La faible solubilité des diamines, produits de cette réduction, entraînait la formation d'un précipité dense dans le milieu réactionnel. Pour compenser l'hétérogénéité du milieu réactionnel, nous avons prolongé les temps de la réduction jusqu'à une semaine, et nous avons agité manuellement le réacteur toutes les 12 heures pour assurer le mélange intime des réactifs (en plus de l'agitation par un barreau magnétique). Dans les conditions idéales nous avons utilisé 2,5 mmoles de triphénylphosphine (1,25 équivalents par fonction azoture) pour une mmole de diazoture dilué dans 1 ml de THF en présence de 100 μ l d'eau (5,5 mmoles).

| Microorganisme | E.c | En.c. | Er.c. | S.ty. | K.pn. | P.ae. | M.lu. | B.me. | B.su. | B.th. | S.au. | A.fu. | N.cr | T.sp. | C.al. | S.ce. |
|----------------------|--------------------|--|-------|-------|-------|--------|-----------|-------|-------|-------|---------|-------|------|-------|-------|-------|
| | о. | | | | | | | | | | | | | | | |
| groupe : | bactéries Gram (-) | | | | | bactéi | ries Grai | m (+) | | ch. | filamen | teux | lev | ures | | |
| ↓ : composé testé | | Concentrations minimales inhibitrices ; MICs (µg / ml) : | | | | | | | | | | | | | | |
| dodécanamine | 6 | 12 | 12 | 6 | 12 | 12 | 3 | 3 | 3 | 12 | 6 | 50 | 50 | 25 | 12 | 12 |
| hexadécanamine | 3 | 6 | >100 | 3 | 12 | 6 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 25 | 6 | 6 | 6 | 3 |
| oléylamine | 3 | 4 | 25 | 3 | >100 | 12 | 3 | 3 | 3 | 6 | 3 | 50 | 12 | 50 | 12 | 6 |
| CPC | 1,5 | 6 | 6 | 1,5 | 6 | 12 | 0,4 | 0,8 | 0,8 | 1,5 | 0,4 | 3 | 3 | 3 | 1,5 | 1,5 |
| DQ | 0,8 | 25 | 6 | 3 | 6 | 12 | 0,8 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 0,8 | 50 | 6 | 1,5 | 3 | 1,5 |
| 12-2N-sat | >50 | | | | | | >50 | | | | | | >50 | | | |
| 14-2N-sat | 18 | >50 | >50 | 25 | 50 | >50 | 8 | 8 | 25 | >50 | 50 | >50 | 50 | >50 | >50 | >50 |
| 16-2N-sat | 2 | 25 | 12 | 6 | 6 | 25 | 1,5 | 3 | 6 | 30 | 4 | >50 | 12 | 6 | 3 | 50 |
| 18-2N-sat | 0,8 | 3 | 1,5 | 1,5 | 3 | 3 | 0,8 | 0,8 | 1,0 | 5 | 1,5 | >50 | 3 | 6 | 1,5 | 3 |
| 20-2N-sat | 1 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 2 | 1,5 | >50 | 1,5 | 6 | 1,5 | 1,5 |
| 18-2N-triple | 12 | | | | | 50 | 3 | | | | 6 | >50 | 25 | | | |
| 18-2N-cis | 3 | | 1 | 3 | 4 | 12 | 1,5 | | 0,8 | 25 | 1,5 | | | | | |
| harmonine | 4 | 25 | 12 | 3 | 12 | 25 | 1,5 | 3 | 3 | 50 | 4 | >50 | 3 | 25 | 25 | 25 |

Agrandi du tableau III.1. : Tableau des activités antimicrobiennes de monoamines et de diamines

| Microorganisme | E.co. | En.c. | Er.c. | S.ty. | K.pn. | P.ae. | M.lu. | B.me. | B.su. | B.th. | S.au. | A.fu. | N.cr | T.sp. | C.al. | S.ce. |
|----------------------|--------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|-------|-------|-----------------|------|-------|---------|-------|
| groupe : | bactéries Gram (-) | | | | | | | bactéri | es Grar | n (+) | | ch. filamenteux | | | levures | |
| ↓ : composé testé | | Concentrations minimales inhibitrices ; MICs (µg / ml) : | | | | | | | | | | | | | | |
| dodécanamine | 6 | 12 | 12 | 6 | 12 | 12 | 3 | 3 | 3 | 12 | 6 | 50 | 50 | 25 | 12 | 12 |
| hexadécanamine | 3 | 6 | >100 | 3 | 12 | 6 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 25 | 6 | 6 | 6 | 3 |
| oléylamine | 3 | 4 | 25 | 3 | >100 | 12 | 3 | 3 | 3 | 6 | 3 | 50 | 12 | 50 | 12 | 6 |
| CPC | 1,5 | 6 | 6 | 1,5 | 6 | 12 | 0,4 | 0,8 | 0,8 | 1,5 | 0,4 | 3 | 3 | 3 | 1,5 | 1,5 |
| DQ | 0,8 | 25 | 6 | 3 | 6 | 12 | 0,8 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 0,8 | 50 | 6 | 1,5 | 3 | 1,5 |
| 12-2N-sat | >50 | | | | | | >50 | | | | | | >50 | | | |
| 14-2N-sat | 18 | >50 | >50 | 25 | 50 | >50 | 8 | 8 | 25 | >50 | 50 | >50 | 50 | >50 | >50 | >50 |
| 16-2N-sat | 2 | 25 | 12 | 6 | 6 | 25 | 1,5 | 3 | 6 | 30 | 4 | >50 | 12 | 6 | 3 | 50 |
| 18-2N-sat | 0,8 | 3 | 1,5 | 1,5 | 3 | 3 | 0,8 | 0,8 | 1,0 | 5 | 1,5 | >50 | 3 | 6 | 1,5 | 3 |
| 20-2N-sat | 1 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 2 | 1,5 | >50 | 1,5 | 6 | 1,5 | 1,5 |
| 18-2N-triple | 12 | | | | | 50 | 3 | | | | 6 | >50 | 25 | | | |
| 18-2N-cis | 3 | | | 3 | 4 | 12 | 1,5 | | 0,8 | 25 | 1,5 | | | | | |
| harmonine | 4 | 25 | 12 | 3 | 12 | 25 | 1,5 | 3 | 3 | 50 | 4 | >50 | 3 | 25 | 25 | 25 |

3.5. Tableau des activités antimicrobiennes de monoamines et de diamines :

Liste des microorganismes testés :

E.co. : Escherichia coli ; En.c. : Enterobacter cloacae ; Er.c. : Erwinia carotovara carotovara ; S.ty. : Salmonella typhimurium ; K.pn. : Klebsiella pneumoniae ; P. ae. : Pseudomonas aerugunosa ; M.lu. : Micrococcus luteus ; B.me. : Bacillus megaterium ; B.su. : Bacillus subtilis ; B. th. : Bacillus thuringiensis ; S.au. : Staphylococcus aureus ; A.fu. : Aspergillus fumigatus ; N.cr. : Neurospora crassa ; T.sp. : Trychophyton species (dermatophytes ?);

C.al: Candida albicans; S.ce.: Saccharomyces cerevisiae

Liste des amines testées :

CPC : chlorure de cétylpyridinium ; DQ : bromure de déqualinium ;

12-2N-sat : 1,12-diaminodacécane ; 14-2N-sat : 1,14-diaminotétradécane ; 16-2N-sat : 1,16diaminohexadécane ; 18-2N-sat : 1,18-diaminooctadécane ; 20-2N-sat : 1,20diaminoeicosane ; 18-2N-triple : 1,18-diaminooctadéc-9-yne ; 18-2N-cis : Z-1,18diaminooctadéc-9-ène ; harmonine : (*rac*)-Z-1,17-diaminooctadéc-9-ène

tableau III.1. : Tableau des activités antimicrobiennes de monoamines et de diamines

3.6. Résultats biologiques :

Les monoamines à longue chaîne aliphatique testées sont toutes antibactériennes, avec le même niveau d'activité que l'harmonine synthétisée. Contrairement aux diamines, les monoamines présentent plus d'hétérogénéité dans leur spectre d'activité antimicrobienne par rapport aux souches de bactéries testées. L'absence d'activité de l'hexadécanamine envers *Erwinia carotovara* ne se reflète pas dans le spectre d'activité de la dodécanamine. L'absence d'activité de l'oléylamine envers *Klebsiella pneumoniae* ne va pas de pair ni avec les activités de la dodécanamine ni avec celles de l'hexadécanamine. Le spectre d'activité des monoamines envers les bactéries Gram (+) est homogène, à l'opposé de leurs activités contre les Gram (-) ; leurs activités antimicrobiennes sont généralement plus fortes par rapport aux bactéries Gram (+).

Dans nos tests nous avons inclus des composés commercialisés comme antiseptiques. Ils servent de référence pour évaluer les mono- et les diamines. Le chlorure de cétylpyridinium (CPC) est un détergent cationique, utilisé comme désinfectant topique.⁷⁶ Le bromure de déqualinium (DQ) est un composé dicationique interagissant probablement avec l'ADN des bactéries, présent dans des lotions buccales désinfectantes.⁷⁶ Leur activité antimicrobienne est très forte, et leur spectre d'activité est très large, allant des bactéries Gram (-) et Gram (+) aux champignons filamenteux et aux levures. Le DQ n'est que peu actif sur *Aspergillus fumigatus*.



L'activité des monoamines soulève une question : leur pharmacophore peut-il être réduit à une fonction amine portée à l'extrémité d'une chaîne hydrocarbonée de 12 carbones, comme c'est le cas de la dodécanamine, tout en gardant des libertés de substitution sur l'autre extrémité ? Le 1,12-diaminododécane maintient ce même squelette de base et porte une fonction amine supplémentaire à l'autre extrémité de la chaîne hydrocarbonée. De cette façon on devrait s'attendre à ce que la fonctionnalisation supplémentaire conduise à une potentialisation de l'activité de la dodécanamine. Or cette diamine à 12 carbones n'a pas d'activité antimicrobienne. C'est donc le caractère amphiphile et la nature cationique des monoamines qui leur confèrent l'activité antimicrobienne. La deuxième fonction amine de la 1,12-dodécanediamine abolit le caractère amphipathique de la molécule et la rend inactive.

La dodécanediamine monoacétylée $(AcNH-(CH_2)_{12}-NH_2)$ n'a pas d'activité antimicrobienne non plus (ces données ne sont pas incluses dans le tableau). La fonction acétylamine terminale ne peut pas se substituer aux CH₂ d'une chaîne hydrocarbonée.

Les propriétés antimicrobiennes de l'harmonine (*cis*-1,17-diaminooctadéc-9-ène) se retrouvent dans toutes les diamines analogues d'une longueur supérieure à celle de la 1,12-
dodécanediamine. L'analogue *cis*-1,18-diaminooctadéc-9-ène présente un léger gain en activité antimicrobienne contre *B. subtilis* et *Klebsiella pneumonia* comparée à l'harmonine. Ceci montre que la présence du carbone asymétrique de l'harmonine n'est pas essentielle à l'activité antimicrobienne.

Le remplacement formel de la double liaison du Z-1,18-diaminooctadéc-9-ène par une triple liaison (\rightarrow alcyne) abaisse l'activité antimicrobienne d'un facteur 2 à 4. Les raisons de cette diminution d'activité du *cis*-1,18-diaminooctadéc-9-yne peuvent être d'ordre stérique, la géométrie linéaire de la triple liaison contraignant la molécule à adopter une structure plus étendue. Cette structure linéaire serait défavorable à l'expression de l'activité antimicrobienne. Les propriétés antimicrobiennes des α, ω -diamines saturées augmentent avec le nombre de carbones de la chaîne hydrocarbonée, à partir d'un minimum de 14 carbones. Le 1,14-diaminotétradécane (14-2N-sat) n'est que peu actif ; le 1,16diaminohexadécane (16-2N-sat) a une activité antimicrobienne moyenne ; le 1,18diaminooctadécane (18-2N-sat) et le 1,20-diaminoeicosane (20-2N-sat) sont fortement antimicrobiens. Les activités biologiques des diamines à 18 et à 20 carbones sont proches. Un nombre total de 20 carbones situés entre les fonctions amines correspond à un plateau d'activité dans un graphe représentant l'activité biologique en fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée saturée (schéma III.12.).



schéma III.12. (La MIC est inversement proportionnelle à l'activité biologique)

Le niveau d'activité de l'harmonine est proche de la hexadécanediamine (16-2N-sat), ce qui montre que ce n'est pas le nombre total d'atomes de carbones dans la molécule qui déterminerait l'activité, mais que c'est plutôt le nombre de carbones faisant jonction entre les amines, qui est déterminant (17 carbones entre les amines pour l'harmonine).

Les α, ω -diamines saturées à 18 et 20 carbones ont des activités antimicrobiennes 4 à 8 fois plus fortes que celles de l'harmonine ou que celles de la 1-dodécanamine. Leur spectre

d'activité est très large et comporte peu de variations par rapport aux diverses souches de bactéries testées. Ces diamines saturées sont aussi bien antiGram(-) que antiGram(+). Elles sont aussi actives envers les levures (*Candida albicans*) que le CPC, mais peu actives contre le champignon filamenteux *Aspergillus fumigatus*.

3.7. Discussion sur l'activité des diamines :

La similitude du comportement biologique des monoamines et des diamines, ainsi que leur ressemblance au niveau de leur structure, nous laisse supposer que ces deux classes d'amines agissent sur la même cible biologique. La caractéristique principale des monoamines est leur nature amphiphile. Les diamines, à l'opposé, ont deux extrémités hydrophiles reliées à un cœur hydrophobe. Les diamines, afin de pouvoir interagir avec des membranes, doivent se replier pour former un coude hydrophobe. Le rapprochement géométrique des têtes polaires des amines lors d'un repliement sous forme de ''U'' permet de dégager le côté hydrophobe central des diamines, qui va interagir avec le feuillet interne hydrophobe. La répulsion des charges positives des têtes polaires sera compensée par l'interaction avec les groupements anioniques du feuillet externe des membranes des bactéries (schéma III.13.).



schéma III.13. Insertion des diamines dans les membranes sous forme coudée

Les diamines synthétisées sont trop courtes pour traverser une membrane cytoplasmique de part et d'autre. Une taille minimale de la partie hydrophobe de 30 carbones serait en effet requise pour qu'un amphiphile puisse s'étendre à travers d'une membrane lipidique.

Une indication supplémentaire, qui tend à confirmer la conformation coudée des diamines lors de l'interaction biologique, est fournie par l'analogue à double liaison de

III. L'harmonine et ses analogues : synthèse chimique et activités antimicrobiennes

configuration Z. La géométrie de la double liaison impose un angle de 120° au squelette hydrocarboné de la molécule. La double liaison n'altère pas l'affinité des diamines pour la cible biologique, les activités antimicrobiennes des α, ω -diamines, saturées ou non, étant du même ordre de grandeur.

Au cours des tests biologiques nous avons remarqué que les diamines saturées sont très faiblement solubles, aussi peu dans l'eau que dans les solutions alcooliques. Les solutions aqueuses sont saturées à une concentration de 1 mg de diamine par millilitre d'eau. La solubilité des diamines à triple et à double liaison, ainsi que la solubilité de l'harmonine sont fortement accrues par rapport à la solubilité des diamines à squelette hydrocarboné saturé. La double liaison présente dans l'harmonine semble *a priori* être superflue et peu favorable au niveau de l'activité antimicrobienne *in vitro*. Cependant cette double liaison pourrait augmenter la solubilisation de ces molécules chez l'insecte, en particulier dans l'hémolymphe, et y atteindre des concentrations élevées. Le groupement méthyle pourrait jouer un rôle analogue à celui de la double liaison. Le groupement alkyle conduit à la rupture de la symétrie des diamines, et le gène stérique exercé par ce méthyle, désorganiserait les diamines à l'état solide. Ces divers paramètres contribueraient à la solubilité de ces diamines dans les solutions aqueuses.

Les activités antimicrobiennes des α, ω -diamines à 18 et 20 carbones étant supérieures aux monoamines, nous supposons que l'augmentation du nombre des groupements amines primaires portées par un squelette hydrocarboné pourrait potentialiser l'activité biologique de ce groupe de substances antimicrobiennes. Ce concept nous a conduit à synthétiser d'autres molécules d'activité biologique accrue.

Remarque :

Comme la diamine acétylénique à 18 carbones a montré de plus faibles activités antimicrobiennes que la diamine vinylique correspondante comportant une double liaison de configuration Z, nous avons supposé que la géométrie coudée serait essentielle à l'activité biologique. La synthèse d'analogues comportant une double liaison de configuration E a donc semblé peu justifiée ; une telle double liaison possède en effet une géométrie étendue similaire à celle d'une triple liaison.

4.1. Polyamines de deuxième génération, à squelette hydrocarboné ramifié :

4.1.1. Objectifs de la synthèse de ces polyamines :

a) Triamines :

Nous avons vu dans le chapitre précédent, que les diamines à longue chaîne hydrocarbonée saturée ont des activités antibactériennes accrues par rapport aux monoamines. Dans l'hypothèse d'une potentialisation par le nombre de fonctions amines nous avons voulu créer des analogues plus actifs, contenant des groupements d'amines primaires supplémentaires. Nous avons déjà vu que l'activité biologique des diamines pourrait être due à une perturbation membranaire par leur insertion dans le feuillet externe des bicouches lipidiques, les diamines se trouvant alors coudées sous forme de U (pour ainsi faire ressortir les têtes cationiques vers l'extérieur de la membrane). Suivant ce modèle, nous avons imaginé qu'il devrait être possible de greffer une chaîne hydrocarbonée (ω -aminée) supplémentaire sur la partie centrale des diamines, en créant de sorte une triamine, ayant des propriétés antimicrobiennes augmentées par rapport à celles des diamines. La conception de structures de nouvelles triamines à partir du modèle d'action hypothétique des α, ω -diamines est illustrée dans le schéma IV.1..



schéma IV.1.: Modèle d'une interaction membranaire des polyamines ramifiées

L'insertion d'une molécule amphiphile dans le feuillet externe d'une membrane y créerait un surnombre de molécules par rapport au feuillet interne. Il est admis que cet excédent de lipides dans le feuillet externe d'une bicouche lipidique tendrait alors à induire une pression de courbure des membranes.⁴⁹ Cette pression déstabiliserait les bicouches lipidiques et entraînerait la formation de pores membranaires. La perméabilisation membranaire par des amphiphiles cationiques est alors responsable de la mort et/ou de la lyse des bactéries. Des études approfondies sur le mécanisme de la perturbation membranaire par des peptides

amphipathiques, détaillées dans la littérature scientifique, tendent a corroborer un tel mécanisme.^{49,54}

Notre stratégie de concevoir des triamines, molécules polyfonctionnalisées, se rapproche du concept des "agents pharmaceutiques polyvalents" de G. M. Whitesides (''pharmaceuticals agents based on polyvalency'').⁷⁷ Souvent des récepteurs biologiques contiennent plusieurs sites de liaison pour un même ligand. L'idée de G. M. Whitesides était de relier plusieurs de ces ligands par des liaisons covalentes créant de suite une molécule polyvalente. Une telle molécule devrait pouvoir interagir simultanément avec plusieurs sites de liaison du même récepteur biologique ; l'affinité du ligand multivalent pour sa cible biologique serait potentialisée par rapport à un ligand monomérique. Nous sommes cependant bien conscients qu'une fonction amine à elle seule ne peut être considérée comme ligand biologique ; ainsi nos diamines (triamines) ne sont pas polyvalentes dans le sens strict de la définition de G. M. Whitesides.⁷⁷

b) Tétraamines et hexaamines :

Nous allons légèrement anticiper sur les résultats biologiques, et révéler que la triamine 9-(8-amino-octyl)-heptadécane-1,17-diamine (**Tri-8**) est effectivement antibactérienne. Ses propriétés antimicrobiennes sont augmentées par rapport à celles des diamines les plus actives.

La réalisation de tests biologiques, en parallèle à la synthèse chimique, nous a permis d'évaluer, à chaque stade de l'étude de structure-activité, ce que les nouvelles modifications structurales apportent au niveau de l'activité biologique. De cette façon nous avons pu nous baser sur ces connaissances acquises pour la conception de nouveaux analogues. A ce stade de nos recherches, nous avons soupçonné qu'il y aurait potentialisation de l'activité biologique des molécules-analogues par le nombre croissant de groupements amines. Nous avons alors envisagé de synthétiser des polyamines basées sur un squelette hydrocarboné ramifié, qui porterait des fonctions amines primaires aux extrémités des chaînes latérales. Des tétraamines et des hexaamines sont ainsi venus compléter la famille des polyamines-analogues de deuxième génération.

L'objectif principal de la synthèse de ces polyamines fut l'étude de l'influence du nombre total de charges positives sur leur activité biologique. Le second objectif a été l'étude de l'impact de la géométrie du squelette hydrocarboné sur les propriétés antimicrobiennes. Le caractère amphipathique des molécules étant supposé être essentiel à l'activité biologique, nous avons pris soin de concevoir des molécules pouvant adopter des conformations stables comprenant un côté hydrophile et un côté hydrophobe. Lors d'une interaction avec des membranes, ces molécules devraient ressembler globalement à une sorte de calice hydrophobe bordé d'une ceinture cationique, comme nous l'avons illustré dans le schéma IV.2..



schéma IV.2. Conformation des polyamines amphipathiques lors d'une insertion dans les membranes cytoplasmiques

Dans toutes les polyamines analogues, que nous avons synthétisées, nous avons délibérément maintenu des fonctions amines primaires, afin de rester proche de l'harmonine (Z-1,17-diaminooctadéc-9-ène), substance naturelle antibactérienne. Or les fonctions amines primaires risquent d'être peu favorables au niveau pharmacocinétique (franchissement des barrières biologiques) lors d'une éventuelle utilisation thérapeutique. Le but de la préparation de cette série d'analogues a été précisément de connaître les limites d'une utilisation de ces polyamines comme agents antimicrobiens.

4.1.2. Synthèse chimique des polyamines de deuxième génération :

a) Triamines Tri-8 :

Le squelette ramifié de la triamine **Tri-8** a été synthétisée par triple addition d'un organomagnésien, ω -fonctionnalisé, sur le diéthylcarbonate. L'alcool tertiaire a porté trois fonctions d'alcool primaire, protégées par un groupement benzyle. Il fut converti quantitativement en alcène par déshydratation acido-catalysée dans du toluène à reflux, l'eau étant retirée du milieu réactionnel par un piège de type Dean-Stark.⁷⁸ L'alcène trisubstitué a pu être hydrogéné par catalyse sur palladium (Pd/C 5 %) en présence de dihydrogène (sous pression d'1 atmosphère).⁷⁸ Le choix de benzyles comme groupements protecteurs des alcools primaires a permis la déprotection en même temps que l'hydrogénation de la double liaison trisubstituée. La transformation des fonctions alcools en amines a été réalisée suivant la même stratégie utilisée lors de la synthèse des diamines. Le triazoture, obtenu à partir du triol activé par mésylation, fut réduit par la réaction de Staudinger. La triamine a été précipitée au gaz

chlorhydrique. Le chlorhydrate de cette triamine, la 9-(8-amino-octyl)-heptadécane-1,17diamine, a été appelée **Tri-8** (schéma IV.3.).



schéma IV.3. : Synthèse de la triamine Tri-8

b) Tétraamine **Tét-7** :

Le squelette ramifié de la tétraamine **Tét-7** a été obtenu par réaction d'organomagnésiens ω -fonctionnalisés sur le diéthylester de l'acide succinique commercialisé. Nous avons choisi de synthétiser une tétraamine où les points d'embranchement des chaînes latérales sont distants de seulement 2 carbones ; les '''bras latéraux'' fonctionnalisés ont ainsi pu en être d'autant plus longs, et ils ont gardé le maximum de liberté conformationelle. La longueur de 7 carbones des ''bras latéraux'' a été fixée de sorte que la distance maximale entre les fonctions amines les plus éloignés dans cette tétraamine corresponde à 18 carbones. De par sa structure de base cette polyamine est une octadécane-1,18-diamine disubstituée [8,11-bis(7-amino-heptyl)-octadécane-1,18-diamine] ; le squelette hydrocarboné la rapproche des diamines à 18 carbones, analogues de l'harmonine.

La synthèse de cette tétraamine suit globalement le même schéma que la triamine **Tri-8**. L'étape de déshydratation a donné lieu à deux familles de produits de polarité différente : pour une part il s'agit d'un mélange de diènes, pour l'autre part il s'agit d'un autre composé issu d'une cyclisation du 1,4-diol en ''tétrahydrofurane''. Nous allons revenir en détail sur ce type de réarrangement, donnant lieu à un tétrahydrofurane tétrasubstitué dans les positions 2, 2, 5 et 5. Les autres étapes de la synthèse de la tétraamine 8,11-bis(7-aminoheptyl)octadécane-1,18-diamine (dont le chlorhydrate est noté **Tét-7**), se sont déroulées comme attendues (schéma IV.4.).



schéma IV.4. : Synthèse de la tétraamine Tét-7

c) Hexaamines Hex-6 et Hex-4 :

L'acide 4-(2-carboxyéthyl)-4-nitropimélique a servi de molécule de départ à la construction des hexaamines **Hex-4** et **Hex-6**. Sa conversion en triester méthylique dans le méthanol a été quantitative. La fonction "nitro" a été réduite par réduction radicalaire à l'aide de l'hydrure de tributylétain en présence d'un initiateur radicalaire, l'azaisobutyronitrile (AIBN) à 100°C.⁷⁹ Ce triester a servi à la construction d'un squelette *hexa*-branché par réaction avec un organomagnésien ω -fonctionnalisé (12 équivalents par équivalent de molécule-substrat). Le triol résultant de ce couplage a été déshydraté, et le mélange d'alcènes formé a été hydrogéné sur palladium. Simultanément à la réduction des doubles liaisons, cette hydrogénation déprotégeait les fonctions alcools benzylées.



schéma IV.5. : Synthèse des hexaamines Hex-4 et Hex-6

La synthèse des molécules hexafonctionnalisées a été compliquée par le fait qu'il y a 6 réactions individuelles qui doivent se faire sur une même molécule-substrat lors de chaque étape de transformation chimique. Pour convertir les fonctions alcools en amines, nous avons tiré profit de notre expérience recueillie lors des réactions d'optimisation sur des substrats bifonctionnalisés. Ces mêmes réactions ont pu être appliquées à la fonctionnalisation correcte des hexaamines ; elles se sont déroulées avec de bons rendements, comme nous l'avons indiqué dans le schéma IV.5..

4.1.3. Problèmes rencontrés au niveau de la synthèse des tétra- et hexaamines :

Dans ce chapitre nous allons nous consacrer aux problèmes rencontrés lors de la synthèse des tétra- et des hexaamines. En particulier nous allons revenir sur le problème de l'hydrogénation catalytique par le palladium, et nous allons détailler la formation du squelette tétrahydrofurane 2,2,5,5-tétrasubstitué lors de la déshydratation des 1,4-diols.

Réduction catalytique des alcènes trisubstitués par hydrogénation catalytique :

L'hydrogénation des alcènes **T2**, **Q2**, **H4(4)** et **H4(6)** par catalyse au Pd/C (5 %) s'est avérée difficile sous une atmosphère d'1 bar. Comme l'alcène benzoxylé est insoluble dans l'éthanol, nous avons choisi d'utiliser de l'acétate d'éthyle comme solvant de ces réactions d'hydrogénation. Les réactions de débenzylation se font plus rapidement que l'hydrogénation de la double liaison trisubstituée. Les polyols n'étant que peu solubles dans l'acétate d'éthyle, nous avons remplacé l'acétate d'éthyle par de l'éthanol après un jour d'hydrogénation. Lors de l'hydrogénation de **Q2** dans l'acétate d'éthyle il s'est formé un précipité blanc. Ce solide a été replacé dans des conditions d'hydrogénation dans l'éthanol pendant deux jours. Le tétraol **Q3** a été obtenu de cette façon avec un rendement de 80 %. Les hydrogénations de **T2** et de **H4(6)** ont nécessité des temps de réduction plus courts, et elles se sont faites avec des rendements de 65 % pour **H4(6)** et de 79 % pour **T2**.

Le rendement de la réaction d'hydrogénation de **H4(4)** s'est trouvé fortement diminué par rapport au rendement d'hydrogénation de l'alcène **H4(6)**. L'analyse en chromatographie sur couche mince (CCM) du milieu réactionnel nous a révélé la présence de deux produits secondaires de polarité réduite. Ces composés ont été caractérisés par spectroscopie RMN ¹H et RMN ¹³C. Leur spectre diffère de celui de l'hexol **H5(4)** par des signaux, qui indiquent la présence de groupements méthyles (sous forme de triplet) dans leur structure. D'après l'intégration de ces signaux le premier contaminant contiendrait un méthyle, le second deux méthyles, par molécule. La détermination du poids moléculaire en spectrométrie de masse de type FAB (''fast atom bombardement'') de ces composés indique une différence de masse de 16 et de 32 par rapport au poids moléculaire de l'hexol **H5(4)**. Ces composés sont donc issus de l'hydrogénolyse de la liaison carbone-oxygène, qui s'est faite lors de l'hydrogénation catalytique des doubles liaisons.

Les rendements de chaque produit de cette réaction d'hydrogénation sont donnés dans le schéma IV.6.. Des traces du composé tri-déshydroxylé ont pu être détectés en CCM, mais ce composé se trouvait en quantité trop faible pour être isolé et caractérisé. Le composé ''didéshydroxylé'' est en réalité constitué d'un mélange d'isomères de position dont les spectres en RMN sont superposés.



31 % isomères de position

schéma IV.6.: La débenzylation et la réduction catalytique des doubles liaisons par catalyse au palladium sur charbon conduit partiellement à l'hydrogénolyse des fonctions hydroxyles

La formation de produits d'hydrogénolyse lors de la réduction de ces alcènes trisubstitués est l'une des raisons pour lesquelles nous avons évité d'utiliser des catalyseurs plus réactifs, ou d'appliquer de conditions d'hydrogénation plus drastiques (augmentation de la pression ou de la température).

Formation de tétrahydrofuranes tétrasubstitués à partir de 1,4-diols :

Lors de la déshydratation du diol **Q1** nous avons obtenu non seulement le mélange de diènes attendu, mais également un produit secondaire issu d'une cyclisation intramoléculaire. Le cation tertiaire, formé lors de la perte d'une fonction alcool du diol, est attaqué par un doublet de la fonction hydroxy voisine (groupement γ -hydroxy) et forme une liaison éther interne, donnant lieu à un tétrahydrofurane tétrasubstitué (schéma IV.7.).



schéma IV.7.: Cyclisation des 1,4-diols pour former un tétrahydrofurane

Nous avons fait différents essais pour favoriser, ou bien l'un, ou bien l'autre des produits de déshydratation, changeant la température de la réaction ou le type du catalyseuracide. Les proportions des produits formés ont toujours été sensiblement les mêmes lors des différentes conditions de réaction. Le chauffage du diène en présence d'eau acidifiée n'a pu ni régénérer le diol de départ, ni conduire à la formation du tétrahydrofurane. De façon similiaire, le THF-tétrasubstitué n'a pas pu être déshydraté pour fournir un diène.

Une recherche bibliographique par le serveur "Beilstein" nous a montré que le squelette du tétrahydrofurane, tétrasubstitué dans les position 2,2,5,5, n'a été décrit qu'une seule fois dans la littérature scientifique. Précisément, il s'agit d'une étude sur la formation du composé 6-oxa-dispiro[4.1.4.2]tridécane à partir du 1,1'-éthylènedicyclopentanol.⁸⁰ Les proportion des produits ont été en faveur du composé tétrahydrofurane, la déshydratation du 1,1'-éthylènedicyclopentanol ne formant que 30 % de diènes dans ce cas précis.



schéma IV.8. (littérature) : Cyclisation d'un 1,4-diol pour former un tétrahydrofurane-spiro

Dans cet article les auteurs ont décrit, que malgré l'utilisation de conditions très variées, la déshydratation donnait toujours les deux familles de produits dans des proportions conservées. La compétition entre la réaction de cyclisation intramoléculaire et la formation des diènes dépend alors uniquement de la géométrie du diol d'origine, et non des conditions de déshydratation. Nous n'avons donc pas essayé d'optimiser davantage les réactions de la formation des diènes Q2.

| Microorganisme | E. coli | Salmonella | Pseudomonas | Micrococcus | Staphylococcus | Neurospora | Aspergillus |
|-----------------|--|-------------|-------------|-------------|----------------|------------------------|-------------|
| | D 363 | typhimurium | aeruginosa | luteus | aureus | crassa | fumigatus |
| | | | | | | | |
| groupe : | Gram (-) | | | Gram (+) | | champignon filamenteux | |
| | | | | | | | |
| composé testé : | Concentrations minimales inhibitrices : MICs, exprimées en (µg / ml) | | | | | | |
| \downarrow | et en [μM] ; minima en gras ; incertitude : +/- 25 % | | | | | | |
| diamine | 1,0 | 1,5 | 1,5 | 1,0 | 1,5 | 3 | >50 |
| 18-2N-sat | [2,8] | [4,2] | [4,2] | [2,8] | [4,2] | [8,4] | [>140] |
| (PM=357,44) | | | | | | | |
| triamine | 0,7 | 1,5 | 1,5 | 0,7 | 1,0 | 2,5 | 50 |
| Tri-8 | [1,4] | [3,0] | [3,0] | [1,4] | [2,0] | [4,9] | [99] |
| (PM=507,11) | . / 1 | . /] | | . /] | | | |
| tétraamine | 0,8 | 0,8 | 1,5 | 0,4 | 0,8 | 6 | 25 |
| Tét-7 | [1.2] | [1,2] | [2,3] | [0,6] | [1,2] | [9,1] | [38] |
| (PM=656,77) | . / . | | | . / . | | | |
| hexaamine | 1,5 | 1,5 | 3 | 1,5 | 1,5 | 12 | 50 |
| Hex-6 | [1.6] | [1.6] | [3,1] | [1,6] | [1.6] | [12,6] | [52] |
| (PM=956,09) | L / J | L / J | | L / J | | L / J | |
| hexaamine | 1,5 | 1,5 | 50 | 1,5 | 6 | 6 | >100 |
| Hex-4 | [1,9] | [1,9] | [63,5] | [1,9] | [7,6] | [7,6] | [>127] |
| (PM=787,77) | - / - | . / 3 | | - / - | | | |

4.1.4. Activités antimicrobiennes des polyamines de deuxième génération :

tableau IV.1. : Activités antimicrobiennes des polyamines de deuxième génération

Toutes les polyamines de deuxième génération ont montré des propriétés antimicrobiennes prononcées dans nos tests biologiques. La ramification au niveau du squelette hydrocarboné est compatible avec l'expression des activités biologiques. Le spectre d'activité des polyamines est large ; elles sont aussi toxiques pour les bactéries à Gram(-) que pour les bactéries à Gram(+). Toutefois elles n'inhibent la croissance de champignons filamenteux qu'à des concentrations élevées, et certaines s'avèrent même inactives (**Hex-4** sur *A. fumigatus*) dans les tests antifongiques.

La tétraamine **Tét-7** a été la polyamine ramifiée la plus puissante sur toutes les bactéries testées, ce qui s'est exprimé aussi bien au niveau de son activité massique qu'au niveau de son activité molaire. Elle a été 2 à 4 fois plus efficace que la diamine la plus puissante. La structure de cette tétraamine est donc optimisée par rapport à celle des autres analogues de l'harmonine. Cette molécule a été considérée comme ''chef de file'' ou ''lead structure'', termes fréquemment utilisés en chimie médicinale.

Le niveau d'activité de la triamine **Tri-8** a été intermédiaire entre celui des diamines et celui de la tétraamine. Une augmentation du nombre des groupes amines au-delà de 4 diminue l'activité des polyamines envers les bactéries, comme c'est le cas pour la hexaamine **Hex-6**. La hexaamine **Hex-4** est plus polaire que son homologue **Hex-6** de par le raccourcissement de sa partie hydrophobe centrale. Ses activités envers *P. aeruginosa* sont diminuées, mais elle garde des activités fortes contre des bactéries tels que *E. coli* ou *S. typhimurium*.

4.1.5. Solubilité des polyamines de deuxième génération :

La solubilité des polyamines **Tri-8**, **Tét-7**, **Hex-6** et **Hex-4** dans l'eau est fortement augmentée par rapport à celle des α, ω -diamines saturées.

Lors des tests antimicrobiens nous avons cependant constaté que ces polyamines, à haute concentration, tendent à précipiter en présence de peptides anioniques (trypton, mélange de peptides obtenus par digestion enzymatique de la caséine), qui composent les milieux de culture des bactéries. Des ions phosphates, constituant le tampon PBS 1x, ont également précipité ces mêmes amines (PBS :''Phosphate Buffered Saline'').

4.2. Polyamines de troisième génération, basées sur un tétrahydrofurane tétrasubstitué :

4.2.1. Objectifs de la synthèse des tétraamines, basées sur un tétrahydrofurane tétrasubstitué :

Dans ce chapitre nous allons décrire comment nous avons réussi à synthétiser des tétraamines partiellement rigidifiées par un cycle tétrahydrofurane tétrasubstitué. Nous avons tiré profit de la cyclisation inattendue de 1,4-diols tertiaires, décrite au chapitre 4.1.3., qui donne lieu à la formation d'une liaison intramoléculaire.

L'incorporation de l'hétérocycle-tétrahydrofurane au centre des tétraamines va bloquer le degré de rotation de 3 liaisons consécutives et conduire à la rigidification de la partie centrale de ces composés. La présence d'un atome d'oxygène au sein de ces molécules atténuerait le caractère hydrophobe de leur squelette de base, les doublets de l'oxygène s'engageant dans une liaison hydrogène avec l'eau du milieu environnant. L'augmentation partielle de la polarité de la partie centrale des tétraamines devrait avoir des influences au niveau de leur interaction avec les membranes biologiques. Nous avons également espéré que la solubilité de ces polyamines se trouverait augmentée, ce qui empêcherait leur précipitation en présence d'anions oxygénés (phosphates). Le schéma IV.9. résume la conception de ces polyamines oxygénées à partir de leurs analogues à squelette hydrocarboné.



schéma IV.9.: L'introduction d'un atome d'oxygène dans les tétraamines devrait conduire à leur rigidification partielle

La préparation de différents analogues, comportant des chaînes latérales de taille variable, nous a permis d'évaluer l'influence de l'hydrophobie globale de ces molécules sur leurs propriétés biologiques. Le raccourcissement des chaînes latérales réduit aussi les degrés de flexibilité des tétraamines, le cycle tétrahydrofurane imposant d'autant plus sa propre géométrie à l'ensemble de la molécule.

Le schéma suivant montre comment la substitution formelle de deux atomes d'hydrogène par un seul atome d'oxygène conduit à la conception d'une tétraamine comportant un noyau THF central à partir de la tétraamine **Tét-7**. Cette nouvelle tétraamine a été appelée **THF-7**, le chiffre 7 indiquant le nombre de carbones présents dans chacune de ses chaînes latérales (schéma IV.10.).



schéma IV.10. Passage formel de la tétraamine Tét-7 vers la molécule THF-7

4.2.2. Objectifs de la synthèse de la tétraamines THF-cyclo, comportant des cyclohexanes dans ses chaînes latérales :

Afin de pouvoir regrouper les objectifs très variés de la synthèse de toutes les polyamines de troisième génération, il est à nouveau utile d'anticiper sur les résultats biologiques. Ceci nous permettra de mieux justifier pourquoi nous nous sommes engagés dans une voie précise de la diversification de ces polyamines-analogues. La tétraamine THF-7 est en effet dotée de propriétés antimicrobienne du même niveau que celles la molécule Tét-7. Les autres molécules, basées sur un tétrahydrofurane tétrasubstitué et pourvues de chaînes latérales raccourcies, ont eu des activités antibactériennes réduites (THF-6), voire même absentes (THF-4). Les propriétés biologiques améliorées de la molécule THF-7 l'ont promue au rang de chef de file, comme nous allons le détailler dans le chapitre spécifique consacré aux activités biologiques.

La tétraamine **THF-7** est partiellement rigidifiée par sa liaison éther intramoléculaire. Or elle garde une haute flexibilité au niveau de ses bras latéraux, qui sont d'une longueur relativement importante. Nous avons voulu prouver qu'une rigidification des chaînes latérales permet de conserver l'activité antibactérienne, ce qui contribuerait à comprendre la géométrie de la conformation active des tétraamines **THF-7** et **Tét-7**.

Lors de la conception "sur papier" d'un analogue rigidifié, un cyclohexane de configuration *trans* allait fixer une conformation précise des chaînes latérales de la tétraamines **THF-7**. Ce cyclohexane serait idéalement substitué en ses positions 1 et 4. En général, la substitution en *trans* d'un tel cyclohexane favorise une seule conformation, à savoir celle où les deux substituants reposent en position équatoriale (la conformation axiale-axiale étant stériquement défavorable). Ce nouvel analogue a été appelé **THF-cyclo**.

Le plan de symétrie du cyclohexane assure que la tétraamine **THF-cyclo** ne portera pas de centre chiral sur ses chaînes latérales.

Le groupement 4-aminométhyl-*trans*-cyclohexyl-éthyle du **THF-cyclo** a pratiquement la même taille en longueur que le groupement 7-amino-*n*-heptyle du **THF-7** sous sa forme étendue, comme nous l'avons illustré dans le schéma IV.11..



schéma IV.11.: L'introduction de cyclohexanes dans les bras latéraux des diamines devrait apporter une rigidification supplémentaire

Nous tenons encore une fois à souligner l'importance d'une rigidification du squelette de molécules biologiquement actives. Les objectifs d'une chimie médicinale appliquée aux substances naturelles consiste non seulement à accroître l'activité biologique recherchée, mais également à augmenter la ''spécificité'' d'action des molécules actives. L'augmentation de la sélectivité de ces molécules ne peut être atteinte que par la diminution du nombre de conformères distincts, dont chacun risque à son tour de donner des interactions biologiques non désirées. Ces interactions inattendues risquent en effet de conduire à des effets secondaire lors d'une future utilisation de ces substances actives à des fins thérapeutiques. Dans le cas idéal, la géométrie d'une molécule serait fixe, la molécule n'existant que dans la conformation biologiquement active.

