

INSTITUT GILBERT LAUSTRIAT

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR – STRASBOURG I

Par

Damien HABRANT

Ingénieur ECPM

**Synthèse et caractérisation de nouveaux antioxydants,
dérivés mono-aromatiques d'acides pulviniques,
pour des applications en dermo-cosmétique**

Soutenue le 14 mars 2008 devant la commission d'examen :

Professeur Marcel Hibert
Professeur Louis Fensterbank
Professeur Jacques Lebreton
Docteur Alain Wagner
Docteur Stéphane Poigny
Docteur Stéphane Meunier

Rapporteur interne
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Directeur de thèse

Laboratoire de Synthèse Bioorganique (Université Louis Pasteur, UMR 7175, LC-1)

à Miko,

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Synthèse Bioorganique à la Faculté de Pharmacie d'Illkirch-Graffenstaden, sous la direction du Dr Charles MIOSKOWSKI, en collaboration avec les Laboratoires Pierre Fabre Dermo-Cosmétique à Vigoulet-Auzil.

Ma première pensée ira bien évidemment au Dr Charles MIOSKOWSKI, à qui je dédie ce travail. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir encadré durant la première partie de ma thèse. J'ai été très fier d'avoir eu la chance de travailler sous sa direction et d'avoir pu partager son enthousiasme et sa passion pour la chimie. Ses innombrables idées, toujours plus originales les unes que les autres, ont été une grande source de motivation pour mener ce travail.

Je souhaite également remercier le Dr Alain WAGNER qui a brillamment repris le flambeau lors des derniers mois de la thèse. Succéder à MIKO n'est pas une tâche aisée, mais ses connaissances et idées nouvelles ont permis d'insuffler un nouvel élan à ce projet.

J'aimerais adresser mes remerciements au Dr Stéphane MEUNIER pour m'avoir encadré durant ces deux dernières années. Ses conseils, ses idées et son soutien m'ont permis de gérer au quotidien ce travail et de garder le cap pour une bonne orientation du projet. Un grand merci également pour les stages d'initiation à l'immunologie et pour les corrections pertinentes de ce manuscrit.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres des Laboratoires Pierre Fabre Dermo-Cosmétique pour leur aimable collaboration au cours de ce projet : les Drs Pascal BORDAT, Roger TARROUX, Yves BRUNEL et Stéphane POIGNY (désolé pour la phénylcétone, j'ai fait ce que j'ai pu...).

Je remercie sincèrement les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail : le Pr Marcel HIBERT de l'Université de Strasbourg, le Pr Louis FENSTERBANK de l'Université de Paris VI et le Pr Jacques LEBRETON de l'Université de Nantes.

Je remercie le Centre National de la Recherche Scientifique et les Laboratoires Pierre Fabre pour le soutien financier.

Je voudrais remercier l'ensemble du service de Pharmacochimie des Laboratoires Pierre-Fabre à Vigoulet, particulièrement Mmes Muriel DERAÏ-SEGUR et Laure DUPRAT, pour m'avoir accueilli à plusieurs reprises dans leur laboratoire et pour leur aide à la réalisation des tests. Je tiens également à exprimer mes remerciements aux différentes équipes du CEA de Saclay pour leur collaboration : l'équipe du Dr Thierry LE GALL, notamment Aurélie MALLINGER et Brice NADAL, et les équipes du Service de Pharmacologie et d'Immunologie pour m'avoir permis d'utiliser leurs infrastructures. Je remercie également le Pr Thierry VANDAMME du Laboratoire de Pharmacie Biogalénique d'Illkirch pour m'avoir mis à disposition la balance de Langmuir et pour m'avoir éclairé sur le monde obscur des monocouches. Merci également au Dr Guy ZUBER et à Liliane ITALIANO du Laboratoire de Chimie Génétique d'Illkirch pour m'avoir initié aux joies de l'électrophorèse, ainsi qu'au Dr Régis SALADIN et Axelle STREHLE pour les tests MTT. Une pensée aussi pour le Dr Antoinette DE NICOLA.

Je tenais également à remercier Cyril ANTHEAUME pour les analyses RMN et pour m'avoir aidé, parfois à des heures tardives, à élucider certaines structures, ainsi qu'à Pascale BUISINE et Patrick WEHRUNG pour la spectrométrie de masse.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance au Pr Gilbert KIRSCH de l'Université de Metz, mon « conseiller d'orientation » personnel, pour ses nombreux conseils avisés et sa grande disponibilité durant l'intégralité de mes études.

Un merci bien particulier à tous les membres du labo MIKO que j'ai pu croisé pendant ces trois ans, bien trop nombreux pour être tous cités ! Ceux qui comptent pour moi le savent, et je tenais à les remercier pour leur accompagnement au cours de cette période, pour leur soutien dans les moments difficiles et pour les bons moments passés en leur compagnie, au labo ou à l'extérieur. Spéciale dédicace à mes correcteurs officiels : Roll-K, Géraldine, Ghyslain, Manu et Cédric. Merci également à Carine, Olivier, Michel et Ghyslain pour leurs coups de main sur ce projet.

Les occasions de le faire étant relativement rares, je tiens également à exprimer d'immenses remerciements à ma famille, tout particulièrement mes parents Janine et Christian et mes sœurs Aline et Estelle, pour leur soutien sans faille durant ces longues études (ça y est, je suis presque au bout...) et pour parvenir à me supporter depuis si longtemps ! Une pensée toute spéciale également à ma seconde famille, mes amis strasbourgeois : Karol, Judy, Claire, Yazan, Alex, Mika, pour les moments inoubliables passés ensemble, ainsi qu'à mes potes de l'ASS (cette année c'est la bonne, les gars !). Un grand merci également à mes amis The Fabolous Fab5, Lil'Lo et Guillaume, pour être à mes côtés depuis si longtemps et pour le mal qu'ils se donnent à essayer de comprendre ce que je fais au labo. Enfin, last but not least, un merci très sincère à Carolina, sans qui tout ceci n'aurait pas été possible, pour son aide énorme, ses encouragements et pour être restée à mes côtés contre vents et marées (voire tsunamis...). Muchissimas gracias, guapa!

« There's no way I can pay you back, but my plan is to show you that I understand, you are appreciated » (Dear Mama, Tupac Shakur)

“No Pain, No Gain”
(Robert Herrick)

“Celui qui combat peut perdre, celui qui ne combat pas a déjà perdu”
(Bertold Brecht)

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| ABRÉVIATIONS | 11 |
| INTRODUCTION GENERALE | 17 |
| CHAPITRE 1 : PROTECTION DES EFFETS DU RAYONNEMENT SOLAIRE PAR DES AGENTS ANTIOXYDANTS | 19 |
| I. GÉNÉRALITÉS SUR LE RAYONNEMENT SOLAIRE..... | 21 |
| <i>I.1 Généralités</i> | <i>21</i> |
| <i>I.2 Contexte de l'étude.....</i> | <i>22</i> |
| II. EFFETS DU RAYONNEMENT SOLAIRE SUR L'ORGANISME | 24 |
| <i>II.1 Effets positifs.....</i> | <i>24</i> |
| <i>II.2 Effets des UV sur les constituants cellulaires</i> | <i>25</i> |
| <i>II.3 Effets des rayonnements UV sur la peau.....</i> | <i>35</i> |
| III. LES MECANISMES DE DEFENSE | 39 |
| <i>III.1 Défenses contre les UV.....</i> | <i>39</i> |
| <i>III.2 Défenses contre les EOR</i> | <i>41</i> |
| IV. LES ANTIOXYDANTS : MECANISMES ET ENJEUX..... | 46 |
| <i>IV.1 Mécanismes d'action</i> | <i>46</i> |
| <i>IV.2 Criblage d'antioxydants</i> | <i>48</i> |
| V. OBJECTIFS DU TRAVAIL | 53 |
| VI. CONCLUSIONS..... | 55 |
| CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE D'ACIDES PULVINIQUES MONO-AROMATIQUES .. | 57 |
| I. GENERALITES SUR LES ACIDES PULVINIQUES..... | 59 |
| II. SYNTHÈSES D'ACIDES PULVINIQUES : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES | 61 |
| <i>II.1 Stratégie 1 utilisant une 1,2-dicétone acyclique</i> | <i>62</i> |
| <i>II.2 Stratégie 2 utilisant la chimie des anhydrides maléiques</i> | <i>66</i> |
| <i>II.3 Stratégie 3 utilisant une condensation de type Dieckmann.....</i> | <i>69</i> |
| <i>II.4 Stratégie 4 utilisant un couplage de Suzuki-Miyaura</i> | <i>70</i> |
| <i>II.5 Synthèses biomimétiques.....</i> | <i>73</i> |

| | |
|---|------------|
| III. ETUDE DE LA SYNTHÈSE D'ACIDES PULVINIQUES MONO-AROMATIQUES | 75 |
| <i>III.1 Approche A : à partir d'une 1,2-dicétone.....</i> | 77 |
| <i>III.2 Approche B : à partir d'une condensation de type Dieckmann.....</i> | 86 |
| <i>III.3 Approche C : à partir d'un anhydride maléique</i> | 94 |
| <i>III.4 Approche D : à partir d'une dilactone pulvinique mono-aromatique</i> | 105 |
| <i>III.5 Autres produits synthétisés</i> | 132 |
| IV. SYNTHÈSE D'ACIDES PULVINIQUES LIPOPHILES..... | 137 |
| <i>IV.1 Chaîne grasse sur le noyau aromatique</i> | 139 |
| <i>IV.2 Chaîne grasse sur la double liaison exo-cyclique.....</i> | 141 |
| <i>IV.3 Chaîne grasse greffée au niveau du groupement carbonyle</i> | 144 |
| <i>IV.4 Conclusions.....</i> | 144 |
| V. CONCLUSIONS..... | 145 |
| | |
| CHAPITRE 3 : ANALYSE DES ACIDES PULVINIQUES..... | 151 |
| | |
| I. PRÉSENTATION | 153 |
| II. ETUDE DE LA PROTECTION DE LA THYMININE | 154 |
| <i>II.1. Principe.....</i> | 154 |
| <i>II.2. Résultats.....</i> | 159 |
| <i>II.3. Conclusions.....</i> | 171 |
| III. TESTS DE PROTECTION DE L'ADN..... | 172 |
| <i>III.1 Principe</i> | 172 |
| <i>III.2 Résultats</i> | 174 |
| <i>III.3 Conclusions</i> | 180 |
| IV. ETUDE DE LA CAPTURE DU RADICAL SUPEROXYDE | 181 |
| <i>IV.1 Principe</i> | 181 |
| <i>IV.2 Résultats.....</i> | 182 |
| <i>IV.3 Conclusions.....</i> | 186 |
| V. ETUDE DE LA CAPTURE DU RADICAL DPPH[•] | 187 |
| <i>V.1 Principe.....</i> | 187 |
| <i>V.2 Résultats.....</i> | 189 |
| <i>V.3 Conclusions.....</i> | 191 |
| VI. ETUDE DE LA PHOTOSTABILITÉ | 192 |
| VII. ETUDE DE L'INHIBITION DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE..... | 194 |
| <i>VII.1 Principe</i> | 194 |
| <i>VII.2 Résultats</i> | 196 |
| <i>VII. 3 Conclusions</i> | 198 |

| | |
|--|------------|
| VIII. CYTOTOXICITE | 199 |
| <i>VIII.1 Principe.....</i> | <i>199</i> |
| <i>VIII.2 Résultats.....</i> | <i>200</i> |
| <i>VIII.3 Conclusions.....</i> | <i>200</i> |
| IX. ETUDE AVEC LA BALANCE DE LANGMUIR | 201 |
| <i>IX.1 Principe</i> | <i>201</i> |
| <i>IX.2 Objectifs des mesures.....</i> | <i>205</i> |
| <i>IX.3 Résultats.....</i> | <i>206</i> |
| <i>IX.4 Conclusions.....</i> | <i>210</i> |
| X. CONCLUSIONS..... | 212 |
| | |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... | 215 |
| | |
| PARTIE EXPERIMENTALE | 221 |
| | |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 309 |
| | |
| ANNEXES..... | 315 |

Abréviations

| Abréviation | Nom complet |
|-----------------------------------|--|
| [Bmim][BF ₄] 4 ÅMS | 1-butyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate Tamis moléculaire 4 Å |
| ABTS | Acide 2,2'-azino- <i>bis</i> (3-éthylbenzthiazoline)-6-sulphonique |
| Ac | Acétyle |
| AChE | Acétylcholinestérase |
| ACN | Acétonitrile |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| Ag | Antigène |
| AGPI | Acide gras polyinsaturé |
| alk | Alkyle |
| APTS | Acide <i>para</i> -toluène sulfonique |
| aq | Aqueux (se) |
| Ar | Aromatique |
| BCC | Carcinome basocellulaire |
| Benz | Benzène |
| BHT | Hydroxytoluène butylé |
| Bn | Benzyle |
| BSA | Albumine sérique bovine |
| BuLi | Butyllithium |
| CAN | Nitrate de cérium ammonium |
| cat | Catalyseur |
| CCM | Chromatographie sur couche mince |
| CEA | Commissariat à l'énergie atomique |
| CIPA | Cyclohexyl- <i>iso</i> -propylamine |
| Cy | Cyclohexane |
| Cys | Cystéine |
| d | Doublet |
| DABCO | 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane |
| DBN | 1,5-diazabicyclo[4,3.0]non-5-ène |
| DBU | 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimide |
| DCM | Dichlorométhane |
| DEAD | Diéthylazadicarboxylate |
| DEM | Dose Erythémale Minimale |
| DIAD | di- <i>iso</i> -propylazadicarboxylate |
| DIPA | di- <i>iso</i> -propylamine |
| DMAP | Diméthylaminopyridine |
| DME | Ether diméthylique |
| DMF | Diméthylformamide |

| | |
|---------------|---|
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| DO | Densité optique |
| DPPC | Dipalmitoyl phosphatidylcholine |
| dppf | 1'-bis(diphénylphosphino)ferrocène |
| DPPH | 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl |
| DTNB | 5,5'-dithiobisacide 2-nitrobenzoïque |
| EDC | <i>N</i> -(3-diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide |
| EDL | Enthalpie de dissociation de liaison |
| EDTA | Acide éthylènediaminetétraacétique |
| EIA | Dosage enzymo-immunologique |
| EOR | Espèces oxygénées réactives |
| éq. | Equivalent(s) |
| ES | Electrospray |
| Et | Ethyle |
| Ether | Ether diéthylique |
| GC-MS | Couplage chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse |
| Glu | Glutamate |
| GP | Groupement protecteur |
| h | Heure(s) |
| His | Histidine |
| HMPA | Hexaméthylphosphoramide |
| HPLC | Chromatographie liquide haute performance |
| HRMS | Spectrométrie de masse haute résolution |
| HWE | Horner-Wadworth-Emmons |
| <i>i</i> Pr | <i>Iso</i> -propyle |
| IR | Infrarouge |
| j | Jour(s) |
| l | Large |
| LAH | Hydruide de lithium aluminium |
| LC | Liquide condensé |
| LDA | Di- <i>iso</i> -propylamidure de lithium |
| LE | Liquide expansé |
| LI | Liquide ionique |
| LiHMDS | Héxaméthylidisilazane de lithium |
| liq | Liquide |
| LNS | Liaisons non spécifiques |
| Lys | Lysine |
| m | Massif |
| M | Mol/L |
| <i>m</i> CPBA | Acide <i>meta</i> -chloroperbenzoïque |
| MDA | Malondialdéhyde |
| Me | Méthyle |
| MOM | Méthoxyméthyle |

| | |
|-------------|--|
| Ms | Mésyle, Méthylsulfonyle |
| MS | Spectrométrie de masse |
| MTT | Bromure de (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium |
| NADH | Nicotinamide adénine dinucléotide |
| NADPH | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| NBA | Norbadione A |
| NMO | <i>N</i> -Méthylmorpholine- <i>N</i> -Oxide |
| Nu | Nucléophile |
| Pd/C | Palladium sur charbon |
| Ph | Phényle |
| PI | Potentiel d'ionisation |
| Px | Peroxydase |
| q | Quadruplet |
| quant | Quantitatif |
| Rdt | Rendement |
| Réf | Référence |
| Rf | Rapport frontal |
| RMN | Résonance magnétique nucléaire |
| RPE | Résonance paramagnétique électronique |
| s | Singulet |
| SCC | Carcinome Spinocellulaire |
| SPLET | <i>Sequential proton loss electron transfer</i> |
| Spt | Septuplet |
| t | Triplet |
| ta | Température ambiante |
| TBA | Acide 2-thiobarbiturique |
| TBAC | Chlorure de tétrabutylammonium |
| TBAF | Fluorure de tétrabutylammonium |
| TBDPS | <i>Tert</i> -butyldiphénylsilyle |
| <i>t</i> Bu | <i>Tert</i> -butyle |
| Tf | Triflate, trifluorométhanesulfonate |
| TFA | Acide trifluoacétique |
| TFAA | Anhydride trifluoroacétique |
| THF | Tétrahydrofurane |
| TMEDA | Tétraméthylènediamine |
| TMS | Triméthylsilyle |
| Tol | Toluène |
| Tp. | Tampon |
| Trp | Tryptophane |
| UV | Ultraviolet |

INTRODUCTION

GENERALE

« Pour en finir avec la **Toast Attitude** ». C'est avec ce slogan que l'Institut National du Cancer a lancé en juin 2006 une campagne nationale visant à sensibiliser le public aux dangers liés à l'exposition solaire. Lors de cette campagne ont été rappelées les bonnes habitudes à prendre face au Soleil :

- ◆ Eviter l'exposition de 12h à 16h,
- ◆ Rechercher l'ombre,
- ◆ Se couvrir,
- ◆ Renouveler la crème solaire fréquemment,
- ◆ Eviter l'exposition des enfants.

Le Soleil est un plaisir, il dope le moral et favorise la synthèse de la vitamine D. Mais quelques minutes par jour suffisent à profiter de ces bienfaits. Au-delà, il peut provoquer de graves dommages pour les yeux, un vieillissement prématuré de la peau voire, dans les cas les plus graves, des cancers de la peau.

Les risques proviennent d'une partie du rayonnement solaire seulement : **les rayonnements ultraviolets (UV)**. Le risque immédiat pour la peau surexposée est l'érythème cutané ou coup de Soleil, provoqué par les UVB dont la longueur d'onde est comprise entre 280 et 320 nm. Les UVA, dont la longueur d'onde est comprise entre 320 et 400 nm, sont moins énergétiques et pénètrent la peau plus en profondeur. Certaines molécules présentes dans notre organisme sont capables d'absorber les UVA, ce qui va provoquer la formation de **radicaux libres**, qui sont des espèces extrêmement réactives et capables d'endommager les membranes, l'ADN ou les protéines contenus dans l'organisme.

La capacité de défense de l'organisme face à ces attaques n'est pas inépuisable et, afin de limiter les effets délétères du Soleil, le développement de produits photoprotecteurs, plus communément appelés crèmes solaires, est devenu un enjeu majeur dans le domaine de la dermatologie et de la cosmétique. Les produits photoprotecteurs sont notamment constitués de filtres UV. Malheureusement, même les produits solaires les plus efficaces ne filtrent pas la totalité des UV et la notion d'« écran total » reste utopique. De plus, seulement 20% de la dose qui serait nécessaire à une protection efficace est généralement appliquée par les utilisateurs. Ainsi, une partie non-négligeable des UV pénètre tout de même dans la peau. Afin de limiter les effets de ceux-ci, les crèmes solaires plus récentes contiennent également

des agents dits **antioxydants**, dont le but est de neutraliser les radicaux libres et donc de protéger les constituants cellulaires.

La recherche de nouveaux agents antioxydants toujours plus efficaces est devenue un axe de recherche mondial, comme en témoigne le nombre toujours croissant d'articles parus dans la littérature à ce sujet. En outre, la compréhension des phénomènes impliqués dans les mécanismes d'actions de ces molécules est un critère essentiel pour pouvoir imaginer de nouvelles structures encore plus actives. La nature fournit les antioxydants les plus connus, la synthèse par voie chimique permet, dans certains cas, d'améliorer l'activité de ceux-ci par des modifications structurales.