4.2.3. Synthèse chimique des tétraamines basées sur un tétrahydrofurane tétrasubstitué :

Les synthèses chimiques des tétraamines **THF-7**, **THF-6**, **THF-4** et **THF-cyclo** se sont faites suivant le même plan de synthèse que celui de la tétraamine **Tét-7**. Les diverses réactions de conversion de fonctionnalités chimiques se sont faites avec de bons rendements, comme nous l'avons indiqué dans le schéma IV.12..

L'étape de la cyclisation des 1,4-diols en tétrahydrofuranes tétrasubstitués, malgré nos efforts, n'a pas pu être rendue plus efficace, et elle se déroule toujours avec un rendement proche de 33 % ; la formation de diènes a toujours été la réaction dominante de cette réaction de déshydratation. La formation des 1,4-diols par le couplage d'organomagnésiens (ω -fonctionnalisés) sur le diéthylsuccinate a été l'étape la plus critique de ce plan de synthèse. L'homodimérisation des réactifs de Grignard est la réaction compétitive principale de ce couplage (nous allons revenir en détail sur cette réaction).

La purification des tétraamines **THF-7** et **THF-cyclo** a été réalisée par précipitation de leurs chlorhydrates. Les chlorhydrates ont été formés par l'action de gaz chlorhydrique sur une solution diluée de ces polyamines dans le diéthyléther. Les tétraamines **THF-4** et **THF-6** ont formé un précipité trop fin (et même gélatineux) pour être récupéré directement par filtration. Cependant, après ''maturation'' de la solution éthérée pendant 24 heures, le chlorhydrate solide a pu être récupéré sans problème par filtration sur papier filtre.



a) BrMg(chaîne)OBn, (ou bien BrMgCH₂CH₂(cHex)CH₂OBn), Et₂O, THF; b) pTsOH, toluène, reflux; c) H₂, Pd/C, acétate d'éthyle; d) 1) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂; 2) NaN₃, DMF, 60°C; e) 1) PPh₃, THF, H₂O; 2) HCl (gaz), diéthyléther

(* : le rendement de cette réaction de couplage a été très faible à cause de problèmes au niveau de la formation du réactif de Grignard)

(** : les flèches indiquent l'orientation des chaînes fonctionnalisées : les flèches pointent vers le centre des molécules ; les cyclohexanes sont reliés par un éthyle au THF central de la molécule finale)

schéma IV.12.: Synthèse des tétraamines THF-4, THF-6, THF-7 et THF-cyclo

4.2.4. Préparation des chaînes latérales linéaires :

Les "chaînes latérales" des tétraamines THF (ainsi que des autres polyamines synthétisées au cours de ce travail) ont été construites à partir d' α, ω -diols. Ces diols ont dû être "hétéro-fonctionnalisés". Une telle "hétéro-fonctionnalisation" peut consister en une monofonctionnalisation des diols, qui transforme sélectivement une des deux fonctions alcools. La nouvelle fonction chimique créée servira ainsi au couplage carbone-carbone, la fonction alcool conservée servira de précurseur à la fonction amine. Une telle transformation a été réalisée efficacement par la réaction de monobromation des diols. Cette réaction, qui a été réalisée avec de l'acide bromhydrique dans le système biphasique toluène-acide bromhydrique aqueux (48 %) chauffé à reflux, ne donne que très peu de produit de dibromation.⁸¹ La sélectivité de cette monobromation s'expliquerait par des différences d'affinité du diol et du bromoalcool pour les différentes phases du milieu réactionnel hétérogène. Le diol, étant soluble dans la phase aqueuse acide, subit une première bromation. Le bromoalcool ainsi formé n'est pas soluble dans la phase acide, et il diffuse dans la phase organique (toluène) où il reste relativement protégé contre une deuxième bromation, parce que la solubilité de cet acide bromhydrique est très faible dans le toluène. Ces considérations peuvent expliquer les bons rendements des réactions de monobromation des α,ω -diols.

S.-K. Kang *et al.* avaient préconisé l'utilisation d'un piège à eau de type Dean-Stark lors de ces réactions de bromation.⁸² Or d'après notre expérience, ce montage n'était pas favorable. Toute réaction de bromation s'est arrêtée dès que l'ensemble de la phase aqueuse a été piégée dans le système de capture d'eau. Il n'y avait pas enrichissement de l'acide bromhydrique dans la phase organique. En conséquence, des rajouts successifs de petites quantités d'acide bromhydrique ont été nécessaires lors de l'utilisation d'un tel montage.

Finalement, nous avons préféré remplacer le montage de type ''Dean-Stark'' par un montage simple de chauffage à reflux (ballon surmonté d'un réfrigérant) pour réaliser ces monobromations. Nous avons évalué l'influence de différents solvants organiques (n-heptane, cyclohexane, toluène), de la température et de la quantité d'acide bromhydrique sur la sélectivité de ces réactions. Le toluène s'est avéré être le solvant le plus approprié pour ce type de réactions biphasiques. Nous avons optimisé les conditions expérimentales pour l'octanediol, et nous avons gardé les mêmes paramètres lors de la monobromation des autres diols. Suivant les conditions optimisées, 30 mmoles de chaque diol ont été chauffés à reflux dans 100 ml de toluène pendant 7 heures en présence de 7 ml de l'acide bromhydrique (48 % aqueux, 60 mmoles). Les rendements des réactions de monobromation, réalisées suivant ces conditions expérimentales, sont résumés dans le tableau suivant.

| diol | bromoalcool | rendement de la réaction | |
|--|--|--------------------------|--|
| | | de monobromation | |
| HO-(CH ₂) ₅ -OH | HO-(CH ₂) ₅ -Br | (56 %) | |
| | | (volatil à 15 mmHg) | |
| HO-(CH ₂) ₆ -OH | HO-(CH ₂) ₆ -Br | 86 % | |
| HO-(CH ₂) ₇ -OH | HO-(CH ₂) ₇ -Br | 75 % | |
| HO-(CH ₂) ₈ -OH | HO-(CH ₂) ₈ -Br | 90 % | |
| HO-(CH ₂) ₉ -OH | HO-(CH ₂) ₉ -Br | 87 % | |
| НОСОН | HO | 63 % | |

tableau IV.2. : Rendements des réactions de monobromation des α, ω -diols

Le rendement exceptionnellement faible de la monobromation du 1,5-pentanediol s'explique par la volatilité du 5-bromopentan-1-ol (qui s'évapore sous un vide de 15 mm Hg à 30°C) et non par un manque de réactivité du 1,5-pentanediol (contrôle par CCM).

Par contre, le rendement faible de la monobromation du *bis*-(hydroxyméthyl)cyclohexane pourrait s'expliquer par la déshydratation concurrentielle des fonctions alcools, donnant des alcènes trisubstitués (produit secondaire visible en CCM).

Avant de pouvoir réaliser des réactions de couplage carbone-carbone avec ces bromoalcools, nous avons dû protéger leurs fonctions alcools. Nous avons choisi le groupement benzyle comme groupement protecteur, car il est stable à des valeurs de pH extrêmes et peut être déprotégé facilement par hydrogénation catalytique. La benzylation a été réalisée par le bromure de benzyle dans les conditions classiques.⁸³ L'alcoolate est formé en présence d'hydrure de sodium (suspension à 60% de NaH dans de l'huile minérale ; 2,5 mol-équivalents) dans le tétrahydrofurane, à température ambiante, pendant 1 heure. Cet alcoolate a été traité pendant 18 heures avec du bromure de benzyle (1,5 mol-équivalents). Les rendements des benzylations des différents alcools sont résumés dans le tableau suivant.

| bromoalcool | α -benzoxy- ω -bromoalcane | rendement de la réaction | |
|--|--|------------------------------|--|
| | | de benzylation | |
| HO-(CH ₂) ₅ -Br | BnO-(CH ₂) ₅ -Br | <10% | |
| | | cyclisation intramoléculaire | |
| | | → tétrahydropyrane (?) | |
| HO-(CH ₂) ₆ -Br | BnO-(CH ₂) ₆ -Br | 56 % | |
| | ((CH ₂) ₄ OBn) | (30%) | |
| HO-(CH ₂) ₇ -Br | BnO-(CH ₂) ₇ -Br | 85 % | |
| HO-(CH ₂) ₈ -Br | BnO-(CH ₂) ₈ -Br | 88 % | |
| HO-(CH ₂) ₉ -Br | BnO-(CH ₂) ₉ -Br | 87 % | |
| HO | BnO | 91 % | |

tableau IV.3. : Rendements des réactions de benzylation de bromoalcools

Lors de la benzylation du 6-bromohexanol nous avons isolé un produit secondaire, formé en grande quantité. Il s'agit du 6-benzoxyhex-1-ène, formé par l'élimination de HBr à partir du 1-benzoxy-6-bromohexane par l'hydrure de sodium. Cet alcène a pu être isolé et caractérisé par RMN. Cette réaction secondaire est plus importante pour les bromoalcool avec une chaîne de 6 carbones qu'avec ceux ayant des chaînes plus longues.

La benzylation du 5-bromopentan-1-ol donnait des rendements si faibles, qu'une autre voie de synthèse a dû être envisagée. Nous supposons que l'alcoolate formé au cours de cette réaction de benzylation a cyclisé, donnant lieu à une liaison éther et résultant dans la formation de tétrahydropyrane volatil (et non récupéré). Cette réaction de formation d'éther interne devrait être plus importante encore pour la chaîne à 4 carbones (formation du tétrahydrofurane).

Une autre approche chimique pour former ces α -benzoxy- ω -bromoalcanes serait de commencer par une monobenzylation des diols, suivie de la bromation de la fonction alcool restante. Des diols monobenzylés de petite taille sont commercialisés. Il restait à trouver une méthode de bromation douce. En effet, la bromation avec de l'acide bromhydrique dans le toluène à 110°C risquerait de déprotéger le groupement benzoxy par la formation du bromure de benzyle (intermédiaire : cation benzylique, qui sera piégé par l'anion bromure).

Une méthode douce de bromation d'alcools, qui utilise du tétrabromomethane (CBr₄) en présence de trioctylphosphine, a été décrite par J. Hooz et S. S. H. Gilani en 1968.^{84,85} A. P. Bruins et N. M. M. Nibbering ont utilisé la même méthode, substituant la trioctylphosphine par de la triphénylphosphine, pour synthétiser du 1-benzoxy-4-bromobutane à partir de l'alcool correspondant.⁸⁶⁻⁸⁷



Le mécanisme de cette bromation est le suivant :

schéma IV.13. : Mécanisme de la réaction de la bromation d'alcools primaires par le CBr₄ en présence de triphényphosphine comme réducteur

Nous avons utilisé cette même méthode pour synthétiser le 1-benzoxy-4-bromobutane ainsi que le 1-benzoxy-5-bromopentane. D'après la littérature scientifique, la réaction sur le 4-benzoxybutan-1-ol devrait se faire avec un rendements de 68 %.⁸⁶ Le 4-benzoxybutan-1-ol (6 mmoles) a été chauffé en présence de 1,3 équivalents de CBr₄ et de 1,3 équivalents de PPh₃ (8 mmoles) dans 10 ml de THF à reflux, et le produit bromé a pu être isolé avec un rendement de 71 %. La même expérience réalisée sur des quantités doubles de substrat et des réactifs dans 50 ml de THF donnait même un rendement de 89 %. D'après notre expérience cette réaction semble cependant être peu reproductible, et nous supposons que son efficacité dépend de micro-polluants présents dans les réactifs. Ainsi la bromation du 5-benzoxypentan-1-ol ne donnait qu'un rendement de 31 % avec des réactifs d'un autre fournisseur. Ayant consommé les anciens réactifs, nous n'avons pas pu vérifier si cette baisse du rendement a en effet été due au changement des réactifs, ou alors qu'elle dépendrait étroitement de la nature du substrat.

Nous avons également été confrontés à des problèmes de purification des produits bromés. Une première filtration sur silice a été nécessaire pour enlever la majeure partie des sels de phosphonium ainsi que de l'oxyde de triphénylphosphine (éluant : 20 % éther dans l'hexane). Les produits de bromation ont des temps de migration proches du tétrabromométhane (utilisé en excès) ainsi que du bromoforme (formé au cours de cette bromation), et la purification par chromatographie sur silice (éluant : 2,5 % éther dans l'hexane) s'est avérée être difficile.

4.2.5. Préparation des chaînes latérales du THF-cyclo :

Cette tétraamine **THF-cyclo** a des chaînes latérales rigidifiées par un cyclohexane. Un précurseurs potentiel de ces chaînes a été le *trans*-1,4-bis-(hydroxyméthyl-)cyclohexane. La monobromation a été réalisée comme nous l'avons indiqué pour les chaînes linéaires (tableau IV.2.). Le bromoalcool a été protégé par benzylation suivant des conditions classiques (tableau IV.3.). Nous avons voulu obtenir des chaînes rigidifiées d'une taille équivalente à la longueur d'une chaîne linéaire de 7 carbones. Nous avons donc envisagé de transformer le *trans*-1-benzoxyméthyl-4-bromométhyl-cyclohexane par des réactions d'homologation, et de rallonger ainsi d'un carbone la chaîne de ce bromobenzoxyalkane rigidifié. Différentes stratégies ont été envisageables, dont nous voulons en citer une voie directe (V-1 \rightarrow V-2, méthode I) et deux autres voies passant par un alcool intermédiaire (V-1 \rightarrow V-3 \rightarrow V-2, méthode II et III).



schéma IV.14. : Schéma de rétrosynthèse pour la formation de l'intermédiaire V-2

La première méthode utilise le thioanisole (PhSCH₃) comme source d'atome de carbone. Le thioanisole est déprotoné par du butyl-lithium ; ceci résulte dans la formation d'un carbanion PhSCH₂⁻. Ce dernier réagit sur le bromure d'alkyle par substitution nucléophile (SN2) (schéma IV.15, méthode 1). Le thioéther est de suite activé par une S-méthylation à l'aide de l'iodure de méthyle. Ceci résulte dans la formation d'un groupement sulfonium, qui constitue un bon groupement de départ lors d'une réaction de substitution nucléophile sur le carbone porteur de sulfonium. Le chauffage du sulfonium en présence d'un excès d'ions bromure donne lieu à l'halogénure homologué.⁸⁸

La deuxième méthode d'homologation d'un halogénure d'alkyle serait le passage par un nitrile, formé potentiellement lors d'une réaction d'ions cyanures sur cet halogénure d'alkyle. L'hydrolyse de ce nitrile donnerait un acide carboxylique, qui devrait être réduit en alcool **V-3**. Cet alcool serait finalement transformé en halogénure d'alkyle homologué. C'est une méthode classique pour introduire un carbone marqué (¹³C ou ¹⁴C) à l'intérieur d'une molécule.⁸⁸

Nous avons choisi de nous servir d'une troisième méthode, consistant dans la formation d'un organomagnésien à partir de l'halogénure d'alkyle **V-1**. Cet organomagnésien devrait réagir sur du paraformaldéhyde pour donner un alcool primaire, dont le squelette hydrocarboné serait augmenté d'un carbone par rapport au halogénure de départ.⁸⁹ L'alcool primaire serait finalement converti en halogénure homologué. Ces trois méthodes sont résumées dans le schéma IV.15. :



schéma IV.15. : Différentes méthodes applicables à la formation de l'intermédiaire V-2

Cependant la formation de l'alcool **V-3** à partir du bromure **V-1** a été assez délicate.⁹⁰⁻⁹² Lors d'un premier couplage sur le paraformaldéhyde nous n'avons pu isoler l'alcool souhaité qu'avec un rendement de 23 %. L'analyse détaillée des produits secondaires a révélé la formation inattendue du cétal **V-4** (20 % ; schéma IV.16.), qui résulte probablement de la réaction de l'alcoolate avec le paraformaldéhyde en excès (2 équivalents). Ce cétal **V-4** a pu être converti en alcool par méthanolyse dans le méthanol, en présence d'acide chlorhydrique en quantités catalytiques, avec un rendement de 96 %. Malgré cette récupération d'une partie de l'alcool **V-3** par méthanolyse le rendement global du couplage n'a été que de 43 %. Nous pouvons expliquer en partie ce faible rendement par l'observation d'une homodimérisation du

réactif de Grignard, réaction secondaire formant le dimère **V-5** avec un rendement de 24 % (schéma IV.16. ; dimère caractérisé par RMN)



schéma IV.16. : Formation de l'intermédiaire V-3

Nous avons essayé de refaire la même réaction d'addition en remplaçant le paraformaldéhyde par du formaldéhyde gazeux.^{93,83} Le CH₂O-gaz a été obtenu par dépolymérisation thermique du paraformaldéhyde. Le rendement de cette réaction d'addition a été sensiblement le même qu'avec le paraformaldéhyde solide (44 %), donnant également lieu à la dimérisation du réactif de Grignard. Cette fois-ci nous avons pris soin de bien hydrolyser les produits de couplage avant de purifier l'alcool **V-2**.

L'utilisation fastidieuse de formaldéhyde gazeux ⁹³ n'a pas apporté d'amélioration par rapport à l'utilisation aisée d'une suspension de paraformaldéhyde dans le THF.

Nous supposons qu'il serait possible de diminuer la réaction de l'homocouplage par un abaissement de la température du milieu réactionnel pendant le couplage. Une dilution préalable de l'organomagnésien, avant même de le laisser réagir sur l'aldéhyde, pourrait également diminuer ces réactions secondaires. Notons cependant que le réactif de Grignard a dû être préparé à une concentration élevée (1 M dans l'éther ; faible réactivité de ces halogénures envers le magnésium), ce qui a déjà pu entamer l'homocouplage à cette étape préliminaire. Nous estimons cependant qu'il serait relativement facile d'optimiser cette réaction de couplage du réactif de Grignard sur le paraformaldéhyde en ajustant les quelques paramètres physicochimiques.

L'alcool **V-3** a été transformé pour donner le bromure d'alkyle **V-2**, qui est l'homologue de **V-1** rallongé d'un carbone. Nous avons opté pour une bromation à l'aide d'une activation par la mésylation de la fonction alcool.^{92,94} Le mésylate **V-6** a été converti en bromoalkane par réaction avec du bromure de sodium dans le diméthylformamide (DMF) à 60°C pendant 18 heures (schéma IV.17.). Le rendement de cette réaction a été élevé, et contrairement à la bromation à l'aide du couple triphénylphosphine-tétrabromométhane, la purification du produit de bromation a été facilitée par l'absence de produits secondaires apolaires.



schéma IV.17. : Schéma de synthèse de l'intermédiaire V-2

| Microorganisme | E. coli D 363 | Salmonella typhimurium | Pseudomonas aeruginosa | Micrococcus luteus | Staphylococcus aureus | Neurospora crassa | Aspergillus fumigatus |
|--|--|---------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|
| groupe : | Gram (-) | | Gram (+) | | champignon filamenteux | | |
| composé testé : ↓ | Concentrations minimales inhibitrices : MICs, exprimées en (μ g / ml) et en [μ M] ; minima en gras ; incertitude : +/- 25 % | | | | | | |
| tétraamine Tét-7 (PM=656,77) | 0,8 [1,2] | 0,8 [1,2] | 1,5 [2,3] | 0,4 [0,6] | 0,8 [1,2] | 6 [9,1] | 25 [38] |
| tétraamine THF-7 (PM=670,75) | 0,8 [1,2] | 0,8 [1,2] | 6 [8,9] | 0,4 [0,6] | 0,8 [1,2] | 1,5 [2,2] | 25 [37] |
| tétraamine THF-6 (PM=614,64) | 0,8 [1,3] | 3 [4,9] | 50 [81] | 1,5 [2,4] | 3 [4,9] | 12 [19] | 50 [81] |
| tétraamine THF-4 (PM=502,43) | >100 [>199] | | | >100 [>199] | >100 [>199] | >100 [>199] | |
| tétraamine THF-cyclo (PM=774,90) | 0,8 [1,0] | 0,8 [1,0] | 3 [3,9] | 0,8 [1,0] | 0,8 [1,0] | 3 [3,9] | 25 [32] |

4.2.6. Activités antimicrobiennes des tétraamines centrées sur un THF tétrasubstitué :

tableau IV.4.: Activités antimicrobiennes des tétraamines centrées sur un THF tétrasubstitué

La tétraamine **THF-7** présente le même niveau d'activité que l'analogue **Tét-7**. Dans la série des molécules basées sur le tétrahydrofurane tétrasubstitué, nous constatons que les propriétés antimicrobiennes dépendent fortement de la longueur des chaînes latérales. La tétraamine **THF-6**, qui présente 6 atomes de carbone dans chacun de ses bras latéraux (contre 7 carbones pour la molécule **THF-7**), a un spectre d'activité antimicrobien restreint, certaines souches étant relativement résistantes envers cette molécule (*P. aeruginosa, A. fumigatus*). L'homologue **THF-4** n'est pas doté d'activités antimicrobiennes. La tétraamine **THF-cyclo**, qui a la même taille que l'analogue ''linéaire'' **THF-7**, et dont les chaînes latérales sont rigidifiées par un cyclohexane, garde des propriétés antimicrobiennes similaires à celles du **THF-7**. En comparaison avec les propriétés biologiques du **THF-7**, les activités antimicrobiennes du **THF-cyclo** sont légèrement augmentées envers *P. aeruginosa* et légèrement diminuées envers *M. luteus* et *N. crassa*. La rigidification des chaînes latérales par

ces cyclohexanes de substitution *trans*, et l'encombrement stérique qui s'en suit sont donc compatibles avec l'activité biologique.

Nous allons voir plus loin dans le chapitre V que ces modifications structurales (rigification, introduction d'un atome d'oxygène) ont permis d'obtenir des substances plus sélectives (cytotoxicité réduite).

V. Evaluation de la toxicité des polyamines synthétisées

5. Evaluation de la toxicité des polyamines synthétisées :

Dans ce chapitre nous allons présenter les divers résultats des tests de toxicité des polyamines synthétisées. Ces molécules antimicrobiennes sont supposées agir par perturbation des membranes des bactéries. Nous avons voulu vérifier si ces molécules présentaient une certaine spécificité envers les bactéries et donc une absence de toxicité pour les cellules de mammifères. Un telle sélectivité serait d'une importance cruciale lors d'une éventuelle utilisation thérapeutique de cette famille de polyamines. Nous avons également voulu évaluer, si des cellules d'insectes en culture présentent de plus fortes résistances envers ce type de molécules amphipathiques et cationiques ; en effet nous rappelons que les polyamines testées ici sont toutes dérivées de la structure d'une substance naturelle d'insecte à savoir l'harmonine.

Nous allons exposer les résultats de l'évaluation de la toxicité *in vitro*. Les tests *in vitro* comprennent des tests d'hémolyse et des tests de survie, réalisées sur des lignées cellulaires HeLa (lignée cancéreuse humaine) et S2 (lignée de cellules de drosophile). Dans ce chapitre nous allons également discuter les résultats de l'évaluation *in vivo* de la toxicité de nos polyamines. Ces tests de toxicité *in vivo* ont été réalisés par la société EntoMed S. A.. Les toxicités des différentes amines ont été évaluées sur des souris mâles SWISS/OF1 par injection intraveineuse de ces produits.

5.1. Evaluation de la perméabilisation membranaire des érythrocytes (globules rouges) de singe (macaque) par les polyamines : test d'hémolyse

Les érythrocytes sont de bons modèles pour mesurer une perturbation (toxicité) membranaire. Leur bicouche lipidique est un reflet du mélange de phospholipides des cellules des divers organes du corps. Ces phospholipides sont essentiellement "zwitterioniques" (phosphatidylcholine, PC), et les membranes de ces globules rouges contiennent le même pourcentage de cholestérol que la majorité des autres cellules. Nous rappelons que le cholestérol joue le rôle d'un renforçateur membranaire, et que la nature "zwitterionique" des phospholipides PC empêche l'interaction électrostatique avec les détergents cationiques.⁴⁹

Le test d'hémolyse des globules rouges mesure la quantité d'hémoglobine libérée par les érythrocytes lysés. Le dosage colorimétrique de l'hémoglobine permet ainsi de connaître le pourcentage d'érythrocytes lysés pour chaque concentration des composés testés. Les concentrations qui donnent une hémolyse de 50 %, notée HE50%, servent à comparer le pouvoir hémolytique des produits testés. Les érythrocytes ont été purifiés à partir de sang frais héparinisé (de singe ; également de bœuf et de lapin dans d'autres essais), et dilués dans du PBS (1x) (Phospate Buffer Saline, 1 fold concentrated) à 1/10 par rapport au volume du sang initial. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 1 h en présence de concentrations différentes des amines à tester. Du sang de singe (macaque) a été mis à notre disposition par le ''Laboratoire d'Immunologie et de Chimie thérapeutique'' situé à l'IBMC de Strasbourg.

Dans les graphes suivants sont donnés le degré de l'hémolyse en fonction des concentrations des produits testés (μ g/ml). L'hémolyse a été mesurée par la DO à 450, qui est proportionnelle à la quantité d'hémoglobine libérée.



schéma V.1. : Mesure de l'hémolyse (DO à 450 nm) en fonction de la concentration des composés testés

Commentaires :

Les tests d'hémolyse ont été réalisés dans des tubes individuels pour chaque concentration de chacun des composés testés. Le graphe indique, en abscisse, de gauche à droite les concentrations des produits testés (μ g/ml) ; nous avons choisi un ordre décroissant des concentrations pour souligner qu'elles correspondent à une cascade de dilutions 2 à 2. Chaque point des graphes représente la moyenne de 4 expériences individuelles, la barre d'erreur indique +/- l'écart-type (d'un échantillon). Le **CPC** (chlorure de cétylpyridinium) a été le standard interne des tests ; il a été choisi parce que c'est un détergent cationique classique sans spécificité d'action. Le **CPC** n'a été testé que 2 fois (contre 4 expériences pour les autres composés).

La valeur HE50% représente la concentration qui donne un taux d'hémolyse de 50 %. Cette valeur a été déduite des graphes représentant l'hémolyse en fonction de la concentration des échantillons testés. Une hémolyse totale a été atteinte avec le **CPC** pour des concentrations de 50 à 800 μ g/ml. Selon la courbe d'hémolyse du **CPC**, une densité optique de 1,0 à 1,1 DO à 450 nm correspond à l'hémolyse totale. Une valeur de 500 mDO de la densité optique signifie ainsi que 50 % des globules rouges sont lysés. (Nous allons revenir en détail sur le mode opératoire de ce test dans la partie expérimentale.)

Le composé **THF-7** n'a pas été hémolytique dans la gamme de concentrations testées. Une concentration élevée de 1600 μ g/ml a seulement pu donner une hémolyse de 50 %.

L'effet hémolytique des polyamines **Tét-7** et **Hex-6** est très progressive, une faible concentration donnant un faible taux d'hémolyse, et des hémolyses partielles ont été observées pour une gamme de concentrations croissantes. Pour les diamines **harmonine**, et le *cis*-1,18-diaminooctadéc-9-ène (**18-2N-cis**), la courbe de réponse est fondamentalement différente. Il n'y a pas d'effet biologique jusqu'à une concentration seuil. Le dépassement de ce seuil de concentration donne rapidement vers l'effet maximal par le franchissement de cette limite, peuvent signifier qu'il y a une certaine coopérativité des molécules lorsqu'elles agissent sur des globules rouges (*in vitro*). Dans le cas des tests d'hémolyse une interaction membranaire de ces polyamines est le mode d'action le plus probable ; en effet, érythrocytes n'ont ni noyau cellulaire ni peuvent répondre par des mécanismes d'apoptose. La variabilité des courbes de réponse biologique des différentes polyamines pourrait signifier que chacune de ces molécules s'organise différemment lors de l'interaction membranaire (formation de micelles et d'autres formes d'agrégats).

Cette page est laissée libre pour plus de lisibilité des graohes suivants
5.2. Evaluation de la cytotoxicité des polyamines sur des cellules cancéreuses humaines HeLa à l'aide du réactif XTT (Sigma) :

Nous avons évalué la toxicité de nos polyamines sur des cellules cancéreuses de la lignée HeLa. Cette lignée de cellules a servi de modèle pour des cellules typiques de mammifères en division. Ces cellules ont été exposées pendant 24 heures à différentes concentrations de nos polyamines. La viabilité des cellules, après ce traitement, a été mesurée à l'aide du test au XTT (Sigma, 2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide), qui est un réactif de type tétrazolium. Ce test permet de doser une activité enzymatique mitochondriale constitutive qui est présente dans toutes les cellules viables. Le réactif XTT est réduit par des réductases mitochondriales pour former un produit jaune-orange, qui est libéré par les cellules. Un dosage colorimétrique à 450 nm a permis de mesurer le pourcentage de cellules viables par comparaison avec une culture témoin. (Nous allons revenir en détail sur ces tests de cytotoxicité dans la partie expérimentale de ce manuscrit.)

Les graphes suivants montrent, en abscisse, les différentes concentrations des produits testés. En ordonnée sont indiquées les valeurs des densités optiques à 450 nm des milieux de culture révélées au XTT. Ces valeurs sont proportionnelles à la survie cellulaire. Chaque point des courbes représente la moyenne de 3 expériences ; les barres d'erreurs indiquent +/- l'écart type des valeurs expérimentales. Une densité optique de 1,4 DO reflète une survie à 100 % ; une densité optique de 0,7 correspond à une concentration léthale entraînant la mort de 50 % des cellules en culture. Cette concentration est notée LC50.

VI.Antécédents : molécules polycationiques



tableau V.2.: Survie cellulaire (HeLa) en fonction de la concentration des composés testés

Les différentes valeurs des LC50 sont reprises dans le tableau V.6., et elles sont discutées sous le point 5.6.

5.3. Evaluation de la cytotoxicité des polyamines sur des cellules de Schneider S2 de drosophile par le XTT :

Nos composés étant dérivés d'une substance naturelle d'insecte, nous avons décidé d'évaluer la toxicité de nos polyamines sur des cellules S2 de drosophile. Cette lignée de cellules a servi de modèle pour des cellules typiques d'insectes. Les cellules S2 ont été exposés pendant 24 heures à nos produits, et leur survie a été mesurée à l'aide du réactif XTT (Sigma). Les graphes suivants montrent la moyenne de trois expériences individuelles de la survie cellulaire en fonction des concentrations des produits testés. La survie cellulaire est mesurée après révélation au XTT (Sigma) par les densités optiques à 450 nm des milieux de culture. Les barres d'erreur indiquent +/- l'écart-type des valeurs expérimentales. Une DO de 1,2 correspond ici à une survie totale. La concentration qui entraîne 50 % de mortalité des cellules correspond alors à une DO de 0,6 ; elle est notée LC50.





5.4. Evaluation de la cytotoxicité des polyamines sur des cellules de Schneider S2 de drosophile à l'aide d'une coloration par le violet de Gentiane :

Deux séries de tests supplémentaires ont été réalisées sur la lignée S2 de drosophile. Cette fois-ci la vitalité des cellules à été mesurée par une coloration au violet de Gentiane (cristal-violet), qui mesure la quantité de cellules adhérentes au fond des puits de culture. Lorsque les cellules meurent, elles s'arrondissent et se décollent de leur support. Un lavage préalable des puits de culture enlève les cellules mortes. Une coloration totale des cellules restantes, et qui sont adhérentes, permet de déduire le taux de mortalité par comparaison avec des cultures témoins. La forte similitude de ces résultats avec ceux obtenus par la révélation à l'XTT valide les résultats des deux tests de cytotoxicité. Les deux tests reposent sur des principes fondamentalement différents; ensemble ils confirment que les résultats biologiques ne sont pas faussés par un paramètre non contrôlé. Nous pouvons conclure à l'absence d'artefacts influençant sur la mesure de la cytotoxicité. Un contrôle au microscope optique nous a permis de distinguer les cellules viables des cellules mortes. Cette observation directe nous a permis de donner une appréciation qualitative, qui reconfirme les résultats biochimiques et chimiques de l'évaluation de la cytotoxicité. Les concentration théoriques, conduisant à 50 % de léthalité, sont déduites de chaque graphe et leurs valeurs sont résumés dans le tableau V.5.. Deux séries de tests ont été réalisées sur des cellules S2, et nous allons montrer par la suite uniquement les graphes les plus significatifs.

5.4.1. Série 1 : cellules S2 ; révélation au violet de Gentiane

Test de viabilité : révélation des cellules viables après une exposition de 24 h aux amines à différentes concentrations ; révélation au violet de Gentiane, qui colorie les cellules adhérentes (viables)

moyenne de trois expériences ; +/- écart-type



tableau V.4. :Survie cellulaire (S2) en fonction de la concentration des composés
testés (test violet de Gentiane, 1^{ère} série)

Remarques sur les graphes :

Dans ces graphes nous constatons que la toxicité de la tétraamine **Tét-7** et de la hexaamine **Hex-6** sont fortes à une concentration de 12 à 25 μ g / ml. Cette toxicité diminue, comme attendu, avec la diminution de la concentration des composés toxiques. Or une perte de toxicité pour **Tét-7** et **Hex-6** est observée à des concentrations plus élevées (100 μ g/ml pour **Hex-6** et 50-100 μ g/ml pour **Tét-7**!). Cette perte apparente de toxicité n'a pas pu être observé avec la révélation à l'XTT. L'augmentation de la DO (après révélation au violet de Gentiane) pour des concentrations élevées a été reproductible. Cette caractéristique de la courbe de la toxicité a été particulièrement prononcée pour la polyamine **Hex-4** (graphe non donné ici), mais absente chez d'autres amines.

Deux explications pourraient être avancées pour expliquer ce phénomène :

- Pour une part, nous pouvons supposer que les cellules ont été tuées si rapidement et qu'elles n'aient pas pu montrer des signes de défense, tels le détachement de leur support ainsi que leur arrondissement. Mêmes mortes, elles restent accrochées au support, et elles peuvent être colorées de cette façon. Leur activité enzymatique mitochondriale a cependant été complètement abolie, ce qui reflète bien l'absence de survie cellulaire.
- Pour l'autre part, nous pouvons avancer l'hypothèse selon laquelle les cellules restent _ effectivement en vie. Ce sont les amines qui devraient devenir non-toxiques à une concentration élevée. Une telle variabilité des propriétés biologiques, concentration polyamines pourrait s'expliquer par dépendante. des une organisation supramoléculaire des molécules amphipathiques. Les polyamines, lorsqu'elles sont sous forme de micelles, seraient inactives sur des membranes. La révélation d'une toxicité par le XTT à de hautes concentrations d'amines contredit cependant une telle hypothèse d'une agrégation supramoléculaire qui donnerait lieu à des complexes inactifs.

La courbe de toxicité de la tétraamines **Tét-7** diffère de celle de **THF-7**. La tétraamine **THF-7** ne manifeste aucune toxicité à une concentration de 25 μ g/ml sur les cellules S2, concentration qui correspond au maximum de toxicité de la polyamine **Tét-7**.

5.4.2. Série 2 : cellules S2 ; révélation au violet de Gentiane

Nous avons refait le même type d'expériences que pour la série S1, afin de tester des composés nouvellement synthétisés, à savoir les tétraamines THF-6 et THF-cyclo. De légères variations de la densité cellulaire de départ et des temps de révélation différents expliquent pourquoi, d'une série d'expériences à l'autre, nous apercevons une différence des valeurs de DO maximales (survie totale).





tableau V.4. :Survie cellulaire (S2) en fonction de la concentration des composés
testés (test au violet de Gentiane, 2^e série)

Remarques sur les graphes :

La diminution du nombre de cellules observée pour les concentrations de 0,2 à 1,6 μ g/ml pour **THF-cyclo** est un *artefact*. La croissance des cellules est parfois irrégulière vers les bords des plaques multipuits (''effet de bord''). Un ensemencement irrégulier des plaques peut expliquer la chute du nombre de cellules dans les puits correspondant à la concentration de 0,4 μ g/ml de la tétraamine **Tét-7**.

La tétraamine **THF-6** n'a manifesté aucune toxicité sur les cellules de la lignée S2 de drosophile jusqu'à la concentration maximale testée (100 μ g/ml). La sélectivité de cette tétraamine est très prononcée, parce qu'elle garde des propriétés antibactériennes sans être cytotoxique envers les cellules S2 de drosophile.

5.5. Tableau comparatif des diverses activités cytotoxiques des polyamines synthétisées :

| | hémolyse | cytotoxicité | cytotoxicité | cytotoxicité sur cellules S2 | |
|---------------|--------------|-----------------|-----------------|------------------------------|---------|
| | sur | sur cellules | sur cellules S2 | (drosophile) | |
| | érythrocytes | HeLa | (drosophile) | (2 séries de tests) | |
| | de macaque | test : XTT | test : XTT | test : violet de Gentiana | |
| | (lyse | (activité | (activité | (coloration de cellules | |
| concentration | membranaire) | mitochondriale) | mitochondriale) | viables adhérentes) LC50s | |
| en µg / ml 🏼 | HE50% | LC50 | LC50 | série 1 | série 2 |
| CPC | 30 | | | 4* | |
| | | | | | |
| harmonine | 150 | 2 | 8 | 6* | |
| | | | | | |
| diamine | 75 | 2 | 6 | 12* | |
| 18-2N-cis | | | | | |
| diamine | | 4 | 4 | 8* | |
| 18-2N-sat | | | | | |
| triamine | 175 | 4 | 4 | 8* | |
| Tri-8 | | | | | |
| tétraamine | 300 | 4 | 4 | 6 | 4 |
| Tét-7 | | | | | |
| hexaamine | 300 | 0,8 | 20 | 4 | 8* |
| Hex-6 | | | | | |
| hexaamine | | | | | 14* |
| Hex-4 | | | | | |
| tétraamine | 1600 | 2 | 6 | 50 | 25 |
| THF-7 | | | | | |
| tétraamine | | | | | >100 |
| THF-6 | | | | | |
| tétraamine | | 100 | >100 | >100 | |
| THF-4 | | | | | |
| tétraamine | | | | | 20 |
| THF-cyclo | | | | | |

* données dont les graphes ne sont pas donnés

Tableau V.6. :Résumé des valeurs des LC50 obtenues pour les différents
composés dans les différents tests *in vitro*

5.6. Comparaison des résultats de l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* des polyamines :

Le chlorure de cétylpyridinium (CPC) a été utilisé comme composé de référence dans les tests de cytotoxicité ; il est représentatif pour des composés détergents, cationiques et non spécifiques. Il a également été le témoin positif des tests hémolytiques. En effet, ce composé a montré un fort pouvoir hémolytique. La concentration qui a conduit à un taux de 50 % d'hémolyse, notée HE50%, a été de 30 µg/ml. Sa concentration HE50% est ainsi plus élevée que ses MICs envers les bactéries (MICs : concentrations minimales inhibitrices) et ceci d'un facteur 5 à 30. Les érythrocytes sont donc beaucoup moins sensibles envers les composés cationiques que les bactéries. Avant de pouvoir considérer une molécule antibactérienne comme étant sélective, il est donc important d'élargir le différentiel entre l'activité antibactérienne et les propriétés hémolytiques (le rapport HE50%/MIC devrait ainsi être supérieur à 30, ce qui serait équivalent à un différentiel de une à deux puissances Log).

L'effet hémolytique de l'harmonine est 5 fois moins important que celui du CPC. Or nous rappelons que les activités antibactériennes de l'harmonine ont également été plus faibles que celles du CPC (et ceci d'un facteur 4). La diamine 18-2N-cis est 2 fois plus hémolytique que l'harmonine ; cet accroissement d'activité hémolytique va de pair avec l'augmentation des activités antibactériennes (d'un facteur 2). Il existe donc un lien évident entre l'hémolyse et l'effet antibactérien de ces diamines.

Comme les érythrocytes sont considérés comme étant de bons modèles de cellules de mammifères classiques,⁴⁹ la faible toxicité de l'harmonine et de la diamine **18-2N-cis** envers ces cellules sanguines nous a laissé croire que ces composés pourraient également être peu toxiques envers des lignées de cellules en culture. Contre toute attente, la cytotoxicité de ces diamines envers les cellules HeLa a été très aiguë, la concentration LD50 étant très proche des MICs envers les bactéries qui est de l'ordre de 2 μ g/ml.

Les cellules S2 ont été un peu moins sensibles envers l'harmonine, molécule naturelle d'un insecte. Il y a une différence d'un facteur 4 par rapport au cellules HeLa. Les cellules S2 ont de façon similaire été moins sensibles que les cellules HeLa envers la diamine 18-2N-cis, analogue proche de l'harmonine. Le différentiel a cependant été un peu moins prononcé que pour l'harmonine.

La triamine **Tri-8** et la tétraamine **Tét-7** ont été très cytotoxiques envers les deux types de cellules en culture (LD50 = 4 μ g/ml). Leurs propriétés hémolytiques ont cependant été réduites par rapport à celles des diamines. L'hexaamine **Hex-6**, également peu hémolytique, a perdu en toxicité envers les cellules S2 (la quantification de cette toxicité réduite envers les cellules S2 est sujette à de fortes variabilités d'un test à l'autre ; LD50 = 20 ; 8 ; 4 μ g/ml).

VI.Antécédents : molécules polycationiques

Pour la famille de tétraamines basées sur un THF tétrasubstitué, il y a un véritable différentiel qui se dégage par rapport à leurs propriétés antibactériennes. La molécule **THF-7**, qui a des activités antibactériennes plus fortes que le **CPC**, a des propriétés hémolytiques 50 fois plus faibles que celles du **CPC**. Par rapport à celui-ci, la sélectivité membranaire de la molécule **THF-7** est 100 fois augmentée. La toxicité de cette molécule envers les cellules HeLa reste cependant très importante.

L'analogue **THF-6**, qui a des chaînes latérales raccourcies, a perdu sa toxicité envers les cellules S2. Son spectre d'activités antibactériennes est également assez restreint. Il garde de fortes activités envers les bactéries Gram(-) *E. coli*. Il y a perte de la toxicité envers certaines souches de bactéries comme *P. aeruginosa*.

Le parallélisme entre l'activité antibactérienne et l'activité cytotoxique se maintient également chez la molécule **THF-4**. Cette molécule, n'étant pas dotée de propriétés antibactériennes, ne manifeste pas d'activité cytotoxique envers les cellules S2.

Nous pouvons résumer ces résultats de toxicité par la constatation principale que les cellules en culture sont beaucoup plus sensibles envers nos polyamines que les érythrocytes. Pour les molécules de première et de deuxième génération (harmonine, diamine **18-2N-cis**, **Tri-8**, **Tét-7**, **Hex-6**, **Hex-4**) les propriétés cytotoxiques vont de pair avec les propriétés antibactériennes. Les tétraamines de troisième génération (**THF-7** et **THF-6**) ont perdu les propriétés hémolytiques ; elles présentent également des propriétés cytotoxiques réduites.

Les érythrocytes sont des cellules quiescentes ayant perdu leur noyau cellulaire. Ces cellules contiennent presque exclusivement des protéines responsables du transport de l'oxygène. Les autres types de cellules contenant un noyau d'ADN sont capables de réagir à des stimulus externes par des mécanismes de signalisation intracellulaires. Dans certains cas celles-ci peuvent entrer en apoptose, qui est une ''mort programmée'' des cellules.

Les résultats biologiques soulèvent ainsi une question essentielle : les polyamines agissent-elles préférentiellement sur des cellules en division (cellules cancéreuses) que sur des cellules différenciées (érythrocytes) et au repos ?

Cette page est laissée libre pour plus de lisibilité des graohes suivants

5.7. Evaluation de la toxicité des polyamines synthétisées sur des souris par injection intraveineuse (toxicité *in vivo*) :

| Composé | Dose, (administration par voie | | Effets physiologiques | |
|------------|--------------------------------|------------|--|--|
| | intraveineuse) | | | |
| Harmonine | (souris de 16 g) | 95 mg/kg | mort immédiate | |
| | (2 souris de 14 g) | 33,3 mg/kg | 1 OK ; 1 mort après 15 minutes | |
| | (souris de 14 g) | 27 mg/kg | OK | |
| | (souris de 14 g) | 10 mg/kg | OK | |
| Triamine | (souris de 14 g) | 10 mg/kg | mort immédiate | |
| Tri-8 | (souris de 14 g) | 3,3 mg/kg | convulsions, mort rapide | |
| | (souris de 14 g) | 1,65 mg/kg | convulsions, mort rapide | |
| | (souris de 14 g) | 0,59 mg/kg | convulsions, mort après 1 minute | |
| Hexaamine | (souris de 14 g) | 10 mg/kg | convulsions, mort après 30-60 secondes | |
| Hex-6 | (souris de 14 g) | 3,3 mg/kg | idem | |
| | (souris de 14 g) | 1,3 mg/kg | idem | |
| tétraamine | (souris de 17 g) | 10 mg/kg | mort rapide | |
| THF-7 | (souris de 17 g) | 5 mg/kg | mort immédiate | |
| | (souris de 17 g) | 2 mg/kg | mort après 3 minutes | |
| | (souris de 17 g) | 1 mg/kg | inoffensif, souris évolue normalement pendant | |
| | | | les 2 semaines suivantes ; | |
| | | | prise de poids normale, jours J1-J5 | |
| tétraamine | (mâle de 18 g) | 10 mg/kg | Immédiatement convulsions et mort après 1 | |
| THF-6 | | | minute | |
| | (mâle de 17,6 g) | 3 mg/kg | Immédiatement panique et prostration, | |
| | | | hyperventilation. Après 1 minute réactivité OK, | |
| | | | exploration et comportement OK | |
| | | | prise de poids normale, jours J1-J5 | |
| | (mâle de 19,2 g) | 3 mg/kg | Immédiatement prostration légère et titube en | |
| | | | marchant. prostration plus longue ; tout OK au | |
| | | | bout de 5 minutes ; | |
| | | | prise de poids normale, jours J1-J5 | |
| | (mâle de 18,5 g) | 1 mg/kg | Immédiatement prostration légère, mais bonne | |
| | | | réactivité, déplacements et exploration | |
| | | | normales ; prise de poids normale, jours J1-J5 | |
| | (mâle de 17,7 g) | 1 mg/kg | Immédiatement prostration légère, mais bonne | |
| | | | réactivité, déplacements et exploration normales | |
| | | | prise de poids normale, jours J1-J5 | |

| tétraamine | (mâle de 18 g) | 10 mg/kg | Immédiatement convulsions et mort en moins | |
|-------------|------------------|-------------|--|--|
| THF-cyclo | | | d'1 minute | |
| | (mâle de 18 g) | 3 mg/kg | Immédiatement hyperventilation et panique, | |
| | | | ensuite tremblements légers et prostration. Après | |
| | | | 1 minute le comportement est OK ; | |
| | | | prise de poids normale, jours J1-J5. | |
| | (mâle de 18,3 g) | 3 mg/kg | Immédiatement prostration légère ; réactivité | |
| | | | amoindrie ; tremblements et prostration plus | |
| | | | importante ; OK au bout de 10 minutes ; | |
| | | | prise de poids normale, jours J1-J5. | |
| | (mâle de 17,6 g) | 1 mg/kg | Prostration légère, mais bonne réactivité ; | |
| | | | déplacements normaux ; comportement normal au bout de 5 minutes ; prise de poids normale, jours J1-J5. | |
| | | | | |
| | | | | |
| | (mâle de 18,5 g) | 1 mg/kg | Pas d'effet observé : pas de prostration, bonne | |
| | | | réactivité ; comportement normal ; | |
| | | | prise de poids normale, jours J1-J5. | |
| tahlaan V 7 | • Tovioitó do | a diffárant | a composós synthóticós dons dos tosts <i>in vivo</i> | |

tableau V.7. :Toxicité des différents composés synthétisés dans des tests in vivo
chez les souris

Commentaires :

Les résultats des tests de toxicité in vivo sur souris ne concordent pas avec les résultats in vitro sur des cellules en culture. La toxicité excessivement forte de ces polyamines et la rapidité de leur action indiquent que les amines agissent chez les souris par un mécanisme qui diffère d'une simple cytotoxicité. Une dissection des souris défuntes a monté que l'aspect des organes est normal ; les différents tissus ne montrent pas de signe de nécrose (cytotoxicité), et l'aspect du foie et de la rate semblent normaux (absence d'hémolyse). Après cessation des premiers signes de détresse, les souris traitées avec des doses subléthales ont évolué normalement ; ceci montre également que les polyamines n'induisent pas de lésions au niveau des organes. La prise du poids des souris traitées a été normale (par comparaison avec des souris non traitées) ; ceci montre, entre autres, que les composés injectés n'ont pas induit de lésions au niveau des reins. Toutes ces observations montrent que la toxicité des polyamines n'est pas due à une interaction non-spécifique avec des membranes biologiques, mais que ces polyamines interagissent probablement avec des récepteurs biologiques (récepteurs cholinergiques (?), canaux ioniques (?)), pouvant conduire à une stimulation du système nerveux périphérique. Il est particulièrement important de noter l'augmentation de la toxicité de la triamine **Tri-8** (LD50 < 0,6 mg/kg ; LD50 = dose léthale pour 50% des animaux) par rapport à celle de la diamine "harmonine" (LD50 \approx 30 mg/kg). La molécule THF-cyclo semble être un peu moins toxique in vivo que la tétraamine THF-7, les deux molécules ava cependant le même niveau d'activité antibactérienne. Les souris testés ont supporté le THFcyclo à une dose de 3 mg/kg, mais elles ont été mortes après injection de la molécule THF-7 à une dose de 2 mg/kg.

VI. Antécédents : molécules polycationiques

Dans ce chapitre nous allons montrer que le présent travail peut s'inscrire dans des domaines autres que celui des composés naturels d'insectes. Nous allons regrouper les antécédents en trois sous-chapitres. Le premier sera consacré à des molécules naturelles cationiques à longue chaîne flexible. Le deuxième sous-chapitre sera focalisé sur des molécules cationiques de synthèse à intérêt pharmacologique. Enfin dans le troisième, nous allons exposer des études faites sur des α, ω -diamines ainsi que sur des α, ω -diammoniums saturés, constituant des antériorités directes à nos travaux.

6.1. Molécules cationiques naturelles :

6.1.1. Molécules naturelles dicationiques à longue chaîne flexible :

Dans notre travail de thèse nos avons montré que des α, ω -diamines à longue chaîne hydrocarbonée sont antimicrobiennes. Il serait intéressant de rechercher dans la littérature des substances naturelles ayant des structures similaires à nos α, ω -diamines, répondant ainsi aux mêmes critères de distribution de charges et de l'hydrophobie. Ceci permettrait de savoir si de tels motifs sont récurrents et reflètent réellement d'une importance biologique fondamentale.

Une molécule structurellement très proche de l'harmonine **VI-1** (1,17diaminooctadéc-9-ène) est la 2-(12'-aminotridécyl)-pyrrolidine **VI-2** (isolée de la coccinelle *E. varivestis*). Cet alcaloïde, tout comme l'harmonine, est composé d'une longue chaîne hydrocarbonée flexible, portant des amines aux deux extrémités (une amine étant engagée dans un cycle pyrrolidine dans l'alcaloïde de *E. varivestis*).³³

Un autre composé dicationique **VI-3**, basé sur une chaîne hydrocarbonée flexible, est présent dans le venin des araignées *Plectreurys tristis*. Dans ce composé, les groupes cationiques sont formés par des groupes guanidines.⁹⁵

Des composés dicationiques similaires (**VI-4** et **VI-5**) ont été isolés d'organismes marins, entre autres à partir d'éponges.^{96,97} Dans le schéma VI.1. nous avons juxtaposé ces structures dicationiques ; pour chaque composé nous avons mis en évidence le nombre d'atomes reliant les ammoniums.

Similitude de certains alcaloïdes d'invertébrés



schéma VI.1.: Molécules naturelles dicationiques à longue chaîne flexible

Nous remarquons que toutes ces molécules ressemblent à l'harmonine par la présence de deux têtes cationiques aux deux extrémités d'une longue chaîne. Certaines de ces molécules sont rigidifiées en leur centre d'une part par des doubles liaisons (harmonine) ou encore par le système oxalamide.

6.1.2. Molécules naturelles monocationiques à longue chaîne flexible :

Des molécules monocationiques à longue chaîne hydrocarbonée sont très fréquentes parmi les substances naturelles. Les venins d'hyménoptères illustrent parfaitement cette diversité. Nous tenons ici à rappeler que ces venins peuvent être basés sur des hétérocycles pipéridine (ex. **VI-6**), ou pyrrolidine (ex. **VI-7**).¹⁹



6.1.3. Molécules naturelles polycationiques : la famille des polyamines :

Le terme de polyamine est souvent réservé pour désigner des substances naturelles basées sur le motif de la spermine **VI-8** ou de la spermidine $(H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2)$. Ces tri- et tétraamines linéaires sont des composés ubiquistes, participant au règlement et au contrôle de la division cellulaire ; ces polyamines agiraient par liaison directe à l'ADN ; leur interactions avec des récepteurs protéiques spécifiques sont également envisageables.⁹⁸⁻¹⁰²

Les motifs de ces polyamines sont retrouvés dans des venins d'araignées (ex. **VI-9**) ou de certaines guêpes (ex. **VI-10**).⁹⁵ Ces toxines d'araignée sont responsables du blocage sélectif de canaux ionotrophes conduisant à la paralysie de leurs proies (**VI-9** : inhibiteur de canaux calciques et de récepteurs glutamatergiques du sous-type NMDA ; **VI-10** : antagoniste noncompétitif des récepteur neuronaux et musculaires de l'acétylcholine (nAChR)).⁹⁵



Le motif spermidine fait également partie d'un aminostéroïde du requin de l'espèce *Squalus acanthias*.^{103,104} Cet aminostéroïde, appelé squalamine **VI-11**, est doté de fortes propriétés antibactériennes. De nombreux travaux ont été publiés sur des composés analogues visant à optimiser l'activité antibactérienne.¹⁰⁵ Certains aminostéroïdes de synthèse sont décrits comme étant spécifiquement antitrypanosomiques.¹⁰⁶



Il est donc clair que d'autres molécules polycationiques sont biosynthétisés par des espèces animales phylogéniquement éloignées des insectes. Ces structures sont souvent beaucoup plus complexes que l'harmonine, diamine naturelle de coccinelles.

6.2. Molécules cationiques antiseptiques de synthèse :

6.2.1. Molécules dicationiques antiseptiques de synthèse :

Diverses molécules antiseptiques sont basées sur des motifs de dication porté par des aromatiques. Les diamidine-2,4-diphényl-furanes **VI-12**, antibactériens, sont actifs contre *Pneumocystis carinii*.¹⁰⁷ Ces diamidines agissent par liaison dans le petit sillon de l'ADN.¹⁰⁷ La pentamidine **VI-13** est un composé antiseptique commercialisé.¹⁰⁸



D'autres molécules dicationiques antiseptiques, dont la structure rappelle celle de la pentamidine, sont le brintobal **VI-14** et le bromure de déqualinium **VI-15**. Il n'est pas clair si ces composés agissent principalement par interaction avec l'ADN, ou s'ils perméabilisent les membranes cytoplasmiques des bactéries, agissant alors comme des détergents cationiques.



Dans le contexte de l'interaction de substances polycationiques avec l'ADN, nous tenons à noter que de nombreuses molécules polychargées (et des lipides cationiques) sont étudiées comme agents de transfection de l'ADN dans le domaine de la thérapie génétique.¹⁰⁹ En particulier, des molécules ramifiées (dendrimères) du type des polyéthylène-imines PEIs ou des dendrimères du type des polyaminoamides PAMAMs, interagissent effectivement avec l'ADN lors des essais de transfection.

6.2.2. Molécules antiseptiques basées sur le squelette des polyamines :

De nombreuses études ont été réalisées sur des di- et polyamines alkylées par de longues chaînes grasses (ex. VI-16 à VI-19). Ces composés sont testés principalement contre des bactéries responsables de la formation de la plaque dentaire.^{110,111} Des N-oxydes (ex. VI-18) non-cationiques peuvent remplacer avantageusement des ammoniums quaternaires.¹¹²



schéma VI.2.

Les molécules dicationiques et antibactériennes que nous avons montrées ici sont relativement éloignées de la structure de l'harmonine. Souvent ces détergents cationiques contiennent des ammoniums quaternaires. L'originalité de nos molécules, basées sur un squelette ramifié, vient entre autres du fait qu'elles contiennent des groupes d'amines primaires séparés par une parte hydrophobe étendue.

6.3. Antériorités par rapport à nos travaux sur des α, ω -diamines à longue chaîne :

6.3.1. α, ω -diamines à longue chaîne :

Même si de façon récurrente de nouvelles études sont faites sur l'activité antimicrobienne des monoamines à longue chaîne,⁶⁴ des études détaillées sur des α,ω -diamines à longue chaîne sont peu fréquentes ; elles datent alors des années 1950.¹¹³

En 1952 D. E. Ames et R. E. Bowman ont synthétisé certaines diamines à longue chaîne hydrocarbonée et évalué leur activité antibactérienne contre *Staphyllococcus pyogenes* et contre *Mycobacterium tuberculosis* (tableau V.1.).¹¹³

| | dilution maximal | toxicité | |
|---|--------------------|----------------------|-----------------------------------|
| | | | LD50 |
| diamines : | Staph. pyogenes | Myc. tuberculosis | souris (souscutané ; mg/kg) |
| Me ₂ N-(CH ₂) ₁₀ -NMe ₂ VI-20 | 1/ 1000 | - | - |
| Me ₂ N-(CH ₂) ₁₆ -NMe ₂ VI-21 | 1/ 10 ⁶ | 1/ 512000 | 5 |
| Me ₂ N-(CH ₂) ₁₈ -NMe ₂ VI-21 | $1/2x10^{6}$ | 1/ 512000 | 5 |
| Me ₂ N-(CH ₂) ₂₂ -NMe ₂ VI-22 | $1/2x10^{6}$ | 1/ 10 ⁶ | 5 |
| Me ₂ N-CH(Me)-(CH ₂) ₁₆ -CH(Me)-NMe ₂ VI-23 | 1/ 10 ⁶ | 1/ 512000 | - |
| Me ₂ N-(CH ₂) ₃ -O-(CH ₂) ₁₀ -O-(CH ₂) ₃ -NMe ₂ VI-24 | 1/ 1000 | inactive | - |
| $ \begin{array}{c c} $ | 1/ 4000 | 1/ 4000 | - |

tableau VI.1. : Activité biologique de certaines α, ω -diamines à longue chaîne

Nous notons que l'activité de ces diamines N,N,N',N'-tétramétylées (**VI-20** à **VI-22**), dépend de la longueur de la chaîne reliant les deux fonctions amines. Ces résultats correspondent à ceux obtenus lors de nos propres tests avec nos diamines analogues de l'harmonine, diamine naturelle d'une coccinelle. La diamine **VI-23**, de par ses méthyles en α , se rapproche encore d'avantage du *cis*-1,17-diamino-octadéc-9-ène (harmonine). Il est intéressant de constater que la molécule **VI-24** n'était que très peu active ; dans cette molécule des liaisons éther ne peuvent pas se substituer à des méthylènes de la chaîne hydrocarbonée (ces considérations sont importantes pour mieux comprendre la bonne activité antibactérienne de nos tétraamines basées sur un éther interne, le THF).

Des travaux similaires étaient réalisés par A. T. Fuller en 1942 sur des diamines primaires à longue chaîne hydrocarbonée H_2N -(CH_2)_n- NH_2 (n = 6, 14, 16, 18).¹¹⁴ Ces diamines ont été testées sur les 20 souches de bactéries. Cette étude avait également démontré la relation existant entre la taille de la chaîne hydrocarbonée et l'activité antibactérienne. L'activité de ces diamines était fortement inhibée lors des tests contenant du sérum sanguin dans les milieux de culture.

En 1938, des études étaient faites sur l'activité de ces diamines primaires à longue chaîne envers des trypanosomes *Trypanosoma rhodesiense*. Des test de toxicité sur des souris avaient montré que la dose léthale est de 25 mg/kg pour l'hexadécane-1,16-diamine ainsi que pour l' octadécane-1,18-diamine.¹¹⁵

6.3.2. α,ω-diammoniums à longue chaîne :

Des études très récentes sur des diammoniums à longue chaîne ont montré que cette famille de molécule est dotée de très fortes activités contre *Plasmodium falciparum*.¹¹⁶ Le groupe de H. Vial a pu optimiser la structure de molécules diammoniums jusqu'à atteindre des concentrations inhibitrices IC50 de 3 pM.¹¹⁶ L'activité antiparasitaire augmente avec le nombre de carbones (tout comme l'activité antibactérienne des diamines). Un optimum est atteint pour des chaînes d'une longueur de 22 carbones. Des triéthylammoniums sont les plus actifs et ils sont supposés s'accomoder le mieux dans le site actif du récepteur-cible. Typiquement un tel site serait anionique, mais il peut également être composé de résidus aromatiques ('aromatic pocket''). Le récepteur cible serait un transporteur de la choline.¹¹⁶ La choline est essentielle à la croissance de Plasmodium, mais elle ne peut pas être biosynthétisées par celui-ci ; elle doit donc être importée à partir de la cellule hôte. Le transporteur de la choline est ainsi une cible de choix pour bloquer la multiplication du Plasmodium.

Si des travaux antécédents ont bien montré l'intérêt de certaines diamines pour certains aspects médicaux, notre approche a conduit à la conception de polyamines à squelette ramifié, qui sont des molécules originales par la polyprésentation des fonctions cationiques.

VII. Conclusions générales : Résumé et Perspectives

7.1. Conclusions générales :

Résumé des objectifs du présent travail :

- Au cours de ce travail de thèse nous avons essayé d'<u>isoler par pharmacoguidage</u> des molécules antibactériennes à partir d'insectes et nous avons réussi à obtenir des produits actifs.
- Les molécules actives ont été obtenues par <u>synthèse organique</u> afin de pouvoir confirmer et quantifier leur activité biologique.
- Des molécules analogues de ces substances naturelles bioactives ont été préparées pour comparer leur activité à celle du composé naturel de départ. Le but ultime de cette <u>étude de structure-activité</u> a consisté à comprendre quels éléments structuraux sont essentiels à l'activité biologique ; ceci nous a permis de concevoir des composés ayant des activités biologiques accrues.
- L'intégration des résultats des tests de <u>toxicité *in vitro*</u> dans notre étude de structureactivité nous a permis de comprendre très tôt comment nous pouvons diminuer la cytotoxicité des molécules tout en gardant l'activité antimicrobienne
- L'évaluation de la <u>toxicité *in vivo*</u> dans des souris des molécules actives nous a permis d'identifier les limites d'une utilisation thérapeutique des molécules synthétisées.

Cadre du travail :

Jusqu'à présent les insectes ont été peu étudiés ; or ces arthropodes se caractérisent de tous les organismes vivants par leur diversité et leur nombre élevé d'espèces. Au vu du succès évolutif des insectes et de leur grande adaptabilité à des niches écologiques diverses, nous avons pu nous attendre à ce que cette richesse se reflète également dans les substances naturelles issus du métabolisme secondaire des insectes. En effet, il est bien connu que les insectes se servent de la communication chimique dans leurs relations inter- et intra-espèce (phéromones, allomones, etc). Certains de ces métabolites servent, comme nous l'avons vu dans le chapitre (I), à la défense contre des prédateurs (stéroïdes de dytiques, alcaloïdes de coccinellidés) ou encore contre des parasites et des microorganismes (H₂O₂, quinones).

L'isolement par pharmacoguidage :

Nous avons essayé de caractériser des composés naturels d'insectes qui ont des propriétés antimicrobiennes. Pour cela, nous avons testé des extraits d'une dizaine d'espèces d'insectes. Très tôt dans notre étude nous avons détecté une substance fortement antibactérienne chez une coccinelle de l'espèce *Harmonia axyridis*. Nous avons pu caractériser chimiquement cette substance bioactive et identifier sa structure. Il s'agissait d'une diamine à longue chaîne hydrocarbonée, le *cis*-1,17-diaminooctadéc-9-ène. Cette

diamine avait déjà été isolée d'une espèce de coccinelle voisine, à savoir *Harmonia leis conformis*, par le groupe de J. C. Braekman et al.⁵⁹; cette diamine était alors appelée ''harmonine'' d'après l'espèce qui la biosynthétise. L'activité répulsive envers des fourmis avait été décrite, or avant nos travaux aucune étude évaluant l'activité antimicrobienne de cette substance n'avait été réalisée.

Obtention de la substance active par synthèse organique :

Nous avons refait la synthèse chimique de l'harmonine pour confirmer ainsi son activité antimicrobienne, et pour disposer d'assez de matériel pour établir le spectre d'activité sur un nombre élevé de souches bactériennes. L'harmonine de synthèse a également servi de "standard" pour démarrer une étude sur la relation de la structure-activité de α,ω -diamines à longue chaîne. Plusieurs de ces diamines analogues de l'harmonine ont été préparées par synthèse organique, et elles ont servi à tester quels éléments de structure de l'harmonine sont essentiels à son activité antimicrobienne. Le remplacement formel de la double liaison de l'harmonine par une liaison simple, et le déplacement formel de la fonction amine de la position 17 à l'extrémité de la chaîne hydrocarbonée ont conduit à la conception de la 1,18octadécanediamine. Cette diamine présente un accroissement de l'activité biologique par rapport à l'harmonine. Des α, ω -diamines saturées de taille variable ont été synthétisées. Nous avons constaté que l'activité biologique dépend fortement de la longueur de la chaîne hydrocarbonée reliant les deux fonctions amines. En dessous de 16 carbones, l'activité antimicrobienne des diamines homologues s'est avérée être fortement réduite, même abolie envers certaines souches bactériennes. Les α, ω -diamines à longue chaîne hydrocarbonée présentent un spectre d'activités antimicrobiennes très large : ces composés sont actifs aussi bien sur des bactéries Gram(+) que Gram(-).

L'étude de la relation de structure-activité :

Nous avons comparé l'activité de ces diamines avec celle de monoamines à longue chaîne hydrocarbonée. Les activités des diamines à 18 et 20 carbones ont été plus fortes que celles des monoamines les plus actives.

Suivant l'hypothèse d'une potentialisation de l'activité antibactérienne par le nombre croissant de groupements amines, nous avons synthétisé des polyamines. Nous avons choisi de construire les polyamines de façon à conserver un cœur hydrophobe à l'intérieur des molécules. En effet, nous supposons que les diamines, à l'instar des monoamines, interagissent au niveau des membranes biologiques. Le côté hydrophobe des molécules serait nécessaire à leur insertion dans les bicouches lipidiques. Nous avons ainsi conçu des molécules basées sur un squelette hydrocarboné ramifié. Nous rappelons les structures des polyamines les plus caractéristiques synthétisées au cours de ce travail de thèse ; ceux sont la triamine Tri-8. tétraamine l'hexaamine Hex-6. la Tét-7 et



Ces polyamines ramifiées ont montré des activités antimicrobiennes accrues par rapport aux mono- et diamines. La présence de 4 groupements amines dans les molécules semble être optimale pour l'expression de l'activité antimicrobienne ; l'hexaamine **Hex-6** a en effet été moins active que la tétraamine **Tét-7**. La longueur des bras de ces polyamines a été choisie de sorte à ce que le nombre maximal de carbones entre deux fonctions amines soit proche de 18 comme pour la 1,18-octadécanediamine, qui a été la diamine saturée la plus active dans notre étude de structure-activité.

Un test d'hémolyse a été utilisé afin d'évaluer la perméabilité membranaire d'érythrocytes par les polyamines synthétisées. Ce test a montré que les polyamines (nombre des fonctions amines \geq 3) perturbent moins les membranes de ces cellules d'eucaryotes que les diamines avec le même niveau d'activité antibactérienne. Nous avons pu synthétiser une molécule qui a perdu toutes ses propriétés hémolytiques, tout en conservant les activités antimicrobiennes accrues. Il s'agit de la tétraamine **THF-7**, dont la structure est basée sur un tétrahydrofurane tétrasubstitué.



Nous avons eu recours à d'autres tests *in vitro* de l'évaluation de la toxicité des polyamines synthétisées. Ainsi nous avons déterminé les concentrations léthales des amines sur deux types de cellules en culture : d'une part nous avons utilisé la lignée cancéreuse HeLa, d'autre part la lignée S2 de drosophile. Les polyamines, tout comme les diamines, ont été très toxiques envers ces cellules en culture. Les concentrations de ces polyamines conduisant à 50% de léthalité cellulaire ont été du même ordre de grandeur que les concentrations minimales inhibitrices sur les bactéries. Le différentiel entre l'activité antibactérienne et l'activité cytotoxique, déterminée sur ces cellules en culture, a donc été très faible voire nulle.

Un raccourcissement des chaînes latérales des tétraamines basées sur un tétrahydrofurane a conduit à la molécule **THF-6**, présentant 6 carbones dans ses bras latéraux. L'activité antibactérienne de cette dernière molécule a été globalement réduite, mais cette

perte d'activité envers les bactéries est très dépendante des espèces bactériennes testées. Cette polyamine **THF-6** est restée très efficace contre les bactéries *Escherichia coli*. En même temps, la cytotoxicité envers les cellules S2 a été fortement réduite. Cette molécule montre donc un véritable différentiel entre son activité contre *E. coli* et sa cytotoxicité.

Des tests de l'évaluation de la toxicité *in vivo* a été réalisée sur des souris par injection intraveineuse des produits à tester. Les polyamines synthétisées ont montré une toxicité systémique aiguë. Les symptômes suggèrent que ces molécules seraient neurotoxiques. Les effets physiologiques des polyamines, qui entraînent la mort des souris, se manifestent instantanément après l'injection. Les polyamines, aux concentrations injectées, n'ont conduit ni à des nécroses ni à des histolyses ; la dissection des souris a en effet montré que les organes présentaient un aspect normal. Nous avons donc supposé que les polyamines devraient interagir avec un récepteur biologique, dont la stimulation entraînerait la mort de l'animal. La stimulation d'un récepteur cellulaire expliquerait également la rapidité de la survenance de la mort.

Nous notons que l'harmonine, diamine naturelle, est jusqu'à 50 fois moins toxique *in vivo* que les polyamines comportant 3 à plusieurs fonctions cationiques. Cette faible toxicité de l'harmonine dans les souris a été complètement inattendue, vu que sa cytotoxicité *in vitro* et son effet hémolytique ont été élevés. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la toxicité aiguë *in vivo* ne se manifesterait qu'avec des composés comportant 3 à plusieurs fonctions cationiques.

Au cours de ces travaux de thèse nous avons pu synthétiser une tétraamine stériquement encombrée, dont les chaînes latérales sont partiellement rigidifiées par un cyclohexane. Cette molécule, basée sur un tétrahydrofurane, a été notée **THF-cyclo**. Cette tétraamine rigidifiée a conservé le même niveau d'activité antibactérienne que celui de la molécule **THF-7**. Son spectre antibactérien a été très large. Comme la rigidification des chaînes latérales de cette tétraamine **THF-cyclo** n'a pas entraîné de perte des propriétés antibactériennes, nous pouvons conclure que les autres tétraamines antibactériennes adoptent des conformations étendues similaires lors de l'interaction biologique.

Nous avons cru que la rigidification des chaînes latérales de la tétraamine **THF-cyclo** pourrait augmenter la sélectivité de ces polyamines. Or contrairement à nos espoirs, cette molécule **THF-cyclo** est restée fortement toxique pour les souris par injection intraveineuse, malgré son encombrement au niveau des chaînes latérales.

 NH_2 H_2N 0 NH_2 $H_2N_{\rm N}$

THF-cyclo

7.2. Perspectives :

Au cours de ce travail de thèse nous avons synthétisé plusieurs séries de molécules polycationiques. A partir de la géométrie de ces molécules nous avons réussi à dégager quelques règles, qui permettent de conserver l'activité antibactérienne lors de la conception d'autres molécules analogues. Conserver une distance minimale entre les fonctions amines est une de ces règles. Nous gardons donc de grandes libertés pour élaborer d'autres molécules actives à structure similaire, afin d'optimiser la sélectivité de cette famille de molécules.

7.2.1. Perspectives au niveau de la chimie médicinale :

Dans le but d'une utilisation thérapeutique des polyamines synthétisées, il serait primordial de s'affranchir de la toxicité *in vivo* de ces molécules.

Dans l'hypothèse d'une interaction des polyamines avec des récepteurs spécifiques, il serait possible d'encombrer d'avantage les molécules polycationiques ; les amines primaires pourraient faire place à des amines secondaires et tertiaires portant des substituants R volumineux. De tels groupements R, pourraient empêcher l'interaction avec le récepteur responsable de l'effet toxique des polyamines, bloquant l'accès au site actif.

Le remplacement formel des fonctions amines par des phosphoniums serait une autre façon pour élargir la taille des groupements cationiques.

Nous avons vu que l'introduction de l'hétérocycle tétrahydrofurane (THF) a été efficace pour atténuer l'activité cytotoxique des polyamines. Même si l'oxygène du THF est partiellement masqué par les chaînes latérales de cet hétérocycle, celui-ci atténue l'hydrophobie de la partie centrale (entre autres la solubilité des polyamines-THF est accrue). Il serait envisageable d'introduire d'autres fonctions chimiques polaires (hétérocycles) à l'intérieur des molécules pour compenser encore d'avantage le caractère purement amphipathique de ces amines.

Comme l'harmonine est nettement moins toxique sur les souris que les polyamines à squelette hydrocarboné ramifié, on devrait évaluer si la toxicité de ces polyamines ne pourrait être baissée par la limitation à deux charges positives par molécule. On pourrait alors regrouper les acquis des différents groupes de polyamines pour en concevoir des molécules moins toxiques *in vivo* et exemptes de cytotoxicité. Dans cet esprit on pourrait garder un tétrahydrofurane substitué, ne portant que deux fonctions amines. Des cyclohexanes

pourraient toujours servir de bras rigides, et les fonctions amines pourraient être encombrées par des groupements volumineux R (schéma VII.1.).

Conception de molécules réunissant les éléments favorables des différentes polyamines que nous avons synthétisées



schéma VII.1.: Conception de nouvelles diamines

Dans le chapitre de l'introduction nous avons présenté les peptides antimicrobiens d'insectes. Globalement ces peptides agissent également comme détergents cationiques. Or certains de ces peptides présentent un indice thérapeutique élevé, étant inoffensifs pour les souris par injection intraveineuse. Ils portent, tout comme nos polyamines plusieurs charges positives à pH physiologique. Il serait alors intéressant de concevoir des peptidomimétiques, en nous inspirant de la structure des polyamines, que nous avons synthétisées. Il serait essentiel de comprendre comment la répartition dans l'espace de groupes hydrophobes, polaires et chargés pourrait engendrer un maximum de sélectivité. Nous tenons à donner un exemple d'une telle molécule, où des liaisons peptidique remplaceraient l'hétérocycle central (schéma VII.2.)



schéma VII.2.: Remplacement du THF central des diamines par d'autres systèmes rigidifiés

Nous avons vu que de nombreuses études ont débuté sur l'étude de la squalamine, aminostéroïde de requin doté de fortes propriétés antibactériennes.^{103,104} Il serait intéressant de connaître le lien exact entre ces aminostéroïdes et nos polyamines. On pourrait dans le même esprit remplacer formellement les chaînes flexibles de nos polyamines par des squelettes rigides de stéroïdes.

7.2.2. Perspectives au niveau de l'interaction moléculaire des polyamines avec des récepteurs biologiques :

La forte toxicité *in vivo* sur des souris pourrait indiquer que les polyamines synthétisées interagissent avec une forte affinité avec un récepteur biologique. Il serait important de pouvoir identifier ce (ou ces) récepteur(s) (membranaires ?) pour deux raisons essentielles : de plus amples connaissances sur les origines moléculaires de la toxicité systémique induite par les polyamines pourraient nous aider à mieux concevoir de nouveaux analogues antibactériens et non toxiques. Si les récepteurs biologiques stimulés par les polyamines synthétisées seraient d'un intérêt pharmacologique, il serait alors peut-être intéressant de commencer une étude détaillée de type relation de structure-activité envers cette nouvelle cible.

Dans le même contexte, il serait intéressant d'étudier en détail comment l'insecte (*Harmonia axyridis*) se protège contre l'effet toxique de l'harmonine (complexation de la diamine par des protéines ?).

7.2.3. Perspectives au niveau de l'interaction membranaires

Si le mécanisme d'action des polyamines ramifiées passe par la perméabilisation des membranes biologiques, il serait intéressant d'en tirer profit pour se servir de ces molécules comme agents de transfert. Nous avons également observé une forte interaction des polyamines avec des ions phosphates. Ces polyamines pourraient-elles interagir ainsi avec des groupements phosphates des ADN. Les polyamines ramifiées pourraient-elles alors servir d'agents de transfert de l'ADN dans des cellules lors d'essais de transfection ?

7.2.4. Perspectives au niveau de la synthèse chimique

Au niveau de la synthèse chimique on pourrait essayer d'améliorer davantage la réaction de couplage des organomagnésiens à longue chaîne ω -fonctionnalisées sur un substrat polyfonctionnalisé.

Des conditions de purification des polyamines par l'utilisation de phases inverses devraient être mises au point afin d'atteindre de meilleurs degrés de puretés (microanalyse). L'efficacité de la dernière étape de la synthèse serait de cette sorte augmentée considérablement.

L'utilisation des techniques de la chimie combinatoire pourraient servir à introduire une grande variété de fonctions amines (têtes polaires) lors de la dernière étape de la synthèse. Ces amines, à leur tour, pourraient servir à l'introduction d'autres fonctionnalités. Les squelettes hydrocarbonés pourraient alors servir de structure de base (''template'') à la construction d'une grande diversité de molécules polyfonctionnalisées.

VIII. Partie expérimentale

8.1. Tests biologiques :

8.1.1. Test d'évaluation de l'activité antimicrobienne et/ou antifongique :

8.1.1.1. Principe du test :

Les tests d'inhibition de croissance de bactéries et de champignons ont été réalisés en conditions liquides. L'activité spécifique de chaque molécule est exprimée par la concentration minimale inhibitrice de croissance des bactéries et/ou champignons, notée MIC. La MIC est une valeur spécifique pour chaque composé et varie en fonction des organismes testés. Il est à noter que les valeurs données pour la MIC suivent une progression logarithmique, ce qui est dû à la cascade de dilution de deux à deux des composés testés dans une série de tests. Les molécules testées ont été présentées sous forme de sels solubles dans l'eau et dans le milieu de culture des microorganismes. Les concentrations des composés testés dans une série de tests varient de 100 μ g / ml à 0,2 μ g / ml de milieu de culture. Des activités dont les valeurs de la MIC sont comprises entre 20 et 100 μ g / ml sont considérées comme des activités faibles. Les composés ayant des MICs comprises entre 0,1 et 20 μ g / ml ont des activités antibactériennes du même ordre de grandeur que des antibiotiques commerciaux.

8.1.1.2. Le test antibactérien :¹¹⁷

Des plaques à 96 puits ont été utilisées pour la réalisation des tests antimicrobiens. Chaque puits contient 90 μ l d'une suspension de bactéries diluées dans du milieu PB (Poor Broth, Difco) pour une concentration finale de 1 mDO.

10 µl du composé en solution dans de l'eau stérile à des concentrations passant de 1 mg / ml à 2 µg / ml sont rajoutés aux bactéries. Les plaques, entourées d'un parafilm, sont placées sous agitation à 29°C pendant 24 heures. La croissance des bactéries est évaluée par la mesure de la turbidité du milieu de culture par la détermination de la densité optique à 595 nm. La valeur de la MIC correspond à la concentration maximale des substances à tester où aucune pousse de bactéries n'est constatée (DO = 0).

8.1.1.3. Le test antifongique :¹¹⁷

Les tests antifongiques sont réalisés de façon similaire aux tests antibactériens dans du "Potato dextrose broth" ($\frac{1}{2}$ PDB, Difco). Le milieu de culture contient des antibiotiques à savoir 10 µg / ml de tétracycline et 0,1 µg / ml de céfotaxime.

La concentration initiale en spores de champignons est de 10^4 / ml de culture et de 1000 par puits.

Un contrôle optique sous microscope à optique inverse permet d'évaluer la croissance et la formation des mycéliums des champignons filamenteux (*Aspergillus fumigatus, Neurospora crassa*). La MIC est déterminée après 48 heures de culture à 29 °C dans une atmosphère saturée en eau et correspond à la concentration maximale où aucune formation de mycélium n'est observée.

8.1.1.4. Témoins :

Comme <u>contrôles positifs</u> nous avons inclus dans chaque série de tests des antiseptiques commerciaux comme le chlorure de cétylpyridinium (CPC) où le bromure de déqualinium (Merck index).

Les puits 1A-1G et 10A-10H des plaques multipuits servent de <u>témoin de stérilité</u> du milieu de culture. Ils ne contiennent que le milieu de culture sans germes.

Le <u>contrôle négatif</u> permet d'évaluer la croissance des microorganismes à tester en absence de produits. Les puits 2A-9A et 2H-9H des plaques multipuits contiennent le milieu de culture ensemencé ; on y observe la croissance maximale.

8.1.1.5. Remarques :

Les tests antibactériens donnent des valeurs des MICs différentes suivant le milieu de culture utilisé. Le milieu de culture *Müller-Hinton* rend les bactéries moins sensibles aux amines testées. Le milieu *Le Master* augmente la sensibilité des tests.

La concentration initiale en bactéries peut être augmentée d'un facteur 8 sans répercussion sur les valeurs des MICs.

Les polyamines testées sont bactéricides pour certaines bactéries de façon à ce que les valeurs des concentrations inhibitrices minimales ne varient pas après une incubation prolongée de 48 heures. D'autres bactéries telle *Pseudomonas aeruginosa* se retrouvent simplement retardés dans leur croissance en présence des amines. Les valeurs des MICs pour *P. aeruginosa* tendent à augmenter avec le temps du maintien en culture. Il est donc indispensable de respecter les temps de culture pour avoir des résultats reproductibles.
Nous avons utilisé des suspensions concentrées de bactéries congelées ainsi que de spores de champignons congelées pour réaliser les tests antimicrobiens. Les valeurs des MICs sont identiques à celles obtenues avec des bactéries non congelées et se trouvant en phase de croissance exponentielle. Ceci a été vérifié pour l'ensemble des monoamines amphiphiles et pour les diamines de synthèse.

La présence d'éthanol dans quelques puits (jusqu'à 10) ne semble pas gêner la croissance des bactéries, même à des concentrations élevées de 10 % d'éthanol dans les puits concernés.

Le remplissage des 96 puits de 10 % d'éthanol conduit à l'arrêt de la croissance bactérienne dans les puits du milieu de la plaque. La croissance bactérienne sur les bords de la plaque est normale, ce qui s'explique par l'échange gazeux favorisé sur le pourtour de la boîte.

8.1.1.6. Référence :

C. Hetru, P. Bulet. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 78: Antibacterial Peptide Protocols. Edited by : W. M. Shafer, Human Press Inc. , Totowa, NJ

Nous remarquons que nos solutions stock des antibiotiques utilisés pour les tests antifongiques sont de 10 mg / ml de tétracycline dans le DMSO et de 100 μ g / ml de céfotaxime dans de l'eau, et elles sont conservées à -20° C. La concentration finale est de 10 μ g / ml de tétracycline (100 μ g / ml dans l'article) et de 0,1 μ g / ml de céfotaxime (1 μ g / ml dans l'article).

8.1.2. Test d'hémolyse

8.1.2.1. Principe du test :

Un composé agissant sur les membranes de bactéries peut potentiellement perturber les membranes de cellules de mammifère. Les globules rouges ou érythrocytes servent de modèle de cellules d'eucaryotes où le degré de la perméabilisation membranaire est facilement évalué par mesure de la quantité d'hémoglobine libérée à travers les pores des membranes fragilisées et dont la concentration est directement proportionnelle à la densité optique à 450 nm.

8.1.2.2. Utilisation du test :¹¹⁸

Préparation du sang :

Du sang de singe (macaque) est prélevé directement dans deux tubes, sous vide, héparinisés, de 5 ml. Le sang a été stocké pendant 5 heures à $5^{\circ}C$.

Du sang de bœuf est prélevé à l'aide d'une seringue et mis en présence de 75 mg de citrate de sodium pour 15 ml de sang.