Récemment a été découverte au Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay une molécule très prometteuse de part son activité antioxydante, appelée Norbadione A. Cette découverte a ouvert la voie à l'étude des **acides pulviniques**, famille de molécules dont est issue la Norbadione A. Ceux-ci se sont révélés également être de très bons antioxydants. La compréhension de la nature de ce fort potentiel passe par la préparation d'analogues simplifiés des acides pulviniques. Ceci pourrait permettre dans un second temps d'imaginer de nouvelles structures encore plus actives.

Le **chapitre 1** de ce manuscrit introduira la problématique de l'étude, en présentant les dommages pouvant être causés par les UV *in vivo* et l'intérêt d'utiliser des agents antioxydants pour s'en protéger.

Après un rappel sur l'état de la littérature concernant la synthèse des acides pulviniques, les différentes approches synthétiques étudiées pour accéder à de nouveaux agents potentiellement antioxydants seront présentées au **chapitre 2**.

Enfin, dans le **chapitre 3** seront rassemblées les différentes études biologiques et physico-chimiques effectuées sur les produits synthétisés, afin notamment d'évaluer leur pouvoir protecteur.

CHAPITRE 1 :

PROTECTION DES EFFETS

DU RAYONNEMENT SOLAIRE

PAR DES AGENTS ANTIOXYDANTS

I. Généralités sur le rayonnement solaire

I.1 Généralités

La lumière correspond à la partie visible du spectre électromagnétique émis par le Soleil et reçu par la Terre. Elle ne représente cependant qu'une petite partie du spectre solaire, dont les rayonnements sont classés selon leur longueur d'onde λ (figure 1).

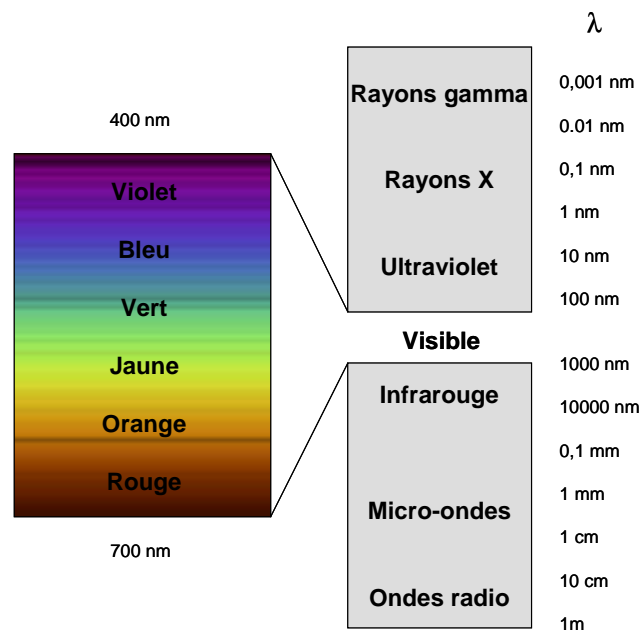


Figure 1 : spectre électromagnétique

Le spectre solaire est très étendu, avec des rayonnements allant des rayons γ aux ondes radio. Cependant, les rayonnements extrêmes sont négligeables à la surface de la Terre ; les rayons X ou γ étant stoppés dès les couches supérieures de l'atmosphère et la proportion d'ondes radios étant négligeable. Ainsi, seuls trois types de rayonnements nous parviennent de façon importante :

- ◆ les ultraviolets (UV), dont la longueur d'onde est comprise entre 200 et 400 nm,
- ◆ la lumière visible, de 400 à 800 nm,
- ◆ les infrarouges (IR), de 800 à 1400 nm.

L'énergie lumineuse atteignant le sol est constituée de 5% d'UV, 39% de lumière visible et 56% d'IR. La lumière visible et les IR ont très peu d'influence négative sur l'organisme : la première est responsable des phénomènes d'éblouissement, alors que les seconds sont à l'origine de la sensation de chaleur suite à l'exposition solaire.

Ce sont les rayonnements UV qui sont les plus dangereux pour l'organisme, puisqu'ils provoquent de nombreux dommages, allant du simple érythème cutané, communément appelé coup de Soleil, à divers cancers cutanés.¹ Ces rayonnements sont classés en trois catégories selon leur longueur d'onde :

- ◆ UVC de 200 à 280 nm (stoppés par la couche d'ozone),
- ◆ UVB de 280 à 320 nm,
- ◆ UVA de 320 à 400 nm.

La proportion des UVA est environ 100 fois supérieure à celle des UVB. Les dommages causés par les UVA et les UVB ne sont pas de même nature, à cause de la différence de longueur d'onde. Ainsi, les UVB, plus énergétiques, sont très majoritairement responsables de l'érythème et ont une action directe sur les constituants cellulaires, c'est-à-dire qu'ils sont capables, par exemple, de dégrader directement l'ADN. Les UVA ont, eux, une action indirecte puisqu'ils vont provoquer la formation d'espèces oxygénées réactives (EOR), très dangereuses pour les structures biologiques. Cependant, les dommages observés sur l'organisme sont souvent la conséquence de l'absorption simultanée d'UVA et d'UVB, qui ont parfois des effets synergiques.

I.2 Contexte de l'étude

L'exposition au Soleil est souvent une source de plaisir et les « bains » de Soleil font partie intégrante de la notion de vacances pour de nombreux individus. Malheureusement, cette exposition parfois excessive n'est pas sans effet sur notre organisme. Le coup de Soleil est la manifestation la plus précoce et la plus visible d'une surexposition, mais des effets à long terme peuvent également se manifester, comme le vieillissement prématuré de la peau ou, dans les cas les plus graves, le déclenchement de cancers cutanés. Ceux-ci sont en constante augmentation et sont généralement dus à une absence de protection lors d'expositions solaires répétées ou intermittentes.

Ainsi, la photoprotection est un axe de recherche majeur pour l'industrie cosmétique et, dans cette optique, les Laboratoires Pierre Fabre Dermo-Cosmétique ont axé une partie de leur recherche sur le développement de nouveaux protecteurs solaires. Les crèmes solaires sont généralement constitués de filtres UV. Les filtres les plus courants sont spécifiques aux UVB, mais les dégâts causés par les UVA étant de mieux en mieux élucidés, des filtres UVA ont récemment fait leur apparition dans ces crèmes. Pourtant, ces filtres ne permettant pas de bloquer la totalité des UV, il est de plus en plus fréquent d'incorporer dans les crèmes solaires des agents dits « antioxydants » dont le but est de limiter la formation de radicaux libres néfastes dans l'organisme ou bien de permettre leur capture.

Les radicaux libres, essentiellement formés par action des UVA, sont des espèces très réactives et délétères pour l'organisme, puisqu'ils sont capables de provoquer de nombreux dommages oxydatifs, notamment dans les membranes où ils sont responsables de la peroxydation lipidique. Ils sont également impliqués dans certains mécanismes de carcinogénèse et de vieillissement cutané.

Ainsi, le développement de nouveaux agents antioxydants est un élément important dans le domaine cosmétique. Ces produits doivent répondre à des critères précis en termes d'activité, de solubilité, de pénétration membranaire et doivent être compatibles avec la formulation de la crème solaire.

II. Effets du rayonnement solaire sur l'organisme

II.1 Effets positifs

Les effets positifs du Soleil sont nombreux. Il provoque souvent une sensation de bien-être (beaucoup de personnes se sentent mieux bronzées et au Soleil que pâles et à l'ombre) et une amélioration du moral (mais ce n'est pas ici l'exposition aux UV qui en est responsable, mais la lumière visible qui joue un rôle dans la production de la mélatonine, hormone qui intervient sur le rythme biologique et le moral). La luminothérapie, ou photothérapie, permet de traiter le phénomène de « dépression saisonnière » qui touche chaque année 3% de la population française en hiver.

Un autre effet bénéfique de l'ensoleillement résulte de son action sur le métabolisme du cholécalférol ou **vitamine D3**. Cette hormone stéroïdienne est nécessaire à l'absorption digestive du calcium et à la minéralisation osseuse. Ainsi, une carence en vitamine D est à l'origine de rachitisme chez l'enfant et d'ostéomalacie chez l'adulte. La **vitamine D3** a pour originalité d'avoir une production endogène, survenant lors de l'exposition de la peau aux UVB. Les UVB provoquent la photolyse de la **provitamine D3** (ou 7-déhydrocholestérol), présente dans les membranes, la transformant en **prévitamine D3** dans le derme et l'épiderme (schéma 1). Cette prévitamine, thermodynamiquement instable, s'isomérisse spontanément en **vitamine D3**. Celle-ci peut alors quitter le compartiment cutané pour gagner la circulation. Il apparaît aujourd'hui que la forme hormonale active de la **vitamine D3**, le calcitriol, participe à des processus fondamentaux de prolifération et de différenciations cellulaires, dont les applications thérapeutiques semblent prometteuses.²

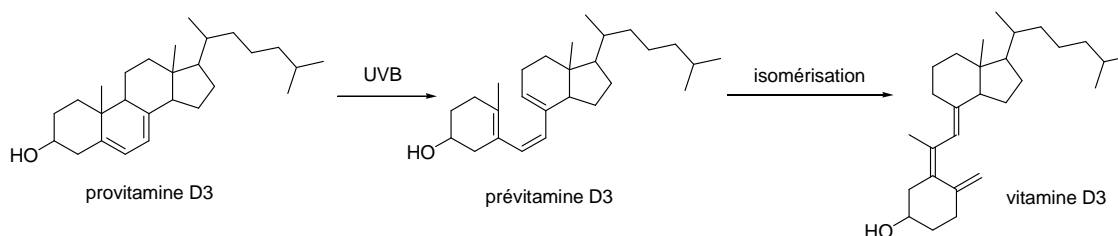


Schéma 1 : photobiologie de la vitamine D

Les rayons UV peuvent également être utilisés à usage thérapeutique. On parle alors de PUVAthérapie ou photochimiothérapie.³ Ce concept thérapeutique un peu particulier consiste à faire suivre l'administration d'un psoralène par une irradiation corporelle UVA du patient. Ce traitement s'est révélé efficace contre plusieurs maladies de la peau dont le psoriasis, le vitiligo, l'eczéma ou dans certains cas de cancers cutanés. Trois types de psoralènes sont actuellement utilisés pour cette thérapie, dont le traitement consiste à exposer le patient à un rayonnement UVA deux heures après l'administration de l'un des psoralènes par voie orale (figure 2). Ainsi activé par la lumière, le psoralène détruit les cellules cancéreuses en modifiant leur ADN.

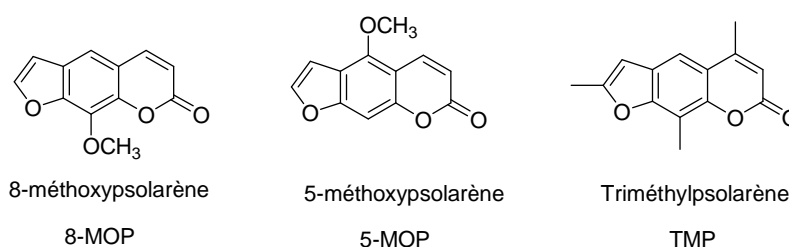


Figure 2 : psoralènes utilisés en PUVAthérapie

II.2 Effets des UV sur les constituants cellulaires

II.2.1 Effets directs et indirects des UV

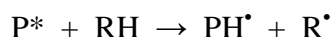
Les UVB sont les rayonnements les plus énergétiques parmi les UV perçus ; ils sont capables d'effets directs sur les biomolécules, en induisant un état excité de celles-ci, qui peut dériver vers des produits d'oxydation divers.

Les UVA, moins énergétiques, ne sont pas capables d'interagir directement avec les biomolécules, mais vont avoir des effets indirects, *via* la formation d'EOR. Cette formation *in situ* d'EOR nécessite l'absorption des photons par un photosensibilisateur endogène (chromophore), qui génère la formation d'états électroniquement excités et engendre un certain nombre de processus photophysiques.⁴

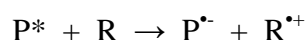
A l'issue de ces processus, le photosensibilisateur dans un état excité triplet est susceptible de participer à :

- ◆ des réactions de **transfert de charge** dites de **type I**,
- ◆ des réactions de **transfert d'énergie** dites de **type II**.

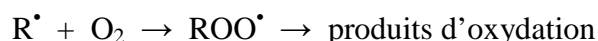
Dans le mécanisme de **type I**, le photosensibilisateur à l'état excité triplet (P^*) peut réagir avec un substrat (RH) donneur d'hydrogène, pour conduire aux deux espèces radicalaires PH^\bullet et R^\bullet , selon la réaction :



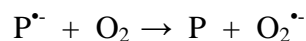
Le substrat (R) peut aussi être un donneur d'électron, on obtient alors, par transfert monoélectronique :



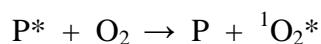
Dans les deux cas, le radical R^\bullet réagit souvent avec de l'oxygène moléculaire pour évoluer ensuite vers des produits d'oxydation (des radicaux intermédiaires hydroperoxydes ROO^\bullet sont formés) :



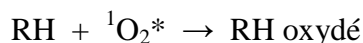
Enfin, le photosensibilisateur est le plus souvent régénéré par transfert d'électron du radical PH^\bullet ou de sa forme déprotonée $P^{\bullet-}$ vers l'oxygène moléculaire pour former l'anion radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$:



Dans le mécanisme de **type II**, le photosensibilisateur excité P^* transfère dans un premier temps l'énergie qu'il a acquise vers l'oxygène moléculaire :



L'oxygène, en absorbant l'énergie, se trouve excité sans avoir absorbé de lumière, on parle alors d'oxygène singulet $^1\text{O}_2^*$. Ce dernier peut oxyder divers substrats biologiques :

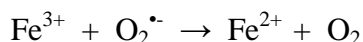


Parmi les EOR susceptibles d'être formées dans les premières étapes du processus de photosensibilisation se trouvent donc l'oxygène singulet $^1\text{O}_2^*$ (premier état excité de l'oxygène), et l'anion radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ (premier état de réduction monoélectronique de l'oxygène). Si $^1\text{O}_2^*$ est une espèce oxydante assez réactive, $\text{O}_2^{\bullet-}$ l'est beaucoup moins vis-à-vis des substrats biologiques.⁵ En revanche, le radical hydroperoxyle HOO^\bullet , la forme protonée de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (pKa = 4,8), est beaucoup plus réactif. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , résultant de la dismutation spontanée ou enzymatiquement catalysée de $\text{O}_2^{\bullet-}$, est lui aussi peu réactif.

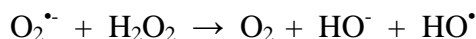
Cependant, $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 sont reconnus comme jouant un rôle majeur dans le stress oxydant, en participant à des réactions impliquant des ions métalliques telles que la **réaction de Fenton**⁶ dans laquelle l'ion ferreux Fe^{2+} réduit H_2O_2 en conduisant au radical hydroxyle HO^\bullet , espèce radicalaire très réactive :



L'anion superoxyde peut, quant à lui, être oxydé par les ions ferriques :



$\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 peuvent alors participer à un cycle catalytique nécessitant des ions métalliques, dit **cycle de Haber Weiss**,⁷ en générant le radical hydroxyle :



II.2.2 Effets des rayonnements UV sur l'ADN

L'ADN est constitué des quatre bases : l'Adénosine (A), la Guanine (G), la Thymine (T) et la Cytosine (C) (figure 3). A et G sont appelés purines, T et C pyrimidines. Dans l'ADN, chaque purine est « associée » à une pyrimidine par liaisons hydrogènes (A avec T, G avec C).

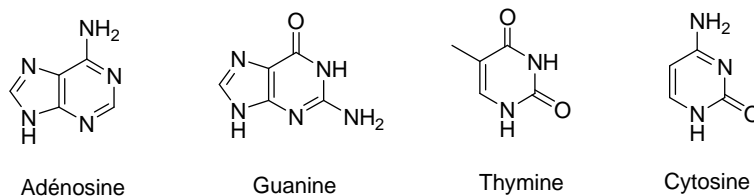


Figure 3 : bases constituant l'ADN

L'altération de la structure chimique de l'ADN peut être à l'origine de l'apparition de mutations et éventuellement conduire à la mort cellulaire. Les dommages induits sur l'ADN sont de différents types : coupures mono- ou double-brins des chaînes nucléotidiques, adduits covalents avec les protéines et produits de modifications des bases.

Dans le cas de dommages photoinduits, la nature des processus physico-chimiques à l'origine de ces modifications dépend principalement de la longueur d'onde des photons incidents.⁸ Ainsi, le rayonnement UVB, dont l'énergie lumineuse est directement absorbée par l'ADN, induit principalement des modifications au niveau des bases pyrimidiques. Le rayonnement UVA et la lumière visible ne sont eux pas absorbés par l'ADN. Cependant, des chromophores endogènes ou exogènes peuvent, dans une forme excitée après absorption de l'énergie lumineuse, dégrader le génome. Cette réaction, qui a pour cible préférentielle la base guanine, est appelée photosensibilisation.

II.2.2.1 Dégradation de l'ADN par les UVB

Le rayonnement UVB représente la partie la plus énergétique du spectre solaire. Les réactions photochimiques qu'il induit dans l'ADN impliquent essentiellement l'excitation des bases nucléiques. Les cibles principales sont les pyrimidines mais des travaux récents ont mis en évidence une faible implication des purines.⁹

L'action des UVB sur l'ADN est largement dominé par la formation de photoproduits dimériques entre deux bases pyrimidiques adjacentes.¹⁰

Les photoproduits créés en plus grand nombre par l'exposition de l'ADN aux UVB sont les **dimères de type cyclobutane**. Ils sont produits par cyclo-addition [2+2] des doubles

liaisons carbone-carbone de deux pyrimidines adjacentes. Les photoproduits comportant une **cytosine** sont plus difficilement isolables puisqu'ils subissent une réaction rapide de désamination, qui peut être un facteur mutagène (schéma 2).

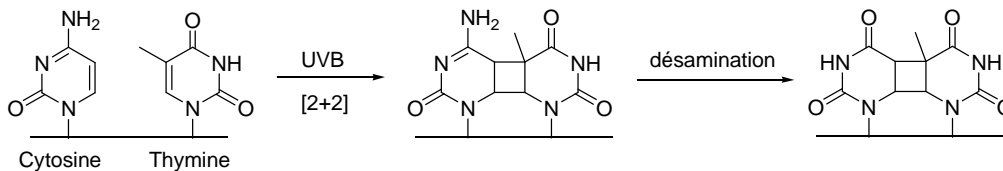


Schéma 2 : séquence CT : photoproduit de type cyclobutane et dégradation

L'autre classe principale de photoproduits de pyrimidines correspond aux **adduits pyrimidine (6-4) pyrimidone**. Ils sont issus d'une cyclo-addition [2+2] entre la double liaison carbone-carbone d'une pyrimidine et le groupement carbonyle d'une thymine (ou imine de la forme tautomère d'une cytosine). Un intermédiaire de type oxétane est ainsi obtenu (ou azétidine pour la cytosine). Une dégradation hydrolytique spontanée conduit à l'**adduit (6-4)**. Une propriété remarquable de cet adduit est la photoconversion de leur noyau pyrimidone en **isomère de valence Dewar**, par exposition aux UVB (schéma 3).

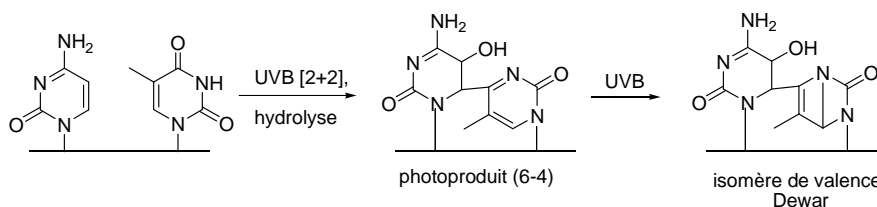


Schéma 3 : séquence CT : photoproduit (6-4) et photoconversion en isomère de valence Dewar

II.2.2.2 Dégradation de l'ADN par les UVA

Les réactions de photosensibilisation à la lumière visible ou aux UVA font intervenir les mécanismes de type I et II, présentés dans le paragraphe II.2.1. Ces deux mécanismes ont été étudiés sur l'ADN isolé et sur des composés modèles.¹¹

a) Photosensibilisation de type I

Les cibles principales de la photosensibilisation de type I dans l'ADN sont les bases. Ces dernières sont converties par une réaction d'oxydation à un électron en leur cation radical. Ce dernier peut ensuite réagir avec l'eau ou se déprotoner.

La base la plus sensible à la photosensibilisation de type I est la **guanine** qui présente le potentiel d'oxydation le plus bas. Le cation radical de la guanine peut se déprotoner en un radical neutre oxydant. Ce dernier réagit lentement avec l'oxygène pour produire une base modifiée de type **imidazolone** qui s'hydrolyse en une molécule de type **oxazolone** (schéma 4, voie a). De manière compétitive, le cation radical de la guanine peut s'hydrater, uniquement dans l'ADN, en un radical 8-hydroxyguan-7-yle réducteur. Ce dernier est converti en un dérivé de type formamidopyrimidine **FapyGua** par réduction (schéma 4, voie b) ou en **8-oxoGua** par oxydation (schéma 4, voie c).

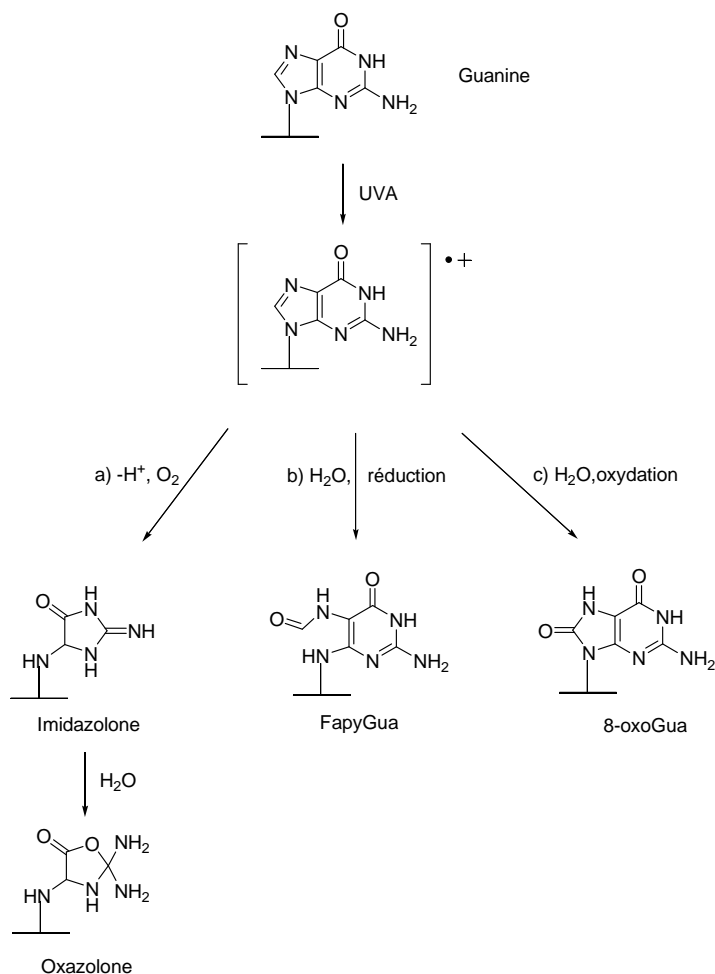


Schéma 4 : Structures des produits issus du cation radical de la guanine

Les pyrimidines sont peu dégradées par l'arrachement photosensibilisé d'un électron dans l'ADN, pour des raisons inverses de celles expliquant la forte susceptibilité de la guanine. Cependant, les cations radicaux issus de la **cytosine** et de la **thymine** peuvent s'hydrater pour conduire à la formation spécifique des radicaux **6-hydroxy-5,6-dihydro-5-yles**. Après réaction avec l'oxygène, ces radicaux neutres sont convertis en **6-hydroxy-5-peroxy-5,6-dihydropyrimidines**, qui sont réduits en **5-hydroxyperoxy-6-hydroxy-5,6-dihydroxypyrimidines**. Ces dernières peuvent alors générer des diols de thymine ou de cytosine, ainsi que des produits de transposition et de fragmentation du cycle pyrimidique (résidu formamido, dérivés de type hydantoïne, schéma 5).

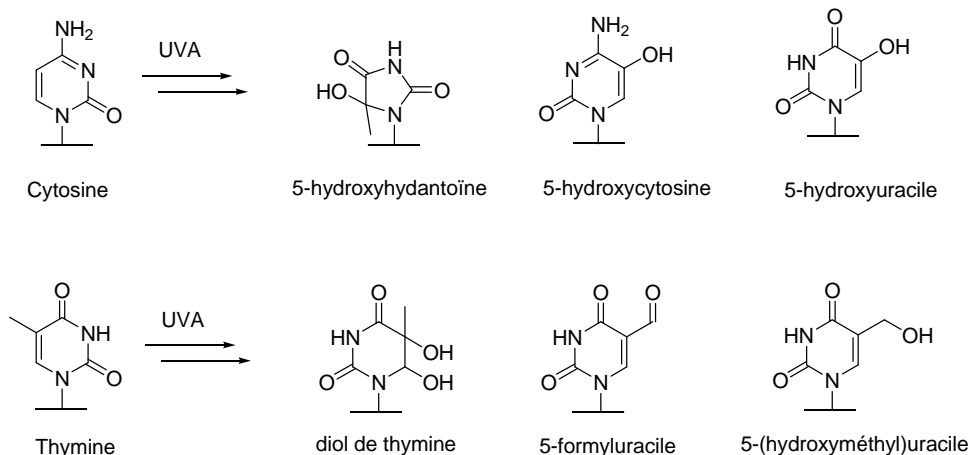


Schéma 5 : exemples de lésions des bases C et T par photosensibilisation de type I

b) Photosensibilisation de type II

Dans le cas d'une photosensibilisation de type II, une espèce réactive non radicalaire de l'oxygène est produite, l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$. Ce dernier réagit spécifiquement avec la **guanine** par une cyclo-addition [4+2]. Un endoperoxyde impliquant les positions 4 et 8 du cycle purique est ainsi formé (schéma 6). Le réarrangement de cet endoperoxyde va conduire à la formation d'un dérivé 8-hydroxyperoxy. Ce dernier, qui est un oxydant très puissant peut oxyder des molécules voisines (telles une guanosine ou tout autre molécule oxydable présente dans le milieu). Cette réaction transforme l'hydroperoxyde en **8-oxoGua**.¹²

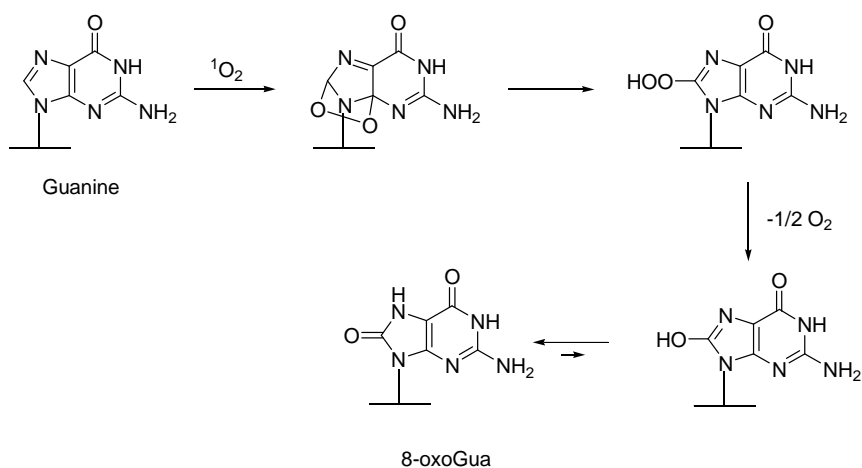


Schéma 6 : oxydation de la Guanine en 8-oxoGua par $^1\text{O}_2$

II.2.3 Effets des UV sur les protéines

Les protéines peuvent être la cible d'espèces réactives générées par réaction photochimique de leurs chromophores. Dans les protéines, l'histidine (His), la cystéine (Cys) et le tryptophane (Trp) sont les acides aminés les plus sensibles à l'oxydation photoinduite (figure 4).

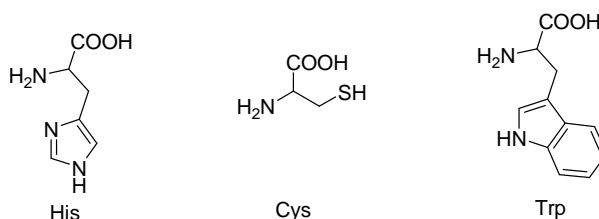


Figure 4 : acides aminés photosensibles

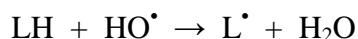
L'importance biologique du Trp est bien démontrée dans la photoinduction de cataractes du cristallin, dans laquelle les photoproduits du Trp génèrent H₂O₂ et O₂^{•-}, qui endommagent les protéines du cristallin.¹³

D'autre part, dans l'élastine et le collagène du derme, certains acides aminés naturels en liaison inter-chaîne absorbent autour de 300 nm et se comportent ainsi comme des chromophores. Une irradiation chronique aux UV peut augmenter la fraction du collagène insoluble et ainsi contribuer au photovieillessement.¹⁴

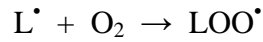
II.2.4 Effets des UV sur les membranes

Une cible particulièrement importante des EOR se situe au niveau des membranes cellulaires, où les conséquences des dommages oxydants en termes d'effets biologiques sont très importantes.

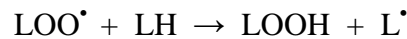
Les membranes sont riches en acides gras polyéthyléniques insaturés qui se dégradent par peroxydation radicalaire.¹⁵ La peroxydation des acides gras insaturés (LH) est déclenchée lors d'une phase d'initiation par un radical libre (HO[•] par exemple), ou par un photosensibilisateur *via* une abstraction d'hydrogène, pour conduire au radical L[•] :



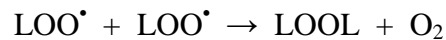
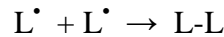
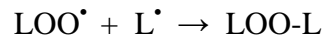
Le réarrangement du radical L^\bullet et la fixation d'oxygène moléculaire conduisent à la formation du radical peroxyde LOO^\bullet :



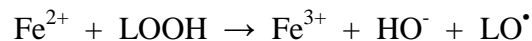
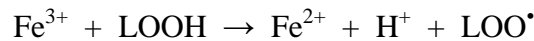
Ce dernier, en arrachant à son tour un atome d'hydrogène, forme l'hydroperoxyde $LOOH$ et régénère le radical L^\bullet :



Ce cycle se renouvelant théoriquement à l'infini (phase de propagation) est interrompu par des réactions de recombinaison d'espèces radicalaires (phase de terminaison).



Si les ions ferriques et ferreux jouent un rôle important dans l'activation du peroxyde d'hydrogène et de l'anion superoxyde, ils sont également essentiels dans l'activation d'autres molécules de type peroxyde. Ainsi, les hydroperoxydes organiques $ROOH$ et les hydroperoxydes d'acides gras libres ou sous leur forme phospholipidique $LOOH$ doivent être considérés comme des EOR ou du moins comme des précurseurs de ces espèces au même titre que H_2O_2 .¹⁶ Les réactions catalytiques suivantes peuvent conduire à la formation de radicaux peroxydes LOO^\bullet ou alkoxydes LO^\bullet qui sont aptes à induire la peroxydation lipidique en chaîne:



La peroxydation des lipides membranaires va altérer la structure et donc la fonctionnalité des membranes avec des modifications de potentiels transmembranaires, de flux ioniques, de transports transmembranaires, l'inactivation des récepteurs, la dérégulation des systèmes messagers... Dans les édifices membranaires, ces peroxydations peuvent par ailleurs conduire à la modification des protéines ou encore à des pontages lipides-protéines.

Il est également important de noter que certains produits de dégradation des peroxydes lipidiques et produits de fragmentation formés durant la peroxydation, en particulier de type aldéhydique, décrits comme des substances mutagènes, interagissent avec l'ADN.^{17, 18}

II.3 Effets des rayonnements UV sur la peau

La peau est l'organe humain le plus grand avec une surface d'environ 2m². Elle est composée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

L'**épiderme** est la couche supérieure de la peau ; sa fonction est de protéger l'organisme contre les agressions extérieures. Il est composé de cinq couches distinctes : la couche cornée, la couche claire, la couche granuleuse, la couche des cellules à épines et la couche cellulaire basale. Il est formé de kératinocytes, de mélanocytes et de cellules de Langerhans.

Le **derme** se situe juste en dessous de l'épiderme. Il est riche en fibres collagènes et élastiques, qui assurent à la peau sa résistance et son élasticité. C'est dans le derme que les cellules se multiplient pour remplacer celles qui sont éliminées au niveau de l'épiderme.

L'**hypoderme** est la couche la plus profonde de la peau. Cette couche, riche en graisse et en vaisseaux sanguins, a pour rôle d'amortir les pressions auxquelles la peau est soumise et de protéger l'organisme des variations de température.

La lumière pénètre d'autant plus profondément dans la peau que la longueur d'onde est élevée. Ainsi, les UVB affectent essentiellement l'épiderme alors que les UVA atteignent le derme.

II.3.1 Erythème induit par les rayonnements UV

L'érythème cutané, fait partie des manifestations précoces induites par le rayonnement UV. S'il est essentiellement induit par les UVB, les UVA sont responsables d'une photoaggravation de l'érythème induit par les UVB. En terme d'efficacité biologique, exprimé en dose érythémale minimale (c'est-à-dire la dose minimale pour provoquer la

formation d'un érythème), il faut environ 1000 fois plus d'UVA que d'UVB solaires pour induire un érythème. Cependant, la quantité d'UVA étant quelques centaines de fois plus importante que celle des UVB, la contribution des UVA dans l'expression d'un érythème peut être estimée à 10-20%.¹⁹

II.3.2 Rayonnement UV et vieillissement cutané

Le vieillissement cutané fait partie du processus général de vieillissement de l'organisme et en constitue souvent un marqueur précoce par son caractère visible. Le vieillissement au sens strict du terme est intrinsèque et il est dû à l'effet de l'écoulement du temps sur la biologie cellulaire.

Parmi les facteurs influençant le vieillissement cellulaire de la peau, le spectre des ultraviolets joue un rôle majeur bien que non exclusif. Les effets de ce rayonnement peuvent être aisément étudiés en comparant les zones photoexposées et photoprotégées.^{20, 21} Les UV affectent, à des degrés divers, le derme et l'épiderme ; le spectre des lésions est donc large.

II.3.3 Les cancers cutanés

La photocarcinogénèse est la conséquence la plus grave des surexpositions solaires, lorsque les dommages induits qui s'accumulent dans les cellules de l'épiderme échappent aux mécanismes de réparation. Il existe deux grands groupes de cancers cutanés : les mélanomes et les carcinomes. En France, 50 000 carcinomes et 7 000 mélanomes sont diagnostiqués chaque année, ces chiffres augmentent de plus de 5% par an.

La responsabilité des UV dans le développement des cancers cutanés est suspectée depuis longtemps en se basant sur les arguments suivants :

- ◆ ces cancers sont plus fréquents dans les pays de fort ensoleillement,
- ◆ ils sont dans la majorité des cas situés sur des zones photoexposées du corps,
- ◆ leur incidence est plus importante chez les individus les plus sensibles (peau claire, cheveux blonds ou roux, taches de rousseur).

Le lien précis entre des dommages cellulaires liés aux UV et l'apparition de cancers cutanés est délicat à établir. Parmi les nombreux effets observés, il est accepté que le rayonnement solaire UVB entraîne des lésions de l'ADN au niveau des sites dipyrimidiques. Ces lésions peuvent entraîner des mutations génétiques si elles ne sont pas correctement réparées. Lorsqu'elles touchent des gènes clés du fonctionnement cellulaire comme les oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeurs, elles peuvent aussi entraîner la transformation cellulaire vers des types cancéreux.

Le rayonnement UVA participe également à la photocarcinogénèse par la formation d'un stress oxydatif qui libère des espèces oxygénées hautement réactives et potentiellement mutagènes. Si leur effet à dose égale est bien moins important que celui des UVB, les quantités d'UVA délivrées par le rayonnement solaire étant beaucoup plus importantes, ils peuvent également être considérés responsables du déclenchement de la maladie.

Le rayonnement solaire agit à plusieurs niveaux dans la carcinogénèse. D'une part, c'est un élément initiateur, qui va provoquer dans les cellules cutanées des lésions entraînant des mutations de gènes qui modifient le comportement cellulaire (clone tumoral). D'autre part, les UV sont promoteurs de tumeurs car ils induisent la synthèse de cytokines qui vont favoriser l'expansion du clone tumoral. Enfin, les UV, par leur effet immunosuppresseur, inhibent également la « veille immunitaire » capable d'éliminer un clone tumoral en formation.²²

II.3.3.1 Rayonnement UV et carcinome

Il existe deux types de carcinomes : le carcinome basocellulaire (BCC) et le carcinome spinocellulaire (SCC).

Les carcinomes représentent plus de 90% de l'ensemble des cancers cutanés. Ils sont rarement mortels car ils ne se propagent pas aux autres organes dans le cas des BCC ou très lentement dans le cas des SCC. Ils peuvent être guéris par une intervention chirurgicale superficielle. Il semblerait que le risque de développer un BCC soit corrélé avec des antécédents d'expositions solaires intermittentes, en particulier durant l'enfance, alors que le risque de développer un SCC soit plutôt lié à une exposition solaire chronique.

II.3.3.2 Rayonnement UV et mélanome

Le mélanome est beaucoup plus rare que le carcinome mais est beaucoup plus dangereux. Il touche environ 200 000 personnes par an dans le monde. Il se propage très vite à d'autres organes du corps. L'incidence globale du mélanome double tous les dix ans et il existe de nombreux arguments pour suspecter le rôle des irradiations UV dans cette augmentation. Une campagne nationale visant à détecter au stade le plus précoce possible un mélanome a récemment été mise en place, avec la règle ABCDE, qui permet de caractériser les lésions précoces :

- ◆ **Asymétrie** : la plupart des mélanomes ont des bords asymétriques,
- ◆ **Bords irréguliers**,
- ◆ **Couleurs non homogènes** : les mélanomes ont souvent plusieurs couleurs : rouge, bleu, marron, noir,
- ◆ **Diamètre** : en général supérieur à 6 mm,
- ◆ **Evolution** : un grain de beauté qui change d'aspect, de couleur ou devient rugueux.

Si le mélanome est détecté de manière précoce, une simple intervention chirurgicale suffira à la guérison. Sinon, des traitements beaucoup plus contraignants pour les patients, telle la chimiothérapie, devront être mis en œuvre.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré le rôle de l'irradiation UV dans la genèse du mélanome. Il semble que les expositions précoces dans l'enfance et intermittentes (érythèmes) entraînent une augmentation de l'incidence des mélanomes chez l'adulte.^{23,24} En revanche, l'exposition chronique ou professionnelle est associée à un risque réduit.

III. Les mécanismes de défense

Pour lutter contre les effets néfastes du rayonnement solaire, l'organisme dispose d'un certain nombre de mécanismes de défense endogènes. En cas de surexposition, des produits de photoprotection exogènes peuvent être utilisés, comme des crèmes solaires.

Ces mécanismes de défense endo- et exogènes peuvent être classés en deux groupes :

- ◆ les défenses contre les effets directs des UV (photoprotection),
- ◆ les défenses contre les effets indirects des UV, c'est-à-dire contre les EOR (protection anti-radicalaire).

III.1 Défenses contre les UV

III.1.1 La photoprotection naturelle

Certaines molécules présentes dans la peau absorbent les rayonnements UV et peuvent être considérés, à certains titres, comme des photoprotecteurs. Les principaux chromophores de la peau absorbant les UVA et UVB sont le 7-déhydrocholestérol, l'acide urocanique et la mélanine (tableau 1).