Lavage des globules rouges :

Les érythrocytes sont préparés à partir du sang fraîchement prélevé. 1 ml de sang héparinisé (ou citraté) est dilué avec 1 ml de PBS (1x) et centrifugé à 2000 g pendant 5 minutes, la centrifugeuse étant refroidie à 15°C. Cette opération a permis de séparer un culot de globules rouges d'un surnageant légèrement jaunâtre. L'opération de lavage est répétée deux fois, de sorte que le surnageant reste incolore. Le culot final d'érythrocytes est repris dans 10 ml de PBS (1x). Cette suspension de globules rouges, dilués 10 fois par rapport à leur concentration dans le sang, sert à réaliser les tests hémolytiques.

A 90 μ l de cette suspension de globules rouges sont rajoutés 10 μ l d'une solution aqueuse des produits à tester. Les érythrocytes sont mis à incuber pendant une heure à 37°C. La suspension est centrifugée à 500 g afin de récupérer le surnageant qui contient l'hémoglobine libérée. Le surnageant est plus ou moins rouge suivant le degré d'hémolyse. Le prélèvement de 50 μ l des surnageants et l'introduction de ces solutions d'hémoglobine dans des plaques à multipuits permet de quantifier l'hémoglobine par la mesure de la densité optique (DO) à 450 nm.

Dans le contrôle négatif les globules rouges sont incubés en absence de produit (10 μ l d'eau) et montre une DO de 0.

L'hémolyse 100 % est obtenue avec 100 µg de chlorure de cétylpyridinium (CPC) par ml de suspension. Le degré d'hémolyse est évalué par rapport au témoin positif 100 % pour les différentes concentrations des produits testés. La DO du témoin d'hémolyse à 100 % se situe autour de 1. Le CPC, testé à différentes concentrations, sert également de standard dans le test hémolytique pour évaluer la qualité du sang. Une densité optique de 0,5 (suivant la valeur de l'hémolyse 100 %) correspond à la lyse de 50 % des globules rouges et sera notée HE50%.

Préparation des échantillons :

1 mg du composé à tester est dissous dans 125 μ l d'eau stérile MilliQ, ce qui correspond à une concentration de 8 mg / ml. La moitié de cette solution sert à faire une cascade de dilutions deux à deux. 10 μ l de chaque concentration sont mis dans 90 μ l de la suspension de globules rouges (1/10). L'intervalle des concentrations finales des composés à tester va de 800 μ g/ml à 2 μ g/ml. Comme l'activité antibactérienne des composés testés se manifeste déjà à des concentrations de l'ordre du μ g/ml, la gamme de concentrations choisies pour ce test hémolytique permet de quantifier la sélectivité d'activité des composés envers les cellules procaryotes, exprimée par le rapport : HE50% du composé / MIC (concentration minimale inhibitrice) du composé.

8.1.2.3. Référence :

P. Fehlbaum, P. Bulet, L. Michaut, M. Lagueux, W. F. Broekaert, C Hetru, J. A. Hoffmann. Insect immunity. *Journal of Biological Chemistry* 1994, 269, 52, 33159-33163
Contrairement à nos tests hémolytiques ce groupe utilise une suspension de seulement 0,5 % de globules rouges (de bœuf) dans du PBS (1x) et ils font la lecture de DO à 405 nm.
1 ml de sang donne en général 200 µl d'érythrocytes après centrifugation à 3000 g. Nous avons dilué ces érythrocytes dans un volume de 10 ml. Notre suspension correspond donc à 2 % d'érythrocytes dans du PBS (1x).

8.1.3. Test de cytotoxicité :

8.1.3.1. Principe des tests :

Nous voulons déterminer la concentration des amines qui conduit à une cytotoxicité de 50 % (LC50%). Le nombre de cellules viables est déterminé de deux façons : L'utilisation d'un test au XTT dose une activité mitochondriale constitutive des cellules vivantes. Le test au Gentiana-violet (cristal-violet) quantifie les cellules adhérentes au fond des boîtes de culture. Les cellules mortes se décollent du support en plastique. Le nombre de cellules adhérentes est proportionnel au nombre de cellules viables.

8.1.3.2. Préparation des cellules :

Les cellules sont dissociées de leur boîte de culture et mises en suspension à une concentration de 10^6 cellules / ml. Les tests se font dans des plaques à multipuits, contenant 100 µl de la suspension cellulaire par puit. Les cellules sont adhérentes après une incubation d'1 heures. 10 µl des différentes concentrations des produits à tester sont introduits, et les cellules sont incubées pendant 24 heures.

Les cellules de Schneider S2 de drosophile sont incubées à 25° C sous atmosphère normale. Les cellules HeLa sont incubées à 37° C sous une atmosphère de 5 % de CO₂.

8.1.3.3. Révélation de la viabilité cellulaire :

XTT (Sigma) :

Mode d'utilisation est fourni avec le produit.

Des déshydrogénases mitochondriales clivent le cycle tétrazolium en présence de phénazine méthosulfate (PMS, electron coupling agent) pour former un formazane orange hydrosoluble. Cette couleur est proportionnelle au nombre de cellules viables.

La révélation dépend du métabolisme des cellules. Elle est restée très faible après 2 heures dans nos tests. La lecture après 18 heures à 450 nm a donné des valeurs d'absorbance significatives.

Gentiana-violet :

La solution stock du Gentiana-violet : 0,5 g de Gentiana-violet sont dissous dans 20 ml de méthanol et sera complété avec 80 ml d'eau distillée.

Le surnageant des cultures cellulaires est aspiré par une pipette Pasteur branchée à une trompe à eau. Les puits sont lavés avec 100 μ l de PBS (1x), qui sera réaspiré par la trompe à eau. 50 μ l de la solution de Gentiana-violet sont introduits dans les puits secs et laissés pendant 20 minutes à température ambiante. Les plaques sont alors lavées sous un filet d'eau courante. 100 μ l d'une solution de SDS 1 % sont introduits dans chaque puits pour redissoudre le résidu de cellules coloriées. La densité optique des plaques est mesurée à 595 nm. Une forte densité optique (\approx 1 DO) signifie que toutes les cellules du puits sont viables.

8.2. Synthèse organique :

8.2.1. Synthèse de l'harmonine (Z-1,17-diaminooctadéc-9-ène)

La synthèse de cette diamine est décrite 2 fois dans la littérature :

D. Enders, D. Barzen (Liebigs Ann. Chem, 1991, 569-574) ; M. F. Braconnier, J. C. Braekman, D. Daloze (Bull. Soc. Chim. Belg., 1985, 605-614).

L'équipe de Enders a décrit la synthèse chirale de l'harmonine. Comme la diamine que nous avons isolée de *Harmonia axyridis* semble être racémique ($(\alpha)_D = 0$), nous avons synthétisé l'harmonine sous forme de mélange racémique. Nous nous sommes inspirés largement de la synthèse de Enders. Tout comme dans cette synthèse, notre méthode de construction de la chaîne linéaire est passée par des intermédiaires à 17 carbones. Le méthyle en position 18 étant ramené assez tard dans la synthèse comme nous l'avons montré dans la partie théorique. Nous avons synthétisé le 2-(16-chloro-hexadéc-7-ynyl)-1,3-dioxolane suivant les modes opératoires décrits dans la publication de Enders ; toutes les étapes sont bien reproductibles et se font avec les rendements décrits. Cet alcyne est l'intermédiaire clé de la synthèse. Notre voie de synthèse de l'harmonine diverge à partir de cet intermédiaire.

(CH₂)₅ (CH₂)₈ Cl

2-(16-chloro-hexadéc-7-ynyl)-1,3-dioxolane (= III-8)

Nous allons maintenant décrire les intermédiaires correspondant aux étapes propres de notre voie de synthèse :

2-(16-chloro-Z-hexadécényl)-1,3-dioxolane :

III-11; C₁₉H₃₅ClO₂; PM = 330,93

Hydrogénation catalytique au Pd de Lindlar du III-8

1,328 g de 2-(16-chloro-hexadéc-7-ynyl)-1,3-dioxolane (4,038 mmoles , PM=328,96) sont mis en solution dans 30 ml d'hexane sous argon. 130 μ l d'une solution éthanolique de 2,2'éthylenedithiodiéthanol (1 mg / ml) sont rajoutés. Le milieu est mis sous agitation, et le palladium de Lindlar 5 % (130 mg ; 0,06 mmoles ; PM=106,42) est additionné ; l'agitation continue pendant 3 minutes sous 1 atmosphère d'argon. L'argon est échangé contre de l'hydrogène. Après ½ heure de réaction, une analyse par CCM montre que la réaction est complète (éluant : 30 % diétyléther dans l'hexane). Le milieu réactionnel est filtré sur du papier filtre, le filtre est lavé avec un mélange dichlorométhane-méthanol. Le filtrat est évaporé dans un évaporateur rotatif. Le produit récupéré est pur par analyse en RMN ¹H et ¹³C. Le produit d'hydrogénation pèse 1,323 g , ce qui correspond à 4,00 mmoles et à un rendement de 99 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,37 (15 \%$ éther dans l'hexane), $\mathbf{Rf} = 0,58 (30 \%$ éther dans l'hexane) ; révélation forte à la vanilline

¹H–RMN (CDCl₃) :

5,34 ppm ; triplet ; J = 4,6 Hz ; 2 H ; protons vinyliques 4,84 ppm ; triplet ; J = 4,7 Hz ; 1 H ; proton en position 2 du dioxolane 3,8-3,95 ppm ; multiplet ; 4 H ; 2 CH₂ du dioxolane (pos . 4, 5) 3,53 ppm ; triplet ; J = 6,7 Hz ; 2 H ; CH₂ en α du chlore 1,95-2,05 ppm ; multiplet (forme de doublet) ; 4 H ; 2 CH₂ allyliques 1,65-1,85 ppm ; multiplet ; 2 H ; CH₂ en β du chlore 1,6-1,65 ppm ; multiplet (forme triplet) ; 2 H ; CH₂ en α du cétal 1,25-1,40 ppm ; multiplet ; 18 H ; 9 CH₂ de la chaîne

13 C-RMN (CDCl₃) :

129,9 ppm (2 CH) (vinyliques) ; 104,7 ppm (CH) (CH du cétal) ; 64,8 ppm (2 CH₂) (O-CH₂-CH₂-O) ; 45,2 ppm (CH₂) (CH₂ en α du chlore) ; 33,9 ppm (CH₂) (CH₂ en α du cétal) ; 32,7 ppm (CH₂) (CH₂ en β de Cl) ; 29,7 (CH₂) ; 29,6 ppm (CH₂) ; 29,5 ppm (CH₂) ; 29,4 ppm (CH₂) ; 29,2 ppm (CH₂) ; 28,9 ppm (CH₂) ; 28,2 (CH₂) ; 27,2 (CH₂) ; 26,9 ppm (CH₂) ; 24,1 ppm (CH₂) : 18 carbones en total

17-chloro-heptadéc-8-énal :

О Н (СН₂)₅ (СН₂)₈СІ

III-12; $C_{17}H_{31}OCl$; PM = 286,88

Déprotection du dioxolane III-11

1,605 g de 2-(16-chloro-Z-hexadécényl)-1,3-dioxolane (4,85 mmoles ; PM=330,94) sont dissous dans 150 ml d'acétone et 15 ml d'acide chlorhydrique sont rajoutés. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 12 heures. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM ; éluant : 15 % de diéthyléther dans de l'hexane). Après 12 heures, le milieu est neutralisé par ajout d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium. L'excès de l'acétone est évaporé. La solution concentrée est diluée avec 100 ml d'eau et extraite avec 500 ml de diéthyléther. La phase aqueuse est lavée avec 200 ml d'éther. Les phases organiques réunies sont séchées sur du sulfate de magnésium anhydre (½ heure) et filtrées sur Célite. Les solvants organiques sont évaporés sous évaporateur rotatif. Le brut récupéré est purifié par chromatographie sur colonne de silice (dimensions de la colonne de silice : 4,5 x 18 cm , éluant : 7,5 % éther dans l'hexane). La chromatographie est suivie par analyse en CCM. Le produit, sortant en premier, correspond au produit recherché, à savoir l'aldéhyde déprotégé. La réunion des fractions contenant le même produit, et l'évaporation des solvants fournissent 1,049 g du produit. Cette quantité correspond à 3,7 mmoles et à un rendement de 76 %.

Le produit qui sort en deuxième de la colonne correspond au produit de départ, et il peut être recyclé (200,5 mg , 12,5 % de produit n'ayant pas réagi).

 $\mathbf{Rf} = 0.45$; éluant : 15 % d'éther dans l'hexane ; révélation à la vanilline

¹H-RMN (CDCl₃):

9,74 ppm ; triplet ; J = 1,8 Hz ; 1H ; proton de l'aldéhyde 5,27-5,35 ppm ; multiplet (forme triplet) ; 2 H ; 2 protons vinyliques 3,53 ppm ; triplet ; J = 6,7 Hz ; 2 H ; CH₂ en α du chlore 2,40 ppm ; triplet de doublets ; J = 1,8 Hz et J' = 7,2 Hz ; 2 H ; CH₂ en α de l'aldéhyde 1,95-2,05 ppm ; multiplet (forme de doublet) ; 4 H ; 2 CH₂ allyliques 1,65-1,85 ppm ; multiplet ; 2 H ; CH₂ en β de l'aldéhyde 1,55-1,65 ppm ; multiplet ; 2 H ; CH₂ en β du chlore 1,25-1,40 ppm ; multiplet ; 16 H ; 8 CH₂ de la chaîne

$^{13}\text{C-RMN}(\text{CDCl}_3)$:

202,8 ppm (CH) (CHO) ; 130,8 ppm (CH) (vinylique) ; 129,7 ppm (CH) (vinylique) ; 45,2 ppm (CH₂) (CH₂ en α du chlore) ; 43,9 ppm (CH₂) (CH₂ en α de CHO) ; 32,7 ppm (CH₂) (CH₂ en β de Cl) ; 29,7 (CH₂) ; 29,5 ppm (CH₂) ; 29,4 ppm (CH₂) ; 29,2 ppm ; 29,1 ppm (CH₂) ; 29,0 ppm (CH₂) ; 28,9 (CH₂) ; 27,2 (CH₂) ; 27,1 ppm (CH₂) ; 26,9 ppm (CH₂) ; 22,1 ppm (CH₂)

IR (NaCl):

 $v_{max} = 3003 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 2927 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2854 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2716 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1726 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 1463 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1310 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}$

18-chloro-Z-octadéc-9-èn-2-ol :

OH H₃C (CH₂)₅ (CH₂)₈Cl

III-13 ; $C_{18}H_{35}OC1$; PM = 302,93

Formation de l'alcool III-13 par réaction de méthyl-Grignard sur l'aldéhyde III-12

287 mg de 17-chloro-heptadéc-8-énal (1 mmole ; PM=286,89) sont dissous dans 8 ml de THF (séché sur sodium-benzophénone) dans un bicol de 25 ml (séché préalablement à 120°C). La solution est refroidie à -30°C sous une atmosphère d'argon. 0,5 ml de méthyl-Grignard (3M) (1,5 mmoles) est rajouté goutte à goutte au milieu réactionnel. Nous laissons monter la température à 0°C pendant 1,5 heure. Pour arrêter la réaction, le milieu réactionnel est versé sur de la glace (10 g). La phase aqueuse obtenue est acidifiée par quelques gouttes d'acide chlorhydrique. La phase aqueuse est saturée en chlorure de sodium, et elle est extraite

avec du diéthyléther (3 x 100 ml). La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium pendant ½ heure, puis elle est filtrée sur Célite. Les solvants sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'alcool brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice avec un mélange d'élution de 30 % d'éther dans de l'hexane. L'aldéhyde, n'ayant pas réagi, sort en premier de la colonne ; il peut être recyclé (27,8 mg ; 9,7 % n'ayant pas réagi). 256,7 mg d'alcool secondaire sont obtenus, ce qui correspond à 0,847 mmoles et équivaut à un rendement de 85 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,26$; éluant : 30 % d'éther dans de l'hexane ; révélation à la vanilline acide ; coloration bleu-noire

¹H-RMN (dans CDCl₃):

5,33 ppm ; triplet ; J = 4,6 ; 2 H ; 2 protons vinyliques 3,7-3,85 ppm ; multiplet ; 1 H ; proton en α de OH 3,51 ppm ; triplet ; J = 6,7 Hz ; 2 H ; CH₂ en α du Cl 1,95-2,05 ppm ; multiplet (forme de doublet) ; 4 H ; 2 CH₂ allyliques 1,65-1,85 ppm ; multiplet ; 2 H ; CH₂ en β du OH 1,25-1,45 ppm ; multiplet ; 20 H ; 10 CH₂ de la chaîne 0,85 ppm ; doublet ; J = 5,2 Hz ; 3 H ; 1 CH₃, protons du C1 de la chaîne

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

129,9 ppm (2 CH) (2 carbones vinylique) ; 68,2 ppm (CH) (C2, CH en α de OH) ; 45,2 ppm (CH₂) (C18, en α du chlore) ; 39,4 ppm (CH₂) (C3, en β de OH) ; 32,7 (CH₂) (CH₂ en β du chlore) ; 29,7 ppm (CH₂) ; 29,6 ppm (CH₂) (plusieurs sont superposés) ; 29,3 ppm ; 28,9 ppm (CH₂) ; 27,2 ppm (CH₂) ; 26,9 ppm (CH₂) ; 25,8 (CH₂) ; 23,5 ppm (CH₃) (C1)

IR (NaCl):

 $v_{max} = 3357 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 2927 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2854 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 1464 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1373 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1126 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 724 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}$

VIII. Partie expérimentale

18-chloro-Z-octadéc-9-èn-2-yl ester d'acide méthanesulfonique (= 18-chloro-2-mésyloxy-Z-octadéc-9-ène)

 $\underset{H_{3}C}{\overset{OMs}{\longleftarrow}}_{(CH_{2})_{5}} \underbrace{(CH_{2})_{8}CI}_{(CH_{2})_{8}}$

III-14; C₁₉H₃₇ClO₃S; PM: 381,01

Activation de III-13 par formation de l'ester mésylique

130,3 mg de chlorure de mésyle (dilué dans 1 ml de dichlorométhane ; 1,14 mmoles ; PM = 114,55) sont rajoutés à une solution de 256 mg de 18-chloro-Z-heptadéc-9-èn-2-ol (0,84 mmoles ; PM = 302,93) dans du dichlorométhane (10 ml ; séché et distillé sur de l'hydrure de calcium). A température ambiante 131,5 mg de triéthylamine (diluée dans 1 ml de dichlorométhane ; 1,3 mmoles ; PM = 101,19) sont rajoutés au milieu réactionnel. Après ¹/₂ heure d'agitation le milieu réactionnel devient jaune. L'analyse par chromatographie sur couche mince montre alors que tout l'alcool est transformé (élution avec 40 % de diéthyléther dans de l'hexane).

Le milieu réactionnel est repris dans un ballon monocol de 100 ml, et les solvants sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le solide récupéré est repris dans du dichlorométhane (50 ml) et lavé avec une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (30 ml). La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium pendant ½ heure, et elle est filtrée sur Célite. Les solvants sont évaporés, et l'ester mésylique brut est récupéré sous forme d'un solide jaunâtre.

 $\mathbf{Rf} = 0.35$; éluant : 40 % d'éther dans l'hexane

1,17-diazido-Z-octadéc-9-ène :

 $\overset{N_{3}}{\vdash}_{(CH_{2})_{5}} \underbrace{(CH_{2})_{8}N_{3}}_{(CH_{2})_{8}}$

III-15; $C_{18}H_{34}N_6$; PM = 334,50

Formation du diazoture III-15

0,65 mmoles de 18-chloro-2-mésyloxy-Z-octadéc-9-ène (brut de la réaction précédente), dissous dans 10 ml de DMF, sont chauffés à 60°C en présence de 422,6 mg

d'azoture de sodium (6,5 mmoles ; PM = 65,01). La réaction se fait dans un ballon monocol de 25 ml surmonté d'un réfrigérant vigreux. Après 18 h le milieu réactionnel est refroidi, et 10 ml d'eau sont rajoutés à froid (0°C). Le milieu réactionnel est extrait à l'éther. La phase organique est séchée sur du MgSO₄ (½ heure), et elle est filtrée sur Célite. Les solvants sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif. Une analyse par chromatographie sur couche mince révèle que tout le produit de départ est consommé. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (3 x 20 cm ; éluant 1 % de diéthyléther dans de l'hexane) (Le brut n'est pas entièrement soluble dans l'éluant ; en effet, lors de la dilution du brut il y a formation de 2 phases non miscibles ; ceci indique que le brut contient trop de DMF insoluble dans l'hexane).

178,8 mg de diazoture sont récupérés, ce qui correspond à 0,53 mmoles et à un rendement de 86%. Ce diazoture est insoluble dans le méthanol.

Rf = 0,15 (1 % éther dans l'hexane) ; révélation à la vanilline-acide : coloration rose-brun

¹H-RMN (dans CDCl₃) :

5,33 ppm ; triplet, J = 4,7 ; 2 H ; 2 protons vinyliques 3,30- 3,47 ppm ; multiplet ; 1 H ; proton en α de N₃ sur C17 3,24 ppm ; triplet ; J = 6,9 Hz ; 2 H ; CH₂ en α du N₃ en C1 1,95-2,05 ppm ; multiplet (forme de doublet) ; 2 H ; 2 CH₂ allyliques 1,40-1,65 ppm ; multiplet ; 4 H ; 2 CH₂ en β des N₃ 1,25-1,45 ppm ; multiplet ; 18 H ; 9 CH₂ de la chaîne 1,23 ppm ; doublet ; J = 6,5 Hz ; 3 H ; 1 CH₃, protons du C1 de la chaîne

¹³C-RMN (CDCl₃) :

129,9 ppm (CH) (vinylique) ; 129,8 ppm (CH) (vinylique) ; 58,0 ppm (CH) (C17, CH en α de N_3) ; 51,5 ppm (CH₂) (C1, en α de N_3) ; 36,2 ppm (CH₂) (C16, en β de N_3) ; 29,7 ppm (CH₂) ; 29,4 ppm (CH₂) ; 29,3 ppm (CH₂) (plusieurs sont superposés) ; 28,9 ppm (CH₂) ; 27,2 ppm (CH₂) ; 26,7 ppm (CH₂) ; 26,1 (CH₂) ; 19,5 ppm (CH₃) (C18)

Harmonine, dichlorhydrate du 1,17-diamino-Z-octadéc-9-ène :

 $\overset{\text{h}}{H_3}C \xrightarrow{(CH_2)_5} (CH_2)_8 \overset{\text{h}}{H_3} + 2 \text{ Cl}^-$ *rac*-harmonine ; C₁₈H₄₀Cl₂N₂ ; PM = 355,43

Réduction du diazoture III-15 pour former l'harmonine racémique

79,6 mg de 1,17-diazido-Z-octadéc-9-ène (0,238 mmoles ; PM = 334,51) sont introduits dans un pilulier de 3 ml. L'azide est mis en solution dans un mélange de 500 µl de THF et de 50 µl de H₂O. 323,9 mg triphénylphosphine (1,235 mmoles ; PM=262,3) sont rajoutés en petites portions. Après chaque rajout nous attendons que le dégagement gazeux s'atténue. Après l'ajout complète de la triphénylphosphine, le pilulier est refermé avec un bouchon en plastique transpercé par une aiguille de seringue. La réaction se fait à température ambiante pendant une semaine, sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté de 5 mm. Le milieu réactionnel est repris dans 100 ml de diéthyléther, et filtré sur papier filtre. La diamine est précipitée par du gaz chlorhydrique séché par passage à travers de l'acide sulfurique concentré. Le HCl gaz est préparé par action de 5 ml de H₂SO₄ sur une pâte de chlorure d'ammonium et d'acide chlorhydrique concentré. Lors de l'action du gaz HCl sur le brut réactionnel il se forme un précipité dense qui est recueilli par filtration sur du papier filtre ; il est relavé à l'éther. Après séchage sous vide, 64 mg de chlorhydrate de la harmonine racémique sont ainsi obtenus, ce qui correspond à 0,18 mmoles et équivaut à un rendement de 75,6 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,19$; éluant : méthanol-CH₂Cl₂-ammoniaque (40 % aqueux) 10/10/1; révélation à l'iode après chauffage de la plaque de CCM pour évaporer toute trace d'ammoniaque et d'eau

¹H-RMN (méthanol-4d) :

5,32 ppm ; triplet ; J = 4,7 ; 2 H ; 2 protons vinyliques

3,15 - 3,3 ppm ; multiplet ; 1 H ; proton en α de NH₃⁺ sur C17

2,88 ppm ; triplet ; J = 7,8 Hz ; 2 H ; CH₂ en α de NH₃⁺ sur carbone 1

1,95 - 2,05 ppm ; multiplet (forme de doublet) ; 4 H ; 2 CH_2 allyliques

1,45 - 1,72 ppm ; multiplet ; 4 H ; 1 CH_2 en β de NH_3^+ sur carbone 2 et 1 CH_2 en β de NH_3^+ sur carbone 16

1,25 - 1,35 ppm ; multiplet ; 18 H ; 9 CH₂ de la chaîne

1,26 ppm; doublet; J = 6,6 Hz; 3 H; 1 CH₃, protons du C1 de la chaîne

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

130,9 ppm (CH) (vinylique) ; 130,8 ppm (CH) (vinylique) ; 49,2 ppm (CH) (C17, CH en α de l'amine) ; 40,9 ppm (CH₂) (C1, en α de NH₂) ; 35,9 ppm (CH₂) (C16, en β de NH₂); 30,9 ppm (CH₂) ; 30,3 ppm (CH₂) ; 28,6 ppm (CH₂) ; 28,2 ppm (CH₂) ; 27,6 ppm (CH₂) ; 26,5 ppm (CH₂) ; 18,8 (CH₃) (C18)

microanalyse :

 $C: 61,04 \ \% \ (calc.: 60,83 \ \%) \ ; \ H: 11,41 \ \% \ (calc.: 11,34 \ \%) \ ; \ N: 7,80 \ \% \ (calc.: 7,88 \ \%)$

IR (KBr):

 $v_{max} = 3550 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 3473 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 3415 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 3236 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 3002 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 2926 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2854 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2033 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1637 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1618 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1506 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1466 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1394 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1208 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 619 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 476 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}$

spectre de masse en électrospray (ES, 50 V) :

La fragmentation est plus importante pour les espèces dichargées, ce qui indique que ces pics supplémentaires correspondent effectivement à une fragmentation des amines et non à une contamination de l'échantillon.

rac-harmonine, masse monoisotopique 282,30

284,3 ; moyen ; M' + H⁺ (1 isotope lourd) ; calc. : 284,32

283,3 ; fort ; $M + H^{\scriptscriptstyle +}$; calc. : 283,31

267,2 ; moyen ; $M' + H^+$ - NH_3 ; calc. : 267,29

266,2 ; fort (maximum) ; $M + H^+$ - NH_3 ; calc. : 266,28

142,2 ; fort ; fragmentation au niveau de la double liaison ; fragment + H⁺ ; calc. : 142,16

210,2 (faible) ; 198,1 (faible) ; 184,2 (faible) ; 170,2 (faible) ; 156,2 (faible) ; 114,1 (faible) ;

105,7 (faible) : fragmentation de la chaîne hydrocarbonée (?)

L'harmonine naturelle, isolée, a exactement le même spectre (maximum pour 142,2)

8.2.2. Synthèse de diamines analogues de l'harmonine :

La synthèse des diamines analogues de l'harmonine suit la même voie de synthèse que l'harmonine. Nous n'allons donc donner que l'analyse de structure de certains intermédiaires et des produits finaux.

8.2.2.1. Synthèse du *cis*-1,18-diaminooctadéc-9-ène :

Z-1,18-octadéc-9-ènediol :

III-20 ; $C_{18}H_{40}Cl_2N_2$; PM = 354,26

La préparation est détaillée dans la partie théorique

¹H-RMN (méthanol-4d) :

5,33 ppm ; triplet ; J = 4,6 ; 2 H ; 2 protons vinyliques

4,84 ppm ; singulet ; 2 H ; protons échangeables, solvant

3,52 ppm ; triplet ; J = 6,5 Hz ; 4 H ; 2 CH₂ en α du OH

1,92-2,10 ppm ; multiplet sous forme de doublet, pics maj. : 2,03 ppm, 2,00 ppm ; 4 H ; 2 CH₂ allyliques

1,42-1,61 ppm ; multiplet, pics maj. : 1,54 ppm, 1,51 ppm, 1,48 ppm ; 4 H ; 2 CH_2 en β du OH

1,23-1,42 ppm ; multiplet centré sur 1,31 ppm ; 20 H ; 10 CH_2 de la chaîne

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

130,9 ppm (CH) (carbone vinylique); 63,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α de OH); 33,8 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OH); 30,9 (CH₂); 30,7 ppm (CH₂) (2 CH₂ superposés); 30,4 ppm (CH₂); 28,2 ppm (CH₂); 27,0 ppm (CH₂)

1,18-diazido-Z-octadéc-9-ène :

III-22 ; $C_{18}H_{34}N_6$; PM = 334,50

La préparation est détaillée dans la partie théorique

¹H-RMN (CDCl₃):

5,35 ppm ; triplet ; J = 4,6 ; 2 H ; 2 protons vinyliques

3,26 ppm ; triplet ; J = 6,9 Hz ; 4 H ; 2 CH₂ en α du N₃

1,92-2,10 ppm ; multiplet sous forme de doublet, pics maj. : 2,03 ppm, 2,00 ppm ; 4 H ; 2 CH₂ allyliques

1,50-1,70 ppm ; multiplet, pics maj. : 1,63 ppm, 1,60 ppm, 1,57 ppm ; 4 H ; 2 CH₂ en β de N₃ 1,20-1,50 ppm ; multiplet centré sur 1,31 ppm ; 20 H ; 10 CH₂ de la chaîne

13 C-RMN (CDCl₃) :

129,9 ppm (CH) (carbone vinylique) ; 51,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α de N₃) ; 29,7 (CH₂) ; 29,4 ppm (CH₂) ; 29,2 ppm (CH₂) (2 CH₂ superposés); 28,9 ppm (CH₂) ; 27,2 ppm (CH₂) ; 26,7 ppm (CH₂)

dichlorhydrate du 1,18-diamino-Z-octadéc-9-ène :

18-2N-cis ; $C_{18}H_{40}Cl_2N_2$; PM = 355,43

La préparation est détaillée dans la partie théorique

RMN ¹H (méthanol-4d) :

5,34 ppm ; triplet ; J = 4,6 ; 2 H ; 2 protons vinyliques

4,87 ppm ; singulet ; 6 H ; protons des ammoniums

2,91 ppm ; triplet ; J = 7,6 Hz ; 4 H ; 2 CH_2 en α du ${\rm NH_3^+}$

1,90-2,10 ppm ; multiplet sous forme de doublet, pics maj. : 2,04 ppm, 2,01 ppm ; 4 H ; 2 CH_2 allyliques

1,52-1,75 ppm ; multiplet centré sur 1,65 ppm $\,$; 4 H ; 2 CH_2 en β du NH_3^+

1,21-1,47 ppm ; multiplet centré sur 1,34 ppm ; 20 H ; 10 CH_2 de la chaîne

VIII. Partie expérimentale

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

130,9 ppm (CH) (carbone vinylique) ; 40,9 ppm (CH₂) (CH₂ en α de NH₃⁺) ; 30,9 (CH₂) ; 30,5 ppm (CH₂) ; 30,3 ppm (CH₂) (2 CH₂ superposés); 28,6 ppm (CH₂) ; 28,2 ppm (CH₂) ; 27,5 ppm (CH₂)

microanalyse :

C: 61,23 % (calc. : 60,83 %); H: 11,42 % (calc. : 11,34 %); N: 7,82 % (calc. : 7,88 %)

IR (KBr):

 $v_{max} = 3550 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 3477 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 3415 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 3007 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2921 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2850 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2061 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1638 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1616 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1507 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 1468 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1396 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1142 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1072 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 979 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 918 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 723 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 621 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 474 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}$

7.2.2.2. Synthèse du 1,18-diaminooctadéc-9-yne :

1,18-octadéc-9-ynediol :

III-23; $C_{18}H_{34}O_2$; PM = 282,46

La préparation est décrite dans le chapitre III

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,80 ppm ; singulet ; 2 H ; protons des hydroxyles 3,49 ppm ; triplet ; J = 6,5 Hz ; 4 H ; 2 CH₂ en α du OH 1,97-2,20 ppm ; triplet non résolu centré sur 2,07 ppm ; 4 H ; 2 CH₂ propargyliques 1,23-1,42 ppm ; massif de 2 multiplets centrés sur 1,36 ppm et 1,29 ppm ; 24 H ; 10 CH₂ de la chaîne et 2 CH₂ en β de OH

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

81,0 ppm (CH) (carbone de la triple liaison) ; 63,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α de OH) ; 33,7 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OH) ; 30,6 (CH₂) ; 30,3 ppm (CH₂) (2 CH₂ superposés) ; 29,9 ppm (CH₂) ; 27,0 ppm (CH₂) ; 19,4 ppm (CH₂) (CH₂ propargylique)

1,18-diazidooctadéc-9-yne :

III-24 ; $C_{18}H_{32}N_6$; PM = 332,49

La préparation est décrite dans le chapitre III

¹H-RMN (CDCl₃):

3,28 ppm ; triplet ; J = 6,9 Hz ; 4 H ; 2 CH₂ en α du N₃ 2,16 ppm ; triplet ; J = 6,8 Hz ; 4 H ; 2 CH₂ propargyliques 1,52-1,69 ppm ; multiplet, pics maj. : 1,65 ppm, 1,62 ppm, 1,59 ppm ; 4 H ; 2 CH₂ en β de N₃ 1,23 - 1,52 ppm ; multiplet centré sur 1,34 ppm ; 20 H ; 10 CH₂ de la chaîne

13 C-RMN (CDCl₃) :

80,2 ppm (CH) (carbone de la triple liaison); 51,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α de N₃); 29,1 (CH₂) (3 CH₂ superposés); 28,8 ppm (CH₂); 28,7 ppm (CH₂); 26,7 ppm (CH₂); 18,7 ppm (CH₂) (CH₂ propargylique)

dichlorhydrate de 1,18-diaminooctadéc-9-yne :

18-2N-triple ; $C_{18}H_{38}Cl_2N_2$; PM = 353,41

La préparation est décrite dans le chapitre III

¹H-RMN (méthanol-4d) :

2,70 ppm ; triplet ; J = 6,9 Hz ; 4 H ; CH_2 en α des NH_3^+ 2,27 ppm ; singulet ; 6 H ; protons des ammoniums 2,03-2,20 ; triplet non résolu centré sur 2,13 ppm ; 4 H ; 2 CH₂ propargyliques 1,20-1,48-1,65 ppm ; massif de 2 multiplets centrés sur 1,43 ppm et 1,31 ppm ; 24 H ; 10 CH₂ de la chaîne et 2 CH₂ en β de NH_3^+

RMN ¹³C (méthanol-4d) :

80,9 ppm (CH) (carbone de la triple liaison) ; 40,8 ppm (CH₂) (CH₂ en α de NH₃⁺) ; 30,3 ppm (CH₂) ; 30,2 ppm (CH₂) ; 30,0 ppm (CH₂) ; 29,8 ppm (CH₂) ; 28,6 ppm (CH₂) ; 27,5 ppm (CH₂) ; 19,4 ppm (CH₂) (CH₂ propargylique)

VIII. Partie expérimentale

microanalyse : déviation de 0,91 % pour l'analyse du carbone C : 60,61 % (calc. : 61,17 %) ; H : 10,85 % (calc. : 10,84 %) ; N : 7,83 % (calc. : 7,93 %)

8.2.2.3. Synthèse de diamines saturées :

dichlorhydrate du 1,18-diaminooctadécane :

 $\textbf{18-2N-sat} \text{ ; } C_{18}H_{42}Cl_2N_2 \text{ ; } PM = 357,44$

La préparation est décrite dans le chapitre III

RMN ¹H (méthanol-4d) :

4,82 ppm ; singulet ; 6 H ; protons des ammoniums

2,86 ppm ; triplet ; J = 7,6 Hz ; 4 H ; 2 CH₂ en α des NH₃⁺

1,50-1,68 ppm ; multiplet, pics maj. : 1,64 ppm, 1,61 ppm, 1,57 ppm ; 4 H ; 2 CH₂ en β de $\rm NH_3^+$

1,20-1,38 ppm ; multiplet ; pic min : 1,31 ppm ; pic maj. : 1,25 ppm ; 28 H ; 14 CH_2 de la chaîne

¹³C-RMN : diamine est trop peu soluble

microanalyse :

C : 60,64 % (calc. : 60,48 %) ; H : 11,92 % (calc. : 11,84 %) ; N : 7,79 % (calc. : 7,84 %)

IR (KBr):

 $v_{max} = 3550 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 3475 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 3415 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 3231 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 3002 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2919 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2849 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2027 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1638 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1618 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1518 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1469 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1401 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1137 \text{ cm}^{-1}$

1,20-diaminoeicosane :

20-2N-sat ; $C_{20}H_{46}Cl_2N_2$; PM = 385,50

La préparation est détaillée dans la partie théorique

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,84 ppm ; singulet ; 6 H ; protons des ammoniums 2,88 ppm ; triplet ; J = 7,6 Hz ; 4 H ; 2 CH₂ en α des NH₃⁺ 1,52-1,68 ppm ; multiplet centré sur 1,62 ppm ; 4 H ; 2 CH₂ en β de NH₃⁺ 1,22-1,40 ppm ; multiplet ; pic min : 1,33 ppm ; pic maj. : 1,26 ppm ; 32 H ; 16 CH₂ de la chaîne

¹³C-RMN : diamine est trop peu soluble

microanalyse :

C : 62,49 % (calc. : 62,31 %) ; H : 12,13 % (calc. : 12,03 %) ; N : 7,23 % (calc. : 7,27 %)

1,16-diaminohexadécane :

16-2N-sat ; $C_{16}H_{38}Cl_2N_2$; PM = 329,39

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,82 ppm ; singulet ; 6 H ; protons des ammoniums

2,87 ppm ; triplet ; J = 7,6 Hz ; 4 H ; 2 CH₂ en α des NH₃⁺

1,52-1,70 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,65 ppm, 1,62 ppm, 1,58 ppm ; 4 H ; 2 CH_2 en β de $\rm NH_3^+$

1,18-1,40 ppm ; multiplet ; pic min : 1,31 ppm ; pic maj. : 1,26 ppm ; 24 H ; 12 CH₂ de la chaîne

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

40,8 ppm (CH₂) (CH₂ en α de NH₃⁺) ; 30,8 (CH₂) (2 CH₂ superposés) ; 30,7 ppm (CH₂) ; 30,6 ppm (CH₂) ; 30,3 ppm (CH₂) ; 28,6 ppm (CH₂) ; 27,5 ppm (CH₂)

microanalyse : déviation de 5,5 % pour l'analyse de l'azote C : 58,65 % (calc. : 58,34 %) ; H : 11,41 % (calc. : 11,63 %) ; N : 8,03 % (calc. : 8,50 %)

1,14-diaminotétradécane :

 $C_{14}H_{34}Cl_2N_2$; PM = 301,34

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,84 ppm ; singulet ; 6 H ; protons des ammoniums 2,94 ppm ; triplet ; J = 7,6 Hz ; 4 H ; 2 CH₂ en α des NH₃⁺ 1,52-1,70 ppm ; multiplet centré sur 1,68 ppm ; 4 H ; 2 CH₂ en β de NH₃⁺ 1,28-1,45 ppm ; multiplet ; pic min : 1,39 ppm ; pic maj. : 1,33 ppm ; 20 H ; 10 CH₂ de la chaîne

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

40,8 ppm (CH₂) (CH₂ en α de NH₃⁺) ; 30,7 (CH₂) ; 30,7 ppm (CH₂) ; 30,5 ppm (CH₂) ; 30,2 ppm (CH₂) ; 28, 6 ppm (CH₂) ; 27,5 ppm (CH₂)

microanalyse :

C : 55,46 % (calc. : 55,80 %) ; H : 11,33 % (calc. : 11,37 %) ; N : 9,29 % (calc. : 9,30 %)

8.2.3. Synthèse de la triamine Tri-8 :

1,17-bis-benzyloxy-9-(8-benzyloxy-octyl)-heptadécan-9-ol:



T1; $C_{46}H_{70}O_4$; PM = 687,05

Formation de l'alcool tertiaire T1

121 mg de tournures de magnésium (Mg ; 5 mmoles ; PM=24,31) sont introduits dans un bicol de 25 ml (séché à l'étuve) surmonté d'un réfrigérant. 1496 mg de 8-bromo-1benzoxyoctane (5 mmoles ; PM=299,26) sont pesés dans un ballon piriforme (séché à l'étuve) et dissous dans 4 ml de diéthyléther (distillé sur du sodium-benzophénone) sous argon. Le bromure est additionné sur le magnésium par seringue à travers d'un sérum cap par portions de 0,5 ml. La réaction est initiée par chauffage par un sèche cheveux, et elle démarre sans problème. Le reflux est entretenu par rajout successif du bromure. A la fin du rajout, le milieu réactionnel est mis sous léger reflux pendant 1 heure. 157,5 mg de diéthylcarbonate (1,33 mmoles ; 1 / 3,75 éq. ; PM=118,13) dissous dans 4 ml de diéthyléther sont rajoutés pendant un quart d'heure. La réaction est laissée à température ambiante pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est versé sur une solution saturée en NH₄Cl, et elle est extraite avec de l'éther. La phase éthérée est séchée par du sulfate de magnésium et elle est filtrée sur Célite. Le brut réactionnel obtenu après évaporation des solvants est purifié par chromatographie sur silice (3 x 20 cm ; 30 % d'éther dans de l'hexane). L'alcool tertiaire élue très vite avec une bonne séparation. 454 mg de **T1** sont obtenus, ce qui correspond à 0,66 mmoles et équivaut à un rendement de 50 % par rapport au diéthylcarbonate.