La mélanine joue un rôle essentiel dans le système de photoprotection naturelle. En effet, elle constitue un filtre qui absorbe plus de 90% des UV ayant franchi la couche cornée. La mélanine va absorber les photons lumineux et l'énergie absorbée va être dissipée sous forme de chaleur ou utilisée pour oxyder la pré-mélanine (pigmentation immédiate). Cependant, chaque individu possède un coefficient de protection plus ou moins élevé selon la nature de ses pigments mélaniques.

Enfin, la pilosité, la barrière cornée ou les lipides de surface peuvent également être considérés comme des photoprotecteurs naturels, même si leur contribution est moindre.

Tableau 1: chromophores majeurs de la peau absorbant les UV

| Chromophores | Spectre d'absorption |
|---------------------------|----------------------|
| ADN | 220-320 nm |
| Acide urocanique | 250-360 nm |
| Acides aminés aromatiques | 240-320 nm |
| Esters du rétinol | 260-380 nm |
| Mélanines | 250-700 nm |
| NADH, NADPH | 260-400 nm |
| Hémoglobines | 260-450 nm |
| Bilirubine | 300-350 nm |
| Flavines | 225-510 nm |
| Caroténoïdes | 300-500 nm |
| 7-dihydrocholestérol | 270-315 nm |

III.1.2 La photoprotection externe

La photoprotection vestimentaire constitue le moyen le plus simple et le plus efficace pour lutter contre les rayonnements dangereux. L'autre type de photoprotection, par les produits antisolaires, constitue une protection cutanée topique.

Il existe deux classes pharmaceutiques d'actifs antisolaires : les filtres et les écrans. Les **écrans** sont des substances inorganiques ayant un fort pouvoir de réflexion du rayonnement solaire (UVA et UVB), empêchant ainsi son absorption par la peau. L'écran le plus souvent utilisé est le dioxyde de titane TiO_2 . Les **filtres** sont des molécules organiques qui assurent un rôle de chromophore externe, en absorbant l'énergie transportée par les photons lumineux.²⁵ En fonction de l'étendue de la longueur d'onde absorbée, on distingue les filtres à spectre large et les filtres à spectre étroit. Les filtres les plus courants sont dits à spectre étroit, ils absorbent de façon sélective les UVB et protègent de l'érythème solaire, mais sont perméables aux UVA (figure 5). Depuis peu, des filtres spécifiques aux UVA ont également été mis au point.

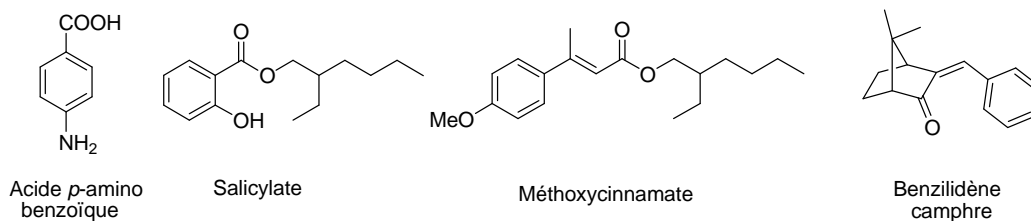


Figure 5 : principales familles de filtres à spectre étroit et exemples

Les filtres dits à spectre large absorbent à la fois les UVB et les UVA, ils sont actuellement en pleine expansion, du fait de la récente élucidation du rôle des UVA dans les pathologies dues aux rayonnements solaires (figure 6).

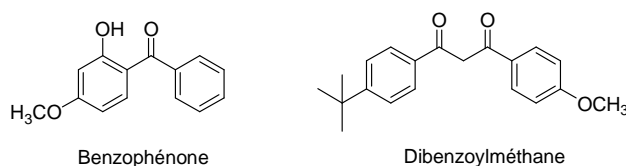


Figure 6 : principales familles de filtres à spectre large et exemples

III.2 Défenses contre les EOR

Comme énoncé précédemment, les UV, et essentiellement les UVA, provoquent la formation de radicaux libres, espèces très réactives. Pour lutter contre la surproduction d'EOR et contre leurs conséquences, la cellule est dotée d'un certain nombre de systèmes de défense. Trois grandes classes peuvent être distinguées :

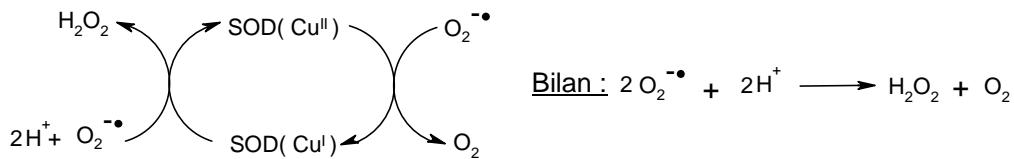
- ◆ la protection par les enzymes,
- ◆ la protection contre les ions métalliques, c'est-à-dire contre l'activation des peroxydes et du cycle de Haber-Weiss,
- ◆ la protection par de petites molécules appelées « antioxydants ».

Ces trois catégories vont être présentées ci-dessous, avant de considérer de façon plus précise les antioxydants dans le paragraphe suivant.

III.2.1 La protection par les enzymes

III.2.1.1 Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des enzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène²⁶ :



Ces enzymes assurent donc l'élimination de l'anion radical superoxyde et contribuent à éviter la coexistence de celui-ci avec le peroxyde d'hydrogène, empêchant ainsi les réactions de type Haber-Weiss.

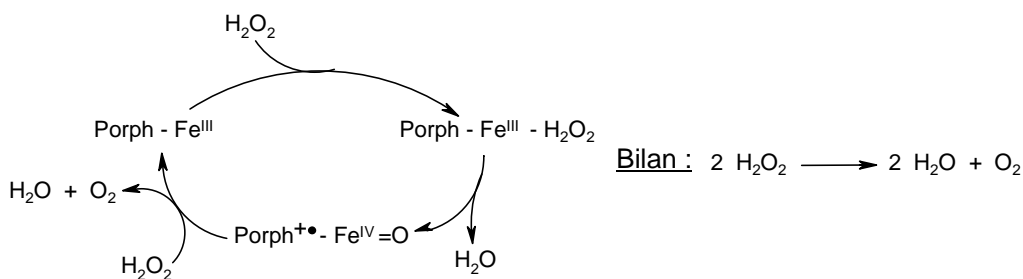
Deux formes de SOD ont été isolées :

- ◆ une enzyme à cuivre et zinc (Cu,Zn-SOD), située dans le cytosol. Le rôle catalytique est assuré par l'ion Cu^{2+} , l'ion Zn^{2+} ayant une fonction stabilisante,
- ◆ une enzyme à manganèse (Mn-SOD), située dans les mitochondries. Le rôle catalytique est assuré par l'ion Mn^{2+} .

Puisque la SOD est présente dans tous les compartiments subcellulaires qui génèrent l'anion superoxyde, il est supposé que cette enzyme joue un rôle central dans les systèmes de défense contre le stress oxydant.²⁷

III.2.1.2 Les catalases

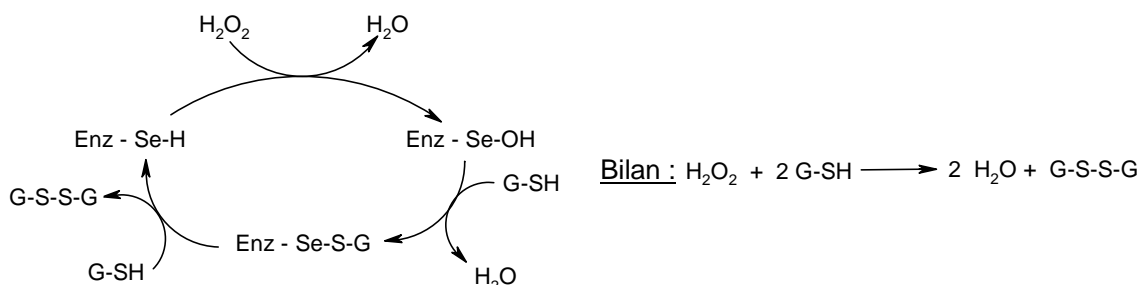
Les catalases sont des enzymes protéiques hémiques dans lesquelles l'hème catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène :



Elles permettent donc d'éviter la formation du radical hydroxyle en présence de Fe^{2+} . Ces enzymes sont très sensibles à l'irradiation UV et leur inactivation par les UVA est bien connue.²⁸

III.2.1.3 La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GSHPx) assure la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau, en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène. Cette enzyme séléno-dépendante se situe essentiellement dans le cytosol :



Le rapport glutathion réduit sur glutathion oxydé, généralement élevé, est maintenu constant grâce à l'action de la glutathion réductase qui, comme son nom l'indique, réduit le glutathion oxydé.²⁹ Ainsi, sans être à proprement parler une enzyme de protection, la glutathion réductase est un élément des systèmes de défense. La GSHPx peut également réduire les hydroperoxydes organiques et les hydroperoxydes d'acides gras polyéthyléniques libres.³⁰

III.2.2 Le piégeage des ions métalliques

Le rôle activateur des ions métalliques dans la production d'EOR est bien connu.⁷ Ainsi, toute molécule capable de séquestrer les ions métalliques va conduire à une protection. Cette séquestration est assurée par des protéines spécifiques de transport telles que la céruloplasmine pour le cuivre et la transferrine pour le fer.

III.2.3 La protection par les molécules antioxydantes

Les systèmes de défenses non-enzymatiques correspondent à l'action antioxydante de petites molécules endogènes. Leurs propriétés antioxydantes sont liées à leur aptitude à intercepter ou désactiver des états excités ou radicalaires. Ils sont capables d'inhiber les réactions en chaînes déclenchées par les EOR, en captant les radicaux. Les antioxydants conduisent à de nouveaux radicaux stables, donc moins réactifs, qui ne participent pas à la propagation des réactions en chaîne.

Les principaux antioxydants cellulaires sont représentés ci-dessous (schéma 7) :

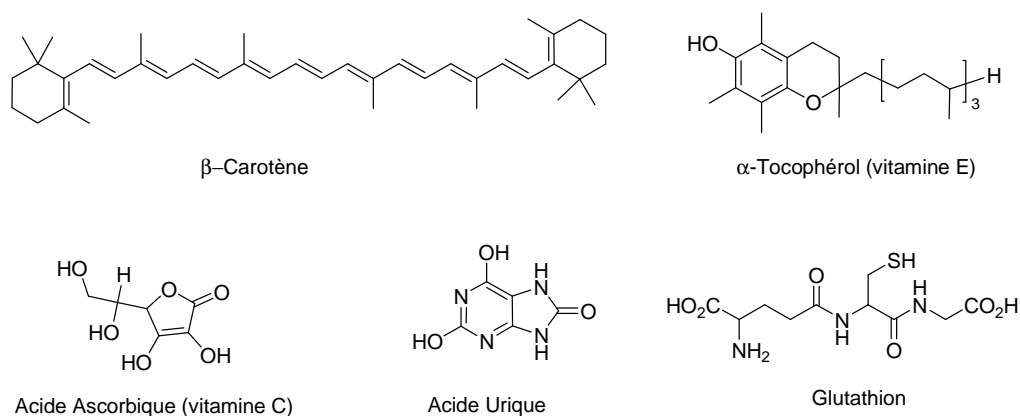


Schéma 7 : structures de quelques antioxydants cellulaires

Les caroténoïdes, dont le **β -carotène**, localisés dans les environnements très lipophiles, contribuent à la désactivation physique de photosensibilisateurs excités triplets et de l'oxygène singulet et à l'inhibition de réactions radicalaires.³¹

L' **α -tocophérol** (vitamine E), également très hydrophobe et donc essentiellement membranaire, peut chimiquement désactiver l'oxygène singulet et intercepter le radical

hydroxyle. Le rôle essentiel de la vitamine E, en tant que donneur d'hydrogène, réside dans son aptitude à interrompre les chaînes de propagation radicalaires dans les membranes.³² Le nouveau radical tocophéryle formé est très peu réactif car stabilisé par des effets stériques et électroniques.

L'**acide ascorbique** (vitamine C) réagit avec le radical superoxyde et le radical hydroxyle, mais son rôle majeur réside dans la réduction du radical issu de la vitamine E, assurant ainsi la régénération de celle-ci.³² Le rôle de la vitamine C est cependant complexe dans la mesure où elle peut présenter des propriétés prooxydantes, en réduisant les ions Fe^{3+} en ions Fe^{2+} , et donc en contribuant à la production de radicaux *via* la réaction de Fenton.³³

L'**acide urique** est soluble dans l'eau, il réagit avec les radicaux hydroxyles et hydroperoxydes en cédant les hydrogènes de ses fonctions hydroxyles. De plus, l'acide urique forme des complexes avec les ions Fe^{3+} , dans lesquels le potentiel redox du couple Fe^{3+}/Fe^{2+} est diminué, empêchant ainsi le métal de réagir par un mécanisme de type Fenton.

Le **glutathion** (GSH) est un tripeptide (Glu-Cys-Lys) dont l'activité antioxydante est due à la fonction thiol de la cystéine, qui en fait un excellent réducteur et donneur d'hydrogène.³⁴ Lors de son oxydation, le soufre porte un radical qui dimérise pour conduire à la formation d'un pont disulfure (GS-SG). Le glutathion est présent dans la plupart des cellules et compartiments cellulaires. Du fait de sa concentration élevée, qui peut atteindre 10 mM, il a un rôle essentiel dans le maintien de l'état redox de la cellule. Il peut également participer à la régénération des vitamines E et C en transférant un atome d'hydrogène à leurs radicaux respectifs. Enfin, il participe à des réactions enzymatiques qui contribuent aux défenses antioxydantes.

IV. Les antioxydants : mécanismes et enjeux

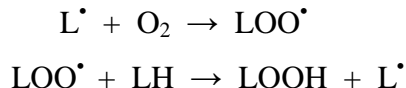
IV.1 Mécanismes d'action

Pour qu'une molécule ROH soit un bon antioxydant, il faut que le radical RO[•], formé après réaction sur une EOR, soit suffisamment inerte pour ne pas dégrader le matériel biologique. La stabilité de RO[•] peut provenir d'une part de la délocalisation du radical, sur un noyau aromatique par exemple, mais peut également être due à l'encombrement stérique autour du radical.

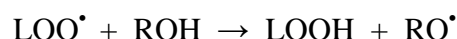
Les antioxydants peuvent inhiber les processus d'oxydation suivant plusieurs mécanismes :

◆ **Mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène**³⁵

Comme dans le cas de la peroxydation lipidique, les dommages oxydatifs sur le substrat biologique L peuvent être le fruit de réactions en chaîne, du type :



L'antioxydant peut intervenir dans ce mécanisme en interrompant la chaîne de propagation, par réaction avec un radical peroxyde:

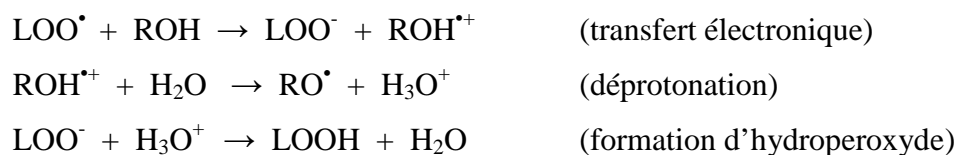


On parle dans ce cas d'antioxydant « par rupture de chaîne ». Pour être efficace, ROH doit réagir de façon rapide avec le radical peroxyde et RO[•] doit être suffisamment stable pour ne pas réagir avec LH.

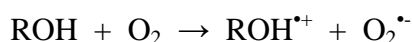
Le facteur primordial dans ce cas est la capacité de ROH à donner un atome d'hydrogène. L'enthalpie de dissociation (EDL) de la liaison RO-H est donc un facteur déterminant et doit être la plus faible possible.

◆ **Mécanisme de transfert monoélectronique** ³⁵

La désactivation du radical peut également s'effectuer suivant les réactions :



Dans ce cas, c'est le potentiel d'ionisation (PI) qui est le facteur déterminant. Celui-ci doit être le plus faible possible. Cependant, un PI trop faible provoque une instabilité du produit à l'oxygène, qui désactive ROH, par formation d'anion superoxyde :



◆ **Mécanisme SPLET** ³⁶⁻⁴⁰

Des travaux récents ont mis en évidence l'existence d'un nouveau mécanisme appelé **SPLET** pour *Sequential Proton Loss Electron Transfer*. En effet, lors d'études de capture du radical DPPH[•], les auteurs ont découvert des cinétiques anormalement rapides dans des conditions où ROH pouvait être partiellement ou totalement déprotoné. Ils ont alors proposé un nouveau mécanisme, faisant intervenir l'alcoolate formé, en l'occurrence un phénolate (schéma 8).

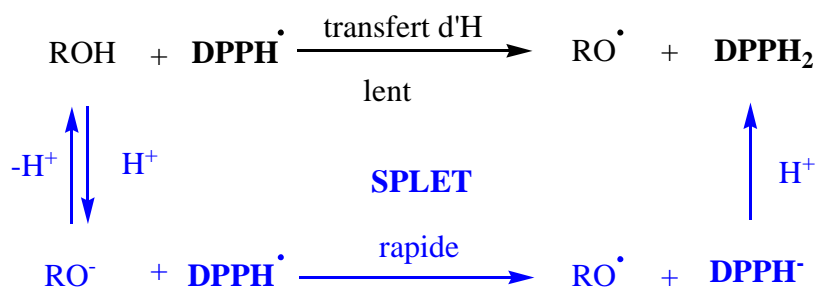


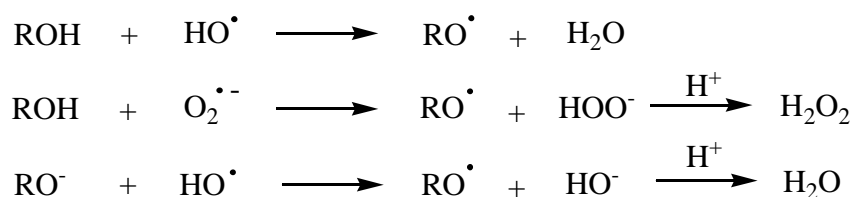
Schéma 8 : mécanisme SPLET (en bleu)

Le bilan du mécanisme SPLET est le même que celui du mécanisme par transfert d'atome d'hydrogène. Cependant, les constantes de vitesse de capture du radical DPPH[•] sont beaucoup plus élevées lorsque la formation de RO⁻ est favorisée (par addition d'une base notamment). Il semblerait donc que la valeur du pKa de ROH soit une donnée essentielle ; plus le pKa est bas, plus la proportion de SPLET est

importante par rapport au transfert d'H et donc plus la cinétique de capture du radical est rapide.

◆ **Capture de radicaux oxygénés** ^{41, 42}

Les antioxydants peuvent également réagir directement avec les EOR, par exemple HO[•] ou O₂^{•-}. Cette désactivation de radicaux peut se faire *via* une abstraction d'atome d'hydrogène à partir de ROH ou à partir de la forme alcoolate RO⁻ :



IV.2 Criblage d'antioxydants

IV.2.1 Principe

L'influence des EOR dans l'organisme et leur implication dans de nombreuses pathologies est désormais bien élucidée. Ceci a motivé la recherche de nouvelles molécules au pouvoir antioxydant. De nombreux composés antioxydants sont connus, cependant de nouveaux produits plus actifs pourraient être obtenus à partir d'extraits naturels. Ceci explique l'engouement scientifique pour développer des tests simples et rapides de caractérisation du pouvoir antioxydant. Ces tests rapides représentent la première étape d'une stratégie générale pour la découverte de nouveaux composés actifs (figure 7). A partir d'une banque de molécules (provenant d'extraits naturels ou issues de la synthèse chimique), un test de criblage de l'activité antioxydante permet de sélectionner les produits les plus actifs, appelés « têtes de série ». A partir de ceux-ci, une nouvelle banque de produits, plus ciblée, peut être conçue et sera à son tour évaluée. Après quelques cycles, les molécules antioxydantes les plus prometteuses subiront des tests complémentaires de toxicité ou seront testées sur des modèles biologiques plus complexes.

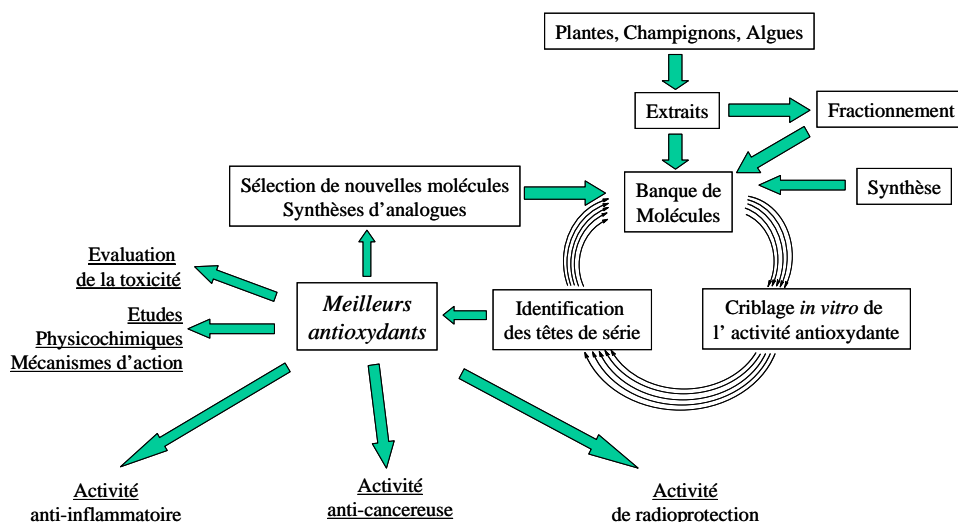


Figure 7 : stratégie de découverte de nouveaux composés antioxydants

C'est dans cette optique qu'a récemment été développé par les Drs S. MEUNIER et F. TARAN, au Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) de Saclay, un test de criblage haut-débit de l'activité antioxydante.^{43, 44} Ce test a été appliqué à l'étude de 24 extraits naturels et à plus de 120 antioxydants, commerciaux ou issus de la synthèse chimique, dont l'activité antioxydante était connue ou non. Ce test s'appuie sur l'étude de la dégradation d'une cible biologique, la thymidine, un des quatre nucléotides de l'ADN. Il repose sur un dosage immunoenzymatique par compétition (le principe de ce test sera décrit en détail au chapitre 3). La dégradation de la thymidine a été étudiée sous trois types de stress oxydatif :

- ◆ irradiation γ au ^{137}Cs ,
- ◆ irradiation UV à 254 nm en présence d'eau oxygénée,
- ◆ système métallique de type Fenton, en présence de Fe^{2+} et d'eau oxygénée.

Chacune des conditions d'oxydation conduit à des espèces oxydantes particulières. L'intérêt de tester les candidats antioxydants dans ces trois systèmes est d'estimer l'étendue de leurs propriétés protectrices dans des conditions de stress oxydant variables.

IV.2.2 Découverte du pouvoir antioxydant de la Norbadione A

Parmi les extraits naturels testés, un extrait de la pisolithe des sables (*Pisolithus tinctorius*) a révélé une activité protectrice exceptionnellement haute, sous stress induits par la radiolyse et les UV. Suite à cette découverte, les différents constituants de cet extrait ont été

séparés par HPLC préparative et chacun d'entre eux a été testé individuellement. Une seule des six fractions obtenues a conservé une activité antioxydante intéressante. Cette fraction est majoritairement constituée d'une molécule appelée norbadione A **1** (NBA, figure 8).

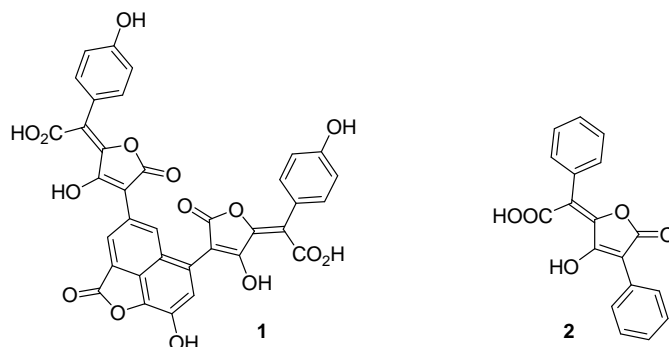


Figure 8 : structures de la norbadione A **1** et de l'acide pulvinique **2**

La NBA **1** fait partie de la famille des acides pulviniques, dont le membre le plus simple est la molécule **2**, appelée elle-même acide pulvinique (figure 8).

L'activité antioxydante de la NBA isolée a ensuite pu être comparée à d'autres produits, dont certains sont connus pour être de bons antioxydants (de type phénols, benzophénones, quinones, coumarines, flavonoïdes, thiols...). Parmi les 120 molécules de la banque de produits, le composé qui conduit à la meilleure protection dans les tests UV et radiolyse est la NBA. Par contre, lors d'un stress oxydatif dans les conditions de Fenton, la norbadione A ne protège que de façon médiocre la thymidine. Ce résultat peut être dû à un effet prooxydant de la NBA sous les conditions de Fenton, ou bien à son incapacité à piéger les espèces oxydantes métalliques générées dans ces conditions (figure 9).⁴⁵

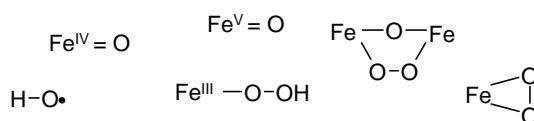


Figure 9 : hypothèses sur les espèces oxydantes générées lors du test Fenton

Afin de poursuivre l'étude des capacités antioxydantes de la norbadione A, des tests complémentaires de protection de l'ADN bactérien ont ensuite été menés (le principe de ce test sera également discuté dans le chapitre 3). Les dégradations de l'ADN sont probablement les effets des EOR les plus conséquents *in vivo*. L'étude de la protection de l'ADN par les antioxydants est donc particulièrement intéressante pour envisager une utilisation future de ces molécules dans l'organisme.

Dans le cas d'une irradiation par le ^{137}Cs , la NBA s'est révélée être un excellent protecteur de l'ADN. Par contre, dans les conditions de Fenton, aucune protection du plasmide n'a été observée. Des coupures multiples de l'ADN en petits fragments ont été observées, ce qui rend compte d'un effet prooxydant de la NBA dans ces conditions. Ces derniers résultats ont permis de mieux comprendre les observations faites dans le cas de la protection de la thymidine. La nature de ce comportement prooxydant en conditions de Fenton a été postulée, par analogie avec l'acide ascorbique,⁴⁶ par un mécanisme à deux électrons, permettant la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} .

A la lumière de ces résultats, il paraissait donc intéressant d'étudier des molécules analogues à la norbadione A, notamment les acides pulviniques.

IV.2.3 Cas du dérivé pulvinique **3**

Compte tenu des résultats préliminaires obtenus sur la NBA, le produit **3**, analogue diméthoxylé de l'acide pulvinique, a été étudié (figure 10).

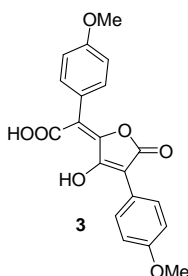


Figure 10 : structure de l'acide pulvinique **3**

L'activité antioxydante de ce produit a été testée dans les mêmes conditions que la NBA, pour la protection dans un premier temps de la thymidine, puis de l'ADN plasmidique.

Dans l'étude de la protection de la thymidine, il a été montré que le dérivé **3** protège non seulement dans les conditions radiolyse et UV, de manière comparable à la norbadione A, mais il protège également de façon efficace dans les conditions de Fenton. Ce type de molécule ne présente donc pas, *a priori*, les mêmes effets prooxydants que la norbadione A.

Ceci a été confirmé par les tests de protection du plasmide bactérien. Le composé **3** s'est montré efficace aussi bien dans les conditions de radiolyse que dans les conditions de Fenton.

IV.2.4 Conclusions

Le dérivé de l'acide pulvinique **3** s'est donc révélé être un excellent antioxydant, capable de protéger différentes cibles sous différentes sources de stress. L'avantage majeur de ce produit par rapport à la NBA réside dans le fait qu'il ne présente aucune activité prooxydante dans les conditions de Fenton testées.

Parmi les 120 produits testés, ce dérivé pulvinique s'est révélé être un des meilleurs agents protecteurs dans les trois tests. Ceci est relativement surprenant car il ne possède qu'un seul site potentiel de capture de radical (la fonction énol, figure 10), contrairement aux antioxydants classiques qui en possèdent plusieurs. De plus, la structure de ce produit est relativement simple et originale pour un antioxydant, puisqu'il ne possède aucune fonction phénol, contrairement à la majorité des antioxydants connus à ce jour.

Pour ces raisons, notre laboratoire a décidé de s'intéresser aux dérivés des acides pulviniques, afin d'essayer de mieux comprendre la nature de leur activité antioxydante.

V. Objectifs du travail

Ce travail de thèse est réalisé en collaboration avec les Laboratoires Pierre Fabre Dermo-Cosmétique.

La préparation et l'évaluation de nouveaux agents antioxydants, dérivés d'acides pulviniques, constituent les objectifs de cette thèse. A long terme, l'application visée de ces molécules est leur incorporation dans une formulation à usage cosmétique (crème solaire par exemple), afin de diminuer les effets des radicaux libres pouvant se former suite aux expositions UV. Ces produits, de structures originales et non naturelles, devront en outre aider à la compréhension du pouvoir antioxydant de cette famille de composés.

L'hypothèse selon laquelle la nature antioxydante des dérivés pulviniques proviendrait de leur capacité à piéger des EOR, en générant un radical stable, sera étudiée. Il est envisageable que le radical formé sur le noyau pulvinique puisse se délocaliser sur le motif céto-énolique, mais également sur la partie aromatique portée par la partie « sud » de la molécule (schéma 9) :

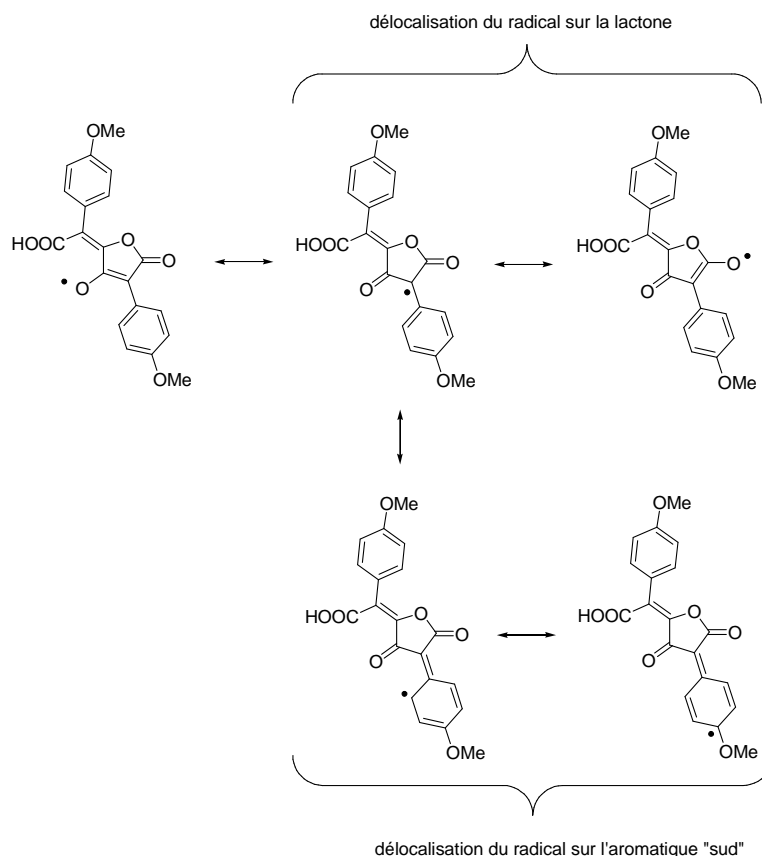


Schéma 9 : sites supposés de délocalisation du radical généré sur **3**

Ainsi, la synthèse de nouveaux dérivés pulviniques simplifiés, c'est-à-dire ne portant qu'un seul noyau aromatique, devrait permettre de progresser dans l'étude de la relation structure-activité des acides pulviniques. Les structures de ces nouveaux dérivés, que l'on appellera acides pulviniques mono-aromatiques, sont les suivantes :

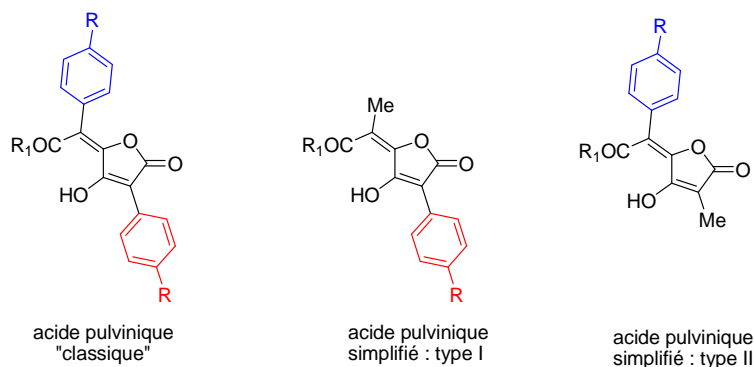


Schéma 10 : acides pulviniques classique et simplifiés

Ainsi, les acides pulviniques simplifiés peuvent être de deux types (schéma 10):

- ◆ Type I : le groupement aromatique « sud » est conservé (en rouge), tandis que celui de la partie « nord » est remplacé par un groupement méthyle,
- ◆ Type II : le groupement aromatique « sud » est remplacé par un groupement méthyle alors que celui porté par la partie « nord » est conservé (en bleu).

La comparaison du pouvoir antioxydant de chaque type de dérivé simplifié avec celle d'acides pulviniques « classiques » permettra de caractériser le rôle joué par les groupements aromatiques dans l'activité antioxydante.

Ces dérivés d'acides pulviniques sont des structures originales et nouvelles. Seul un exemple de dérivé de type I est décrit dans la littérature⁴⁷ (voir schéma 25, p. 70), mais il est obtenu avec un rendement très faible inférieur à 1%. Leur synthèse devra donc être mise au point, à partir de voies nouvelles ou en adaptant celles déjà décrites pour les acides pulviniques « classiques ». De plus, ces synthèses devront être modulables, afin de faire varier les groupements R et R₁, en vue d'étudier leur éventuelle influence sur l'activité antioxydante.

Ces produits étant destinés à un usage cosmétique, ils devront en outre posséder des propriétés physico-chimiques permettant leur incorporation dans des crèmes et notamment selon des critères d'hydrophilie ou de lipophilie. Les synthèses de ces produits devront donc permettre d'introduire le plus facilement possible des fonctions compatibles avec les critères retenus.

VI. Conclusions

Ce chapitre a brièvement exposé les différents effets du rayonnement solaire sur l'organisme. L'action des rayonnements UV est multiple et peut conduire, en cas de surexposition, à des dommages au niveau de l'ADN, des protéines ou des membranes lipidiques.

La photoprotection est devenue un axe de recherche majeur dans le domaine de la cosmétique. Les rayons UVB ont une action dite directe, l'emploi de filtres spécifiques permet de limiter leurs effets. Les rayons UVA ont, eux, une action indirecte et les dommages qu'ils induisent sont dus à la formation d'EOR.

Ces EOR sont des radicaux libres très réactifs vis-à-vis des cibles biologiques. Pour limiter leurs dommages, l'organisme dispose de plusieurs méthodes de défense, dont des molécules organiques appelés antioxydants. L'intérêt de ces antioxydants réside dans le fait qu'ils sont capables de désactiver les EOR et de rompre les réactions radicalaires en chaîne.

La famille des acides pulviniques a montré des propriétés antioxydantes très prometteuses. Ainsi, la compréhension des mécanismes mis en jeu devrait permettre de mettre au point des molécules encore plus efficaces.

Dans cette optique, la synthèse de dérivés simplifiés d'acides pulviniques a été entreprise. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre 2. Enfin, l'étude des propriétés des molécules obtenues est décrite dans le chapitre 3.

CHAPITRE 2 :

SYNTHESE

D'ACIDES PULVINIQUES

MONO-AROMATIQUES

I. Généralités sur les acides pulviniques

Les acides pulviniques sont des membres de la famille des 5-arylidène-buténolides. Ils sont isolés de diverses sources fongiques, en particulier dans la famille des bolets, et des lichens.^{48, 49} Ils sont connus pour être à l'origine de la remarquable couleur jaune ou orange des lichens ou des chapeaux des bolets. La structure des acides pulviniques est caractérisée par une lactone à 5 chaînons, insaturée, hydroxylée et substituée en γ par un groupement hydroxycarbonylalkylidène (schéma 11). On appelle acide pulvinique la molécule **2** substituée par deux groupements phényles et pour laquelle $R=H$ et acide vulpinique l'ester méthylique correspondant **4** (dans la suite de ce document, le terme acide pulvinique décrira la famille de ces composés, et non pas le produit **2** exclusivement).

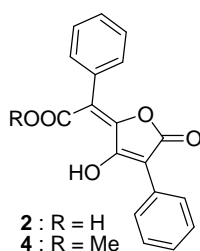
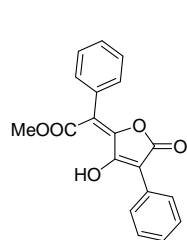
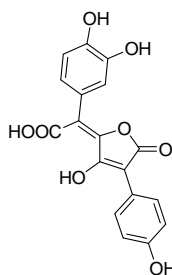


Schéma 11 : structure générale des acides pulviniques

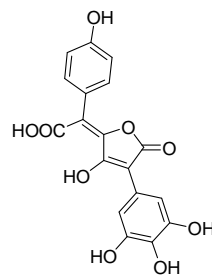
Les différents membres de cette famille sont différenciés par la substitution des groupements aromatiques, souvent hydroxylés ou méthoxylés, ou plus rarement chlorés. En outre, on appelle **acides pulviniques symétriques** les produits pour lesquels les deux groupements aromatiques sont identiques. *A contrario*, lorsque les deux groupements aromatiques sont différents, on parle d'**acides pulviniques dissymétriques**. Le schéma 12 représente quelques membres de la famille des acides pulviniques, leur nom usuel et leur source naturelle.