 $\mathbf{Rf} = 0,13$; éluant : 30 % d'éther dans de l'hexane ; révélation à la vanilline (noir)

¹H-RMN (CDCl₃) :

7,25-7,45 ppm ; multiplet ; 15 H ; 3 phényles 4,55 ppm ; singulet ; 6 H ; 3 O<u>CH</u>₂Ph 3,51 ppm ; triplet ; J = 6,6 Hz ; 6 H ; 3 <u>CH</u>₂OBn 1,57-1,78 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,70 ppm, 1,67 ppm, 1,63 ppm ; 6 H ; 3 <u>CH</u>₂CH₂OBn 1,21-1,54 ppm ; multiplet ; pic maj. : 1,35 ppm ; 37 H ; 18 CH₂ intrachaîne

13 C-RMN (CDCl₃) :

138,8 ppm (C₀) (phényle, C1') ; 128,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5') ; 127,7 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,5 ppm (CH) (phényle, C4') ; 74,5 ppm (C₀) (carbone tertiaire portant OH) ; 72,9 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 70,6 ppm (CH₂) (CH₂ en α du OBn) ; 39,4 ppm (CH₂) (en β de OH tertiaire) ; 30,3 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OBn) ; 29,8 ppm (CH₂) (chaîne) ; 29,7 ppm (CH₂) (chaîne) ; 29,5 ppm (CH₂) (chaîne) ; 26,3 ppm (CH₂) (chaîne) ; 23,5 ppm (CH₂) (chaîne)

IR (NaCl) :

 $v_{max} = 3090 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 3066 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 3030 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 2929 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2851 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2791 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1492 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1454 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1362 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1306 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1205 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1101 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 1025 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 734 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 697 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}$

1,17-dibenzyloxy-9-(8-benzyloxy-octyl)-heptadec-9-ène :



T2; $C_{46}H_{68}O_3$; PM = 669,03

Obtention de l'alcène trisubstitué par déshydratation de l'alcool tertiaire T1 :

231,5 mg de l'alcool tertiaire **T1** (0,337 mmoles ; PM=687,06) sont dissous dans 50 ml de toluène dans un ballon de 100 ml surmonté d'un piège d'eau de type Dean-Stark. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux en présence de 13,5 mg d'acide paratoluènesulfonique (0,07 mmoles ; PM=190,22). Le chauffage est arrêté après 2 heures (l'analyse CCM ne montre plus d'évolution), et le toluène est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice (3 x 17 cm ; 10 % éther dans l'hexane). 215,3 mg d'alcène sont obtenus sous forme d'un solide blanc amorphe, ce qui correspond à 0,322 mmoles et équivaut à un rendement de 96 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,27$; éluant : 10 % éther / hexane ; vanilline

¹H-RMN (CDCl₃) :

7,26-7,45 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,383 ppm ; 15 H ; 3 phényles 5,13 ppm ; triplet ; J = 7,0 Hz ; 1 H ; proton vinylique 3,52 ppm ; triplet ; J = 6,6 Hz ; 6 H ; 3 $\underline{CH_2OBn}$ 1,92-2,09 ppm ; multiplet ; pics maj. : 2,03 ppm, 2,00 ppm ; 6H ; 3 $\underline{CH_2}$ allyliques 1,56-1,75 ppm ; multiplet ; pics maj. 1,67 ppm, 1,64 ppm ; 6 H ; 3 $\underline{CH_2CH_2OBn}$ 1,23-1,50 ppm ; multiplet ; pic maj. 1,35 ppm ; 28 H ; 14 $\underline{CH_2}$ intrachaîne

¹³C-RMN (CDCl₃) :

139,6 ppm (C₀) (phényle, C1') ; 138,8 ppm (C₀) ; 128,4 ppm (CH) (phényle, C3',C5'); 127,6 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,5 ppm (CH) (phényle, C4') ; 124,7 ppm (CH) (CH vinylique) ; 72,9 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 70,6 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy); 37,0 ppm (CH₂) (CH₂ allylique en syn avec H) ; 30,2 ppm (CH₂) (faible) ; 29,8 ppm (CH₂) (fort) ; 29,6 ppm (CH₂) (fort) ; 28,6 ppm (CH₂) (faible) ; 28,3 ppm (CH₂) (faible) ; 27,7 ppm (CH₂) (faible) ; 26,3 ppm (CH₂) (fort) (les signaux des 3 chaînes latérales ne sont que partiellement confondus)

IR (NaCl) :

 $v_{max} = 3083 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 3063 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 3029 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 2926 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2853 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2778 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1946 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1604 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1496 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1454 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1362 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1307 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1204 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1102 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 1069 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1028 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 734 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 696 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}$

9-(8-hydroxy-octyl)-heptadécane-1,17-diol :



T3 ; $C_{25}H_{52}O_3$; PM = 400,68

Hydrogénation de l'alcène **T2** pour former le triol **T3** :

Le produit tribenzylé **T2** est insoluble dans l'éthanol, solvant classique pour les hydrogénations au palladium. 215 mg de l'alcène (0,321 mmoles, PM=669,04) sont dissous dans 8 ml d'acétate d'éthyle et placés dans un ballon bicol de 25 ml sous argon. 20 mg de Pd/C (5 %) sont introduits dans le ballon bicol, puis l'argon est remplacé par du dihydrogène (cycles de vide-H₂). L'hydrogénation se fait pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est filtré sur du papier filtre et le filtre est lavé avec un mélange de méthanol-dichlorométhane (50 : 50). Les solvants sont évaporés. Une analyse par chromatographie sur couche mince montre que la débenzylation est complète. La purification par chromatographie sur colonne de silice (3 x 17 cm ; éluant : 65 % AE/hexane) fournit 145 mg de produit, dont l'analyse par RMN révèle que la double liaison trisubstituée n'est que partiellement hydrogénée. Ce triol est repris dans de l'éthanol, et il est remis à hydrogéner dans de l'éthanol pendant 4 heures en présence de 20 mg de Pd/C 5 %. Une purification comme celle qui est décrite permet d'isoler 102 mg de triol saturé, ce qui correspond à 0,25 mmoles et équivaut à un rendement de 79 %.

 $\mathbf{Rf} = 0.15$; 50 % d'acétate d'éthyle dans de l'hexane ; révélation à la vanilline

¹H-RMN (CDCl₃) :

3,59 ppm ; triplet ; J = 6,6 Hz ; 6 H ; $3 CH_2OH$

2,23 ppm ; singulet ; 3H ; 3 OH ; déplacement dépend de la concentration

1,43-1,62 ppm ; multiplet (forme de quintuplet) ; pics maj. : 1,57 ppm, 1,53 ppm, 1,50 ppm, 1,47 ppm ; 6 H ; 3 <u>CH₂CH₂OH</u>

1,00-1,43 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,27 ppm, 1,20 ppm, ; 37 H ; 18 CH $_2$ intrachaîne et H central

$^{13}\text{C-RMN}(\text{CDCl}_3)$:

62,9 ppm (CH₂) (CH₂ en α de OH) ; 37,3 ppm (CH) (CH du centre de la molécule) ; 33,7 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OH) ; 32,8 ppm (CH₂) (CH2 en γ de OH) ; 30,0 ppm (CH₂) (chaîne) ; 29,6 ppm (CH₂) (chaîne) ; 29,5 ppm (CH₂) (chaîne) ; 26,6 ppm (CH₂) (chaîne) ; 25,8 ppm (CH₂) (chaîne)

1,17-diazido-9-(8-azido-octyl)-heptadécane :



 $\textbf{T4} \text{ ; } C_{25}H_{49}N_9 \text{ ; } PM = 475,72$

Activation du triol T3 par permésylation :

168,8 mg de triol **T3** (0,421 mmoles, 1 éq., PM = 400,68) sont dissous dans 15 ml de CH₂Cl₂. 253 mg de chlorure de mésyle, dissous dans 2 ml de dichlorométhane, sont rajoutés. A température ambiante 255 mg de triéthylamine, dissous dans 2 ml de dichlorométhane, sont additionnés goutte à goutte au milieu réactionnel. La réaction est laissée sous agitation pendant une heure. Une analyse CCM révèle qu'il reste du produit de départ. 125 mg de chlorure de mésyle et 125 mg de Et₃N sont rajoutés. Après une demie heure, le milieu réactionnel est devenu jaune et une analyse CCM montre que la réaction est terminée. Les solvants sont évaporés à l'aide d'un évaporareur rotatif, et le résidu est repris dans du dichlorométhane (100 ml). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaHCO₃. La phase aqueuse est réextraite au dichlorométhane ; les phases organiques réunies sont séchées par du sulfate de magnésium. La phase organique est filtrée sur Célite et séchée sous vide. Nous récupérons un brut jaune.

Rf (ester mésylique) = 0,75 ; éluant : 70 % d'AE dans de l'hexane ; révélation à la vanilline ; couleur bleu-noir

Conversion en triazoture T4 :

Le trimésylate brut est dissous dans 10 ml de diméthylformamide (DMF) dans un ballon de 25 ml et 410 mg d'azoture de sodium sont rajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à l'aide d'un bain d'huile à 65-70° C pendant 18 heures. Après refroidissement du milieu, 25 ml d'eau sont ajoutés. Le milieu est extrait avec de l'éther (3 x 100 ml). Les phases organiques réunies sont lavées avec 50 ml d'eau, puis elles sont séchées par du sulfate de magnésium (filtration sur Célite, évaporation). Le brut est chromatographié sur colonne de silice (3 x 17 cm, éluant : 300 ml de 1 % d'éther dans de l'hexane, puis 2,5 % éther dans l'hexane). Le composé sort très vite de la colonne lors de l'élution avec ce deuxième solvant ; il migre par contre très peu sur colonne de silice avec 1 % d'éther dans de l'hexane. 183 mg de triazoture sont récupérés, ce qui correspond à 0,385 mmoles et équivaut à un rendement de 91 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,61$; éluant : 2,5 % d'éther dans de l'hexane ; la révélation à la vanilline-acide donne une couleur brun-rose faible

¹H-RMN (CDCl₃) :

3,28 ppm ; triplet ; J = 6,9 Hz ; 6 H ; 3 \underline{CH}_2N_3

1,52-1,72 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,63 ppm, 1,60 ppm, ; 6 H ; 3 <u>CH₂CH₂N₃</u>

1,12-1,50 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,34 ppm, 1,25 ppm ; 37 H ; 18 CH_2 intrachaîne et 1 H central

13 C-RMN (CDCl₃) :

51,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α de N₃) ; 37,4 ppm (CH) (embranchement) ; 33,7 ppm (CH₂) (CH₂ en β de N₃) ; 30,0 ppm (CH₂) (chaîne) ; 29,5 ppm (CH₂) (chaîne) ; 29,2 ppm (CH₂) (chaîne) ; 28,9 ppm (CH₂) (chaîne) ; 26,7 ppm (CH₂) (2 CH₂ de la chaîne hydrocarbonée qui donnent des signaux superposés)

IR (NaCl):

 $v_{max} = 3329 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 2926 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2855 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 2511 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 2094 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 1465 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1369 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 1348 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1288 \text{ cm}^{-1} \text{ (moyen)}; 1258 \text{ cm}^{-1} \text{ (fort)}; 920 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 896 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 758 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}; 723 \text{ cm}^{-1} \text{ (faible)}$

VIII. Partie expérimentale

triamine Tri-8, trichlorhydrate de la 9-(8-amino-octyl)-heptadécane-1,17-diamine :

$$(CH_2)_8NH_2$$

 $(CH_2)_8NH_2$
 $(CH_2)_8NH_2 * 3 HC1$

Tri-8; $C_{25}H_{58}C_{13}N_3$; PM = 507,11

Réduction du triazoture T4, et formation du trichlorhydrate de la triamine Tri-8

158 mg de triazoture (0,332 mmoles, PM = 475,72) sont introduits dans un pilulier de 5 ml et ils sont dissous dans 800 μ l de THF et 80 μ l d'eau. Par petites portions 522,5 mg de triphénylphosphine sont ajoutés de façon à ce que la réaction se calme après chaque ajout. La réaction est accompagnée d'un fort dégagement gazeux, mais la réaction reste contrôlée (peu d'échauffement). Après une semaine sous agitation, le milieu réactionnel reste homogène sans formation de précipité.

Afin d'arrêter la réaction, le milieu réactionnel est dilué dans 100 ml de CH_2Cl_2 . Il est filtré sur du papier filtre, ce qui enlève des traces d'eau résiduelles. La triamine **Tri-8** est précipitée par du HCl gazeux (sec, cf. harmonine). Le précipité dense qui se forme initialement change d'aspect lorsqu'un excès de HCl barbote à travers la solution ; il semble prendre un aspect vitrifié et il se dépose sur les parois du ballon. La solution est filtrée sur du papier filtre. L'essentiel du précipité reste au fond du ballon et il est lavé plusieurs fois avec du solvant neuf. Au total, 118 mg du chlorhydrate de la triamine sont récupérés, ce qui correspond à 0,233 mmoles et équivaut à un rendement de 70 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,09 \text{ ppm}$; éluant : méthanol-CH₂Cl₂-ammoniaque 10/10/1 ; révélation faible à la vanilline ; couleur brune

¹H-RMN (méthanol-4d) :

2,88 ppm ; triplet ; J = 7,6 Hz ; 6 H ; 3 <u>CH₂NH₂</u> 1,50-1,72 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,66 ppm, 1,62 ppm, 1,59 ppm ; 6 H ; 3 <u>CH₂CH₂NH₂</u> 1,10-1,46 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,31 ppm, 1,22 ppm ; 37 H ; 18 CH₂ intrachaîne et 1 H central

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

40,9 ppm (CH₂) (CH₂ en α de NH₃⁺); 38,8 ppm (CH) (embranchement) ; 34,9 ppm (CH₂) (CH₂ en β de NH₃⁺) ; 31,2 ppm (CH₂) (chaîne) ; 30,6 ppm (CH₂) (chaîne) ; 30,4 ppm (CH₂) (chaîne) ; 28,7 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,9 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,6 ppm (CH₂) (chaîne)

microanalyse : Tri-8

 $C: 56,37 \ \% \ (calc.: 59,21 \ \%) \ ; \ H: 10,89 \ \% \ (calc.: 11,53 \ \%) \ ; \ N: 7,99 \ \% \ (calc.: 8,29 \ \%)$

spectre de masse en électronspray (ES, 70 V) :

La fragmentation est plus importante pour les espèces dichargées, ce qui indique que ces pics supplémentaires correspondent effectivement à une fragmentation des amines et non à une contamination de l'échantillon.

Tri-8, masse monoisotopique : 397,44 398,4 ; moyen ; M + H⁺ ; calc : 398,45 399,4 ; faible ; M' + H⁺ (1 isotope lourd) ; calc 399,46 381,4 ; traces ; M + H⁺ – NH₃ ; cal : 381,42 364,4 ; faible ; M+ H⁺ – 2 NH₃ ; calc : 364,40 256,3 ; faible ; fragmentation avec perte d'une chaîne (?) 199,8 ; fort (maximum); $(M + 2 H^+) / 2$; calc : 199,73 191,3 ; moyen ; $(M + 2 H^+ – NH_3) / 2$; calc : 191,21 133,5 ; fort ; $(M + 3 H^+) / 3$; calc : 133,49 170,2 (faible) ; 156,2 (faible) ; 142,2 (faible) ; 128,2 (faible) ; 114,1 (faible) : fragmentation de la chaîne (?)

8.2.4. Synthèse des hexaamines Hex-6 et Hex-4 :

La synthèse de l'hexaamine **Hex-4** suit la même voie de synthèse que **Hex-6**. Nous allons donc nous limiter à détailler la synthèse de **Hex-6**. Les analyses de structure des intermédiaires de synthèse de **Hex-4** sont données.

Triméthylester de l'acide 4-(2-carboxy-éthyl)-4-nitro-heptanedioïque :



H1; $C_{13}H_{21}O_8N$; PM = 319,31

Formation du triester méthylique **H1** par estérification de l'acide 4-(2-carboxyéthyl)-4nitropimélique :

11,09 g d'acide 4-(2-carboxyéthyl)-4-nitropimélique (40 mmoles, PM = 277,24; Fluka), dissous dans 250 ml de méthanol, sont chauffés pendant 3 h à reflux en présence de 380,4 mg d'acide paratoluènesulfonique, puis laissés à température ambiante pendant 12 heures. Le méthanol est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif, et le résidu est séché sous pompe à palettes.

Le brut est purifié par chromatographie sur silice (dimensions : 20 x 6 cm ; éluant : 70 % d'éther dans de l'hexane). Le produit réactionnel n'est que peu soluble dans l'éluant. Nous déposons le mélange constitué de 2 phases sur la colonne.

Le produit purifié est peu soluble dans l'éther ; il est très visqueux. 12,1695 g de l'ester **H1** sont récupérés, ce qui correspond à 38,1 mmoles et équivaut à un rendement de 95 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,38$; éluant : 70 % d'éther dans de l'hexane ; la révélation à la vanilline-acide donne une tache orange

¹H-RMN (CDCl₃) :

3,68 ppm ; singulet ; 9 H ; 3 OMe des esters
2,18-2,38 ppm ; multiplet ; pics maj. : 2,28 ppm, 2,29 ppm ; 12 H ;
3 CH₂ en α de l'ester et 3 CH₂ en β de NO₂ confondus

13 C-RMN (CDCl₃) :

172,2 ppm (C₀) (carbonyle de l'ester) ; 91,9 ppm (1/3 C₀) (carbone tertiaire portant le groupement nitro) ; 52,1 ppm (CH₃) (méthoxy) ; 30,3 ppm (CH₂) (CH₂ en α de l'ester) ; 28,5 ppm (CH₂) (CH₂ en β du nitro)

Triméthylester de l'acide 4-(2-carboxy-éthyl)-heptanedioïque :



H2; $C_{13}H_{22}O_6$; PM = 274,32

Réduction radicalaire du nitrotriester H1 par le HSnBu₃ :

5,821 g de triméthylester de l'acide 4-(2-carboxy-éthyl)-4-nitro-heptanedioïque (10 mmoles, PM = 316,31) sont introduits dans un ballon monocol et dissous dans 6 ml de toluène. Ce ballon est surmonté d'un réfrigérant. 328 mg d'azoisobutyronitrile AIBN (2 mmoles, PM = 164,21) et 5,3 ml d'hydrure de tributylétain (5,821 g de Bu₃SnH, 20 mmoles, PM = 291,05) sont ajoutés. Le milieu réactionnel (MR) est chauffé sur un bain d'huile. La température monte de 23°C à 120° C pendant 20 minutes, puis elle reste à 120°C pendant une heure. Après refroidissement du MR, une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) révèle qu'il reste du produit nitro de départ. 2 mmoles de AIBN sont rajoutés, et le MR est remis à chauffer à 105° C pendant une heure. Après refroidissement du MR une analyse CCM montre que tout le dérivé nitro est consommé. Le toluène est évaporé, et le brut réactionnel est séché sur pompe à palettes.

Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (4,5 x 18 cm) avec comme éluant un mélange de 30 % d'éther dans de l'hexane.

2,045 g de produit purifié sont récupérés, ce qui correspond à 7,453 mmoles et à un rendement de 74,5 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,44$, éluant 60 % d'éther dans de l'hexane

 $\mathbf{Rf} = 0,28$, éluant 30 % d'éther dans de l'hexane ; le triester ne révèle pas à la vanilline, il révèle bien à l'iode

VIII. Partie expérimentale

¹H-RMN (CDCl₃) :

3,66 ppm ; singulet ; 9 H : 3 OMe 2,32 ppm ; triplet ; J = 7,8 Hz ; 6 H α 1,60 ppm ; multiplet sous forme de quadruplet ; 7,3 Hz ; 6 H β 1,25-49 ppm ; heptuplet centré sur 1,38 ppm ; 6,4 Hz ; 1 H ; CH en γ de COOMe

¹³C-RMN (CDCl₃) :

174,0 ppm (C₀) (carbonyle de l'ester) ; 51,6 ppm (CH₃) (méthoxy) ; 36,1 ppm (CH) (CH au centre de la molécule) , 31,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α de l'ester); 27,9 ppm (CH₂) (CH₂ en β de l'ester)

1,19-bis-benzyloxy-10-[9-benzyloxy-3-(6-benzyloxy-hexyl)-3-hydroxy-nonyl]-7,13-bis-(6-benzyloxy-hexyl)-nonadécane-7,13-diol :



H3(6) ; C₈₈H₁₃₀O₉ ; PM = 1331,97

Formation du hexabenzoxytriol **H3(6)** par couplage d'organomagnésiens sur les 3 fonctions esters :

Un ballon bicol de 50 ml est surmonté d'un réfrigérant (verrerie séchée à l'étuve à 120° C puis refroidie sous vide). 121,55 mg de tournures de magnésium (Mg, 5 mmoles, PM=24,31) sont introduits et placés sous argon, le montage étant fermé par des sérum caps. 1,356 g de 6-bromo-1-benzyloxyhexane (5 mmoles, PM=271,20) sont pesés dans un ballon piriforme (séché dans l'étuve), placés sous argon et dissous dans 4 ml d'éther (distillé sur du sodium benzophénone). Cette solution est ajoutée par portions de 0,5 ml sur le magnésium à l'aide d'une seringue. La réaction démarre après le troisième ajout. L'addition se fait pendant 10 minutes, puis le milieu réactionnel est placé 10 minutes à reflux.

109,7 mg de triester **H2** (0.4 mmoles, 1/12 éq.) est dissous dans 15 ml de THF (distillé sur du sodium-benzophénone). Cette solution est ajoutée goutte à goutte sur l'organomagnésien, à l'aide d'une ampoule à addition, pendant ½ heure. La réaction est laissée à 23°C pendant 18 heures. Afin d'arrêter la réaction le milieuréactionnel est versé sur de la glace. Après fonte de la glace, la phase aqueuse est neutralisée par ajout de quelques gouttes de HCl concentré (1 ml). La phase aqueuse est saturée en NaCl et extraite avec de l'éther. La phase organique est

séchée sur du MgSO₄, puis évaporée à sec. Le brut est chromatographié sur une colonne de silice (3 x 17 cm, éluant : 70 % d'éther dans de l'hexane). Le produit ciblé est celui ayant la polarité la plus forte. Lorsque ce produit commence à sortir, les premières fractions sont accompagnés d'un contaminant qui est de polarité légèrement plus faible (révélation forte à la vanilline). Ces fractions mixtes sont repurifiées lors d'une deuxième colonne. Au total 299,4 mg de triol sont récupérés, ce qui correspond à 2,24 mmoles et équivaut à un rendement de 56 %.

 $\mathbf{Rf} = 0.31$; éluant : 70 % d'éther dans de l'hexane ; révélation à la vanilline

¹H-RMN (CDCl₃) :

7,23-7,42 ppm ; multiplet ; pic maj. 7,360 ppm ; 30 H ; 6 phényles 4,53 ppm ; singulet ; 12 H ; 6 O<u>CH₂</u>Ph 3,49 ppm ; triplet ; J = 6,5 Hz ; 12 H ; 6 <u>CH₂</u>OBn 1,54-1,73 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,65 ppm, 1,62 ppm; 12 H ; <u>CH₂CH₂OBn</u> 1,20-1,52 ppm ; multiplet ; pic maj. 1,40 ppm, 1,35 ppm ; 61 H ; 30 CH₂ intrachaîne et 1 H central

¹³C-RMN (CDCl₃) :

138,8 ppm (C₀) (phényle, C1') ; 128,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5') ; 127,6 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,5 ppm (CH) (phényle, C4') ; 74,4 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (carbone tertiaire de l'alcool) ; 72,9 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 70,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 39,2 ppm (CH₂) (en pos 1' de l'alcool tert.) ; 38,9 ppm (1/6 CH) (CH du milieu) ; 36,2 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (en pos 1 de l'alcool tertiaire dans la partie centrale) ; 30,2 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OBn) ; 29,8 ppm (CH₂) (chaîne) ; 26,8 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (en pos. 2 de l'alcool dans partie centrale) ; 26,3 ppm (CH₂) (chaîne) ; 23,5 ppm (CH₂) (chaîne)

1,15-bis-benzyloxy-8-[7-benzyloxy-3-(4-benzyloxy-butyl)-3-hydroxy-heptyl]-5,11-bis-(4-benzyloxy-butyl)-pentadécane-5,11-diol :



H3(4); $C_{76}H_{106}O_9$; PM = 1163,65

 $\mathbf{Rf} = 0.14$, éluant : 70 % d'éther dans de l'hexane ; révélation à la vanilline-acide

La préparation se fait suivant le même mode opératoire que la préparation de H3(6)

¹H-RMN (CDCl₃) :

7,15-7,38 ppm ; multiplet ; pic maj. 7,28 ppm ; 30 H ; 6 phényles

4,45 ppm ; singulet ; 12 H ; 6 OCH_2Ph

3,43 ppm ; triplet ; J = 6,4 Hz ; 12 H ; 6 $\underline{CH_2OBn}$

1,48-1,67 ppm ; multiplet ; pic maj. : 1,57 ppm; 12 H ; 6 CH₂CH₂OBn

1,12-1,46 ppm ; multiplet ; pic maj. 1,36 ppm ; 37 H ; 18 CH₂ intrachaîne et 1 H central

13 C-RMN (CDCl₃) :

138,7 ppm (C₀) (phényle, C1') ; 128,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5') ; 127,7 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,6 ppm (CH) (phényle, C4') ; 74,3 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (carbone tertiaire de l'alcool) ; 73,0 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 70,3 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 39,0 ppm (CH₂) (en pos. 1' de l'alcool tert.) ; 38,8 ppm (1/6 CH) (CH du milieu) ; 36,1 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (en pos. 1 de l'alcool tertiaire dans la partie centrale) ; 30,4 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OBn) ; 26,6 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (en pos. 2 de l'alcool dans partie centrale) ; 20,3 ppm (CH₂) (chaîne)

VIII. Partie expérimentale

1,19-dibenzyloxy-10-[9-benzyloxy-3-(6-benzyloxy-hexyl)-non-2-ényl]-7,13-bis-(6-benzyloxy-hexyl)-nonadéca-5,10-diène et isomères de position :



H4(6) ; C₈₈H₁₂₄O₆ ; PM = 1277,92

Déshydratation du hexabenzoxytriol H3(6) :

594 mg de triol **H3(6)** (0,445 mmoles, PM=1335,04) sont introduits dans un ballon monocol de 50 ml et dissous dans 25 ml de toluène. Le ballon est surmonté d'un piège Dean-Stark couplé à un réfrigérant. 17,1 mg d'acide paratoluènesulfonique (0,09 mmoles, 0,2 éq. PM=190,22) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement du milieu réactionnel le toluène est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur silice (17 x 3 cm) avec comme éluant un mélange de 20 % éther dans l'hexane. Les triènes **H4(6)** sont élués très vite avec ce mélange de solvants. Les différents isomères sont inséparables par chromatographie sur colonne. 528 mg de **H4(6)** (ensemble des isomères) sont obtenus, ce qui correspond à 0,412 mmoles et à un rendement de la réaction de déshydratation de 92,5 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,26$; éluant : 20 % d'éther dans de l'hexane ; révélation faible en UV, forte avec de l'iode

¹H-RMN (CDCl₃) :

- 7,22-7,40 ppm ; multiplet ; 30 H ; 6 phényles
- 5,03-5,17 ppm ; multiplet centré sur 5,107 ppm ; 3 H ; 3 protons vinyliques
- 4,51 ppm ; singulet ; 12 H ; 6 O<u>CH₂Ph</u>
- 3,47 ppm ; triplet ; J = 6,5 Hz ; 12 H ; 6 <u>CH</u>₂OBn
- 1,88-2,08 ppm ; multiplet centré sur 1,97 ppm ; 18 H ; 9 CH₂ allyliques
- 1,54-1,71 ppm ; multiplet centré sur 1,63 ppm ; 12 H ; CH2CH2OBn
- 1,20-1,46 ppm ; multiplet centré sur 1,33 ppm ; 37 H ; 18 CH₂ intrachaîne et CH central

¹³C-RMN (CDCl₃) : (mélange d'isomères)

140,3 ppm (C₀) ; 139, 9 ppm (C₀) ; 138,8 ppm (C₀) ; 128,4 ppm (CH) ; 127,6 ppm (CH) ; 127,5 ppm (CH) ; 124,5 ppm (CH) ; 123,2 ppm (CH) ; 72,9 ppm (CH₂) ; 70,6 ppm (CH₂) ; 37,1 ppm (CH₂) ; 32,3 ppm (CH₂) ; 31,8 ppm (CH₂) ; 30,1 (CH₂) ; 29,9 ppm (CH₂) ; 29,5 ppm (CH₂) ; 28,5 ppm (CH₂) ; 27,8 ppm (CH₂) ; 26,3 ppm (CH₂)

1,15-dibenzyloxy-8-[7-benzyloxy-3-(4-benzyloxy-butyl)-hept-2-ényl]-5,11-bis-(4-benzyloxy-butyl)-pentadéca-5,10-diène et isomères de position :



H4(4) ; $C_{76}H_{100}O_6$; PM = 1109,60

La préparation se fait suivant le même mode opératoire que la préparation de H4(6)

 $\mathbf{Rf} = 0,18$; éluant : 20 % d'éther dans de l'hexane, révélation faible en UV, forte avec de la vanilline acide

¹H-RMN (CDCl₃) :

7,18-7,38 ppm ; multiplet ; 30 H ; 6 phényles 5,00-5,14 ppm ; multiplet centré sur 5,09 ppm ; 3 H ; 3 protons vinyliques 4,46 ppm ; singulet ; 12 H ; 6 O<u>CH₂</u>Ph 3,43 ppm ; triplet ; J = 6,3 Hz ; 12 H ; 6 <u>CH₂</u>OBn 1,83-2,13 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,97 ppm, 1,94 ppm ; 18 H ; 9 CH₂ allyliques 1,48-1,70 ppm ; pics maj. : 1,61 ppm, 1,58 ppm ; 12 H ; 6 <u>CH₂</u>CH₂OBn 1,20-1,48 ppm ; multiplet centré sur 1,42 ppm ; 13 H ; 6 CH₂ intrachaîne et CH central

¹³C-RMN (CDCl₃) : (mélange d'isomères)

140,1 ppm (C₀) ; 139,8 ppm (C₀) ; 138,8 ppm (C₀) ; 128,4 ppm (CH) ; 127,7 ppm (CH) ; 127,5 ppm (CH) ; 124,1 ppm (CH) ; 123,2 ppm (CH) ; 72,9 ppm (CH₂) ; 70,5 ppm (CH₂) ; 70,0 ppm (CH₂) ; 36,8 ppm (CH₂) ; 32,3 ppm (CH₂) ; 31,8 ppm (CH₂) ; 30,2 (CH₂) ; 30,0 ppm (CH₂) ; 29,7 ppm (CH₂) ; 25,0 ppm (CH₂) ; 24,8 ppm (CH₂) ; 24,4 ppm (CH₂)

7,13-bis-(6-hydroxyhexyl)-10-[9-hydroxy-3-(6-hydroxy-hexyl)-nonyl]-nonadécane-1,19-diol :



H5(6); $C_{46}H_{94}O_6$; PM = 743,23

Réduction des doubles liaisons de **H4(6)** *et débenzylation par hydrogénation catalysée au palladium :*

396,5 mg du triène H4(6) (0,31 mmoles, PM=1277,94) sont introduits dans un ballon bicol de 50 ml et dissous dans 25 ml d'acétate d'éthyle. L'air est remplacé par de l'argon, par des cycles successifs de vide et d'argon. 39 mg de Pd/C (5 %) sont introduits. Les traces d'air sont remplacés par de l'argon, puis l'argon est remplacé par du dihydrogène sous une pression d'une atmosphère. L'hydrogénation catalytique se fait pendant 2 jours. Le milieu réactionnel est dilué avec un mélange de CH₂Cl₂-méthanol (50 : 50), et filtré sur du papier filtre. Le filtre est lavé à son tour avec du CH₂Cl₂-méthanol. Les phases de lavage sont réunies et les solvants sont évaporés. Le résidu obtenu est repris dans de l'éthanol et remis à hydrogéner en présence de 39 mg de Pd/C (5 %) pendant 2 jours. L'hydrogénation est arrêtée par filtration du palladium sur du papier filtre (et lavage du filtre par CH₂Cl₂-méthanol). Après évaporation des solvants, le produit réactionnel est purifié par chromatographie sur silice (3 x 18 cm, conditionnée avec de l'acétate d'éthyle). L'hexol est peu soluble dans l'acétate d'éthyle. Il est dissous dans 10 ml d'acétate d'éthyle (AE) contenant 20 % de méthanol avant d'être déposé sur colonne. Nous éluons la colonne avec 100 ml d'AE 100 %, puis avec un gradient de 1 à 10 % de méthanol dans de l'AE (100 ml pour chaque n %). Le produit majeur élue avec 9 à 10 % de méthanol dans de l'AE. Après la sortie du produit, la colonne est lavée avec 20 % et 40 % de MeOH dans de l'AE, ce qui nous a permis de vérifier qu'aucun produit n'est resté accroché sur colonne.

148,2 mg du hexol H5 sont récupérés, ce qui correspond à 0,2 mmoles et équivaut à un rendement de 64,5 %.

65 mg d'un produit secondaire sont récupérés (hydrogénolyse de la liaison alcool)

 $\mathbf{Rf} = 0,30$; éluant : 15 % de méthanol dans du CH_2Cl_2 ; révélation à la vanilline-acide : bleunoir

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,80 ppm ; singulet ; 6 H ; protons des alcools 3,50 ppm ; triplet ; J = 6,5 Hz ; 12 H ; 6 $\underline{CH_2OH}$ 1,42-1,60 ppm ; multiplet centre sur 1,49 ppm ; 12 H ; 6 $\underline{CH_2CH_2OH}$ 1,1-1,4 ppm ; multiplet ; pics maj . : 1,25 ppm, 1,20 ppm ; 64 H : 30 $\underline{CH_2}$, 1 H central et 3 H sur embranchements

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

63,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α de OH) ; 39,4 ppm (1/6 CH) (milieu de la molécule) ; 39,0 ppm (¹/₂ CH) (CH des embranchements) ; 35,0 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OH) ; 33,8 ppm (CH₂) (CH₂ en γ de OH) ; 31,5 ppm (CH₂) (2 CH₂ entre les CH confondus) ; 31,2 ppm (CH₂) (CH₂ en pos. 1') ; 28, 0 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,1 ppm (CH₂) (chaîne)

5,11-bis-(4-hydroxy-butyl)-8-[7-hydroxy-3-(4-hydroxy-butyl)-heptyl]-pentadécane-1,15-diol :



H5(4); $C_{34}H_{70}O_6$; PM = 574,92

La préparation se fait suivant le même mode opératoire que la préparation de H5(6)

 $\mathbf{Rf} = 0,22$; éluant : 15 % méthanol dans du CH_2Cl_2 ; révélation à la vanilline : bleu-noir

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,83 ppm ; singulet ; 6 H ; protons des alcools 3,50 ppm ; triplet ; J = 6,4 Hz ; 12 H ; 6 $\underline{CH_2}OH$ 1,38-1,53 ppm ; multiplet centre sur 1,47 ppm ; 12 H ; 6 $\underline{CH_2}CH_2OH$ 1,10 -1,38 ppm ; multiplet ; pics maj . : 1,26 ppm, 1,21 ppm ; 22 H : 6 x 3 $\underline{CH_2}$, 1 H central et 3 H des embranchements
¹³C-RMN (méthanol-4d) :

63,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α de OH) ; 39,5 ppm (1/6 CH) (CH du milieu de la molécule) ; 39,0 ppm ($\frac{1}{2}$ CH) (CH des embranchements); 34,8 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OH) ; 34,2 ppm (CH₂) (CH₂ en pos. 1' des chaînes) ; 31,5 ppm (CH₂) (2 CH₂ entre les CH confondus) ; 24,2 ppm (CH₂) (chaîne)

1,19-diazido-10-[9-azido-3-(6-azido-hexyl)-nonyl]-7,13-bis-(6-azido-hexyl)-nonadécane :



H6(6); $C_{46}H_{88}N_{18}$; PM = 893,31

Activation de la molécule par formation du hexamésylate :

145 mg de l'hexol H5(6) (0,2 mmoles, 1 éq. , PM=743,25) sont introduits dans un ballon monocol de 50 ml et dissous dans 15 ml de CH₂Cl₂. 240 mg de chlorure de mésyle (2,1 mmoles, 10,5 éq. , PM=114,55), dissous dans 2 ml de CH₂Cl₂ sont rajoutés. 242,7 mg de triéthylamine (2,4 mmoles, 12 éq. ; PM=101,12), dilués dans 2 ml de CH₂Cl₂, sont additionnés goutte à goutte ; la formation d'une fumée blanche est observée. Le milieu réactionnel, mis sous agitation à température ambiante pendant 1 heure, vire lentement au jaune pâle puis au jaune orange. Les solvants sont évaporés. Le solide résultant est repris dans du dichlorométhane (50 ml), puis lavé avec une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (30 ml): La phase aqueuse est ensuite lavée avec du dichlorométhane (50 ml). Les phases organiques réunies sont séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées sur Célite, et le CH₂Cl₂ est évaporé sous vide.

Rf (de l'ester mésylique) = 0,37 ; éluant : 75 % d'acétate d'éthyle dans de l'hexane ; décomposition sur silice (traînée)

Conversion en hexaazoture :

Le solide récupéré de la réaction précédente est repris dans 10 ml de DMF et placé dans un ballon monocol de 25 ml, surmonté d'un réfrigérant vigreux. 390 mg d'azoture de sodium sont ajoutés, et le milieu réactionnel est chauffé à 65°C pendant 16 heures. Après refroidissement du milieu, 25 ml d'eau sont ajoutés au milieu, et le milieu réactionnel est extrait avec de l'éther (3 x 100 ml). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau, puis séchées avec du MgSO₄. Après filtration sur Célite les solvants de la phase organique

sont évaporés. Ceci fournit un brut, qui est purifié par chromatographie sur silice (colonne : 3 x 18 cm, éluant : 2,5 % d'éther dans de l'hexane, puis gradient vers 10 %). 109 mg du produit purifié sont récupérés, ce qui correspond à 0,122 mmoles et équivaut à un rendement de 61 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,32$ éluant : 5 % éther dans l'hexane, révélation très faible à la vanilline, révélation faible à l'iode.

¹H-RMN (CDCl₃) :

3,27 ppm ; triplet ; J = 6,8 Hz ; 12 H ; 6 <u>CH</u>₂N₃ 1,50-1,70 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,61 ppm, 1,58 ppm ; 12 H ; 6 <u>CH</u>₂CH₂N₃ 1,10-1,50 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,33 ppm, 1,25 ppm, 1,19 ppm ; 64 H ; 6 x 5 CH₂ intrachaîne et 3 + 1 H sur embranchements

¹³C-RMN :

51,5 ppm (CH₂ en α de N₃); 38, 5 ppm (1/6 CH) (milieu de la molécule); 37,8 ppm ($\frac{1}{2}$ CH) (CH des embranchements); 33,6 ppm (CH₂) (CH₂ en β de N₃); 30,4 ppm (CH₂) (2 CH₂ entre les CH confondus); 29,7 ppm (CH₂) (CH₂ en pos. 1'); 28,9 ppm (CH₂) (chaîne); 26,8 ppm (CH₂) (chaîne); 26,6 ppm (CH₂) (chaîne)

1,15-diazido-8-[7-azido-3-(4-azido-butyl)-heptyl]-5,11-bis-(4-azido-butyl)-pentadécane :



H6(4); $C_{34}H_{64}N_{18}$; PM = 724,99

La préparation se fait suivant le même mode opératoire que la préparation de H6(6)

 $\mathbf{Rf} = 0.25$; éluant : 5 % éther dans l'hexane

¹H-RMN (CDCl₃) :

3,31 ppm ; triplet ; J = 6,8 Hz ; 12 H ; 6 <u>CH</u>₂N₃ 1,50-1,75 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,66 ppm, 1,63 ppm, 1,59 ppm ; 12 H ; 6 <u>CH</u>₂CH₂N₃ 1,10-1,50 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,33 ppm, 1,29 ppm, 1,23 ppm ; 40 H ; 6 x 3 CH₂ intrachaîne et 1 + 3 H sur embranchements

¹³C-RMN (CDCl₃) :

51,5 ppm (CH₂ en α de N₃); 38,5 ppm (1/6 CH) (milieu de la molécule); 37,7 ppm ($\frac{1}{2}$ CH) (CH des embranchements); 33,1 ppm (CH₂) (CH₂ en β de N₃); 30,4 ppm (CH₂) (2 CH₂ entre les CH confondus); 29,3 ppm (CH₂) (CH₂ en pos. 1'); 23,9 ppm (CH₂) (chaîne)

Hexaamine-6, Hex-6 hexachlorhydrate de la 10-[9-amino-3-(6-amino-hexyl)-nonyl]-7,13-bis-(6-amino-hexyl)-nonadécane-1,19diamine :



Hex-6 ; $C_{46}H_{106}Cl_6N_6$; PM = 956,09

Réduction de H6(6) et conversion en chlorhydrate de hexaamine :

109 mg de l'hexaazoture **H6(6)** sont introduits dans un pilulier de 5 ml. 800 μ l de THF et 80 μ l d'eau sont rajoutés. 384 mg de triphénylphosphine sont additionnés, spatule par spatule (1,464 mmoles, 12 éq. ; PM=262,3). La réaction est douce, avec un dégagement gazeux faible. Le pilulier est fermé d'un bouchon transpercé par l'aiguille d'une seringue, le milieu réactionnel étant agité par un barreau aimanté de 2 mm. Après 3 jours de réaction, 192 mg de PPh₃ sont rajoutés (peu soluble cette fois-ci, et pas de dégagement gazeux supplémentaire). Après une semaine de réaction totale, le milieu réactionnel est repris dans 100 ml de CH₂Cl₂, et filtré sur papier filtre, ce qui permet de piéger les traces d'eau excédentaire. L'amine est alors précipitée par de l'HCl gazeux (préparé par action de H₂SO₄ sur une pâte de NH₄Cl et de HCl concentré, et lavage du gaz HCl par passage à travers de l'H₂SO₄ concentré). Après filtration nous récupèrons 85,6 mg de l'hexamine, qui forme un précipité amorphe, piégeant les solvants. Ce précipité durcit sous vide d'une pompe à palettes et devient floconneux. Le filtre est lavé avec du méthanol, ce qui permet de récupérer 17,1 mg de produit supplémentaire. Le produit pèse donc en total 102,7 mg, ce qui correspond à 0,107 mmoles et à un rendement de 88 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,0$; ne migre pas ; éluants méthanol-CH₂Cl₂-ammoniaque 10/10/1 ou 10/0/1 ou 10/0/2

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,83 ; singulet ; 18 H ; 6 NH₃⁺ 2,89 ppm ; triplet ; J = 7,6 Hz ; 12 H ; 6 CH₂NH₃⁺ 1,54-1,72 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,68 ppm, 1,64 ppm, 1,61 ppm ; 12 H ; 6 <u>CH₂NH₃⁺</u> 1,11-1,47 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,31 ppm, 1,26 ppm, 1,18 ppm ; 76 H ; CH₂ intrachaîne et H sur embranchements

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

40,9 ppm (CH₂) (CH₂ en α de NH₃⁺); 39,7 ppm (1/6 CH) (milieu de la molécule) ; 39,1 ppm ($\frac{1}{2}$ CH) (embranchement) ; 34,8 ppm (CH₂) (CH₂ en β de NH₃⁺) ; 31,7 ppm (CH₂) (2 CH₂ , entre les CH, confondus) ; 30,8 ppm (CH₂) (pos. 1') ; 28,7 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,8 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,7 ppm (CH₂) (chaîne)

microanalyse : Hex-6

C: 56,01 % (calc. : 57,79 %); H: 10,66 % (calc. : 11,17 %); N: 8,40 % (calc. : 8,79 %)

Spectres de masse en électrospray (ES, tension de cône : 100V)

La fragmentation est plus importante pour les espèces dichargées, ce qui indique que ces pics supplémentaires correspondent effectivement à une fragmentation des amines et non à une contamination de l'échantillon.

Hex-6, masse monoisotopique : 736,80 737,9 ; moyen ; $M + H^+$; calc : 737,81 369,5 ; fort (maximum) ; $(M + 2H^+) / 2$; calc : 369,41 Hexaamine-4, hexachlorhydrate de la 8-[7-amino-3-(4-amino-butyl)-heptyl]-5,11-bis-(4-amino-butyl)-pentadécane-1,15diamine :



Hex-4; $C_{34}H_{82}Cl_6N_6$; PM = 787,77

La préparation se fait suivant le même mode opératoire que la préparation de Hex-6.

 $\mathbf{Rf} = 0.0$; éluants méthanol-CH₂Cl₂-ammoniaque 10/10/1

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,84 ; singulet ; >18 H ; 6 NH_3^+ ; H du méthanol 3d-H 2,892 ppm ; triplet ; J = 6,9 Hz ; 12 H ; 6 $CH_2NH_3^+$ 1,52-1,74 ppm ; multiplet centré sur 1,629 ppm ; 12 H ; 6 $\underline{CH_2}NH_3^+$ 1,11-1,47 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,304 ppm, 1,215 ppm ; 40 H ; 3 x 6 CH_2 intrachaîne et 4 H sur embranchements

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

41,0 ppm (CH₂) (CH₂ en α de NH₃⁺); 40,0 ppm (1/6 CH) (milieu de la molécule) ; 39,0 ppm (¹/₂ CH) (embranchement) ; 34,3 ppm (CH₂) (CH₂ en β de NH₃⁺) ; 31,8 ppm (CH₂) (2 CH₂ , entre les CH, confondus) ; 29,1 ppm (CH₂) (pos. 1') ; 24,9 ppm (CH₂) (chaîne

spectres de masse en électrospray (ES, tension de cône : 110V)

La fragmentation est plus importante pour les espèces dichargées, ce qui indique que ces pics supplémentaires correspondent effectivement à une fragmentation des amines et non à une contamination de l'échantillon.

Hex-4, masse monoisotopique : 568,61 569,6 ; moyen ; $M + H^+$; calc : 569,62 570,7 ; faible ; $M' + H^+$ (1 isotope lourd) ; calc 570,63 552,3 ; traces ; $M + H^+ - NH_3$; calc : 552,59 535,3 ; traces ; $M + H^+ - 2 = NH_3$; calc : 535,57

169

518,5 ; faible ; $M + H^+ - 3 NH_3$; calc : 518,54 501,5 ; faible ; $M + H^+ - 4 NH_3$; calc : 501,51 484,3 ; traces ; $M + H^+ - 5 NH_3$; calc : 484,49 285,4 ; fort (maximum) ; $(M + 2H^+) / 2$; calc : 285,31 276,8 ; moyen ; $(M + 2H^+ - NH_3) / 2$; calc : 276,75 268,3 ; moyen ; $(M + 2H^+ - 2 NH_3) / 2$; calc : 268,29 268,3 ; moyen ; $(M + 2H^+ - 2 NH_3) / 2$; calc : 268,29 259,8 ; moyen ; $(M + 2H^+ - 3 NH_3) / 2$; calc : 259,77 251,3 ; faible ; $(M + 2H^+ - 4 NH_3) / 2$; calc : 251,26 190,6 ; faible ; $(M + 3H^+ - NH_3) / 3$; calc : 184,87 179,3 ; moyen ; $(M + 3H^+ - 2 NH_3) / 3$; calc : 179,20 **279,3 ; moyen ; (M + 3H^+ - 2 NH_3) / 3 ; calc : 179,09**

8.2.5. Synthèse de la tétraamine Tét-7 :

1,18-bis-benzyloxy-8,11-(7-benzyloxy-heptyl)-octadécane-8,11-diol:



Q1; $C_{60}H_{90}O_6$; PM = 907,35

Formation du tétrabenzoxydiol Q1 :

Un ballon bicol de 50 ml est surmonté d'un réfrigérant (verrerie séchée à l'étuve à 120° C puis refroidie sous vide). 267,41 mg de tournures de magnésium (Mg, 11 mmoles, PM=24,31) sont introduits dans le ballon et placés sous argon, le montage étant fermé par des sérum caps. 2,852 g de 7-bromo-1-benzyloxyheptane (10 mmoles, PM=285,23) sont pesés dans un ballon piriforme (séché dans l'étuve), placés sous argon et dissous dans 8 ml d'éther (distillé sur du sodium-benzophénone). Cette solution est rajoutée par portions de 0,5 ml sur le magnésium à l'aide d'une seringue. La réaction démarre après le troisième rajout et après chauffage par un sèche-cheveux. L'addition complète se fait pendant un intervalle de 10 minutes, puis le milieu réactionnel est placé à reflux pendant 10 minutes.

217,75 mg de diéthylsuccinate (1,25 mmoles, 1/8 éq. ; PM=174,2) sont dissous dans 25 ml de THF (distillé sur du sodium-benzophénone) ; il est ajouté goutte à goutte sur l'organomagnésien, par une ampoule à addition, pendant une demi-heure. La réaction est laissée à 23°C pendant 20 heures. Afin d'arrêter la réaction le milieu réactionnel est versé dans de l'eau ; la phase aqueuse est neutralisée par ajout de HCl concentré. La phase aqueuse est saturée en NaCl, puis elle est extraite avec de l'éther. La phase organique est séchée sur du MgSO₄, puis elle est évaporée à sec. Le brut est chromatographié sur colonne de silice (3 x 17 cm, éluant : 50 % puis 70 % éther dans l'hexane). Le produit ciblé est celui ayant la polarité la plus élevée. Lorsqu'il commence à sortir de la colonne lors de la chromatographie, les premières fractions sont accompagnés d'un contaminant, qui est révélé à la vanilline et qui a une polarité légèrement plus faible. Ces fractions mixtes sont repurifiées lors d'une deuxième colonne. Au total 538,4 mg de diol **Q1** sont récupérés, ce qui correspond à 0,593 mmoles et équivaut à un rendement de 47,5 %.

Rf = 0,41, éluant : 70 % d'éther dans de l'hexane ; révélation à la vanilline : couleur noir

¹H-RMN (méthanol-4d) :

7,18-7,33 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,28 ppm ; 4 x 5 H ; 4 phényles

4,85 ppm ; singulet ; 2 H ; 2 O<u>H</u>

4,44 ppm ; singulet ; 8 H ; 4 O<u>CH₂</u>Ph

3,43 ppm ; triplet ; J = 6,4 Hz ; 8 H ; <u>CH</u>₂OBn

1,46-1,65 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,56 ppm, 1,53 ppm ; 1,56 ppm ; 8 H ; <u>CH₂CH₂OBn</u>

1,18-1,45 ppm ; multiplet ; pic maj. : 1,16 ppm ; 44 H ; 20 CH_2 intrachaîne et 2 CH_2 du milieu

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

140,0 ppm (C₀) (phényle, C1'); 129,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5') ; 128,8 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 128,7 ppm (CH) (phényle, C4') ; 75,1 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (carbone tertiaire portant fonction OH)) ; 73,9 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 71,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 40,2 ppm (CH₂) (CH₂ des chaînes en β de OH); 33,4 ppm (CH₂) ($\frac{1}{2}$ CH₂ de la partie centrale en β de OH) ; 31,4 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OBn) ; 30,8 ppm (CH₂) (chaîne); 30,6 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27, 3 ppm (CH₂) (chaîne) ; 24,5 ppm (CH₂) (chaîne) (4 CH₂ des chaînes hydrocarbonées)

1,18-bis-benzyloxy-8,11-bis-(7-benzyloxy-heptyl)-octadéca-8,10-diène, et isomères de position :



$$Q2$$
; $C_{60}H_{86}O_4$; $PM = 871,32$

Déshydratation du diol Q1 :

538 mg du diol **Q1** (0,445 mmoles, 1 éq. ; PM=907,37) sont introduits dans un ballon monocol de 50 ml et dissous dans 30 ml de toluène. Le ballon est surmonté d'un piège Dean-Stark couplé à un réfrigérant. 22,5 mg d'acide paratoluènesulfonique (0,12 mmoles, 0,2 éq. PM=190,22) sont ajoutés au milieu réactionnel. L'ensemble est chauffé à reflux pendant 2 heures. Afin d'arrêter la réaction, le toluène est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Par chromatographie sur couche mince, nous pouvons constater que le produit recherché est accompagné d'un produit secondaire de plus forte polarité et de même intensité. Ce deuxième composé correspond au produit cyclisé **F1-7** (voir la synthèse des tétraamines-THF). Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur silice (17 x 3 cm) avec un mélange d'élution composé de 10 % d'éther dans de l'hexane. 290,3 mg de **Q2** sont obtenus, ce qui correspond à 0,333 mmoles et équivaut à un rendement de 56,4 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,43$; éluant : 20 % d'éther dans de l'hexane, révélation faible en UV, forte avec de l'iode

¹H-RMN (CDCl₃): (mélange d'isomères)

7,24-7,43 ppm ; pic maj. : 7,36 ppm ; 20 H ; 4 phényles 5,05-5,19 ppm ; multiplet centré sur 5,12 ppm ; 2 H ; 2 protons vinyliques 4,53 ppm ; singulet ; 8 H ; 4 O<u>CH₂</u>Ph 3,49 ppm ; triplet ; J = 6,6 Hz ; 8 H ; 4 <u>CH₂OBn</u> 1,93-2,20 ppm ; multiplet ; pics maj. : 2,14 ppm, 2,10 ppm, 2,05 ppm, 2,03 ppm ; 8 H ; 4 CH₂ allyliques 1,54-1,75 ppm ; multiplet ; 8 H ; 4 <u>CH₂CH₂OBn</u>

1,21-1,52 ppm ; multiplet (singulet) ; pic maj. : 1,35 ppm ; 32 H ; 16 CH₂ intrachaîne plusieurs petits massifs correspondent aux protons vinyliques et allyliques d'isomères peu abondants

¹³C-RMN (CDCl₃) : (mélange d'isomères)

141,0 ppm (C₀) ; 139,5 ppm (C₀) ; 138,8 ppm (C₀) ; 128,4 ppm (CH) ; 127,7 ppm (CH) ; 127,5 ppm (CH) ; 124,8 ppm (CH), 120,6 ppm (CH) ; 72,9 ppm (CH₂) ; 70,6 ppm (CH₂) ; 37,8 ppm (CH₂) ; 37,1 ppm (CH₂) ; 30,5 ppm (CH₂) ; 30,2 ppm (CH₂) ; 29,9 ppm (CH₂) ; 29,5 ppm (CH₂) ; 28,8 ppm (CH₂) ; 28,5 ppm (CH₂) ; 28,3 ppm (CH₂) ; 27,8 ppm (CH₂) ; 26,3 ppm (CH₂)

8,11-bis-(7-hydroxy-heptyl)-octadécane-1,18-diol :



Q3; $C_{32}H_{66}O_4$; PM = 514,86

Hydrogénation et débenzylation de **Q2** pour former **Q3** :

290,3 mg du diène **Q2** (0,333 mmoles, PM=871,34) sont introduits dans un ballon bicol de 50 ml et dissous dans 25 ml d'acétate d'éthyle. L'air est remplacé contre de l'argon, par cycles successifs de vide et d'argon. 30 mg de Pd/C (5 %) sont introduits. Le milieu est placé sous argon, puis l'argon est remplacé par du dihydrogène sous une pression d'une atmosphère.

L'hydrogénation catalytique se fait pendant 1 jour. Le milieu réactionnel est dilué avec un mélange de CH₂Cl₂-méthanol (50 : 50), puis il est filtré sur du papier filtre. Le filtre est lavé avec du CH₂Cl₂-méthanol. Les solvants des phases organiques réunies sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans 25 ml d'éthanol et remis à hydrogéner en présence de 30 mg de Pd/C (5 %) pendant 5 jours. Afin d'arrêter la réaction le palladium est enlevé par filtration sur du papier filtre (lavage du filtre par CH₂Cl₂-méthanol). Après évaporation des solvants, le tétrol solide est purifié par chromatographie sur silice (3 x 18 cm, équilibrée avec de l'acétate d'éthyle) (le brut réactionnel est très peu contaminé d'après une analyse par CCM). Le tétrol, étant peu soluble dans l'acétate d'éthyle(AE), est dissous dans 2 ml d'acétate d'éthyle contenant 10 % de méthanol. Ce mélange est déposé sur colonne de silice (3 x 18 cm). Nous éluons avec 100 ml d'AE 100 %, puis avec un gradient de 1 à 10 % de méthanol dans l'AE (100 ml pour chaque n %). Le produit majeur sort lors de l'étlution avec 6 à 8 % de méthanol dans l'AE. Les fractions pures sont réunies et évaporées. Elles fournissent 137,8 mg du tétrol Q3, ce qui correspond à 0,268 mmoles et équivaut à un rendement de 80,4 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,31$; éluant : 10 % de méthanol dans du CH_2Cl_2

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,84 ppm ; singulet ; 4 H ; 4 OH 3,49 ppm ; triplet ; J = 6,5 Hz ; 8 H ; 4 <u>CH₂</u>OH 1,40-1,58 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,52 ppm, 1,49 ppm, 1,46 ppm ; 8 H ; 4 <u>CH₂CH₂CH₂OH</u> 1,10-1,40 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,28 ppm, 1,23 ppm ; 46 H ; 22 CH₂ intrachaîne et 2 CH des embranchements

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

63,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α de OH) ; 38,9 ppm (¹/₂ CH) (CH des enbranchements) ; 34,9 ppm (¹/₂ CH₂) (2 CH₂ entre les CH) ; 33,8 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OH) ; 31,3 ppm (2 CH₂) (chaîne, 2 CH₂ superposés) ; 30,8 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,9 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,1 ppm (CH₂) (chaîne)

1,18-diazido-8,11-bis-(7-azido-heptyl)-octadécane :



Q4; $C_{32}H_{62}N_{12}$; PM = 614,92

Activation de la molécule par formation du tétramésylate :

137,8 mg du tétrol **Q3** (0,268 mmoles, 1 éq. , PM=514,88) sont introduits dans un ballon de 50 ml et dissous dans 15 ml de CH₂Cl₂. 215 mg de chlorure de mésyle (1,876 mmoles, 7 éq. , PM=114,55), dissous dans 2 ml de CH₂Cl₂, sont ajoutés. 218 mg de triéthylamine (2,14 mmoles, 8 éq. , PM=101,12), dilués dans 2 ml de CH₂Cl₂, sont additionnés goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant une demi-heure, et le tétrol, insoluble au début, est passé entièrement en solution. La réaction est lente ; pour l'accélerer nous ajoutons 100 mg de Et₃N (0,98 mmoles) et 100 mg de chlorure de mésyle (0,87 mmoles). Le milieu réactionnel vire lentement au jaune pâle puis au jaune orange pendant une demi-heure. Les solvants sont évaporés. Le solide résultant est repris dans du dichlorométhane (50 ml), puis lavé avec une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (30 ml). La phase aqueuse est lavée avec du dichlorométhane (50 ml). Les phases organiques réunies sont relavées avec 50 ml d'eau, puis séchées avec du sulfate de magnésium, filtrées sur Célite et évaporées sous vide.

Rf (ester de mésyle) = 0.87; éluant : acétate d'éthyle; révélation à la vanilline-acide est faible et elle montre que le produit se dégrade sur silice (tache sur la ligne de base).

Conversion en tétraazoture :

Le solide récupéré de la réaction précédente est placé dans un ballon monocol de 25 ml et repris dans 8 ml de DMF. Le ballon est surmonté d'un réfrigérant vigreux. 348,4 mg d'azoture de sodium (5,36 mmoles ; 20 éq. ; PM=65,01) sont ajoutés, et le milieu réactionnel est chauffé à 70°C pendant 16 heures. Après refroidissement du milieu, 10 ml d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel. Cette phase est extraite avec de l'éther (3 x 100 ml). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau, puis séchées avec du MgSO₄. La filtration sur Célite et l'évaporation des solvants fournissent un brut qui est purifié par chromatographie sur silice (colonne : 3 x 18 cm, éluant : 2,5 % éther dans l'hexane). 112,6 mg du produit purifié sont récupérés, ce qui correspond à 0,183 mmoles et équivaut à un rendement de 68,3 %.

 $\mathbf{Rf} = 0.35$; éluant : 5 % d'éther dans de l'hexane ; révélation faible à la vanilline-acide (couleur brun rose) et révélation faible à l'iode.

VIII. Partie expérimentale

¹H-RMN (CDCl₃) :

3,29 ppm ; triplet ; J = 6,8 Hz ; 8 H ; $4 \text{ CH}_2 N_3$ 1,54-1,73 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,67 ppm, 1,64 ppm, 1,60 ppm ; 8 H ; $4 \text{ CH}_2 \text{CH}_2 N_3$ 1,12-1,48 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,35 ppm, 1,26 ppm, 1,21 ppm ; 46 H ; 22 CH₂ intrachaîne et 2 CH des embranchements

13 C-RMN (CDCl₃) :

51,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α de N₃); 37,8 ppm (¹/₂ CH) (CH des embranchements); 33,7 ppm (CH₂) (CH₂ en β de N₃); 30,4 ppm (¹/₂ CH₂) (2 CH₂ entre les 2 CH); 30,0 ppm (CH₂) (chaîne); 29,3 ppm (CH₂) (chaîne); 28,9 ppm (CH₂) (chaîne); 26,8 ppm (CH₂) (chaîne); 26,7 ppm (CH₂) (chaîne)

Tétraamine-7 ; Tét-7 ; tétrachlorhydrate de la 8,11-bis-(7-amino-heptyl)-octadécane-1,18-diamine



 $T\acute{e}t-7$; $C_{32}H_{74}Cl_4N_4$; PM = 656,77

Réduction de l'azoture en tétraamine et formation du tétrachlorhydrate Tét-7 :

99 mg du tétraazoture **Q4** (0,16 mmoles ; 1 éq. ; PM=614,92) sont introduits dans un pilulier de 5 ml. 500 µl de THF et 50 µl d'eau (2,77 mmoles ; 17,4 éq.) sont ajoutés. 336 mg de triphénylphosphine (1,28 mmoles ; 8 éq. ; PM=262,3) sont additionnés, spatule par spatule. Au début la réaction démarre lentement, mais après 5 min, et l'addition totale du PPh₃, le dégagement gazeux est fort et la réaction est exothermique. Le pilulier est fermé d'un bouchon transpercé par l'aiguille d'une seringue, le milieu réactionnel étant agité par un barreau aimanté de 2 mm pendant 6 jours. Après 1 jours de réaction un précipité s'est formé ; il est amorphe dans la solution et cristallin sur les parois de verre du récipient. Après 6 jours de réaction totale, le milieu réactionnel est repris dans 100 ml de CH₂Cl₂ et filtré sur papier filtre, ce qui piège les traces d'eau excédentaire. L'amine est alors précipitée par de l'HCl gazeux (préparé par action d'H₂SO₄ sur une pâte de NH₄Cl et de HCl concentré, et lavage du gaz par passage à travers de l'H₂SO₄ concentré) dans un ballon bicol. Par filtration nous récupèrons 83,3 mg de la tétraamine **Tét-7**. Le filtre et le bicol sont lavés avec du méthanol, ce qui permet de récupérer 10,6 mg de produit supplémentaire. Le produit pèse donc au total 93,9 mg, ce qui correspond à 0,143 mmoles et équivaut à un rendement de 89 %. $\mathbf{Rf} = 0,015$; éluant : méthanol-dichlorométhane-ammoniaque 10/10/1; révélation à la vanilline-acide : couleur brune

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,87 ppm ; singulet ; 12 H ; NH_3^+

2,91 ppm ; triplet ; J = 7,6 Hz ; 8 H ; 4 $\underline{CH}_2 N H_3^+$

1,57-1,78 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,70 ppm, 1,66 ppm, 1,63 ppm ; 8 H ; 4 $\underline{CH_2}CH_2NH_3^+$

1,18-1,45 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,35 ppm, 1,26 ppm, 1,21 ppm ; 46 H ; 22 $\rm CH_2$ intrachaîne et 2 CH des embranchements

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

40,9 ppm (CH₂) (CH₂ en α de NH₃⁺) ; 39,1 ppm (¹/₂ CH) ; 34,9 ppm (CH₂) (CH₂ en β de NH₃⁺) ; 31,5 ppm (¹/₂ CH₂) (2 CH₂ entre les 2 CH) ; 31,1 ppm (CH₂) (chaîne) ; 30,4 ppm (CH₂) (chaîne) ; 28,7 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,9 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,6 ppm (CH₂) (chaîne)

microanalyse : Tét-7

C: 58,15 % (calc. : 58,52 %); H: 11,18 % (calc. : 11,36 %); N: 8,44 % (calc. : 8,53 %)

spectres de masse en électrospray (ES, tension de cône : 70V)

La fragmentation est plus importante pour les espèces dichargées, ce qui indique que ces pics supplémentaires correspondent effectivement à une fragmentation des amines et non à une contamination de l'échantillon.

Tet-7, masse monoisotopique : 510,56

511,6; moyen; $M + H^+$; calc: 511,57

512,3 ; M' + H+ (1 isotope lourd) ; calc : 512,58

494,3; traces; $M + H^+$ - NH_3 ; calc: 494,54

477,5 ; faible ; $M + H^+ - 2 NH_3$; calc : 477,52

460,5 ; faible ; M + H+ - 3 NH3 ; calc : 460,49

256,4 ; fort (maximum) ; (M + 2 H+) / 2 ; calc : 256,29

247,8 ; moyen ; (M + + H+ - NH3) / 2 ; calc / 247,77

239,3 ; moyen ; (M + 2 H+ - 2 NH3) / 2 ; calc : 239,27

171,3 ; fort ; (M + 3 H+) / 3 ; calc : 171,20

165,6 ; faible ; (M + + H + - NH3) / 3 ; calc : 165,52

156,2 (faible) ; 142,2 (faible) ; 128,2 (faible) ; 114,1 (faible : fragmentation de la chaîne (?)

8.2.6. Synthèse de la tétraamine THF-7 :

1,18-bis-benzyloxy-8,11-bis-(7-benzyloxy-heptyl)-octadécane-8,11-diol:



Q1(7); $C_{60}H_{90}O_6$; PM = 907,35

La synthèse de ce diol est décrite dans la synthèse de la tétraamine Tét-7

2,2,5,5-tétrakis-(7-benzoxy-heptyl)-tétrahydrofurane :



Y1-7; $C_{60}H_{88}O_5$; PM = 889,34

Cyclisation du diol **Q1**(7)

538 mg du diol **Q1(7)** (0,445 mmoles, 1 éq. ; PM=907,37) sont introduits dans un ballon monocol de 50 ml et dissous dans 30 ml de toluène. Le ballon est surmonté d'un piège Dean-Stark couplé à un réfrigérant. 22,5 mg d'acide paratoluènesulfonique (0,12 mmoles, 0,2 éq. PM=190,22) sont ajoutés, et le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 2 heures. Afin d'arrêter la réaction le toluène est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Par chromatographie sur couche mince, nous voyons que le produit recherché est accompagné d'un produit secondaire de plus faible polarité (diène **Q2(7)**) et de même intensité. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur silice ($17 \times 3 \text{ cm}$) avec un éluant composé d'un mélange de 10 % puis de 20 % d'éther dans de l'hexane. 195,6 mg de **Y1(7)** sont obtenus, ce qui correspond à 0,220 mmoles et équivaut à un rendement de 37,3 %.

Rf = 0,31 ; éluant : 20 % d'éther dans de l'hexane, révélation à la vanilline : couleur violette

¹H-RMN (CDCl₃) :

7,25-7,47 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,388 ppm; 20 H ; 4 phényles

4,557 ppm ; singulet ; 8 H ; 4 O<u>CH₂</u>Ph

3,518 ppm ; triplet ; J = 6,6 Hz ; 8 H ; $\underline{CH_2OBn}$

1,766 ppm ; singulet ; 4 H ; H du tétrahydrofurane

1,58-1,73 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,710 ppm, 1,673 ppm, 1,641 ppm ; 8 H ; CH₂CH₂OBn

1,20-1,52 ppm ; multiplet centré sur 0,948 ppm ; 40 H ; 20 CH₂ intrachaîne

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl₃) :

138,81 ppm (C₀) (phényle, C1') ; 128,38 ppm (CH) (phényle, C3', C5') ; 127,65 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,51 ppm (CH) (phényle, C4') ; 85,16 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (C2 et C5 du THF); 72,91 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 70,60 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 39,72 ppm (CH₂) (CH₂ en position 1' par rapport au THF) ; 35,58 ppm (CH₂) ($\frac{1}{2}$ CH₂ de la partie centrale du THF) ; 30,40 ppm (CH₂) (CH₂ en β du OBn) ; 29,85 ppm (CH₂) (chaîne) ; 29,60 ppm (CH₂) (chaîne) ; 26, 28 ppm (CH₂) (chaîne) ; 24,59 ppm (CH₂) (chaîne) (4 CH₂ des chaînes hydrocarbonées)

2,2,5,5-tétrakis-(7-hydroxy-heptyl)-tétrahydrofurane :



Y2(7) ; $C_{32}H_{64}O_5$; PM = 528,85

Hydrogénation et débenzylation de Y1(7) pour former Y2(8) :

195,6 mg de **Y1(7)** (0,220 mmoles, PM=889,34) sont dissous dans 25 ml d'acétate d'éthyle et introduits dans un ballon bicol de 50 ml. L'air est remplacé par de l'argon, par cycles successifs de vide et d'argon. 20 mg de Pd/C (5 %) sont introduits. Le milieu est placé sous argon, puis l'argon est remplacé par du dihydrogène sous une pression d'une atmosphère. L'hydrogénation catalytique se fait pendant 24 heures à température ambiante. L'hydrogène est remplacé par de l'argon afin d'arrêter la réaction. Le milieu réactionnel est dilué avec un mélange de CH₂Cl₂-méthanol (50 : 50) et filtré sur papier filtre. Le filtre est lavé avec du CH₂Cl₂-méthanol et les solvants récupérés sont évaporés. Le tétrol solide (le brut réactionnel est très peu contaminé d'après l'analyse par CCM) est purifié par chromatographie sur silice (3 x 18 cm, conditionnée avec de l'acétate d'éthyle). Le tétrol étant peu soluble dans l'acétate d'éthyle est dissous dans 3 ml d'acétate d'éthyle (AE) contenant 20 % de méthanol et déposé sur colonne. Nous éluons avec 100 ml d'AE 100 %, puis avec un gradient de 1 à 10 % de méthanol dans de l'AE (100 ml pour chaque n %). Le produit majeur sort entre 6 et 8 % de méthanol. Les fractions pures réunies fournissent 82,6 mg du tétrol **Y2(7)**, ce qui correspond à 0,155 mmoles et à un rendement de 70,5 %.

 $\mathbf{Rf} = 0,28$; éluant : 10 % méthanol dans CH_2Cl_2 ; révélation à la vanilline en bleu-noir

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,83 ppm ; singulet ; 4 H ; 4 OH 3,50 ppm ; triplet ; J = 6,5 Hz ; 8 H ; 4 <u>CH₂</u>OH 1,73 ppm ; singulet ; 4 H ; H du cycle 1,40-1,58 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,49 ppm, 1,46 ppm ; 8 H ; 4 <u>CH₂CH₂OH</u> 1,12-1,40 ppm ; multiplet ; pic maj. : 1,29 ppm ; 40 H ; 20 CH₂ intrachaîne

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

86,9 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (C2 et C5 du THF) ; 63,0 ppm (CH₂) (CH₂ en α du OH) ; 40,7 ppm (CH₂) (CH₂ en position 1' par rapport au THF) ; 36,5 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (CH₂ de la partie centrale du THF) ; 33,7 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OH) ; 31,5 ppm (CH₂) (chaîne) ; 30,7 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,0 ppm (CH₂) (chaîne) ; 25,6 ppm (CH₂) (chaîne) (4 CH₂ des chaînes hydrocarbonées)

2,2,5,5-tétrakis-(7-azido-heptyl)-tétrahydrofurane :



Y3(7) ; $C_{32}H_{60}N_{12}O$; PM = 628,90

Activation de la molécule par formation du tétramésylate :

82,5 mg du tétrol **Y2(7)** (0,155 mmoles, 1 éq. , PM=528,86) sont introduits dans un ballon de 50 ml et dissous dans 10 ml de CH₂Cl₂. 125 mg de chlorure de mésyle (1,092 mmoles, 7 éq. , PM=114,55), dissous dans 2 ml de CH₂Cl₂ sont ajoutés. 127 mg de triéthylamine (1,25 mmoles, 8 éq. , PM=101,12), dilués dans 2 ml de CH₂Cl₂, sont additionnés goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant une 16 heures. Le milieu réactionnel est légèrement jaunâtre. La réaction est lente, et pour l'accélerer 50 mg de Et₃N (0,49 mmoles) et 50 mg de MsCl (0,43 mmoles) sont rajoutés. Le milieu réactionnel vire au jaune orange après l'ajout.

Les solvants sont évaporés. Le solide résultant est repris dans du dichlorométhane (50 ml), puis lavé avec une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (30 ml): La phase aqueuse est relavée avec du dichlorométhane (50 ml). Les phases organiques réunies sont relavées avec 30 ml d'eau et évaporées sous vide.

Rf (mésylate) = 0.87; éluant : 10 % MeOH dans CH₂Cl₂; révélation à la vanilline avec couleur noire, le brut réactionnel contient un seul produit détectable

Conversion en tétraazoture Y3-7 :

Le solide récupéré lors de la réaction précédente est placé dans un ballon monocol de 25 ml et repris dans 9 ml de DMF. Le ballon est surmonté d'un réfrigérant vigreux. 202,8 mg d'azoture de sodium (3,12 mmoles ; 20 éq. ; PM=65,01) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à 73° C pendant 16 heures. Après refroidissement du milieu, 10 ml d'eau sont rajoutés et le milieu réactionnel est extrait avec de l'éther (3 x 100 ml). Les phases organiques réunies sont lavées avec de l'eau (50 ml), puis séchées avec du MgSO₄. La filtration sur Célite et l'évaporation des solvants fournit un brut qui est purifié par chromatographie sur silice (colonne : 3 x 18 cm, éluant : 5 % éther dans l'hexane). 59 mg du produit purifié sont récupérés, ce qui correspond à 0,094 mmoles et à un rendement de 60,1%.

 $\mathbf{Rf} = 0,28$; éluant : 10 % d'éther dans de l'hexane ; révélation faible à la vanilline (couleur brun rose) ; révélation faible à l'iode.

¹H-RMN (CDCl₃) :

3,21 ppm ; triplet ; J = 6,8 Hz ; 8 H ; 4 <u>CH</u>₂N₃ 1,68 ppm ; singulet ; 4 H ; H du cycle 1,45-1,63 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,59 ppm, 1,56 ppm, 1,52 ppm ; 8 H ; 4 <u>CH</u>₂CH₂N₃ 1,05-1,48 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,39 ppm, 1,28 ppm ; 40 H ; 20 CH₂ intrachaîne

13 C-RMN (CDCl₃) :

85,1 ppm ($\frac{1}{2}$ C0) (C2 et C5 du THF) ; 51,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α de N₃) ; 39,6 ppm (CH₂) (CH₂ en position 1' par rapport au THF); 35,6 ppm (CH₂) ($\frac{1}{2}$ CH₂ de la partie centrale du THF); 30,2 ppm (CH₂) (CH₂ en β de N₃) ; 29,2 ppm (CH₂) (chaîne) ; 28,9 ppm (CH₂) (chaîne) ; 26,8 ppm (CH₂) (chaîne) ; 24,5 ppm (CH₂) (chaîne) (4 CH₂ des chaînes hydrocarbonées)

VIII. Partie expérimentale

tétrachlorhydrate du 2,2,5,5-tétrakis-(7-amino-heptyl)-tétrahydrofurane :

$$H_{3}\dot{N}(CH_{2})_{7}$$
 (CH₂)₇ $\dot{N}H_{3}$
 O
 $H_{3}\dot{N}(CH_{2})_{7}$ (CH₂)₇ $\dot{N}H_{3}$ + 4 Cl⁻

THF-7; $C_{32}H_{72}Cl_4N_4O$; PM = 670,75

Réduction de l'azoture en tétraamine et formation du tétrachlorhydrate THF-7 :

49 mg du tétraazoture **Y3(7)** (0,094 mmoles ; 1 éq. ; PM = 628,91) sont introduits dans un pilulier de 5 ml. 300 μ l de THF et 30 μ l d'eau (1,6 mmoles ; 18 éq.) sont ajoutés. 196,8 mg de triphénylphosphine (0,7504 mmoles ; 8 éq. ; PM = 262,3) sont additionnés, par petites portions. Le dégagement gazeux est fort et la réaction est exothermique. Le pilulier est fermé d'un bouchon percé par l'aiguille d'une seringue, le milieu réactionnel étant agité par un barreau aimanté de 2 mm. Le milieu réactionnel reste homogène pendant toute la réaction. Après 6 jours de réaction totale, le milieu réactionnel est repris dans 100 ml de CH₂Cl₂ et filtré sur papier filtre, pour piéger les traces d'eau excédentaire. L'amine est alors précipitée par de l'HCl gazeux (préparé par action de H₂SO₄ sur une pâte de NH₄Cl et de HCl concentré, et lavage du gaz par passage à travers de H₂SO₄ concentré) dans un ballon bicol. Par filtration nous récupèrons 50,0 mg du tétrachlorhydrate de la tétraamine, ce qui correspond à 0,0745 mmoles et équivaut à un rendement de 79 %.

 $\mathbf{Rf} = 0.05$; éluant: méthanol-dichlorométhane-ammoniaque 10/10/1; révélation à la vanilline; couleur brune (Il faut chauffer les plaques CCM pour évaporer toutes les traces d'eau et d'ammoniaque avant la révélation chimique)

Température de fusion : > 230°C , le chlorhydrate jaunit à cette température

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,84 ppm ; singulet ; 12 H ; NH_3^+ 2,89 ppm ; triplet ; J = 7,6 Hz ; 8 H ; 4 $\underline{CH_2}NH_3^+$ 1,75 ppm ; singulet ; 4 H ; H du cycle 1,55-1,72 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,68 ppm, 1,65 ppm, 1,61 ppm ; 8 H ; 4 $\underline{CH_2}CH_2NH_3^+$ 1,15-1,52 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,33 ppm ; 40 H ; 20 CH₂ intrachaîne

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

86,9 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (C2 et C5 du THF) ; 40,9 ppm (CH₂) (CH₂ en α de NH₃⁺) ; 40,7 ppm (CH₂) (CH₂ en position 1' par rapport au THF) ; 36,5 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (en partie centrale du THF); 31,3 ppm (CH₂) (CH₂ en β de NH₃⁺); 30,4 ppm (CH₂) (chaîne); 28,7 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,6 ppm (CH₂) (chaîne) ; 25,7 ppm (CH₂) (chaîne) (4 CH₂ des chaînes hydrocarbonées)

microanalyse : THF-7

C : 57,33 % (calc. : 57,30 %) ; H : 10,66 % (calc. : 10,82 %) ; N : 8,30 % (calc. : 8,35 %) ; O: 2,60 % (calc.: 2,39 %)

spectre de masse en électrospray (ES, 100 V) :

La fragmentation est plus importante pour les espèces dichargées, ce qui indique que ces pics supplémentaires correspondent effectivement à une fragmentation des amines et non à une contamination de l'échantillon.

THF-7 : masse monoisotopique : 524,54

525,6; moyen; $M + H^+$; calc : 525,55

526,6 ; faible ; M' + H⁺ (1 isotope lourd) ; calc 526,56

507,6 ; faible ; $M + H^+$ - H_2O ; calc : 507,54

490,5 ; faible ; $M + H^+ - H_2O - NH_3$; cal : 490,51

473,5 ; faible ; $M+H^+$ - $H_2O - 2 NH_3$; calc : 473,49

456,5; faible; M + H⁺ - H₂O - 3 NH₃; calc : 456,46

263,3 ; fort ; $(M + 2 H^{+}) / 2$; calc : 263,28

254,4 ; fort (maximum); (M + 2 H^{+} - $H_{2}O)$ / 2 ; calc : 254,28

245,8 ; fort ; $(M + 2 H^{+} - H_{2}O - NH_{3}) / 2$; calc : 245,76

237,3 ; moyen ; $(M + 2 H^{+} - H_{2}O - 2 NH_{3}) / 2$; calc : 237,25

158,1 (faible); 141,0 (faible); 114,1 (faible); 105,0 (faible): fragmentation des chaînes latérales (?)

8.2.7. Synthèse de la tétraamine THF-6 :

La voie de synthése est identique à celle décrite pour la tétraamine **THF-7** et se fait avec des rendements semblables pour les différentes étapes.