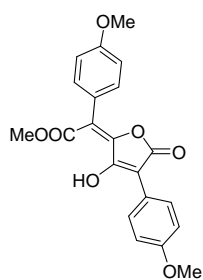
acide vulpinique
(*Boletus subglaberrimus*)



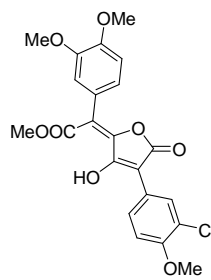
acide isoxerocomique
(*Serpula lacrimans*)



acide gomphidique
(*Gomphidius glutinosus*)



4,4'-Di-O-méthylatromentate de méthyle
(*Pulverobolus auriflammeus*)



3'-Chloro-3,4,4'-tri-O-méthylxerocomate de méthyle
(*Pulverobolus auriflammeus*)

Schéma 12 : exemples d'acides pulviniques naturels

II. Synthèses d'acides pulviniques : rappels bibliographiques

La première synthèse d'acides pulviniques a été décrite en 1894. Depuis cette date, une soixantaine d'articles ont été publiés à ce sujet. Ces différentes synthèses ont récemment fait l'objet d'une revue.⁵⁰

Le motif des acides pulviniques **5** a pu être construit à partir de différentes stratégies. Ces différentes synthèses peuvent être regroupées en quatre groupes, suivant la nature de la stratégie employée pour la construction du noyau pulvinique (schéma 13) :

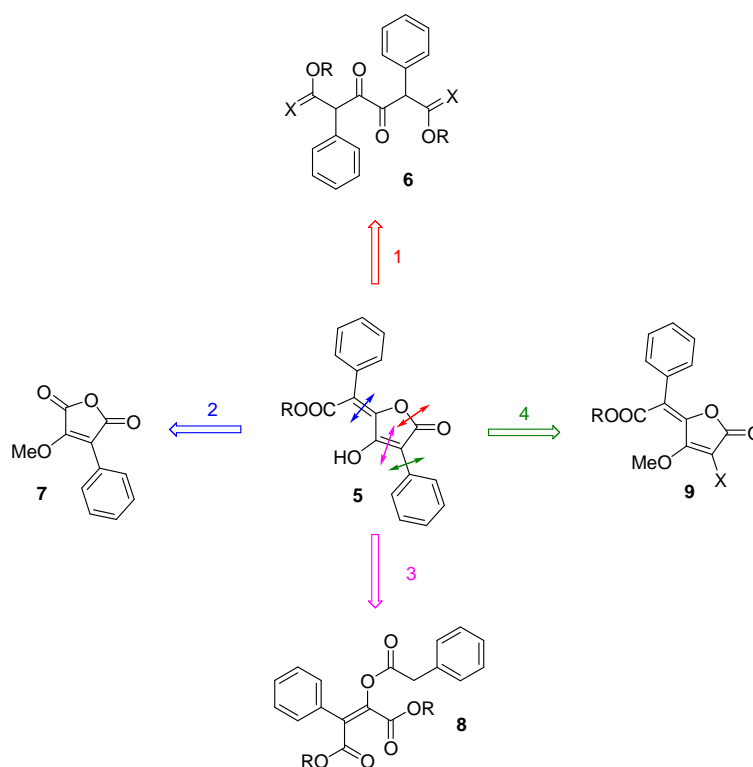


Schéma 13 : stratégies générales de synthèse d'acides pulviniques

La stratégie 1 constitue l'approche historique et utilise comme intermédiaire-clé une 1,2-dicétone acyclique de type **6**. La stratégie 2 utilise la chimie des anhydrides maléiques **7**. La stratégie 3 permet d'avoir accès au motif pulvinique par une condensation de type Dieckmann sur un substrat de type **8**. Enfin, la stratégie 4 est l'approche la plus récente et permet d'introduire le motif aromatique porté par la lactone *via* une réaction de type Suzuki-Miyaura sur un substrat de type **9**.

Ces différentes stratégies, ainsi qu'une approche biomimétique, vont être présentées dans les paragraphes suivants.

II.1 Stratégie 1 utilisant une 1,2-dicétone acyclique

II.1.1 A partir d'une dilactone pulvinique

De 1894 à 1975, la quasi-totalité des synthèses décrites d'acides pulviniques utilisait comme intermédiaire-clé une dilactone pulvinique **10** (schéma 14).

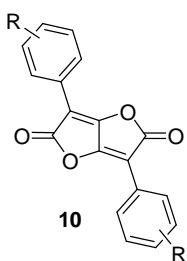
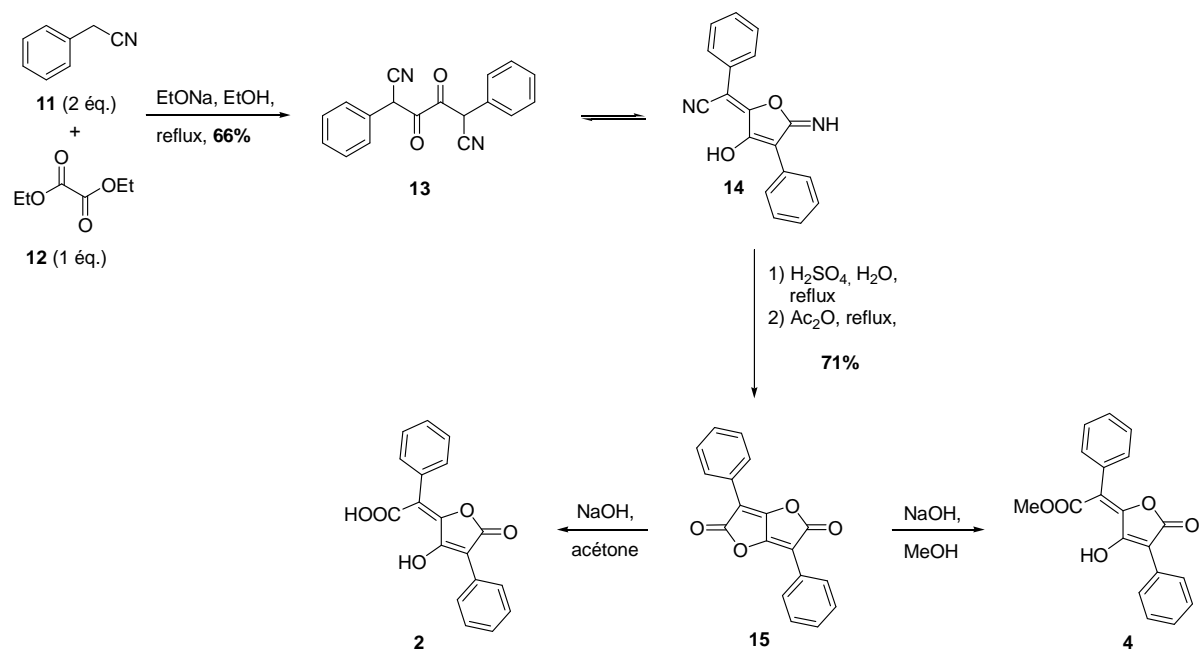
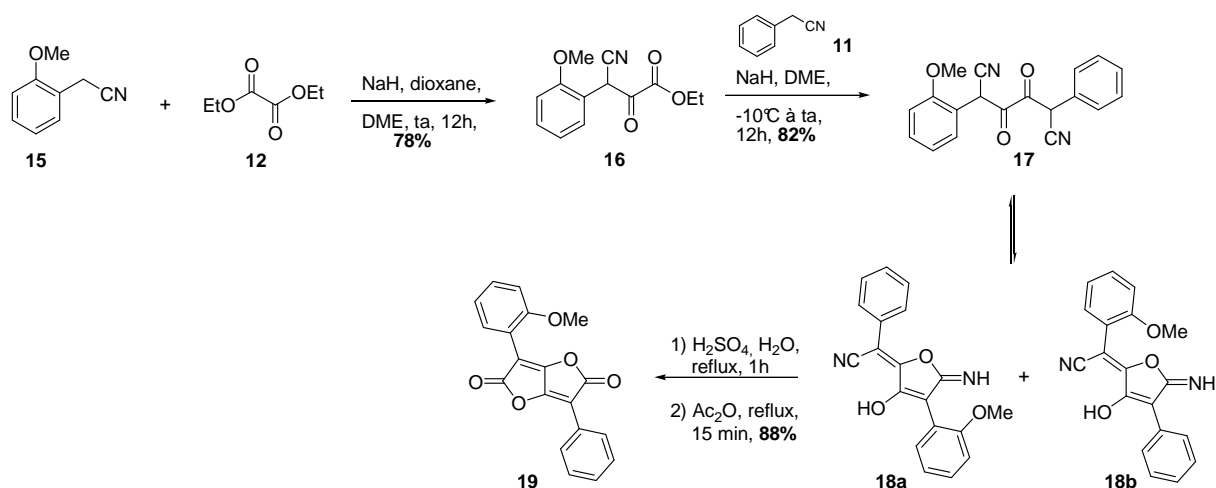


Schéma 14 : structure générale d'une dilactone pulvinique **10**

La première synthèse de l'acide pulvinique **2** et de l'acide vulpinique **4** a été décrite par Volhard en 1894 (schéma 15).⁵¹ La condensation de deux équivalents de phénylacétonitrile **11** sur l'oxalate de diéthyle **12**, en présence d'éthylate de sodium dans l'éthanol, fournit la 1,2-dicétone **13**, en équilibre avec sa forme cyclique **14**. Après traitement acide et déshydratation, cette iminolactone fournit la dilactone pulvinique **15**. L'hydrolyse basique de cette dilactone fournit l'acide pulvinique **2** et sa méthanolyse donne accès à l'acide vulpinique **4**.

Schéma 15 : premières synthèses de l'acide pulvinique **2** et de l'acide vulpinique **4**

Cette voie n'est applicable qu'aux motifs symétriques. Les travaux d'Asano⁵² puis d'Akermark⁵³ ont permis d'adapter cette voie de synthèse à la préparation de dilactones pulviniques dissymétriques, précurseurs d'acides pulviniques dissymétriques (schéma 16).

Schéma 16 : synthèse d'une dilactone pulvinique dissymétrique **19** par Akermark

Dans ce cas, le 2-méthoxyphénylacétonitrile **15** est condensé sur l'oxalate de diéthyle **12**, en présence d'hydrure de sodium et fournit le nitrile **16**. Celui-ci est à son tour mis à réagir dans les mêmes conditions avec l'anion du phénylacétonitrile **11** pour fournir la dicéto-nitrile **17**. Après traitement acide et déshydratation, la dilactone pulvinique dissymétrique **19** est obtenue avec un bon rendement.

Le traitement par méthanolyse de dilactones pulviniques dissymétriques comme **19** fournit deux dérivés d'acides pulviniques isomères. En effet, l'attaque de l'anion méthylate peut s'effectuer sur l'une ou l'autre des deux lactones de la dilactone, la régiosélectivité de cette réaction n'étant pas contrôlée. Cette réactivité a été mise à profit par O'Mant, qui, à partir de la dilactone **20**, obtient par méthanolyse les deux dérivés pulviniques isomères **21** et **22** (schéma 17). Ceci lui a permis de préparer de nombreux analogues dissymétriques afin d'étudier les propriétés anti-inflammatoires de cette famille.⁵⁴

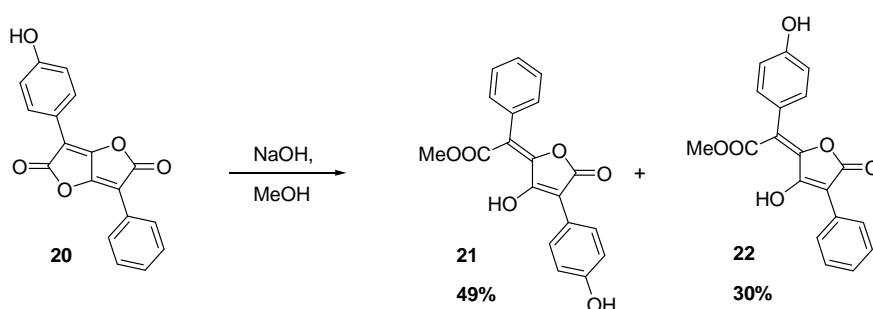
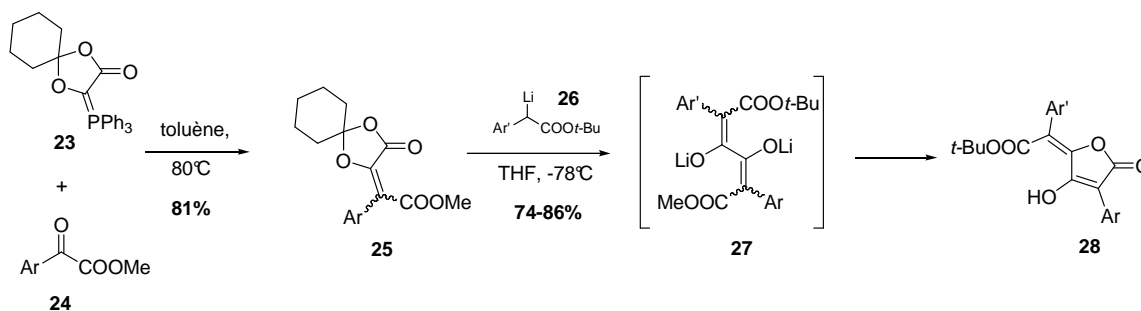


Schéma 17 : méthanolyse d'une dilactone dissymétrique **20** par O'Mant

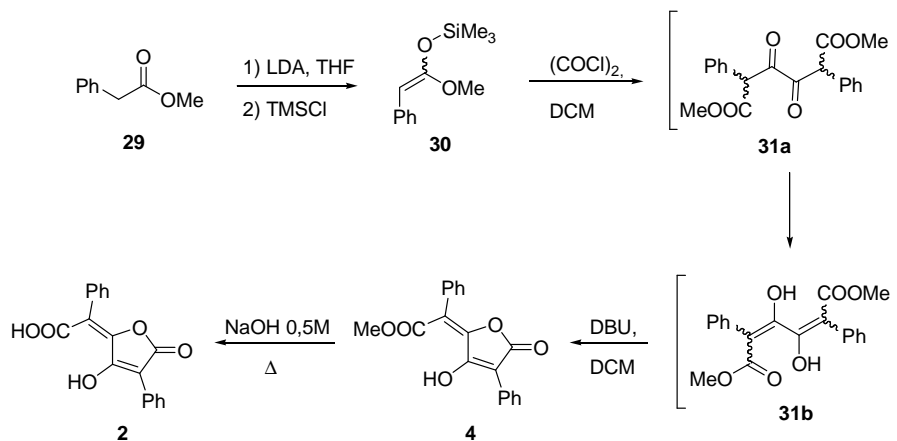
II.1.2 A partir d'une dioxalonone

Une synthèse d'acides pulviniques, décrite par Ramage en 1984, utilise une réaction d'oléfination (schéma 18).⁵⁵ La dioxalonone **25** est formée par réaction entre le phosphorane **23** et l'arylformate de méthyle **24** avec un bon rendement. **25** réagit ensuite avec l'énolate lithié de l'arylacétate de *tert*-butyle **26** pour fournir l'intermédiaire ouvert **27** qui a tendance à lactoniser (**27** étant l'analogue lithié de la 1,2-dicétone correspondante). La régiosélectivité de la cyclisation est contrôlée par la différenciation des esters ; la cyclisation ne se faisant que du côté de l'ester méthylique. On obtient ainsi des esters *tert*-butyliques dérivés d'acides pulviniques, qu'il est aisé de déprotéger pour obtenir les acides pulviniques correspondants. Cette méthode permet la préparation de produits dissymétriques, puisque les groupements aromatiques sont introduits indépendamment l'un de l'autre.

Schéma 18 : synthèse d'acides pulviniques à partir de la dioxolanone **25**

II.1.3 A partir d'un acétal de cétène silylé

Une autre voie d'accès aux 1,2-dicétones a récemment été décrite par Le Gall et Mioskowski.⁵⁶ Dans ce cas, deux équivalents d'acétal de cétène silylé **30**, obtenu par silylation d'un acétate d'aryle **29**, réagissent avec un équivalent de chlorure d'oxalyle. La 1,2-dicétone obtenue **31a** cyclise ensuite en milieu basique, *via* la forme diénol **31b**, pour donner accès à l'acide vulpinique **4**, qui peut ensuite être saponifié pour donner l'acide pulvinique **2** (schéma 19).

Schéma 19 : synthèse de l'acide pulvinique **3** par Mioskowski

Cette méthode rapide et efficace (les produits sont obtenus avec des rendements globaux compris entre 60 et 70% suivant la nature de l'acétate d'aryle) n'est cependant applicable qu'à des motifs symétriques.

II.2 Stratégie 2 utilisant la chimie des anhydrides maléiques

Le comportement particulier des anhydrides maléiques substitués de manière dissymétrique vis-à-vis de divers nucléophiles a été étudié par Pattenden.^{57, 58} En effet, l'auteur a remarqué que la réduction par l'hydrure de lithium aluminium (LAH) de l'anhydride **7** s'effectue de manière régiosélective sur le carbone adjacent au groupement méthoxyle, donnant un mélange de buténolide **32** et d'hydroxybuténolide **33** (schéma 20).

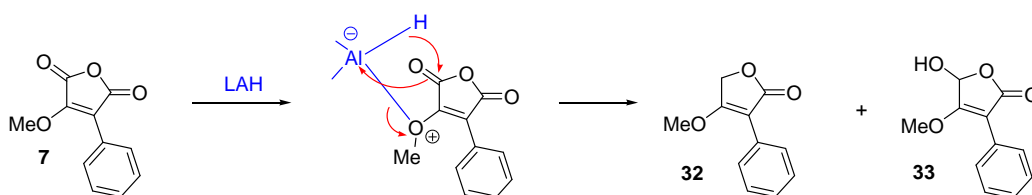


Schéma 20 : réduction régiosélective de l'anhydride **7** par LAH

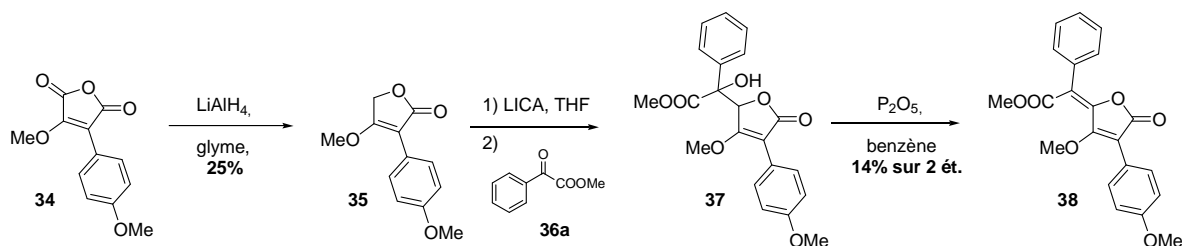
La régiosélectivité de cette réduction a été expliquée par des effets de chélation du groupement méthoxyle, ce qui a été confirmé par les travaux de Kayser, qui a étudié la réduction de nombreux anhydrides maléiques et succiniques.^{59, 60}

La même régiosélectivité a été observée avec d'autres nucléophiles, tels que des réactifs de Grignard (EtMgBr, grâce à une chélation similaire à celle observée avec LAH) ou des phosphoranes (EtOOC-CH=PPh₃, par un complexe donneur-accepteur).

Ce comportement particulier a été appliqué par Pattenden à la synthèse d'acides pulviniques.

II.2.1 Par réduction régiosélective et réaction avec un formate d'aryle

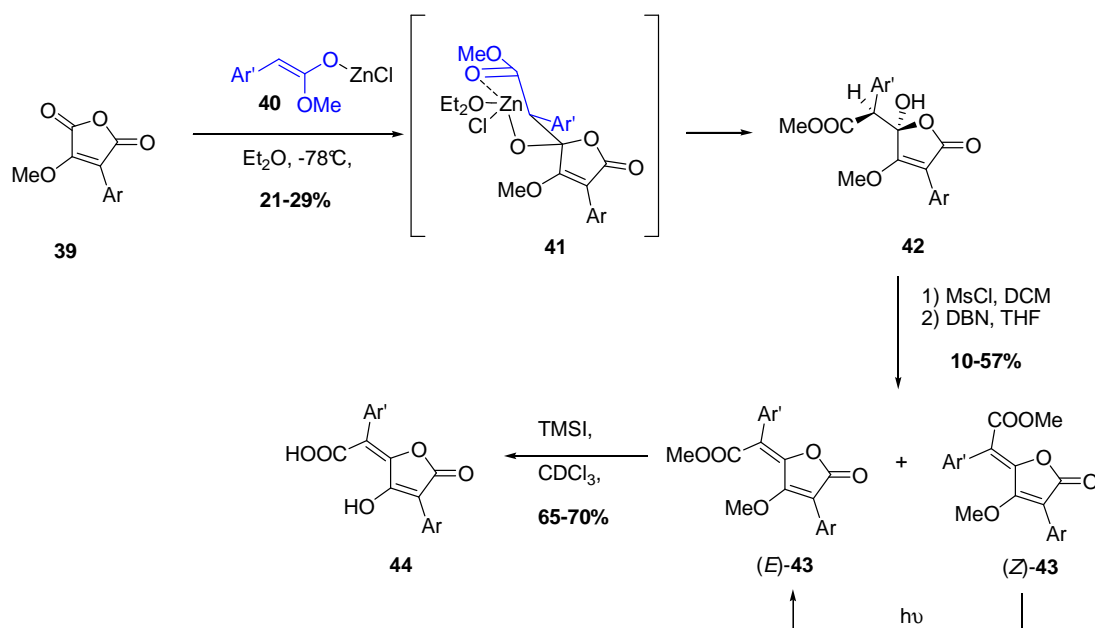
L'anhydride maléique **34** est réduit régiosélectivement par l'hydrure de lithium aluminium pour donner le dérivé tétronique **35** (schéma 21).⁶¹ Celui-ci est déprotoné par la *N*-cyclohexyl-*N*-isopropylamine (LICA) et réagit avec le benzylformate de méthyle **36a** pour conduire à l'alcool **37**, qui, après déshydratation par le pentoxyde de phosphore, fournit le pulvinate **38**, terminologie employée pour décrire un analogue d'acide pulvinique protégé sur sa fonction énol par un groupement méthyle.