1,16-bis-benzyloxy-7,10-bis-(7-benzyloxy-heptyl)-hexadécane-7,10-diol:

$$\begin{array}{ccc} \mathsf{BnO}(\mathsf{CH}_2)_6 & (\mathsf{CH}_2)_6\mathsf{OBn} \\ & & \mathsf{HO} \\ & & \mathsf{OH} \\ & & \mathsf{BnO}(\mathsf{CH}_2)_6 & (\mathsf{CH}_2)_6\mathsf{OBn} \end{array}$$

Q1(6); $C_{56}H_{82}O_6$; PM = 851,25

Le mode opératoire suit celui du Q1(7) $\mathbf{Rf} = 0,21$, éluant : 70 % éther dans l'hexane ; révélation à la vanilline : couleur noir

¹H-RMN (méthanol-4d) :

7,22-7,43 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,36 ppm ; 4 x 5 H ; 4 phényles

4,44 ppm ; singulet ; 8 H ; 4 O<u>CH₂Ph</u>

3,49 ppm ; triplet ; J = 6,5 Hz ; 8 H ; <u>CH</u>₂OBn

1,52-1,74 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,65 ppm, 1,62 ppm ; 8 H ; CH₂CH₂OBn

1,47 ppm ; (4 H) ; 2 CH₂ du milieu, en β et β ' des OH

1,20-1,50 ppm ; multiplet ; pic maj. : 1,35 ppm ; 32 H (superposé au précédent); 16 CH_2 intrachaîne

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

138,8 ppm (C₀) (phényle, C1'); 128,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5') ; 127,6 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,5 ppm (CH) (phényle, C4') ; 74,1 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (carbone tertiaire portant fonction OH) ; 72,9 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 70,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 39,2 ppm (CH₂) (CH₂ des chaînes en β de OH) ; 32,6 ppm (CH₂) ($\frac{1}{2}$ CH₂ de la partie centrale en β de OH) ; 30,1 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OBn) ; 29,8 ppm (CH₂) (chaîne); 29,3 ppm (CH₂) (chaîne) ; 23,6 ppm (CH₂) (chaîne) (3 CH₂ des chaînes hydrocarbonées)

2,2,5,5-tétrakis-(6-benzoxy-hexyl)-tétrahydrofurane :



Y1(6) ; C₅₆H₈₀O₅ ; PM = 833,23

Le mode opératoire suit celui du Y1(7)

 $\mathbf{Rf} = 0.33$; éluant : 20 % éther dans l'hexane, révélation à la vanilline en violet

¹H-RMN (CDCl₃) :

7,25-7,45 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,36 ppm; 20 H ; 4 phényles

4,53 ppm ; singulet ; 8 H ; 4 O<u>CH₂Ph</u>

3,49 ppm ; triplet ; J = 6,5 Hz ; 8 H ; <u>CH₂</u>OBn

1,74 ppm ; singulet ; 4 H ; H du tétrahydrofurane

1,56-1,71 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,69 ppm, 1,66 ppm, 1,62 ppm ; 8 H ; <u>CH₂CH₂OBn</u>

1,20-1,55 ppm ; multiplet centré sur 1,34 ppm ; 32 H ; 16 CH₂ intrachaîne

¹³C-RMN (CDCl₃) :

138,8 ppm (C₀) (phényle, C1') ; 128,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5') ; 127,6 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,5 ppm (CH) (phényle, C4') ; 85,1 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (C2 et C5 du THF) ; 72,9 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 70,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 39,7 ppm (CH₂) (CH₂ en position 1' par rapport au THF) ; 35,5 ppm (CH₂) ($\frac{1}{2}$ CH₂ de la partie centrale du THF) ; 30,3 ppm (CH₂) (CH₂ en β du OBn) ; 29,8 ppm (CH₂) (chaîne) ; 29,3 ppm (CH₂) (chaîne) ; 24,6 ppm (CH₂) (chaîne) (3 CH₂ des chaînes hydrocarbonées)

6-[2,5,5-tris(6-hydroxy-hexyl)-tétrahydrofuran-2-yl]-hexan-1-ol:



Y2(6); $C_{28}H_{56}O_5$; PM = 472,74; Le mode opératoire suit celui du Y2(7)

 $\mathbf{Rf} = 0,14$; éluant : 10 % méthanol dans CH_2Cl_2

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,83 ppm ; singulet ; 4 H ; 4 OH 3,50 ppm ; triplet ; J = 6,4 Hz ; 8 H ; 4 <u>CH₂</u>OH 1,74 ppm ; singulet ; 4 H ; H du cycle 1,40-1,60 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,50 ppm, 1,47 ppm ; 8 H ; 4 <u>CH₂CH₂OH</u> 1,12-1,40 ppm ; multiplet ; pic maj. : 1,29 ppm ; 32 H ; 16 CH₂ intrachaîne

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

86,9 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (C2 et C5 du THF) ; 63,0 ppm (CH₂) (CH₂ en α du OH) ; 40,7 ppm (CH₂) (CH₂ en position 1' par rapport au THF) ; 36,5 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (CH₂ de la partie centrale du THF) ; 33,7 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OH) ; 31,3 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,0 ppm (CH₂) (chaîne) ; 25,6 ppm (CH₂) (chaîne) (3 CH₂ des chaînes hydrocarbonées)

2,2,5,5-tétrakis-(6-azido-hexyl)-tétrahydrofurane :



Y3(6) ; C₂₈H₅₂N₁₂O ; PM = 572,79

Le mode opératoire suit celui du Y3(7)

 $\mathbf{Rf} = 0,26$; éluant : 10 % éther dans l'hexane ; révélation faible à la vanilline (couleur brun rose)

¹H-RMN (CDCl₃) :

3,29 ppm ; triplet ; J = 6,8 Hz ; 8 H ; 4 <u>CH₂N₃</u> 1,76 ppm ; singulet ; 4 H ; H du cycle 1,50-1,71 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,67 ppm, 1,64 ppm, 1,60 ppm ; 8 H ; 4 <u>CH₂CH₂N₃</u> 1,20-1,50 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,47 ppm, 1,36 ppm ; 32 H ; 16 CH₂ intrachaîne

$^{13}\text{C-RMN}(\text{CDCl}_3)$:

85,1 ppm ($\frac{1}{2}$ CO) (C2 et C5 du THF) ; 51,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α de N₃) ; 39,6 ppm (CH₂) (CH₂ en position 1' par rapport au THF) ; 35,6 ppm (CH₂) ($\frac{1}{2}$ CH₂ de la partie centrale du THF) ; 29,9 ppm (CH₂) (CH₂ en β de N₃) ; 28,9 ppm (CH₂) (chaîne) ; 26,8 ppm (CH₂) (chaîne) ; 24,5 ppm (CH₂) (chaîne) (3 CH₂ des chaînes hydrocarbonées)

tétrachlorhydrate de la 6-[2,5,5-tris-(6-amino-hexyl)-tétrahydrofuran-2-yl]-hexylamine :

 $\textbf{THF-6} \ ; \ C_{28}H_{64}Cl_4N_4O \ ; \ \textbf{PM} = 614, 64$

Le mode opératoire suit celui du THF-7

 $\mathbf{Rf} = 0.03$; éluant: méthanol-dichlorométhane-ammoniaque 10/10/1; révélation à la vanilline; couleur brune (chauffage des plaques CCM pour enlever les traces d'ammoniaque avant de procéder à la révélation chimique)

Température de fusion : $> 230^{\circ}$ C , le chlorhydrate jaunit à cette température

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,85 ppm ; singulet ; 12 H ; NH₃⁺ 2,92 ppm ; triplet ; J = 7,5 Hz ; 8 H ; 4 <u>CH₂</u>NH₃⁺ 1,79 ppm ; singulet ; 4 H ; H du cycle 1,55-1,75 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,68 ppm, 1,64 ppm ; 8 H ; 4 <u>CH₂</u>CH₂NH₃⁺ 1,25-1,55 ppm ; multiplet ; pic maj. : 1,36 ppm ; 32 H ; 16 CH₂ intrachaîne

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

86,8 ppm ($\frac{1}{2}$ C0) (C2 et C5 du THF) ; 40,8 ppm (CH₂) (CH₂ en α de NH₃⁺) ; 40,6 ppm (CH₂) (CH₂ en position 1' par rapport au THF) ; 36,5 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (en partie centrale du THF) ; 31,0 ppm (CH₂) (CH₂ en β de NH₃⁺); 28,7 ppm (CH₂) (chaîne) ; 27,6 ppm (CH₂) (chaîne) ; 25,6 ppm (CH₂) (chaîne) (3 CH₂ des chaînes hydrocarbonées)

spectre de masse en électronspray (ES, 100 V) :

La fragmentation est plus importante pour les espèces dichargées, ce qui indique que ces pics supplémentaires correspondent effectivement à une fragmentation des amines et non à une contamination de l'échantillon.

THF-6 : masse monoisotopique : 468,48 469,5 ; moyen ; $M + H^+$; calc. : 469,49 470,5 ; faible ; $M' + H^+$ (1 isotope lourd) ; calc. : 470,50 451,5 ; faible ; $M + H^+ - H_2O$; calc. : 451,48 434,4 ; faible ; $M + H^+ - H_2O - NH_3$; calc. : 434,45 417,4 ; faible ; $M + H^+ - H_2O - 2 NH_3$; calc. : 417,43 400,4 ; faible ; $M + H^+ - H_2O - 3 NH_3$; calc. : 400,40 235,3 ; fort ; $(M + 2 H^+) / 2$; calc. : 235,25 226,3 ; fort ; $(M + 2 H^+) / 2$; calc. : 226,24 217,8 ; fort ; $(M + 2 H^+ - H_2O - NH_3) / 2$; calc. : 217,73 209,3 ; moyen ; $(M + 2 H^+ - H_2O - 2 NH_3) / 2$; calc. : 209,22 158,1 (faible) ; 141,0 (faible) ; 114,1 (faible) ; 109,1 (faible); 105,0 (faible) : fragmentation des chaînes latérales (?)

8.2.8. Synthèse de la tétraamine THF-4 :

1-benzoxy-4-bromobutane (chaîne latérale) :

 $C_{11}H_{15}BrO$; PM = 243,14

2,282 g de 4-benzoxybutan-1-ol (12,66 mmoles ; PM = 180,25) sont dissous dans 50 ml de THF (séché sur Na-benzophénone) dans un ballon de 100 ml surmonté d'un réfrigérant. 5,46 g de tétrabromométhane (16,46 mmoles ; 1,3 éq. ; PM = 331,65) et 4,32 g de triphénylphosphine (16,47 mmoles ; 1,3 éq. ; PM = 262,30) sont introduits dans le milieu réactionnel ; la réaction est exothermique et le THF se met à refluer. Lorsque la température du milieu réactionnel baisse nous chauffons le milieu réactionnel pendant 2 heures à 60°C. La réaction est agitée pendant 18 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est dilué avec 5 volumes d'hexane, ce qui conduit à la précipitation de l'oxyde de triphénylphosphine. L'ensemble est filtré sur de la silice (1 x 7 cm) et la silice est lavée avec un mélange de 30 % d'éther dans l'hexane. Ce brut est rechromatographié sur une colonne de silice (4 x 15 cm) avec un gradient de 2 % à 5 % d'éther dans de l'hexane. Le composé isolé doit être repurifié lors d'une deuxième chromatographie sur colonne dans les mêmes conditions.

2,747 g de produit sont récupérés, ce qui correspond à 11,3 mmoles et à un rendement de 89 %.

La réaction est difficilement reproductible et donne souvent des rendements très variables. La purification est également délicate à cause de la présence de l'excès de tétrabromométhane et de triphenylphosphine apolaires qui traînent sur colonne de silice.

 $\mathbf{Rf} = 0,40$; éluant : 5 % d'éther dans de l'hexane ; révélation à la vanilline : couleur noir

¹H-RMN (CDCl₃) :

7,22-7,42 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,35 ppm ; 5 H ; phényle 4,52 ppm ; singulet ; 2 H ; O<u>CH₂</u>Ph 3,52 ppm ; triplet ; J = 6,1 Hz ; 2 H ; <u>CH₂</u>OBn 3,45 ppm ; triplet ; J = 6,7 Hz ; 2 H ; <u>CH₂</u>Br 1,88-2,09 ppm ; multiplet ; pics maj. : 2,03 ppm, 2,02 ppm, 2 H ; <u>CH₂CH₂Br</u> 1,68-1,85 ppm ; multiplet ; forme de singulet large ; pics maj. : 1,81 ppm, 1,77 ppm ; <u>CH₂CH₂OBn</u>

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

138,5 ppm (C₀) (phényle, C1'); 128,5 ppm (CH) (phényle, C3', C5') ; 127,7 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,6 ppm (CH) (phényle, C4') ; 73,0 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 69,3 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 33,8 ppm (CH₂) (CH₂ en α du bromure) ; 29,8 ppm (CH₂) (CH₂ en β du Br) ; 28,4 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OBn)

1,12-bis-benzyloxy-5,8-bis-(4-benzyloxy-butyl)-dodécane-5,8-diol:



Q1(4); $C_{48}H_{66}O_6$; PM = 739,03

Le mode opératoire suit celui du Q1(7)

 $\mathbf{Rf} = 0,22$; éluant : éther/hexane 90/10; révélation à la vanilline; coloration en brun-rose

¹H-RMN (CDCl₃) :

7,20-7,42 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,330 ppm ; 4 x 5 H ; 4 phényles

4,49 ppm ; singulet ; 8 H ; 4 O<u>CH</u>₂Ph

3,47 ppm ; triplet ; J = 6,4 Hz ; 8 H ; 4 <u>CH₂</u>OBn

1,77 ppm ; singulet ; 2 H de hydroxyles

1,52-1,71 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,65 ppm, 1,62 ppm, 1,58 ppm ; 8 H ; 4 <u>CH₂CH₂OBn</u>

1,45 ppm ; singulet ; (12 H) ; 2 CH_2 entre les fonctions OH et 4 CH_2 en pos. 1' des chaînes latérales

1,25-1,52 ppm ; multiplet ; forme de singulet large ; pic maj. : 1,41 ppm ; 20 H (8 H superposés au pic précédent); 4 CH_2 intrachaîne en pos. 2'

¹³C-RMN (CDCl₃) :

138,7 ppm (C₀) (phényle, C1'); 128,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5') ; 127,7 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,6 ppm (CH) (phényle, C4') ; 74,1 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (carbone tertiaire portant fonction OH) ; 73,0 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 70,3 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 38,9 ppm (CH₂) (CH₂ des chaînes en pos. 1') ; 32,6 ppm (CH₂) ($\frac{1}{2}$ CH₂ de la partie centrale en β de OH) ; 30,3 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OBn) ; 20,3 ppm (CH₂) (milieu chaîne latérale)

2,2,5,5-tétrakis-(4-benzoxy-butyl)-tétrahydrofurane :



Y1(4) ; $C_{48}H_{64}O_5$; PM = 721,02

 $\mathbf{Rf} = 0,22$; éluant : 30 % d'éther dans de l'hexane ; révélation à la vanilline en brun

¹H-RMN (CDCl₃) :

7,20-7,40 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,33 ppm; 20 H ; 4 phényles

4,49 ppm ; singulet ; 8 H ; 4 O<u>CH₂Ph</u>

3,46 ppm ; triplet ; J = 6,5 Hz ; 8 H ; <u>CH₂OBn</u>

1,73 ppm ; singulet ; 4 H ; H du tétrahydrofurane

1,51-1,69 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,64 ppm, 1,61 ppm, 1,58 ppm ; 8 H ; 4 <u>CH₂</u>CH₂OBn 1,20-1,55 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,45 ppm, 1,38 ppm ; 16 H ; 4 x 2 CH₂ intrachaîne en pos. 1' et 2'.

¹³C-RMN (CDCl₃) :

138,8 ppm (C₀) (phényle, C1') ; 128,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5') ; 127,7 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,5 ppm (CH) (phényle, C4') ; 85,1 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (C2 et C5 du THF) ; 73,0 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 70,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 39,5 ppm (CH₂) (CH₂ en position 1' par rapport au THF) ; 35,5 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (CH₂ de la partie centrale du THF) ; 30,5 ppm (CH₂) (CH₂ en β du OBn) ; 21,3 ppm (CH₂) (chaîne)

4-[2,5,5-tris(4-hydroxy-butyl)-tétrahydrofuran-2-yl]-butan-1-ol :



Y2(4) ; $C_{20}H_{40}O_5$; PM = 360,53

Le mode opératoire suit celui du Y2(7)

 $\mathbf{Rf} = 0,15$; éluant : 10 % méthanol dans l'acétate d'éthyle

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,83 ppm ; singulet ; 4 H ; 4 OH 3,51 ppm ; triplet ; J = 6,2 Hz ; 8 H ; 4 <u>CH</u>₂OH 1,76 ppm ; singulet ; 4 H ; H du cycle 1,18-1,64 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,51 ppm, 1,47 ppm, 1,45 ppm, 1,37 ppm, 1,36 ppm ; 24 H ; 4 <u>CH</u>₂CH₂OH , 4 CH₂ en pos. 1' et 4 CH₂ en pos. 2' des chaînes latérales

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

86,93 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (C2 et C5 du THF) ; 62,99 ppm (CH₂) (CH₂ en α du OH) ; 40,51 ppm (CH₂) (CH₂ en position 1' des chaînes latérales) ; 36,47 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (CH₂ de la partie centrale du THF) ; 34,36 ppm (CH₂) (CH₂ en β de OH) ; 22,03 ppm (CH₂) (chaîne)

2,2,5,5-tétrakis-(4-azido-butyl)-tétrahydrofurane :



Y3(4) ; $C_{20}H_{36}N_{12}O$; PM = 460,58

Le mode opératoire suit celui du Y3(7)

 $\mathbf{Rf} = 0,27$; éluant : 20 % éther dans l'hexane ; révélation faible à la vanilline (couleur brun) et révélation très faible à l'iode.

¹H-RMN (CDCl₃) :

3,29 ppm ; triplet ; J = 6,7 Hz ; 8 H ; 4 $\underline{CH_2N_3}$ 1,77 ppm ; singulet ; 4 H ; H du cycle 1,50-1,70 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,64 ppm, 1,60 ppm, 1,57 ppm ; 8 H ; 4 $\underline{CH_2CH_2N_3}$ 1,20-1,50 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,46 ppm, 1,39 ppm ; 16 H ; 4 CH₂ en pos. 1' et 4 CH₂ en pos. 2' des chaînes latérales

$^{13}\text{C-RMN}(\text{CDCl}_3)$:

84,9 ppm ($\frac{1}{2}$ C0) (C2 et C5 du THF) ; 51,4 ppm (CH₂) (CH₂ en α de N₃) ; 39,0 ppm (CH₂) (CH₂ en position 1' par rapport au THF) ; 35,5 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (CH₂ de la partie centrale du THF); 29,5 ppm (CH₂) (CH₂ en β de N₃) ; 21,8 ppm (CH₂) (chaîne hydrocarbonée)

VIII. Partie expérimentale

tétrachlorhydrate de la 4-[2,5,5-tris-(6-amino-butyl)-tétrahydrofuran-2-yl]-butylamine :

 $H_3 \dot{N} (CH_2)_4$ (CH₂)₄ $\dot{N} H_3$ $H_2 \overline{N} (CH_2)_4$ 4 Cl

THF-4 ; $C_{20}H_{48}Cl_4N_4O$; PM = 502,43

Le mode opératoire suit celui du THF-7

 $\mathbf{Rf} = 0.0$; ne migre pas; éluant: méthanol-dichlorométhane-ammoniaque 10/10/1; révélation à la vanilline; couleur brune

Température de fusion : $> 230^{\circ}$ C , le chlorhydrate jaunit à cette température

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,81 ppm ; singulet ; 12 H ; NH_3^+ 2,90 ppm ; triplet ; J = 7,5 Hz ; 8 H ; 4 $\underline{CH_2}NH_3^+$ 1,80 ppm ; singulet ; 4 H ; H du cycle 1,55-1,75 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,66 ppm, 1,63 ppm, 1,59 ppm ; 8 H ; 4 $\underline{CH_2}CH_2NH_3^+$ 1,22-1,75 ppm ; multiplet ; pic maj. : 1,66 ppm, 1,63 ppm, 1,59 ppm ; 16 H ; 4 x 2 CH₂ en pos. 1' et 4 x 2 CH₂ en pos. 2' des chaînes latérales

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

86,5 ppm ($\frac{1}{2}$ C0) (C2 et C5 du THF) ; 40,9 ppm (CH₂) (CH₂ en α de NH₃⁺) ; 40,0 ppm (CH₂) (CH₂ en position 1' par rapport au THF) ; 36,4 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (en partie centrale du THF) ; 29,2 ppm (CH₂) (CH₂ en β de NH₃⁺) ; 22,7 ppm (CH₂) (chaîne)

spectre de masse en électronspray (ES, 70 V) :

La fragmentation est plus importante pour les espèces dichargées, ce qui indique que ces pics supplémentaires correspondent effectivement à une fragmentation des amines et non à une contamination de l'échantillon.

THF-4 : masse monoisotopique : 356,35

357,3; fort; M + H⁺; calc. : 357,36

358,3 ; moyen ; M' + H⁺ (1 isotope lourd) ; calc. ; 358,37

339,3 ; faible ; $M + H^{\scriptscriptstyle +}$ - H_2O ; calc. : 339,35

322,3 ; faible ; M + H⁺ - H₂O – NH₃ ; calc. : 322,32

305,3; faible; M+ H⁺ - H₂O - 2 NH₃; calc. : 305,30

288,3 ; faible ; $M + H^+$ - $H_2O - 3 NH_3$; calc. : 288,27

279,1 ; fort ; O=PPh₃ + H⁺ (contaminant ?); calc. : 279,09

179,2; fort; $(M + 2 H^+) / 2$; calc. : 179,18

170,2 ; fort ; (M + 2 H⁺ - H₂O) / 2 ; calc. : 170,18

161,7 ; fort ; $(M + 2 H^{+} - H_{2}O - NH_{3}) / 2$; calc. : 161,66

153,2; moyen; $(M + 2 H^{+} - H_{2}O - 2 NH_{3})$ / 2; calc.: 153,16

8.2.9. Préparation de la tétraamine THF-cyclo :

8.2.9.1. Préparation du *trans*-1-(2-bromo-éthyl)-4-benzoxyméthyl-cyclohexane, comme analogue d'une chaîne hydrocarbonée rigidifiée :

(4-bromométhyl-trans-cyclohexyl)-méthanol:

 $C_8H_{15}BrO$; PM = 207,11

Monobromation du 1,4-bis-(hydroxyméthyl)-cyclohexane :

positions

14,42 g de *trans*-(4-hydroxyméthyl-cyclohexyl)-méthanol (100 mmol ; 1 éq. ; PM=144,21) sont introduits dans un ballon monocol de 1 l et dissous dans 500 ml de toluène. 24 ml d'acide bromhydrique à 48 % (214 mmol ; 2,1 éq.) sont ajoutés et le milieu réactionnel est chauffé à reflux et sous argon pendant 7 heures. Après refroidissement, 400 ml d'éther sont ajoutés, et la phase organique est lavée avec 200 ml d'une solution d'eau saturée en NaCl. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther (2 fois 400 ml). Les trois phases organiques sont lavés avec 200 ml d'eau saturée en NaCl. Les phases organiques sont réunies et séchées sur MgSO₄. La filtration sur célite et l'évaporation des solvants fournit un brut qui est purifié par chromatographie sur silice (colonne : 6 x 20 cm ; éluant 30 % puis 40 % éther dans hexane). 10,7 g de bromoalcool purifié sont récupérés, ce qui correspond à 51,8 mmol et équivaut à un rendement de 52 %.

 $\mathbf{Rf} = 0.3$; éluant 40 % d'éther dans de l'hexane; révélation en bleu-noir à la vanilline-acide

¹H-RMN (CHCl₃) :

cyclohexane;

3,42 ppm ; doublet ; J = 6,2 Hz ; 2 H ; CH₂ en α du bromure 3,25 ppm ; doublet ; J = 6,3 Hz ; 2 H ; CH₂ en α de OH 1,70-2,00 ppm ; multiplet ; 2 massifs symétriques ; pics maj. : 1,88 ppm, 1,83 ppm ; 4 H ; protons équatoriaux du cyclohexane 1,80 ppm ; H de l'alcool (superposé au précédent) 1,28-1,68 ppm ; multiplet très large composés de 2 massifs symétriques ; 2 H ; 2 H du

et

4

du

cyclohexane

1

0,80-1,15 ppm ; multiplet sous forme de quintuplet démultiplié ; pics maj. 1,00 ppm, 0,97 ppm ; 4 H ; protons axiaux du cyclohexane

¹³C-RMN (CHCl₃) :

68,3 ppm (CH₂) (CH₂ en α de OH) ; 40,4 ppm (CH₂) (CH₂ en α du bromure) ; 40,2 ppm (2 CH superposés) (jonctions du cycle) ; 31,1 ppm (2 x CH₂) (cycle) ; 28,9 ppm (2 x CH₂) (cycle)

(4-bromométhyl-trans-cyclohexylméthoxyméthyl)-benzène :



 $C_{15}H_{21}BrO$; PM = 297,23

Benzylation du bromoalcool (4-bromométhyl-trans-cyclohexyl)-méthanol:

13,06 g de (4-bromométhyl-*trans*-cyclohexyl)-méthanol (63,05 mmol ; 1 éq. ; PM=207,11) sont dissous dans 200 ml de THF dans un ballon monocol de 500 ml sec et sous argon. 7,566 g d'hydrure de sodium à 60 % dans l'huile (189,15 mmol ; 3 éq. ; PM=24,00) sont lavés deux fois à l'hexane et ajoutés au milieu réactionnel par petites portions. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 heure. 11,3 ml de bromure de benzyle (97,574 mmol ; 1,5 éq. ; PM=171,04) sont additionnés à l'aide d'une seringue. La réaction est agitée durant 16 heures à température ambiante.

Nous arrêtons la réaction en versant le milieu réactionnel par petites portions dans 150 ml de méthanol, ce qui neutralise l'hydrure de sodium en excès. 100 ml d'eau sont ajoutés, et le milieu réactionnel est acidifié avec 6 ml d'HCl concentré (pH \sim 1). Le méthanol est évaporé sous pression réduite. De l'eau saturée en NaCl est ajoutée à la phase aqueuse, puis elle est extraite à l'éther (2 fois 150 ml). Les phases organiques rassemblées sont lavées avec 200 ml d'eau saturée en NaCl puis séchées sur MgSO₄. La filtration sur célite et l'évaporation des solvants fournit un brut qui est purifié par chromatographie sur silice (5 x 20 cm, éluant : 2 à 5% d'éther dans de l'hexane). 15,4 g de produit ont été isolés, ce qui correspond à 52 mmoles et à un rendement de 82,4%.

 $\mathbf{Rf} = 0,60$; éluant : 5 % d'éther dans de l'hexane ; révélation à la vanilline-acide ; couleur bleue-verte

¹H-RMN (CHCl₃) :

7,23-7,45 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,37 ppm ; 5 H ; H du phényle

4,54 ppm ; singulet ; 2 H ; O<u>CH₂</u>Ph

3,33 ppm ; doublet ; J = 6,4 Hz ; 2 H ; CH₂ en α du bromure

3,32 ppm ; doublet ; J = 6,3 Hz ; 2 H ; <u>CH₂</u>OBn

1,81-2,09 ppm ; multiplet ; 4 H ; protons équatoriaux du cyclohexane

1,50-1,78 ppm ; multiplet large ; pic central : 1,64 ppm ; 2 H ; 2 H du cyclohexane ; positions 1 et 4 du cyclohexane

1,30 ppm ; singulet ; H de l'alcool

0,91-1,20 ppm ; multiplet sous forme de quintuplet démultiplié ; pics maj. 1,11 ppm, 1,06 ppm, 1,00 ppm ; 4 H ; protons axiaux du cyclohexane

¹³C-RMN (CHCl₃) :

138,8 ppm (C0) (phényle, C1') ; 128,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5'); 127,6 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,5 ppm (CH) (phényle, C4') ; 75,9 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 73,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 40,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α du bromure) ; 40,3 ppm (CH) (jonction du cycle) ; 38,1 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cycle) ; 31,2 ppm (2 CH₂) (cycle) ; 29,5 ppm (2 CH₂) (cycle)

2-(4-benzyloxyméthyl-trans-cyclohexyl)-éthanol :

 $C_{16}H_{24}O_2$; PM = 248,36

Formation de l'alcool homologue par réaction du Grignard sur du paraformaldéhyde :

Un ballon bicol de 50 ml est surmonté d'un réfrigérant (verrerie séchée à l'étuve à 120° C puis refroidie sous vide). 687 mg de tournures de magnésium (Mg, 28,26 mmoles, PM=24,31) sont introduits et placés sous argon, le montage étant fermé par des sérum caps. 7,075 g de (4-bromométhyl-*trans*-cyclohexyl-)méthoxyméthylbenzène (23,8 mmoles, PM=297,23) sont pesés dans un ballon piriforme (séché dans l'étuve), placés sous argon et dissous dans 20 ml d'éther (distillé sur du sodium-benzophénone). Cette solution est ajoutée par portions de 0,5 ml sur le magnésium à l'aide d'une seringue. La réaction démarre bien après chauffage au sèche-cheveux ; nous continuons ce chauffage pour entretenir un reflux pendant l'addition complète, qui se fait pendant un intervalle de 10 minutes. Le milieu réactionnel est placé à reflux sur un bain d'huile pendant 30 minutes. Le milieu devient gris pendant ce temps.

1,367 g de formaldéhyde polymère (47,1 mmol ; 2 éq. ; PM=29,02) est mis en suspension dans 20 ml de THF (distillé sur du sodium-benzophénone). Le paraformaldéhyde se dissout très peu. La suspension est ajoutée durant 10 minutes par petits volumes. Le milieu réactionnel s'échauffe après l'ajout de tout le formaldéhyde. La réaction est laissée à 23°C pendant 5 heures. Pour arrêter la réaction le milieu réactionnel est versé dans 50 ml d'eau, et la phase aqueuse est acidifiée par ajout de 2 ml de HCl concentré (goutte à goutte). La phase aqueuse est saturée en NaCl par ajout de sel en cristaux, puis la phase aqueuse est extraite à l'éther (2 fois 100 ml). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée à sec. Le brut de la réaction est chromatographié sur colonne de silice (5 x 20 cm ; éluant : 40 % d'éther dans de l'hexane), pour sortir le produit ayant la plus forte polarité. 1,599 g d'alcool sont récupérés, ce qui correspond à 6,4 mmoles et à un rendement de 22,8 %. (Ce rendement peut être augmenté considérablement par hydrolyse du bis-[2-(4-benzyloxyméthyl-*trans*-cyclohexyl)-éthoxy]-méthane. Ce cétal élue dans les fractions tête. Il est un produit secondaire de la réaction d'homologation. Il fournit alors deux molécules d'alcool par molécule de cétal.(nous y revenons plus loin))

Remarques :

-Nous avons fait la même réaction à température ambiante par réaction du formaldéhyde gazeux sur le Grignard. Le formaldéhyde gaz est formé par chauffage de 5 équivalents de paraformaldéhyde dans un ballon bicol chauffé à 250°C, ce qui conduit à la dépolymérisation du paraldéhyde. Le formaldéhyde gaz est entraîné par un flux constant d'argon à travers le bicol. L'aldéhyde est soufflé sur la surface de la solution de l'organomagnésien et conduit à la formation d'un dépôt dense d'alcoolate à la surface du milieu réactionnel. L'excès de formaldéhyde-gaz est capté dans un piège refroidi à l'azote, où il repolymérise au contact des parois de verre refroidies. Cette réaction donne un rendement de 44 % en alcool homologué. -Comme la réaction de couplage est fortement exothermique la dimérisation de l'organomagnésien devient importante. Nous avons isolé ce dimère qui s'est formé avec un rendement de 17 % lors de ce couplage (benzoxy-{4[2-(4-benzyloxyméthyl-*trans*-cyclohexyl}-méthane).

2-(4-benzyloxyméthyl-trans-cyclohexyl)-éthanol :

 $\mathbf{Rf} = 0,25$; éluant : 40 % d'éther dans de l'hexane ; révélation de couleur noire à la vanillineacide

¹H-RMN (CHCl₃) :

7,13-7,37 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,28 ppm ; 5 H ; H du phényle

4,45 ppm ; singulet ; 2 H ; O<u>CH₂</u>Ph

3,64 ppm ; triplet ; J = 6,6 Hz ; 2 H ; CH₂ en α de l'alcool

3,23 ppm ; doublet ; J = 6,4 Hz ; 2 H ; <u>CH₂OBn</u>

1,62-1,90 ppm ; multiplet ; forme de triplet dédoublé ; 4 H ; protons équatoriaux du cyclohexane

1,20-1,62 ppm ; multiplet très large composés de 2 massifs symétriques ; 2 H ; 2 H du cyclohexane ; positions 1 et 4

1,35-1,50 ppm ; multiplet superposé au précédent ; pics maj. : 1,77 ppm, 1,75 ppm ; 2 H ; CH₂ en β de l'alcool

0,77-1,07 ppm ; multiplet sous forme de quintuplet ; pics maj. 0,97 ppm, 0,92 ppm, 0,87 ppm (J = 10,2 Hz) ; 8 H ; protons axiaux des cyclohexanes

¹³C-RMN (CHCl₃) :

138,9 ppm (C0) (phényle, C1') ; 128,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5'); 127,6 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,5 ppm (CH) (phényle, C4') ; 76,3 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 73,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 60,9 ppm (CH₂) (CH₂ en α de l'alcool) ; 40,4 ppm (CH₂) (CH₂ en β de l'alcool) ; 38,3 ppm (CH) (jonction du cycle) ; 34,5 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cycle) ; 32,8 ppm (2 x CH₂) (cycle) ; 30,0 ppm (2 x CH₂) (cycle)

bis-[2-(4-benzyloxyméthyl-trans-cyclohexyl)-éthoxy]-méthane :



 $C_{33}H_{48}O_4$; PM = 508,73

Les fractions tête de la chromatographie précédente sont repurifiées sur colonne de silice avec un mélange de 10 % éther dans l'hexane comme éluant. 1,182 g du cétal, résultant de la condensation de deux molécules d'alcool sur le formaldéhyde, sont purifiés ainsi. Ceci correspond à 2,32 mmoles et à un rendement de 19,5 %.

L'hydrolyse (méthanolyse) de ce cétal (1,182 g) dans du méthanol (100 ml) contenant de l'acide chlorhydrique (10 ml, 36 % aqueux) fournit 1,109 g d'alcool, qui est pur par analyse en chromatographie sur couche mince; ceci correspond à 4,47 mmoles de 2-(4-benzyloxyméthyl-*trans*-cyclohexyl)-éthanol.

(En total 2,71 g d'alcool homologué sont récupérés , ce qui correspond à 9,5 mmoles et à un rendement de 38,9 %)

 $\mathbf{Rf} = 0,24$; éluant : 20 % d'éther dans de l'hexane ; révélation de couleur violet-noir avec de la vanilline

¹H-RMN (CHCl₃) :

7,13-7,37 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,296 ppm ; 10 H ; H aromatiques, 2 benzyles

4,62 ppm ; singulet ; 2 H ; CH₂ du cétale

4,47 ppm ; singulet ; 4 H ; O<u>CH₂</u>Ph

3,53 ppm ; triplet ; J = 6,6 Hz ; 4 H ; CH₂ en α du cétal

3,24 ppm ; doublet ; J = 6,4 Hz ; 4 H ; <u>CH₂OBn</u>

1,62-1,90 ppm ; multiplet ; forme de triplet dédoublé ; 8 H ; protons équatoriaux du cyclohexane

1,21-1,62 ppm ; multiplet très large composés de 2 massifs symétriques ; 4 H ; 2 x 2 H du cyclohexane ; positions 1 et 4

1,38-1,52 ppm ; multiplet superposé au précédent ; forme de quadruplet ; pics maj. : 1,48 ppm, 1,45 ppm ; 4 H ; CH_2 en β du cétal

0,77-1,07 ppm ; multiplet sous forme de quintuplet ; pics maj. 0,97 ppm, 0,92 ppm, 0,87 ppm (J = 10,2 Hz) ; 8 H ; protons axiaux des cyclohexanes

¹³C-RMN (CHCl₃) :

138,9 ppm (C0) (phényle, C1') ; 128,3 ppm (CH) (phényle, C3', C5'); 127,5 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,4 ppm (CH) (phényle, C4') ; 95,3 ppm (CH₂) (cétal) ; 76,3 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 73,0 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 65,7 ppm (CH₂) (CH₂ en α du cétale) ; 38,3 ppm (CH) (jonction du cycle) ; 37,1 ppm (CH₂) (CH₂ en β du cétale) ; 34,8 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cycle) ; 32,7 ppm (2 x CH₂) (cycle) ; 30,0 ppm (2 x CH₂) (cycle)

 $benzoxy-\{4[2-(4-benzyloxym\acute{e}thyl-\textit{trans-cyclohexyl})-\acute{e}thyl]-\textit{trans-cyclohexyl}\}-m\acute{e}thane:$



 $C_{30}H_{42}O_2$; PM = 434,65

Rf = 0,25 ; éluant : 10 % d'éther dans de l'hexane ; révélation en bleu à la vanilline-acide
¹H-RMN (CHCl₃) :

7,22-7,45 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,36 ppm ; $2 \times 5 \text{ H}$; $2 \times \text{H}$ du phényle 4,53 ppm ; singulet ; $2 \times 2 \text{ H}$; $2 \times \text{OCH}_2\text{Ph}$ 3,31 ppm ; doublet ; J = 6,4 Hz ; $2 \times 2 \text{ H}$; $2 \times \frac{\text{CH}_2}{\text{OBn}}$ 1,70-1,95 ppm ; multiplet ; forme de triplet dédoublé ; $2 \times 4 \text{ H}$; pics maj. 1,83 ppm, 1,81 ppm ; 4 H ; protons équatoriaux du cyclohexane 1,50-1,70 ppm ; multiplet ; $2 \times 1 \text{ H}$; $2 \times \text{CH}$ du cycle en β du benzoxy 1,10-1,35 ppm ; multiplet ; $2 \times 3 \text{ H}$; 2 CH_2 reliant les cyclohexanes et $2 \times \text{CH}$ du cycle 0,80-1,10 ppm ; multiplet ; $2 \times 4 \text{ H}$; pic maj. : 0,96 ppm ; protons axiaux du cyclohexane

$^{13}\text{C-RMN}$ (CHCl₃) :

139,0 ppm (C0) (phényle, pos. 0) ; 128,4 ppm (CH) (phényle, pos. 3, 5); 127,6 ppm (CH) (phényle, pos. 2, 6) ; 127,5 ppm (CH) (phényle, pos. 4) ; 76,5 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 73,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 38,5 ppm (CH) (jonction du cycle) ; 38,2 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cycle) ; 34,8 ppm (CH₂) (CH₂ du pont éthylène) ; 32,9 ppm (2 x CH₂) (cycle) ; 30,2 ppm (2 x CH₂) (cycle)

trans-1-(2-bromo-éthyl)-4-benzoxyméthyl-cyclohexane :



 $C_{16}H_{23}BrO$; PM = 311,26

2,829 g de 2-(4-benzyloxyméthyl-*trans*-cyclohexyl)-éthanol (11,39 mmoles ; PM=248,37) sont introduits dans un ballon de 250 ml et dissous dans 150 ml de CH₂Cl₂. 2,283 g de chlorure de mésyle (19,93 mmoles ; 1,75 éq. ; PM=114,55) sont ajoutés à l'aide d'une seringue. 2,313 g de triéthylamine (22,78 mmoles ; 2éq. ; PM=101,12), sont additionnés goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 heures à température ambiante et il devient légèrement jaunâtre pendant ce temps. L'analyse par CCM révèle qu'il y a présence d'un seul produit. Nous ajoutons 0,578 g de triéthylamine et 0,571 g de chlorure de mésyle. Le milieu réactionnel vire au jaune après ¹/₄ d'heure. D'après notre expérience cette couleur jaune indiquerait que les réactifs sont en excès, et que la réaction serait alors complète. Les solvants sont évaporés. Le solide résultant est repris dans du dichlorométhane (150 ml), puis lavé avec de l'eau (2 x 50 ml). La phase aqueuse est lavée avec du dichlorométhane (2 fois 100 ml). Les phases organiques réunies sont évaporées sous vide. Nous récupérons ainsi une huile jaunâtre.

VIII. Partie expérimentale

Rf = 0,66 ; éluant : 40 % d'éther dans l'hexane ; révélation à la vanilline : couleur noire. Le mésylate laisse une traînée sur la plaque (dégradation).

Le produit brut de la réaction précédente est repris dans 50 ml de DMF et placé dans un ballon monocol de 100 ml, surmonté d'un réfrigérant vigreux. 5,859 g de bromure de sodium de sodium (56,95 mmoles ; 5 éq. ; PM=102,89) sont ajoutés, et le milieu réactionnel est chauffé à 65° C pendant 18 heures. Après refroidissement du milieu, le milieu réactionnel est dilué avec 50 ml d'eau distillée. Le milieu aqueux est extrait avec de l'éther (3 x 250 ml). Les phases organiques sont lavées avec de l'eau (50 ml), puis elles sont réunies et séchées avec du MgSO₄. La filtration sur Célite et l'évaporation des solvants fournit un brut qui est purifié par chromatographie sur silice (colonne : 4 x 22 cm, éluant : 2,5 % d'éther dans de l'hexane). 3,035 g du produit purifié sont récupérés, ce qui correspond à 9,75 mmoles et équivaut à un rendement de 86 % comme rendement global des deux étapes.

 $\mathbf{Rf} = 0,42$; éluant : 5 % éther dans l'hexane ; révélation en noir à la vanilline

¹H-RMN (CHCl₃) :

7,18-7,39 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,31 ppm ; 5 H ; H du phényle

4,48 ppm ; singulet ; 2 H ; O<u>CH₂</u>Ph

3,43 ppm ; triplet ; J = 7,2 Hz ; 2 H ; CH₂ en α du bromure

3,26 ppm ; doublet ; J = 6,4 Hz ; 2 H ; <u>CH₂</u>OBn

1,70-1,95 ppm ; multiplet ; forme de triplet dédoublé ; 4 H ; protons équatoriaux du cyclohexane

1,70-1,85 ppm ; multiplet (superposé au précédent) ; forme de quadruplet ; 2 H ; CH_2 en β du bromure

1,33-1,65 ppm ; multiplet très large composés de 2 massifs symétriques ; 2 H ; 2 H du cyclohexane ; positions 1 et 4 du cyclohexane

0,77-1,07 ppm ; multiplet sous forme de quintuplet démultiplié ; pics maj. 0,97 ppm, 0,95 ppm, 0,92 ppm ; 4 H ; protons axiaux du cyclohexane

¹³C-RMN (CHCl₃) :

138,8 ppm (C0) (phényle, C1') ; 128,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5'); 127,6 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,5 ppm (CH) (phényle, C4') ; 76,2 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 73,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 40,3 ppm (CH₂) (CH₂ en α du bromure) ; 38,2 ppm (CH) (jonction du cycle) ; 36,4 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cycle) ; 32,0 ppm (2 x CH₂) (cycle) ; 31,9 ppm (CH₂) (CH₂ en β du bromure) ; 29,8 ppm (2 x CH₂) (cycle)

8.2.9.2. Préparation de la tétraamine THF-cyclo :

1,8-bis-(4-benzyloxy-méthyl-*trans*-cyclohexyl)-3,6-bis-[2-(4-benzyloxyméthyl-*trans*-cyclohexyl)-éthyl]-octane-3,6-diol :



Q1(cyclo) ; $C_{68}H_{98}O_6$; PM = 1011,50

Le mode opératoire suit celui du Q1(7) (préparation de la tétraamine Tét-7)

 $\mathbf{Rf} = 0,12$; éluant : 50 % d'éther dans de l'hexane ; révélation à la vanilline acide

¹H-RMN (CHCl₃) :

7,18-7,38 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,30 ppm ; 4 x 5 H ; H du phényle

4,47 ppm ; singulet ; 4 x 2 H ; O<u>CH₂Ph</u>

3,25 ppm ; doublet ; J = 6,4 Hz ; 4 x 2 H ; $\underline{CH_2OBn}$

1,63-1,90 ppm ; multiplet ; pic maj. centré sur 1,77 ppm ; 4 x 4 H ; protons équatoriaux du cyclohexane

1,00-1,28-1,63 ppm ; multiplets ; 28 H alkyles (1,39 ppm ; singulet ; CH₂ du milieu, entre les OH), 2 H de l'alcool (1,41 ppm)

0,77-1,00 ppm ; multiplet ; pic maj. : 0,95 ppm ; 4 x 4 H ; protons axiaux du cyclohexane

¹³C-RMN (CHCl₃) :

138,9 ppm (C0) (phényle, C1') ; 128,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5'); 127,6 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,5 ppm (CH) (phényle, C4') ; 76,3 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 74,3 ppm (C0) (carbone tertiaire portant fonction OH) ; 73,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy); 38,5 ppm (CH) (jonction du cycle) ; 38,4 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cycle) ; 36,5 ppm (CH₂) (CH₂ dans chaîne latérale en β de OH); 32,9 ppm (2 x CH₂) (cycle) ; 32,5 ppm (CH₂) ($\frac{1}{2}$ CH₂ de la partie centrale en β de OH) ; 31,1 ppm (CH₂) ; 30,1 ppm (2 x CH₂) (cycle)

benzoxy-{4-[4-(4-benzyloxyméthyl-trans-cyclohexyl]-trans-cyclohexyl}-méthane :



 $C_{32}H_{46}O_2$; PM = 462,71

Ce dimère a été formé comme produit secondaire lors de la synthèse de Q1(cyclo) : homodimérisation du réactif de Grignard

 $\mathbf{Rf} = 0.25$; éluant : 10 % d'éther dans de l'hexane ; révélation à la vanilline

¹H-RMN (CHCl₃) :

7,18-7,39 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,30 ppm ; $2 \times 5 \text{ H}$; $2 \times \text{H}$ du phényle 4,47 ppm ; singulet ; $2 \times 2 \text{ H}$; $2 \times \text{OCH}_2\text{Ph}$ 3,25 ppm ; doublet ; J = 6,4 Hz ; $2 \times 2 \text{ H}$; $2 \times \underline{\text{CH}}_2\text{OBn}$ 1,62-1,90 ppm ; multiplet ; forme de triplet dédoublé ; $2 \times 4 \text{ H}$; pics maj. 1,77 ppm, 1,75 ppm ; 4 H ; protons équatoriaux du cyclohexane 1,42-1,62 ppm ; multiplet ; $2 \times 1 \text{ H}$; $2 \times \text{CH}$ du cycle en β du benzoxy 1,04-1,30 ppm ; multiplet ; $2 \times 5 \text{ H}$; $2 \times 2 \text{ CH}_2$ reliant les cyclohexanes et $2 \times \text{CH}$ du cycle 0,72-1,04 ppm ; multiplet ; pic maj. : 0,90 ppm ; $2 \times 4 \text{ H}$; protons axiaux du cyclohexane

¹³C-RMN (CHCl₃) :

138,90 ppm (C0) (phényle, C1') ; 128,3 ppm (CH) (phényle, C3', C5'); 127,5 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,4 ppm (CH) (phényle, C4') ; 76,4 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 73,0 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 38,4 ppm (CH) (jonction du cycle) ; 37,9 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cycle) ; 37,5 ppm (CH₂) (CH₂ aux extrémités du pont butylène) ; 32,8 ppm (2 x CH₂) (cycle) ; 30,1 ppm (2 x CH₂) (cycle) ; 27,3 ppm (CH₂) (CH₂ en milieu du pont butylène)

2,2,5,5-tétrakis[2-(4-benzyloxyméthyl-*trans*-cyclohexyl)-éthyl]-tétrahydrofurane :



Y1(cyclo); $C_{68}H_{96}O_5$; PM = 993,49

Le mode opératoire suit celui du Y1(7)

 $\mathbf{Rf} = 0,30$; éluant : 20 % d'éther dans de l'hexane ; révélation à la vanilline

¹H-RMN (CHCl₃) :

7,18-7,38 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,31 ppm ; 4 x 5 H ; H du phényle

4,47 ppm ; singulet ; $4 \times 2 H$; O<u>CH₂</u>Ph

3,25 ppm ; doublet ; J = 6,4 Hz ; $4 \times 2 H$; <u>CH₂OBn</u>

1,63-1,90 ppm ; multiplet ; centré sur 1,77 ppm ; 4 x 4 H ; protons équatoriaux du cyclohexane

1,68 ppm ; singulet ; 2 x 2 H ; H du tétrahydrofurane

0,99-1,61 ppm ; multiplets ; 24 H alkyles

0,77-0,99 ppm ; multiplet ; pic maj. : 0,95 ppm ; 4 x 4 H ; protons axiaux du cyclohexane

¹³C-RMN (CHCl₃) :

139,0 ppm (C0) (phényle, C1') ; 128,4 ppm (CH) (phényle, C3', C5') ; 127,6 ppm (CH) (phényle, C2', C6') ; 127,5 ppm (CH) (phényle, C4') ; 85,3 ppm ($\frac{1}{2}$ C₀) (C2 et C5 du THF) ; 76,3 ppm (CH2) (CH₂ du benzoxy) ; 73,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 38,6 ppm (CH) (jonction du cycle) ; 38,4 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cyclohexane) ; 36,9 ppm (CH₂) (CH₂ en 1'du THF) ; 35,6 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (CH₂ du THF) ; 33,0 ppm (CH₂) (CH₂ proche du THF dans le cyclohexane) ; 32,9 ppm (CH₂) (CH₂ proche du THF dans le cyclohexane) ; 32,1 ppm (CH₂) (CH₂ en pos. 2' par rapport au THF) ; 30,2 ppm (2 x CH₂) (cycle)

Remarque : les deux côtés latéraux du cyclohexane ne sont plus équivalents (absence de plan de symétrie, le reste de la molécule n'obéissant pas à cette symétrie), ce qui se reflète dans une faible différence de déplacement des pics 32,96 et 32,88 ppm.



2,2,5,5-tétrakis-[2-(4-hydroxyméthyl-trans-cyclohexyl)-éthyl]-tétrahydrofurane :

Y2(cyclo); $C_{40}H_{72}O_5$; PM = 633,00

Le mode opératoire suit celui du Y2(7)

 $\mathbf{Rf} = 0.35$; éluant : 10 % de méthanol dans du dichlorométhane ; révélation à la vanillineacide

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,83 ppm ; H des hydroxyles ; signal de méthanol d-H

3,33 ppm ; doublet ; J = 6,3 Hz ; 4 x 2 H (signal superposé à celui du méthanol d-H); <u>CH₂OH</u> 1,65-1,90 ppm ; multiplet sous forme de doublet , pics maj. : 1,80 ppm, 1,76 ppm ; J = 7,3 Hz ; 4 x 4 H ; protons équatoriaux du cyclohexane

1,74 ppm ; singulet ; 2 x 2 H ; H du tétrahydrofurane

1,00-1,65 ppm ; multiplets ; 24 H alkyles

0,75-1,00 ppm ; multiplet ; pic maj. : 0,91 ppm ; 4 x 4 H ; protons axiaux du cyclohexane

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

87,03 ppm ($\frac{1}{2}$ C0) (C2 et C5 du THF) ; 68,88 ppm (CH₂) (CH₂ en α de OH) ; 41,99 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cyclohexane) ; 39,96 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cyclohexane) ; 37,87 ppm (CH₂) (CH₂ en pos. 1' du THF) ; 36,61 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (CH₂ du THF) ; 34,21 ppm (2 x CH₂) (CH₂ proche du THF dans le cyclohexane) ; 33,24 ppm (CH₂) (CH₂ en pos. 2' par rapport au THF) ; 30,84 ppm (2 x CH₂) (CH₂ éloignés du THF dans le cyclohexane)



2,2,5,5-tétrakis-[2-(4-azidométhyl-trans-cyclohexyl)-éthyl]-tétrahydrofurane :

Y3(cyclo) ; $C_{40}H_{68}N_{12}O$; PM = 733,05

Le mode opératoire suit celui du **Y3(7)**

 $\mathbf{Rf} = 0,40$; éluant : 10 % éther dans l'hexane ; révélation à l'iode

¹H-RMN (CHCl₃) :

3,07 ppm ; doublet ; J = 6,6 Hz ; 4 x 2 H ; $\underline{CH_2}N_3$

1,63-1,90 ppm ; multiplet sous forme de doublet , pics maj. : 1,76 ppm, 1,72 ppm ; J = 7,3 Hz ; 4 x 4 H ; protons équatoriaux du cyclohexane

1,65 ppm ; singulet ; 2 x 2 H ; H du tétrahydrofurane

1,00-1,55 ppm ; multiplets ; 24 H alkyles

0,75-1,00 ppm ; multiplet ; pic maj. : 0,91 ppm ; 4 x 4 H ; protons axiaux du cyclohexane

¹³C-RMN (CHCl₃) :

85,2 ppm ($\frac{1}{2}$ C0) (C2 et C5 du THF) ; 58,0 ppm (CH₂) (CH₂ en α de N₃) ; 38,3 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cyclohexane) ; 38,2 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cyclohexane) ; 36,8 ppm (CH₂) (CH₂ en pos. 1' du THF) ; 35,6 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (CH₂ du THF) ; 32,7 ppm (CH₂) (CH₂ proche du THF dans le cyclohexane) ; 32,6 ppm (CH₂) (CH₂ proche du THF dans le cyclohexane) ; 30,6 ppm (CH₂) (CH₂ en pos. 2'par rapport au THF) ; 29,7 ppm (2 x CH₂) (cycle)

Remarque : les deux côtés latéraux du cyclohexane ne sont plus équivalents (absence de plan de symétrie, le reste de la molécule n'obéissant pas à cette symétrie), ce qui se reflète dans une faible différence de déplacement des pics 32,7 et 32,6 ppm.

tétrachlorhydrate du 2,2,5,5-tétrakis-[2-(4-aminométhyl-*trans*-cyclohexyl)-éthyl]-tétrahydrofurane :



THF-cyclo ; $C_{40}H_{80}Cl_4N_4O$; PM = 774,90

Le mode opératoire suit celui du THF-7

 $\mathbf{Rf} = 0,08$: éluant: méthanol/dichlorométhane/ammoniaque(40 % aq.) 10/10/1; révélation à la vanilline

¹H-RMN (méthanol-4d) :

4,87 ppm ; H des ammoniums ; signal du méthanol 4d-H
2,79 ppm ; doublet ; J = 6,9 Hz ; 4 x 2 H ; <u>CH₂</u>NH₃⁺
1,80-1,95 ppm ; multiplet sous forme de doublet , pics maj. : 1,87 ppm, 1,83 ppm ; J = 8,1 Hz ; 4 x 4 H ; protons équatoriaux du cyclohexane
1,78 ppm ; singulet ; 2 x 2 H ; H du tétrahydrofurane
1,10-1,72 ppm ; multiplets ; 24 H alkyles
0,90-1,10 ppm ; multiplet ; pic maj. : 1,03 ppm ; 4 x 4 H ; protons axiaux du cyclohexane

¹³C-RMN (méthanol-4d) :

87,0 ppm ($\frac{1}{2}$ C0) (C2 et C5 du THF) ; 46,5 ppm (CH₂) (CH₂ en α de NH₃⁺) ; 39,3 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cyclohexane) ; 37,8 ppm (CH₂) (CH₂ en pos. 1' du THF) ; 37,5 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cyclohexane) ; 36,5 ppm ($\frac{1}{2}$ CH₂) (CH₂ du THF) ; 33,7 ppm (2 x CH₂) (CH₂ proche du THF dans le cyclohexane) ; 33,0 ppm (CH₂) (CH₂ en pos. 2' par rapport au THF) ; 31,3 ppm (2 x CH₂) (CH₂ éloignés du THF dans le cyclohexane)

Température de fusion : >130°C ; le chlorhydrate commence à jaunir à cette température

spectre de masse en électronspray (ES, 110 V) :

La fragmentation est plus importante pour les espèces dichargées, ce qui indique que ces pics supplémentaires correspondent effectivement à une fragmentation des amines et non à une contamination de l'échantillon.

THF-cyclo, masse monoisotopique : 628,60 629,6 ; moyen ; $M + H^+$; calc. : 629,61 630,7 ; faible ; $M' + H^+$ (1 isotope lourd) ; calc. : 630,62 611,6 ; faible ; $M + H^+ - H_2O$; calc. : 611,60 594,6 ; faible ; $M + H^+ - H_2O - NH_3$; calc. : 594,57 577,6 ; faible ; $M + H^+ - H_2O - 2 NH_3$; calc. : 577,55 560,4 ; faible ; $M + H^+ - H_2O - 3 NH_3$; calc. : 560,52 315,4 ; fort ; $(M + 2 H^+) / 2$; calc. : 315,31 306,8 ; moyen ; $(M + 2 H^+ - H_2O) / 2$; calc. : 306,30 298,0 ; moyen ; $(M + 2 H^+ - H_2O - 2 NH_3) / 2$; calc. : 289,28

109,1 (moyen) ; 107,1 (moyen) ; 105,1 (moyen) : fragmentation des chaînes latérales

trans-1-hydroxyméthyl-4-benzoxyméthyl-cyclohexane :



 $C_{15}H_{22}O_2$; PM = 234,33

Formation à partir de l'organomagnésien par réaction avec des traces de l'oxygène de l'air :



 $\mathbf{Rf} = 0.25$; éluant : 50 % d'éther dans l'hexane ; révélation à la vanilline

¹H-RMN (CHCl₃) :

7,14-7,38 ppm ; multiplet ; pic maj. : 7,29 ppm ; 5 H ; H du phényle

4,46 ppm ; singulet ; 2 H ; O<u>CH₂</u>Ph

3,40 ppm ; doublet ; J = 6,3 Hz ; 2 H ; <u>CH₂</u>OBn

3,25 ppm ; doublet ; J = 6,4 Hz ; 2 H ; CH₂ en α de OH

1,66-1,94 ppm ; multiplet ; pics maj. : 1,84 ppm, 1,82 ppm ; 4 H ; protons équatoriaux du cyclohexane

1,25-1,64 ppm ; multiplet large ; sous forme de deux massifs ; (3 H) ; 2 H du cyclohexane ; positions 1 et 4 du cyclohexane (contamination avec de l'eau à 1,523 ppm)

1,30 ppm ; singulet ; H de l'alcool

0,78-1,08 ppm ; multiplet sous forme de quintuplet démultiplié ; pic maj. 0,93 ppm ; 4 H ; protons axiaux du cyclohexane

$^{13}\text{C-RMN}$ (CHCl₃) :

138,8 ppm (C0) (phényle, pos. 0) ; 128,4 ppm (CH) (phényle, pos. 3, 5) ; 127,6 ppm (CH) (phényle, pos. 2, 6) ; 127,5 ppm (CH) (phényle, pos 4) ; 76,2 ppm (CH₂) (CH₂ du benzoxy) ; 73,1 ppm (CH₂) (CH₂ en α du benzoxy) ; 68,7 ppm (CH₂) (CH₂ en α de l'hydroxy) ; 40,7 ppm (CH) (jonction du cycle) ; 38,4 ppm (CH) (CH faisant jonction sur le cycle) ; 29,5 ppm (2 x CH₂) (cycle) ; 29,0 ppm (2 x CH₂) (cycle)

Bibliographie :

- H. Bellmann. Guide Vigot des insectes et des principaux arachnides. Paris : Vigot 2000
- 2) M. Chinnery. Insectes de France et d'Europe occidentale. Paris : Arthaud 1997
- 3) J. Zahradnik. *Der Kosmos-Insektenführer : ein Bestimmungsbuch*. Kosmos-Naturführer. Stuttgart : Franckh, **1980**
- 4) K. W. Harde, F. Severa. *Der Kosmos-Käferführer. Kosmos-Naturführer.* Stuttgart : Franckh, **1984**
- 5) A. Harvey. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 7, 294-300
- 6) H. Breithaupt. The new antibiotics. Can novel antibacterial treatments combat the rising tide of drug-resistant infections ? *Nature Biotechnology* **1999**, 17, 1165-1169
- C. Hetru, D. Hoffmann, P. Bulet. Antimicrobial peptides from insects. *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. London : Chapman-Hall 1998
- 8) J. Meinwald, T. Eisner. The chemistry of phyletic dominance. *Proceedings of the National Academy of Science* **1995**, 92, 14-18
- 9) M. S. Blum. *Chemical defenses of arthropods*. London : Academic Press **1981**
- 10) M. T. Fletcher, W. Kitching. Chemistry of Fruit Flies. *Chemical Reviews* **1995**. 95, 4, 789-828
- 11) M. Barbier. Synthesis of Z-Marginalin and identification of the natural product as the *E* isomer. *Liebigs Annalen der Chemie* **1987**, 545-546
- 12) J. E. Oliver, W. R. Lusby. Synthesis of 2-acyl-3,6-dihydroxy-2-cyclohexen-1-ones. *Tetrahedron* **1988**, 44, 6, 1591-1596
- 13) G. S. Wang. Medical use of mylabris in ancient China and recent studies. *Journal of Ethnopharmacology 1989*, 26, 2, 147-162 (Medline)

- 14) Dictionary of Natural Compounds. London : Chapman Hall 1994
- 15) A. McCluskey, C. Walkom, M. C. Bowyer, S. P. Ackland, E. Gardiner, J. A. Sakoff. Cantharimides : a new class of modified cantharidin analogues inhibiting Protein Phosphatases 1 and 2A. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2001, 11, 2941-2946
- 16) T. M. Willson, P. Kocienski, K. Jarowicki, K. Isaac, A. Faller, S. F. Campbell, J. Bordner. Studies related to the synthesis of (+/-)-pederin. Part 1. Synthesis of ethyl pederate and benzoylselenopederic acid. *Tetrahedron* **1990**, 46, 5, 1757-1766
- 17) P. Karlson. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Stuttgart : Thieme **1980**
- K. Dettner ; A. Scheuerlein; P. Fabian ; S. Schulz; W. Francke. Chemical Defense of Giant Springtail *Tetrodotophora bielanensis* (Waga) (Insecta Collembola). *Journal of Chemical Ecology* ; **1996**; Vol. 22; No 5; Medline
- 19) A. B. Attygale, E. D. Morgan. Chemicals from glands of ants. *Chemical Society Reviews* **1984**, 13, 3, 245-278
- J. Yim, S. Kim, G. Walcher, W. Pfleiderer. 136. Pteridines. Part C. Structure and nonenzymatic synthesis of Aurodrosopterin. *Helvetica Chimica Acta* 1993, 76, 1970-1979
- P. H. Boyle, E. M. Hughes, H. A. Khattab, R. J. Lockhart. Synthesis of 6acetylhomopterin. A naturally occuring pyrimido[4, 5-b] [1, 4]diazepine. Tetrahedron Letters 1987, 28, 44, 5331-5334
- S. Schulz. Insect-plant interactions. Metabolism of plant compounds to pheromones and allomones by lepidoptera and leaf beetle. *European Journal of Organic Chemistry* 1998, 13-20
- 23) F. Abe, T. Yamauchi, K. Honda, H. Omura, N. Hayashi. Sequestration of phenanthroindolizidine alkaloids by an Asclediadaceae-feeding danaid butterfly, *Ideopsis similis. Phytochemistry* **2001**, 56, 697-701

- 24) H. Komatsu, M. Watanabe, M. Ohyama, T. Enya, K. Koyama, T. Kanazawa, N. Kawahara, T. Sugimura, K. Wakabayashi. Phenanthrolizidine alkaloids as cytotoxic substances in a Danaid butterfly, *Ideopsis similis*, against human cancer cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 2001, 44, 1833-1836
- 25) X. Shi, A. B. Attygalle, J. Meinwald, M. A. Houck, T. Eisner. Spirocyclic defensive alkaloid from a Coccinellid beetle. *Tetrahedron* **1995**, 51, 32, 8711-8718
- 26) F. Schröder, V. Sinnwell, H. Baumann, M. Kaib. Myrmicarin 430A: a new heptacyclic alkaloid from Myrmicaria ants. *Chemical Communications* **1996**, 2139-2140
- 27) A. B. Attygalle, K. D. McCormick, C. L. Blankespoor, T. Eisner, J. Meinwald. Azamacrolides : a familiy of alkaloids from the pupal defensive secretions of a ladybird beetle (*Epilachna varivestris*). *Proceedings of the National Academy of Science* 1993, 90, 5204-5208
- 28) A. G. King, J. Meinwald. Review of the defensive chemistry of Coccinellids. *Chemical Reviews* **1996**, 96, 3, 1105-1122
- 29) F. C. Schröder, J. J. Farmer, A. B. Attygalle, S. R. Smedley, T. Eisner, J. Meinwald. Combinatorial chemistry in insects: a library of defensive macrocyclic polyamines. *Science* 1998, 281, 428-431
- 30) S. Borman. Beetles do it combinatorially. *Chemistry and Engineering News* **1998**, 20, 11
- A. B. Attygale, S.-C. Xu, K. D. McCormick, J. Meinwald, C. L. Blankespoor T. Eisner. Alkaloids of the Mexican bean beetle, Epilachna varivestris (Coccinellidae). *Tetrahedron* 1993, 49, 41, 9333-9342
- X. Shi, A. B. Attygalle, J. Meiwald. Synthesis and absolute configuration of defensive alkaloids from Mexican bean beetle, Epilachna varivestris. *Tetrahedron Letters* 1997, 38, 37, 6479-6482
- 33) X. Shi, A. B. Attygalle, S.-C. Xu, V. U. Ahmad, J. Meinwald. Synthesis and absolute Configuration of 2-(12'-aminotridecyl)-pyrrolidine, a defensive alkaloid from the Mexican bean beetle Epilachna varivestris. *Tetrahedron* 1996, 52, 20, 6859-6868

- J. C. Braekman, D. Daloze, J. M. Pasteels, P. van Hecke, J. P. Declercq, V. Sinnwell,
 W. Francke. Tetraponerine-8, an alkaloidal contact poison in a Neoguinean Pseudomyrmecine Ant, *Tetraponera sp.*. Zeitschrift für Naturforschung 1987, 42c, 627-630
- 34b) C. Devijver, P. Macours, J. C. Braekman, D. Daloze, J. M. Pasteels. Short Syntheses of (±)-tetraponerines-5 and -6. The structures of tetraponerines-1 and -2, and a revision of the structures of (+)-tetraponerines-5 and -6. *Tetrahedron* **1995**, 51, 40, 10913-10922
- 34c) J. C. Braekman, D. Daloze, J. M. Pasteels. Alkaloids in animals. Chapter 15 : Alkaloids : Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications, edited by Roberts and Wink. Plenum Press, New York, 1998
- 35) J. W. Daly. The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proceedings of the National Academy of Science* **1995**, 92, 9-13
- 36) D. Kovac, U. Maschwitz. Secretion-grooming in the water bug Plea minutissima : a chemical defense against microorganisms interfering with the hydrofuge properties of the respiratory region. *Ecological Entomology* **1989**, 14, 4, 403-411
- 37) H. Schildknecht. Die Wehrchemie von Land- und Wasserkäfern. *Angewandte Chemie International Edition* **1970**, 1, 17-25
- 38) W. S. Leal, Y. Kuwahara, T. Suzuki. Hexyl 2-formyl-3-hydroxybenzoate, a fungitoxic cuticular constituant of the Bulb Mite Rhizoglyphus robini. Agricultural Biological Chemistry 1990, 54, 10, 2593-2597
- 39) Y. Kuwahara, W. S. Leal, T. Suzuki. Antifungal activity of Caloglyphus polyphyllae sex pheromone and other mite exudates. pheromone study on Astigmatid mites, XXIV. *Naturwissenschaften* 1989, 76, 578-579
- W. S. Leal, Y. Kuwahara, Y. Nakano, H. Nakao, T. Suzuki. 2(E)-(4-methyl-3-pentenyl)-butenedial, α-Acaridial, a novel monoterpene from the acarid mite *Tyrophagus perniciosus* (Acarina, Acaridae). *Agricultural Biological Chemistry* 1989, 53, 4, 1193-1196
- T. Suzuki, S. Matsuyama, Y. Kuwahara. A simple synthesis of α-acaridial. *Bioscience*, *Biotechnology and Biochemistry* 1992, 56, 11, 1888-1889

- A. Fredenhagen, S. Y. Tamura, P. T. M. Kenny, H. Komura, Y. Naja, K. Nakanishi,
 K. Nishiyama, M. Sugiura, H. Kita. Andrimid, a new peptide antibiotic by an intracellular bacterial symbiont isolated from a Brown Planthopper. *Journal of the American Chemical Society* 1987, 109, 4409-4411
- 43) H. Aga, T. Shibuya, T. Sugimoto, M. Kurimoto, S. Nakajima. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **1994**, 58, 5, 945-946
- J. Y. Leem, C. Nishimura, S. Kurata, I. Shimada, A. Kobayashi, S. Natori. Purification and characterization of N-β-alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly). *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271, 23, 13573-13577
- 45) P. Bulet. Les peptides antimicrobiens de la drosophile. *Médecine/Sciences* **1999**, 15, 23-29
- 46) S. Cociancich, P. Bulet, C. Hetru, J. A. Hoffmann. The inducible peptides of insects. *Parasitology Today* **1994**, 10, 4, 132-139
- 47) Y. Carton, A. J. Nappi. Drosophila cellular immunity against parasitoids. *Parasitology Today* **1997**, 13, 6, 218-227
- A. J. Nappi, E. Vass, F. Frey, Y. Carton. Superoxide anion generation in Drosophila during melanotic encapsulation of parasites. *European Journal of Cell Biology* 1995, 68, 450-456
- 49) Z. Oren, Y. Shai. Mode of action of linear amphipathic α-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* **1998**, 47, 451-463
- 50) A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero. Amphipathic, α-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* **2000**, 55, 1, 4-30
- 51) M. Dathe, T. Wieprecht. Structural features of helical antimicrobial peptides : their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1462, 71-87

- 52) L. –L. Dimarcq, P. Bulet, C. Hetru, J. Hoffmann. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers (Peptide Science)* **1999**, 47, 6, 465-477
- 53) N. Sitaram, R. Nagaraj. Interactions of antimicrobial peptides with biological and model membranes : structural and charge requirements for activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1462, 29-54
- 54) R. M. Epand, H. J. Vogel. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1462, 11-28
- 55) C. R. H. Raetz. Lipid A. http://ives.biochem.duke.edu/Raetz/Lipid%20A1.html
- 56) V. Frecer, B. Ho, J. L. Ding. Molecular dynamics study on lipid A from Escherichia coli : insights into its mechanism of biological action. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, 1466, 87-104
- 57) T. Paustian, University of Wisconsin-Madison. The Cell Wall. wysiwyg://2/http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/bacterialstructure/CellWall.html
- 58) M. R. S. Salton, K.-S. Kim. Medmicro; chapter 2 ; Structure. http:/gsbs.utmb.edu/microbook/ch002.htm
- 59) M. F. Braconnier, J. C. Braekman, D. Daloze, J. M. Pasteels. (Z)-1,17diaminooctadec-9-ene, a novel aliphatic diamine from Coccinellidae. *Experientia* 1985, 41, 519-520
- 60) M. F. Braconnier, J. C. Braekman, D. Daloze. Synthesis of the racemic form of (Z)-1,17-diaminooctadec-9-ene, an aliphatic diamine from Coccinellidae. Determination of the absolute configuration of the (+)-naturally-occuring antipode. *Bulletin de la Société Chimique de Belgique* **1985**, 94, 8, 605-612
- D. Enders, D. Bartzen. Enantioselective total synthesis of harmonine, a defensive alkaloid of ladybugs (Coleoptera: Coccinellidae). *Liebigs Annales der Chemie* 1991, 569-574
- W. Dandan, L. Shengquan, C. Yingjie, W. Lijun, S. Jingyun, Z. Tingru. Studies on the active constituents of *Syringa oblata Lindl. Yaoxue Xuebao* 1982, 17, 12, 951-954 (Chemical Abstracts 98 : 95537r)

- 63) P. G. Baraldi, D. Simoni, S. Manfredini, E. Menziani. Preparation of 3,4-dihydroxy-1benzeneethanol : a reinvestigation. *Liebigs Annalen der Chemie* **1983**, 684-686
- 64) J. J. Kabara, A. J. Conley, J. P. Truant. Relationship of chemical structure and antimicrobial activity of alkyl amides and amines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1972**, 12, 492-498
- 65) W. N. Smith, O. F. Beumel. Preparation of alkynes and dialkynes by reaction of monohalo- and dihaloalkanes with lithium acetylide-ethylenediamine complex. *Synthesis* **1974**, 441-446
- 66) H. Lindlar, R. Dubuis, F. N. Jones, B. C. McKusick. Palladium catalyst for partial reduction of acetylenes. *Organic Synthesis Collective Volumes* **1975**, V, 880-883
- 67) N. Knouzi, M. Vaultier, R. Carrié. Réduction d'azides par la triphénylphosphine en présence d'eau : une méthode générale et chimiosélective d'accès aux amines primaires. *Bulletin de la Société Chimique de France* **1985**, 5, 815-819
- 68) M. Vaultier, N. Knouzi, R. Carrié. Réduction d'azides primaires par une méthode générale utilisant la réaction de Staudinger. *Tetrahedron Letters* **1983**, 24, 8, 763-764
- 69) A. Koziara, K. Osowska-Pacewicka, S. Zawadzki, A. Zwierzak. One-pot transformation of alkyl bromides into primary amines via the Staudinger reaction. *Synthesis* **1985**, 202-204
- 70) Y. G. Gololobov, I. N. Zhmurova, L. F. Kasukhin. Sixty years of the Staudinger reaction. *Tetrahedron* **1981**, 37, 437-472
- 71) J. K. Pak, M. Hesse. Regioselective deprotection and acylation of penta-N-protected thermopentamine. *Helvetica Chimica Acta* **1998**, 81, 2300-2313
- M. Schmid, R. Barner. Totalsynthese von natürlichem α-Tocopherol. Aufbau der Seitenkette aus (-)-(S)-3-Methyl-γ-butyrolacton. *Helvetica Chimica Acta* 1979, 62, 46, 464-473
- 73) E. J. Corey, K. Achiwa, J. A. Katzenellenbogen. Total synthesis of dl-Sirenin. *Journal* of the American Chemical Society **1969**, 4318-4320

- S. Nagarajan, B. Ganem. Chemistry of naturally occurring Polyamines. 11.
 Unsaturated spermidine and spermine derivatives. *Journal of Organic Chemistry* 1987, 52, 5044-5046
- 75) E. J. Corey, K. C. Nicolaou, R. D. Balanson, Y. Machida. A useful method for the conversion of azides to amines. *Synthesis* **1975**, 590-591
- 76) The Merck Index. 11th edition. **1989** Whitehouse station N. J. USA
- 77) M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides. Polyvalent Interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, 37, 2754-2794
- 78) R. Cloux, G. Défayes, K. Foti, J.-C. Dutoit, E. sz. Kovats. Pair-wise interactions by gas chromatography; part III: Synthesis of isosteric stationary phases for gas chromatography. *Synthesis* **1993**, 909-919
- 79) N. Ono, A. Kaji. Reductive cleavage of aliphatic nitro groups in organic synthesis. *Synthesis* **1986**, 693-697
- 80) D. G. M. Diaper. Dehydration of 1,1'-ethylenedicyclopentanol. *Canadian Journal of Chemistry* **1976**, 54, 2314-2315
- J. M. Chong, M. A. Heuft, P. Rabbat. Solvent effects on yhe monobromation of α,ω-diols : a convenient preparation of ω-bromoalkanols. *Journal of Organic Chemistry* 2000, 65, 5837-5838
- 82) S.-K. Kang, W.-S. Kim, B.-H. Moon. An effective method for the preparation of ω bromoalkanols from α, ω -diols. *Synthesis* **1985**, 1161-1162
- 83) M. M. Midland, A. Kazubski, R. E. Woodling. Asymetric reductions of prochiral ketones with lithium [2-[2-(benzyloxyethyl]-6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]-3-nonyl]-9boratabicyclo-[3.3.1]nonane (lithium NB-enanthide) and its derivatives. *Journal of Organic Chemistry* 1991, 56, 3, 1068-1074
- 84) J. Hooz, S. S. H. Gilani. a rapid, mild procedure for the preparation of alkyl chlorides and bromides. *Canadian Journal of Chemistry* **1968**, 46, 86-87

- 85) R. Appel. Tertiäres Phosphan/Tetrachlormethan, ein vielseitiges Reagens zur Chlorierung, Dehydratierung und PN-Verknüpfungen. *Angewandte Chemie International Edition* **1975**, 24, 863-874
- 86) A. P. Bruins, N. M. M. Nibbering. On the loss of of a benzyl radical from the molecular ion of α,ω -dibenzyloxyalkanes. *Tetrahedron* **1974**, 30, 493-499
- 87) R. E. Dolle, D. McNair. 9-(sulfoxyiminoalkyl)guanine nucleosides as potential antiherpetic agents. *Tetrahedron Letters* **1993**, 34, 1, 133-136
- J. March. Advanced Organic Chemistry. 4th edition. 1992 Wiley-Interscience New York
- 89) Y. Yamagiwa, Y. Koreishi, S. Kiyozumi, M. Kobayashi, T. Kamikawa, M. Tsukino, H. Goi, M. Yamamoto, M. Munakata. Synthesis of imidazole-containing ligands and studies on metal complexes. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1996, 69, 11, 3317-3323
- 90) W. S. Johnson, R. Owyang. Olefinic cyclizations. VI. Formolysis of some branchedchain alkenyl p-nitrobenzenesulfonates. *Journal of the American Chemical Society* 1964, 5593-5598
- 91) A. Monsees, S. Laschat, S. Kotila, T. Fox, E.-U. Wuerthwein. Diastereoselective synthesis of 1-hydroxy-substituted benzo[b]quinolidines and 11-hydroxy-substituted azepino[1,2-b]isoquinolines via hetero-ene reactions. *Liebigs Annalen der Chemie* 1997, 3, 533-540
- 92) L. R. Rodriguez-Avial Franke, H. Wolf, V. Wray. Stereoselektive Totalsynthese von (+/-)-Torreyol. *Tetrahedron* **1984**, 40, 18, 3491-3498
- 93) R. Bergamasco, D. H. S. Horn, R. H. Nearn, J. S. Wilkie. Insect moulting hormones LV. Experiments directed towards the synthesis of non-steroidal ecdysone analogues. *Australian Journal of Chemistry* 1985, 38, 3, 475-483
- 94) R. B. Mitra, G. Bhaskar Reddy. Selective cleavage of dimethylhydrazones to the carbonyl compounds using silica gel and its application in the synthesis of (Z)-9-tetradecenyl acetate. *Synthesis* **1989**, 694-698

- 95) S. Schulz. The chemistry of spider toxins and spider silk. *Angewandte Chemie Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 314-326
- 96) R. A. Hill, A. R. Pitt. Hot off the press. Natural Products Reports 1999, 16 (cité : J. Kobayashi. Tetrahedron Letters 1999, 40, 4819)
- 97) A. Kitamura, J. Tanaka, I. I. Ohtani, T. Higa. Echinoclathrines A-C : a new class of pyridine alkaloids from an Okinawan sponge, *Echinoclathria sp.*. *Tetrahedron* 1999, 55, 2487-2492
- 98) V. K. Reddy, A. Valasinas, A. Sarkar, H. S. Basu, L. J. Marton, B. Frydman. Conformationally restricted analogues of 1N,14N-bisethylspermine : synthesis and growth inhibition effects on human tumor cell lines. *Journal of Medicinal Chemistry* 1998, 41, 4723-4732
- 99) R. A. Casero, Jr. Woster, P. M. Woster. Terminally alkylated polyamine analogues as chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, 44, 1-26
- 100) A. Valasinas, A. Sarkar, V. K. Reddy, L. J. Marton, H. S. Basu, B. Frydman. Conformationally restricted analogues of 1N,14N-bisethylhomospermine (BE-4-4-4) : Synthesis and growth inhibition effects on human prostate cancer cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 2001, 44, 390-403
- 101) V. K. Reddy, A. Sarkar, A. Valasinas, L. J. Marton, H. S. Basu, B. Frydman. Cisunsaturated analogues of 3,8,13,18,23-pentaazapentacosane (BE-4-4-4-4) : synthesis and growth inhibition effects on human prostate cancer cell lines. *Journal of Medicinal Chemistry* 2001, 44, 404-417
- 102) R. J. Bergeron, R. Müller, G. Huang, J. S. McManis, S. E. Algee, H. Yao, W. R. Weimar, J. Wiegard. Synthesis and evaluation of hydroxylated polyamine analogues as antiproliferatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 2001, 44, 2451-2459
- 103) K. S. Moore, S. Wehrli, H. Roder, M. Rogers, J. N. Forrest, Jr. Forrest, D. McCrimmon, M. Zasloff. Squalamine: an aminosteroid from the shark. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **1993**, 90,1354-1358
- 104) M. N. Rao, A. E. Shinnar, L. A. Noecker, T. L. Chao, B. Feibush, B. Snyder, I. Sharkansky, A. Sarkahian, X. Zhang, S. R. Jones, W. A. Kinney, M. Zasloff. Aminosterols from the dogfish shark Squalus acanthias. *Journal of Natural Products* 2000, 63, 631-635

- 105) H.-S. Kim, B.-S. Choi, K.-C. Kwon, S.-O. Lee, H. J. Kwak, C. H. Lee. Synthesis and antimicrobial activity of squalamine analogue. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2000, 8, 2059-2065
- 106) S. Khabnadideh, C. L. Tan, S. L. Croft, H. Kendrick, V. Yardley, I. H. Gilbert. Squalamine analogues as potential anti-trypanosomal and anti-leishmanial compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2000, 10, 1237-1239
- I. Francesconi, W. D. Wilson, F. A. Tanious, J. E. Hall, B. C. Bender, R. R. Tidwell, D. McCurdy, D. W. Boykin. 2,4-Diphenyl furan diamidines as novel anti-*Pneumocystis carinii* pneumonia agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 1999, 42, 2260-2265
- 108) D. A. Patrick, J. E. Hall, B. C. Bender, D. R. McCurdy, W. D. Wilson, F. A. Tanious, S. Saha, R. R. Tidwell. Synthesis and anti-Pneumocystis carinii pneumonia activity of novel dicationic dibenzothiophenes and orally active prodrugs. *European Journal of Medicinal Chemistry* 1999, 34, 575-583
- 109) S. Supattapone, H.-O. B. Nguyen, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, M. R. Scott. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proceedings of the National Academy of the USA* **1999**, 96, 25, 14529-14534
- 110) M. Ueda, Y. Murata. Antimicrobial activity of N-alkylethylenediamines against oral and other microorganisms. *Yakugaku Zassi* **1989**, 109, 3, 184-187
- 111) Y. Murata, K. Mita, E. Miyamoto, M. Ueda. Antimicrobial activity of N,N'dialkylpolymethylenediamines against some dental plaque bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1989**, 33, 9, 1636-1638
- 112) F. Devinsky, I. Lacko, L. Krasnec, D. Mlynarčik. Antimicrobial activity of N,N'-bis(decylmethyl)-α,ω-alkanediamine dioxides. *Zeitschrift für Naturforschung* 1983, 38c, 151-152
- 113) D. E. Ames, R.E. Bowman. Synthetic long-chain aliphatic compounds. Part IX. Some antituberculous long-chain amines. *Journal of the Chemical Society* **1952**, 1057-1068
- 114) A. T. Fuller. Antibacterial action and chemical constitution in long-chain aliphatic bases. *Biochemistry Journal* **1942**, 36, 548-558

- 115) H. King, E. M. Lourie, W. Yorke. Studies in chemotherapy. Further report on new trypanocidal substances. *Ann. Trop. Med. Parasit.* **1938**, 32, 177-192
- 116) M. Calas, M. L. Ancelin, G. Cordina, P. Portefaix, G. Piquet, V. Vidal-Sailhan, H. Vial. Antimalarial activity of compounds interfering with *Plasmodium falciparum* phospholipid metabolism : comparison between mono- and bisquaternary ammonium salts. *Journal of Medicinal Chemistry* 2000, 43, 505-516
- 117) C. Hetru, P. Bulet. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. Methods in Molecular Biology, vol. 78: Antibacterial Peptide Protocols. Humana Press, Totowa, NJ
- 118) P. Fehlbaum, P. Bulet, L. Michaut, M. Lagueux, W. F. Broekaert, C. Hetru, J. A. Hoffmann. Insect Immunity. *The Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, 52 33159-33163

Résumé de thèse

Summary

Résumé de thèse :

Les insectes sont connus pour leur forte résistance aux microorganismes, ce qui est principalement dû à leur réponse immunitaire innée efficace mettant notamment en jeu différentes familles de peptides antimicrobiens. Nous nous sommes posé la question s'il existe chez les insectes des molécules non-peptidique antimicrobiennes qui pourraient compléter naturellement cette réponse immunitaire de l'insecte.

Dans ce travail de thèse nous décrivons l'isolement par pharmacoguidage d'une substance naturelle antimicrobienne à partir de l'espèce *Harmonia axyridis*. Cette coccinelle biosynthétise le Z-1,17-diaminooctadéc-9-ène, également appelé harmonine, dont nous avons pour le première fois mis en évidence ses propriétés antimicrobiennes.

Une étude de la relation de structure-activité, impliquant la synthèse chimique de diverses α, ω -diamines, nous a permis de déterminer quels éléments structuraux sont essentiels à l'activité biologique de la diamine naturelle.

Nous avons pu dégager certains degrés de liberté de substitution autour de cette molécule active. Ainsi nous avons conçu des polyamines originales, qui ont une activité biologique accrue par rapport à la diamine naturelle ; elles ont été construites autour d'un squelette hydrocarboné ramifié.

Nous avons également conçu des analogues rigidifiés de ces polyamines, qui sont basés sur un cycle tétrahydrofurane central. Nous avons synthétisé ces THF-polyamines. Elles gardent les mêmes activités antibactériennes que les polyamines les plus actives. Contrairement à celles-ci, elles ont perdu toutes leurs propriétés cytotoxiques, déterminées par des tests d'hémolyse. Ainsi nous avons pu augmenter l'indice thérapeutique de ces polyamines par rapport à celui de l'harmonine, diamine naturelle d'insecte.

Summary :

Insects are famous for their strong resistance against invading microorganisms. Their immune response is based on a diverse set of inducible antimicrobial peptides. We addressed the question of whether there are other non-peptidic antimicrobial molecules reinforcing the immune response of the insects.

In this work we describe the characterization of an antimicrobial diamine, which was isolated using a bioassay guide, from the coccinellid species *Harmonia axyridis*. This beetle biosynthesises the Z-1,17-diaminooctadec-9-ene, also called 'harmonine'. It is the first time that the antimicrobial activities of this substance have been described.

The chemical synthesis of diverse α, ω -diamines allowed for a detailed analysis of the structure-activity relationship of this family of compounds. This study showed which structural elements are essential for their biological activity.

We showed that the active molecules could be diversely substituted at their central part ; leading from this, novel polyamines, based on a branched hydrocarbon skeleton, were designed. These have an increased activity compared to the isolated natural diamine.

We also describe the novel construction and synthesis of rigidified analogues of the polyamines which are based on a tetrahydrofuran heterocycle. These THF-amines are endowed with the same activities as the most potent polyamines of these series. Unlike the polyamines based on a branched hydrocarbon part, the THF-amines show no cytotoxic properties as proved by hemolytic tests. The therapeutic index of the polyamines is increased as compared to harmonine.

Keywords:

Harmonia axyridis, coccinellid beetle, harmonine, alkaloid, antimicrobial, antibacterial, polyamine, bioassay guided isolation