Schéma 21 : synthèse du pulvinate **38** par Pattenden

Cette méthode est intéressante car les deux groupements aromatiques sont introduits par deux transformations différentes ; l'accès aux dérivés dissymétriques est donc possible. Cependant, les rendements obtenus lors des étapes d'addition du benzylformate de méthyle **36a** sur le buténolide **35** et de déshydratation sont relativement faibles.

II.2.2 Par réaction de type Reformatsky

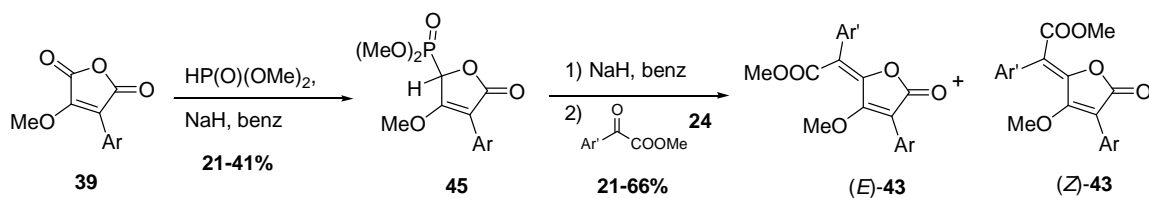
Cette voie utilise encore un anhydride maléique (**39**, schéma 22).^{62, 63} Celui-ci réagit de façon régiosélective avec l'énolate zincique d'un acétate d'aryle **40** pour donner l'alcool tertiaire **42**. Cette addition de type Reformatsky s'effectue par un état de transition supposé **41**, de type cyclohexane chaise, où les substituants encombrés adoptent une orientation équatoriale, donnant l'alcool **42** sous forme d'un seul diastéréoisomère (ou d'un mélange très fortement enrichi, suivant la nature de Ar et Ar'). La déshydratation de cet alcool se fait par activation de l'alcool sous forme de mésylate et élimination en présence de DBN. Les deux isomères *Z* et *E* du pulvinate **43** correspondant sont alors obtenus. Il est important de noter que le produit *Z* s'isomérisse quantitativement pour donner le produit *E* en quelques jours sous l'effet de la lumière naturelle. Enfin, la déprotection de l'énol, de l'ester méthylique et des éventuels groupements méthoxyles portés par Ar et/ou Ar' s'effectue en présence d'iodure de triméthylsilyle pour donner les acides pulviniques correspondants **44**.



De la même façon que précédemment, cette voie de synthèse est efficace pour la préparation de dérivés dissymétriques, mais souffre de rendements faibles.

II.2.3 Par réaction de Horner-Wadsworth-Emmons

Dans ce cas, le motif des acides pulviniques est construit par une réaction d'oléfination. L'anion sodé du phosphite de méthyle réagit avec l'anhydride maléique **39** pour donner le phosphoester **45**. L'oléfination de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) entre **45** et un formate d'aryle **24**, en présence d'hydrure de sodium, fournit les pulvinates correspondants **43**, sous forme d'un mélange de formes *Z* et *E*, toujours avec des rendements modestes (schéma 23).⁶⁴



II.3 Stratégie 3 utilisant une condensation de type Dieckmann

Weinstock décrit, en 1979, une autre méthode permettant d'avoir accès à des motifs dissymétriques (schéma 24).⁴⁷ Dans ce cas, le motif pulvinique est obtenu par une condensation de type Dieckmann d'un ester d'énol **46**. Un acétate d'aryle **47** réagit avec le dioxalate de méthyle **48** en présence de méthylate de sodium dans l'éther. L'énol **49b** obtenu est ensuite estérifié par réaction avec un chlorure d'acide **50**, en présence d'un équivalent de triéthylamine. Dans le même pot, l'ajout d'un second équivalent de triéthylamine accompagné d'un chauffage à 60°C permet d'effectuer la cyclisation de l'ester d'énol **46**, donnant accès au motif des acides pulviniques **51**, avec de faibles rendements.

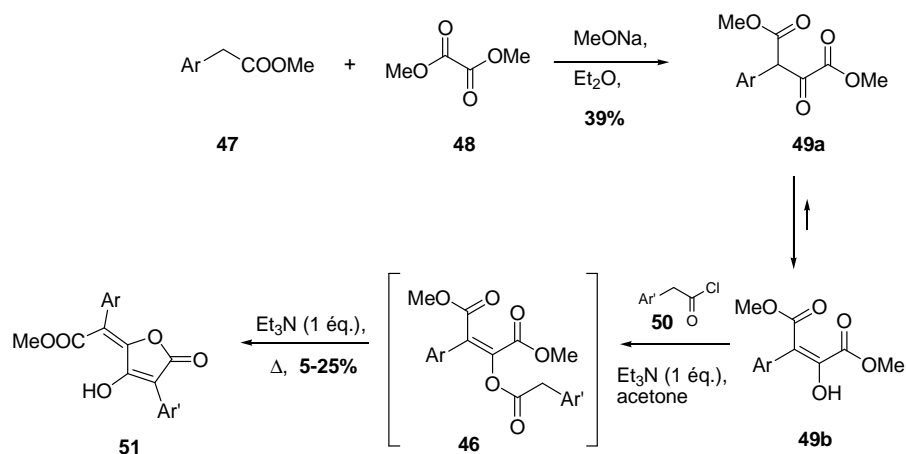
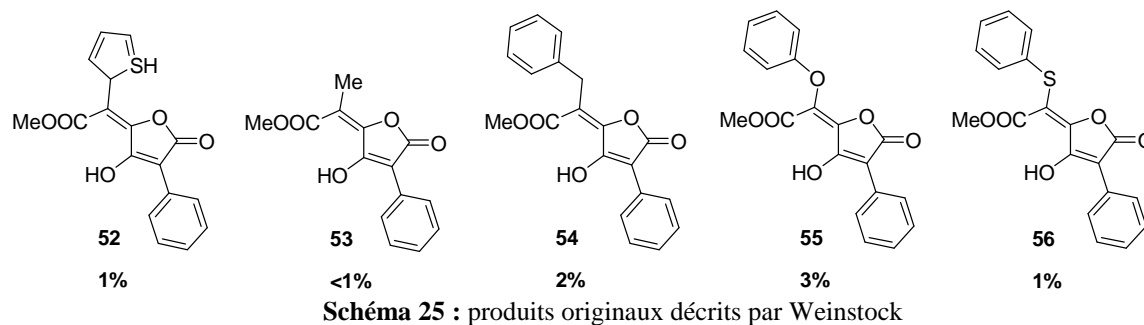


Schéma 24 : synthèse d'acides pulviniques par Weinstock

En faisant varier la nature de l'ester utilisé dans la première étape de condensation, cette méthode a permis la synthèse de dérivés originaux, où le groupement aromatique Ar est remplacé par des groupements non-aromatiques. Ces produits représentent les seuls exemples d'analogues d'acides pulviniques ne possédant qu'un groupement aromatique. La structure de ces produits, ainsi que les (très faibles) rendements globaux obtenus pour leur synthèse, sont présentés dans le schéma 25 :

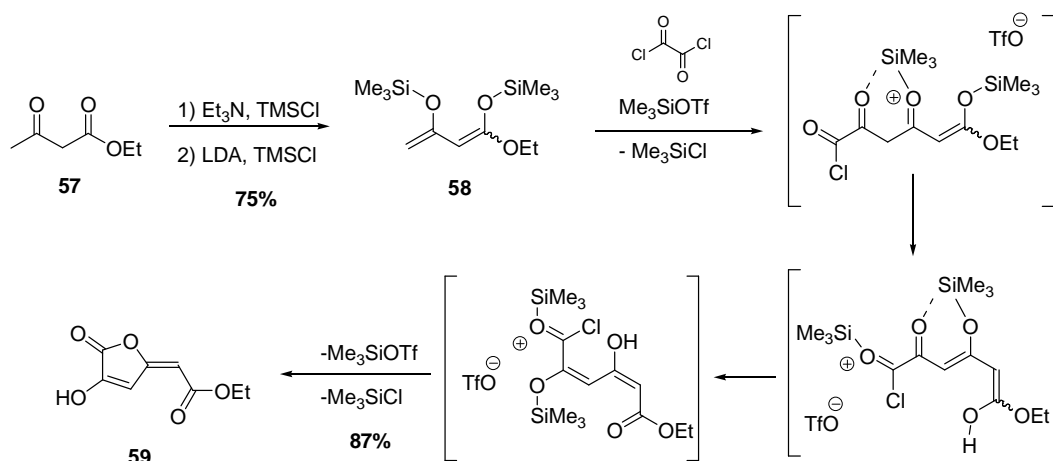


Le produit **53** représente le seul produit de type I décrit dans la littérature à ce jour. Il est obtenu avec un très faible rendement global inférieur à 1%.

II.4 Stratégie 4 utilisant un couplage de Suzuki-Miyaura

II.4.1 Par réaction de dérivés silylés sur le chlorure d'oxalyle

De récents travaux menés par l'équipe de Langer ont montré que la réaction, catalysée par le trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf), entre le chlorure d'oxalyle et des 1,3-bis(triméthylsilyloxy)-1,3-diènes **58**, obtenus par silylation de composés 1,3-dicarbonylés **57**, représentait une nouvelle voie d'accès au motif buténolide **59**, suivant le mécanisme suivant (schéma 26).^{65, 66}



Cette méthode est très efficace puisque le buténolide **59** a pu être obtenu avec un excellent rendement de 87%, à partir du dérivé disilylé **58**, en utilisant 0,3 équivalent de TMSOTf. Cette méthodologie a pu être étendue à la synthèse d'acides vulpiniques, en adaptant le substrat de la réaction de double silylation (schéma 27).⁶⁷⁻⁶⁹

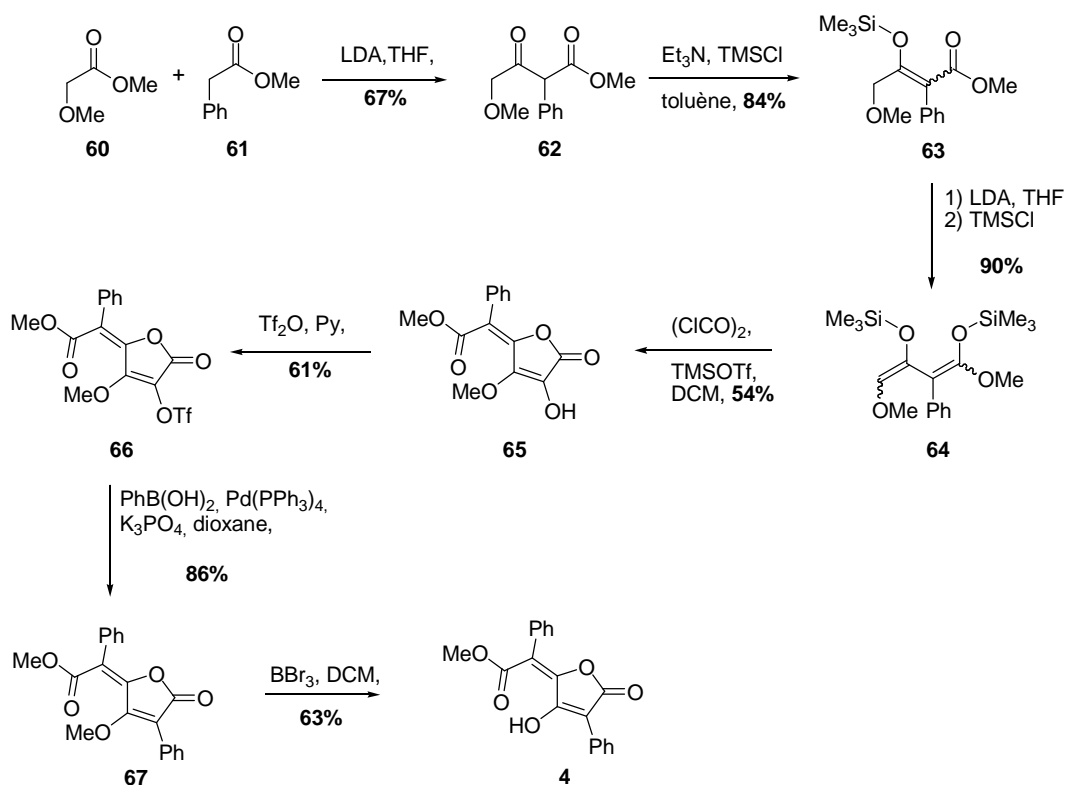


Schéma 27 : synthèse de l'acide vulpinique **4** par Langer

La condensation entre les deux esters **60** et **61** fournit le β -cétoester **62**, qui est silylé deux fois pour fournir l'éther d'énol disilylé **64**. Celui-ci réagit par une cyclisation de type [3+2] avec le chlorure d'oxalyde, en présence de TMSOTf, pour former le buténolide **65**, de configuration *E*. Après transformation en triflate **66**, le produit est engagé dans une réaction de type Suzuki-Miyaura avec l'acide phénylboronique, pour donner le pulvinate **67**. Enfin, la déprotection de la fonction énol par le tribromure de bore permet d'obtenir l'acide vulpinique **4**.

Cette méthode est très efficace et souple, puisqu'il est aisé de faire varier les deux groupements aromatiques. Il a donc été possible de synthétiser de nombreux acides vulpiniques et analogues par cette méthode, avec de bons rendements. Cependant, le nombre d'étapes est relativement important et les intermédiaires, essentiellement silylés, sont instables et il est nécessaire de les manipuler dans des conditions très strictes.

Il est à noter également que cette méthode a été utilisée par Le Gall et Mioskowski pour la synthèse de la Norbadione A et d'analogues.⁷⁰⁻⁷²

II.4.2 A partir de l'acide tétronique

Une nouvelle synthèse d'acides pulviniques a récemment été décrite par Le Gall et Mioskowski,⁷³ à partir de l'acide tétronique **68** (schéma 28). Après protection sous forme d'éther benzyle, l'anion de **69** est additionné sur le benzoylformate de méthyle **36a** pour donner l'alcool **70** sous forme d'un mélange de formes diastéréoisomères. Après déshydratation, effectuée par l'anhydride trifluoroacétique (TFAA) en présence de triéthylamine et diméthylaminopyridine (DMAP), l'alcène **71** est obtenu, majoritairement sous forme de l'isomère *E*. Cet alcène est ensuite efficacement iodé en position 3 en utilisant un mélange d'iode et de nitrate d'ammonium et de cérium (CAN). Le substrat iodé **72** obtenu est ensuite engagé dans un couplage de Suzuki-Miyaura avec différents esters boroniques aromatiques **73**. Les produits attendus **74** ont pu être isolés avec des rendements compris entre 55 et 93% accompagnés, dans certains cas, du produit débenzylé **75** (0-31%). Enfin, l'hydrogénolyse du groupement protecteur de **74** est effectuée pour libérer la fonction énol et ainsi obtenir le dérivé d'acide pulvinique correspondant **75**.

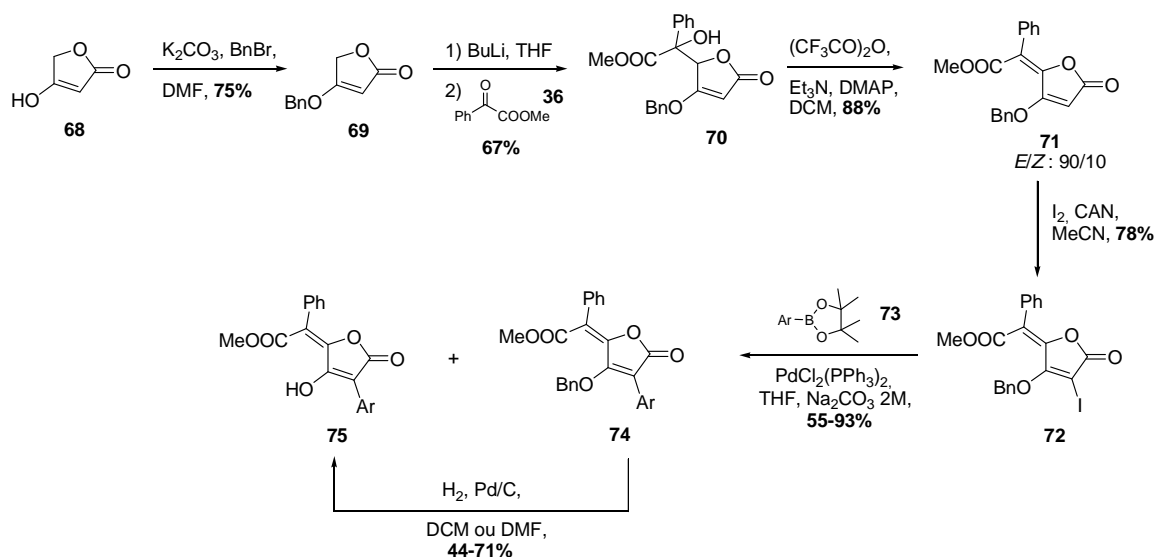


Schéma 28 : synthèse d'acides pulviniques **74** à partir de l'acide tétronique **68**

II.5 Synthèses biomimétiques

La biosynthèse d'un acide pulvinique, l'acide atromentique **76**, est brièvement présentée au schéma 29. L'acide *p*-hydroxyphénylpyruvique **78** est obtenu *via* le chorismate **77**, qui est un intermédiaire dans la biosynthèse de nombreux composés naturels possédant des noyaux aromatiques.⁷⁴ Par action enzymatique, la double condensation de l'acide **78** conduit à une terphénylquinone **79**. Celle-ci est ensuite oxydée en acide atromentique **76**, en passant par un intermédiaire hypothétique de type **80**, qui est la forme 1,2-diénole d'une 1,2-dicéto.⁴⁸

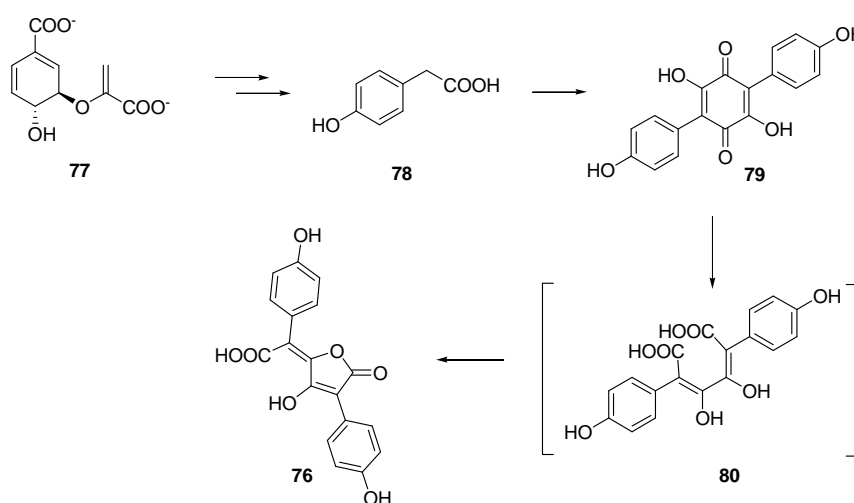
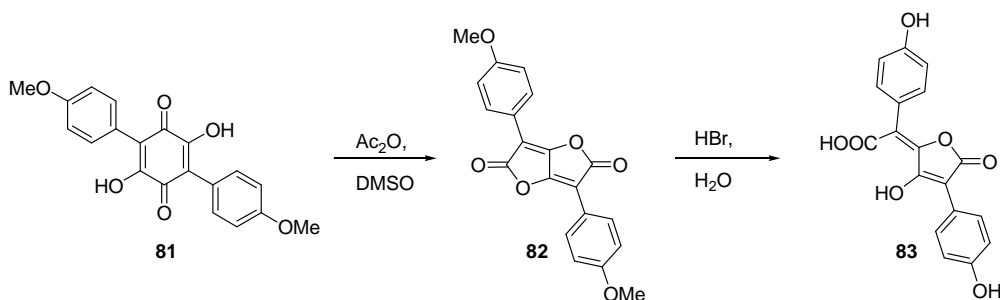


Schéma 29 : biosynthèse de l'acide atromentique

Quelques synthèses d'acides pulviniques ont été décrites, dont la préparation est inspirée de cette biosynthèse.

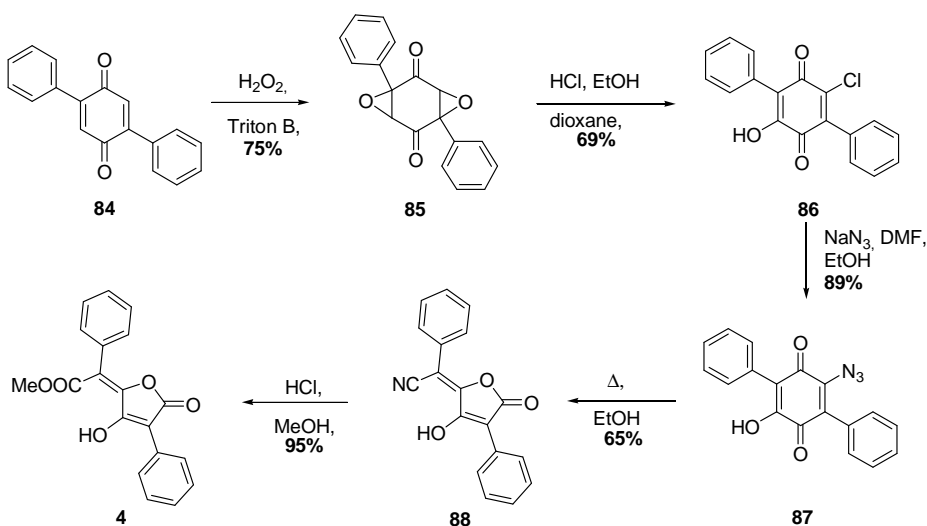
II.5.1 Par oxydation d'une terphénylquinone

Dans ce cas, le précurseur des acides pulviniques est une dilactone, dont d'autres voies de synthèse ont été présentées précédemment. Ici, c'est l'oxydation d'une terphénylquinone **81** qui donne accès au motif dilactone pulvinique **82**. Plusieurs systèmes oxydatifs sont décrits : un mélange anhydride acétique / DMSO (schéma 30),^{75, 76} le peroxyde d'hydrogène en présence d'acide chlorhydrique⁷⁷ ou le tétraacétate de plomb.⁷⁸

Schéma 30 : oxydation d'une terphénylquinone par Ac₂O / DMSO

II.5.2 Par réarrangement d'une azidoquinone

Moore décrit, en 1970, une synthèse de l'acide vulpinique **4** par réarrangement thermique d'une azidoquinone **87** (schéma 31).⁷⁹ La benzoquinone **84**, traitée par le peroxyde d'hydrogène, fournit le diépoxyde **85** qui est hydrolysé en milieu acide pour fournir la chlorohydroxyquinone **86**. L'addition d'azoture de sodium fournit l'azidoquinone correspondante **87**. Celle-ci est convertie en cyanobuténolide **88**, au reflux de l'éthanol, par un réarrangement dans lequel le cycle est ouvert (avec le départ de N₂) puis reformé pour fournir la lactone. Enfin, le buténolide **88** est converti en acide vulpinique **4** par simple méthanolyse de la fonction nitrile.

Schéma 31 : synthèse de l'acide vulpinique par réarrangement thermique de **87**

III. Etude de la synthèse d'acides pulviniques mono-aromatiques

Les stratégies d'accès aux dérivés de type I et II (schéma 32) mises en œuvre sont inspirées de la littérature présentée dans le paragraphe précédent.

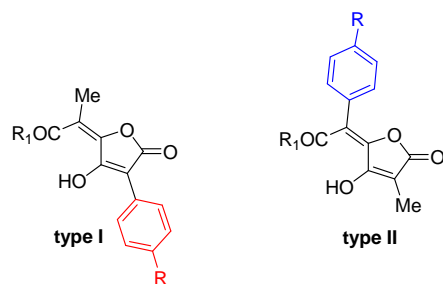


Schéma 32 : molécules visées

Quatre stratégies ont été étudiées, avec des succès variables. Toutes avaient pour objectif de fournir un accès aux deux types de dérivés étudiés, avec le plus grand degré de variabilité possible : nature du groupement aryle, nature du groupement alkyle, nature de la fonction « latérale » (acide, ester, cétone...).

Ces différentes stratégies sont présentées succinctement sur le schéma 33, vers l'obtention d'un produit de type I **89**.

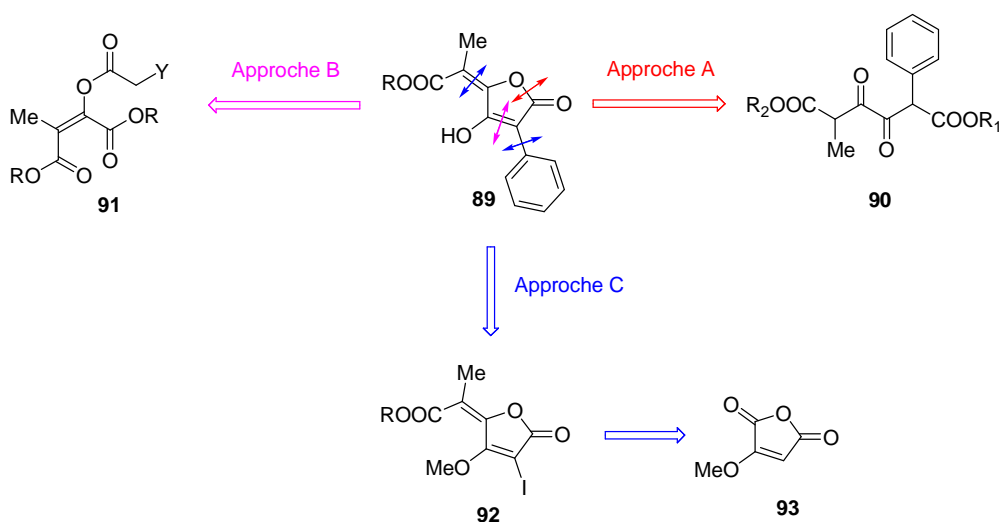


Schéma 33 : différentes approches étudiées

L'approche A s'inspire de la stratégie 1 décrite précédemment, qui passe par un intermédiaire linéaire de type 1,2-dicétone **90**.

L'approche B rappelle les travaux de Weinstock (stratégie 3), mettant en jeu une condensation de type Dieckmann sur un ester d'énol de type **91** (Y étant un noyau aromatique ou un groupe permettant son insertion ultérieure).

L'approche C est à rapprocher des stratégies 2 et 4 présentées plus tôt. Le noyau aromatique serait introduit par un couplage de Suzuki sur un dérivé iodé **92**, lui-même obtenu à partir de l'anhydride méthoxymaléique **93**.

Enfin, l'approche D consiste à préparer un intermédiaire de type dilactone mono-aromatique **94** (schéma 34), qui est un précurseur direct des deux dérivés de type I et II, par une réaction d'ouverture de l'une ou l'autre des deux lactones. Cette approche peut être rapprochée de la stratégie 1 du paragraphe précédent, puisque des dilactones diaromatiques y sont souvent rencontrées.

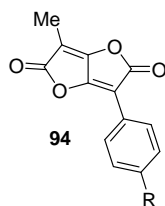


Schéma 34 : structure d'une dilactone mono-aromatique **94**

Enfin, dans la dernière partie de ce chapitre seront rassemblées les synthèses ponctuelles de quelques dérivés de type I ou II n'entrant pas dans ces quatre stratégies principales.

III.1 Approche A : à partir d'une 1,2-dicétone

Les 1,2-dicétones acycliques se sont révélées être de bons précurseurs dans les synthèses d'acides pulviniques « classiques ». Il est donc envisageable de les utiliser également comme intermédiaire-clé pour la synthèse d'acides pulviniques simplifiés. Plusieurs voies d'accès à ces dicétones ont été étudiées.

III.1.1 Par une séquence *Ortho*-métallation / Réduction de Birch / Ozonolyse

III.1.1.1 Rétrosynthèse envisagée

La dicétone **97** pourrait être obtenue *via* une oxydation du diol correspondant **98**. Celui-ci pourrait être synthétisé à partir du composé cyclique **99**, par une réaction d'ozonolyse. Ce précurseur résulterait de la *bis*-hydroxylation de la double liaison la moins encombrée du composé **100**. Ce dernier peut être obtenu *via* une réduction de Birch du composé aromatique **101**, lui-même préparé par une double *ortho*-métallation du composé aromatique **102** (schéma 35).

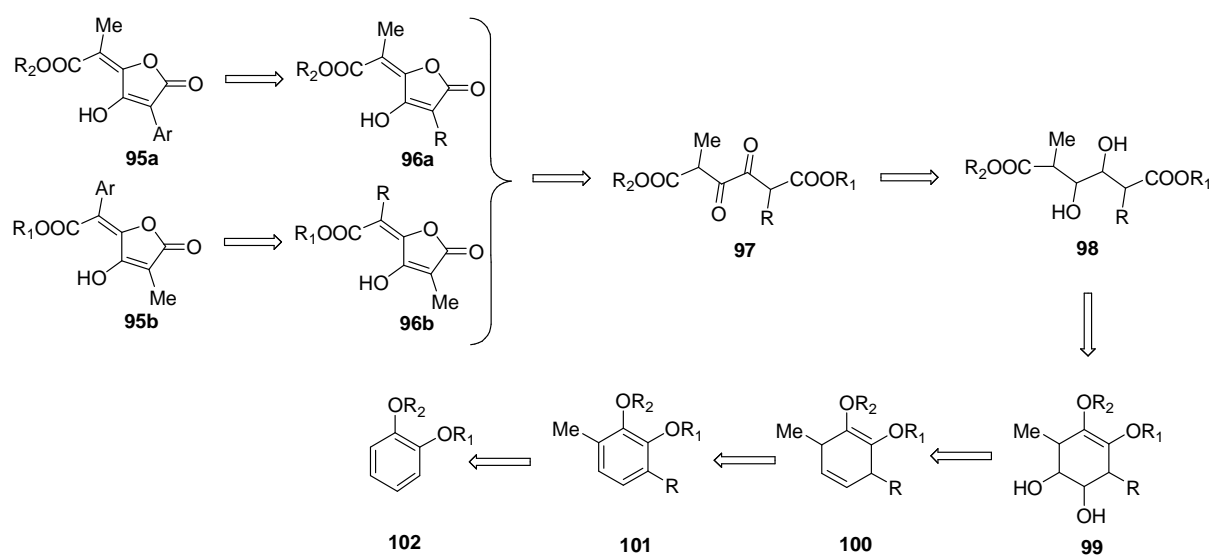


Schéma 35 : rétrosynthèse des dérivés de type I et de type II par *o*-métallation / Birch / Ozonolyse

En choisissant de façon adéquate la nature des groupements R_1 et R_2 , il serait possible de contrôler la régiosélectivité de la cyclisation finale (comme décrit par Ramage⁵⁵) et ainsi d'avoir accès à des dérivés d'acides pulviniques soit de type I, soit de type II. La nature des groupements R_1 et R_2 doit également être telle qu'une discrimination au niveau de la première *ortho*-métallation soit possible. Une échelle de pouvoir *ortho*-métallant a été proposée par Snieckus.⁸⁰ Ainsi le groupement O-méthoxyméthyle (OMOM) apparaît comme un groupement au fort pouvoir *ortho*-métallant par rapport au groupement OMe qui n'a qu'un pouvoir modéré. En effet, la présence de deux atomes d'oxygène sur le groupement O-MOM devrait faciliter l'approche du métal par chélation et ainsi diriger l'*ortho*-métallation (schéma 36).

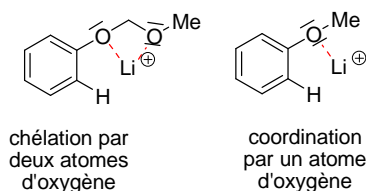


Schéma 36 : pouvoir *ortho*-métallant de OMOM (à gauche) et OMe (à droite)

De nombreux électrophiles peuvent être introduits après l'étape d'*ortho*-métallation, comme des groupements alkyles, des halogènes, des métaux... Ici, cette stratégie se révèle intéressante car, si la régiosélectivité de l'*ortho*-métallation est contrôlée, il sera possible d'introduire successivement le groupement méthyle d'une part et le groupement R d'autre part.

La nature du groupement R doit être telle que le groupement aromatique porté par le dérivé de type I soit introduit en fin de synthèse à partir d'un couplage organométallique sur **95**, de façon à pouvoir introduire aisément une grande diversité sur le motif aromatique. Pour cela, le groupement R peut être de différentes natures :

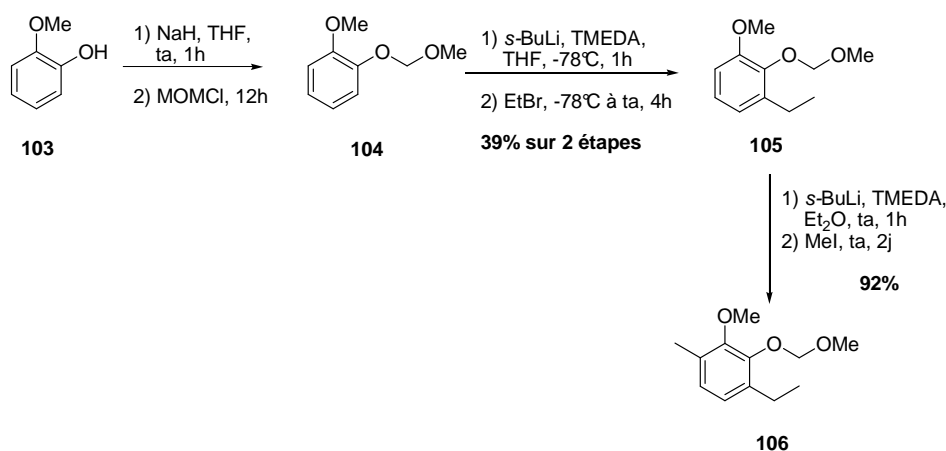
- ◆ soit un halogène (iode, introduit par I_2 ou brome, introduit par $Br-CH_2-CH=CH_2$),
- ◆ soit un alcool (introduit par $B(OMe)_3/H_2O_2/H^+$ ou O_2/H^+) qui peut être transformé par la suite en triflate,
- ◆ soit une espèce métallique : $SnBu_3$ (introduit par Bu_3SnCl).

III.1.1.2 Résultatsa) ortho-métallations

Pour valider la stratégie proposée de double *ortho*-métallation régiosélective, l'étude s'est portée sur l'introduction de deux groupements alkyles différents (éthyle et méthyle) sur le guajacol (schéma 37).

Le guajacol **103** est protégé sous forme de MOM, en présence d'hydrure de sodium et chloro(méthoxy)méthane (MOMCl). La réaction n'est pas complète et le produit protégé **104** n'a pas pu être séparé du guajacol n'ayant pas réagi. Le mélange obtenu contient 81% de produit protégé (détermination par GC-MS). Ce mélange a été engagé dans la première étape d'*ortho*-métallation. Celle-ci est effectuée dans les conditions classiques, en présence de *sec*-BuLi et de *N,N,N',N'*-tétraméthyléthylène diamine (TMEDA), dans le THF à -78°C. Le premier électrophile choisi est le bromoéthane. Dans ces conditions, le produit **105** a pu être obtenu pur avec un rendement de 39% sur les deux étapes. Une analyse par RMN à deux dimensions a permis de confirmer la bonne régiosélectivité de l'addition du groupement éthyle, et aucune trace de l'autre isomère n'a été détectée.

La seconde *ortho*-métallation a ensuite été entreprise dans les mêmes conditions que précédemment, en utilisant l'iodure de méthyle comme électrophile. Malheureusement, le produit de départ a été récupéré inchangé. Le passage du THF à l'éther diéthylique comme solvant de réaction⁸¹ a permis de résoudre ce problème et le produit méthylé **106** a pu être obtenu avec un excellent rendement de 92%.

Schéma 37 : double *ortho*-métallation de **104**

Deux *ortho*-métallations successives ont ici pu être réalisées, avec un contrôle total de la régiosélectivité s'appuyant sur la différence de pouvoir métallant de OMe et de OMOM.

b) réduction de Birch et *bis*-hydroxylation

L'étape suivante envisagée consiste en la réduction du noyau aromatique pour conduire au composé cyclohexadiénique correspondant. La régiosélectivité de cette réduction, dite réduction de Birch, est contrôlée par la nature du ou des substituants du noyau aromatique (schéma 38).⁸²

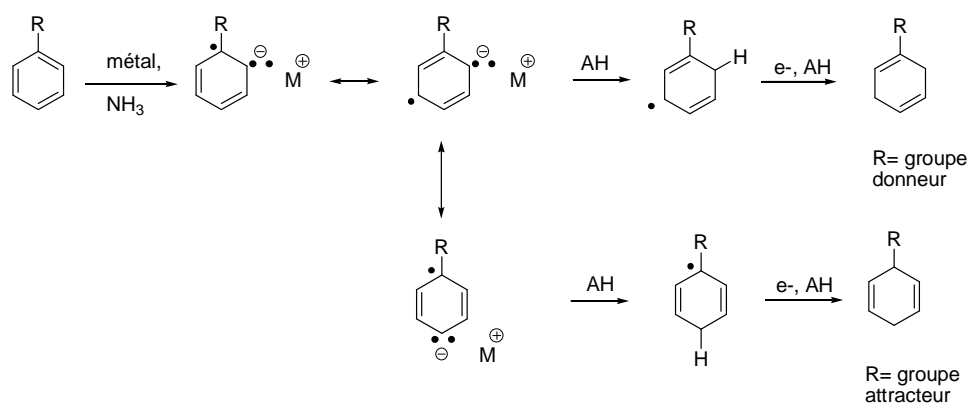


Schéma 38 : régiosélectivité de la réduction de Birch

Dans le cas de la molécule **106**, les deux groupements alkoxyles donneurs devraient diriger la réduction vers l'obtention du composé **107** (schéma 39).

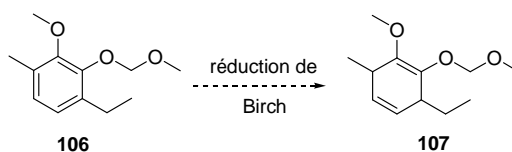


Schéma 39 : produit de réduction attendu **107**

Une première étude de cette réduction a été menée sur un substrat modèle, le vétratole **108** (schéma 40).⁸³ La réaction a été mise en œuvre, en présence d'ammoniaque liquide dans le THF, en utilisant comme métal le lithium et comme source de protons l'alcool éthylique.

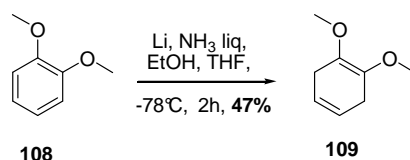
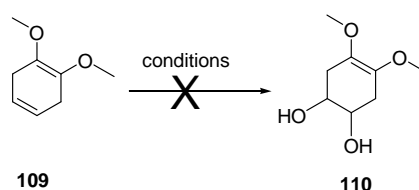


Schéma 40 : réduction du vétratrole

La réduction du vétratrole conduit effectivement au régioisomère attendu **109** mais avec un rendement moyen.

L'étape suivante, à savoir la *bis*-hydroxylation de la double liaison la moins encombrée a ensuite été étudiée (schéma 41).

Schéma 41 : essais de *bis*-hydroxylation

Les conditions classiques de *bis*-hydroxylation (OsO_4 , NMO, *t*BuOH, acétone, H_2O et RuCl_3 , NaIO_4 , H_2O) n'ont malheureusement pas permis d'obtenir le diol **110**. Il semblerait que le produit cyclohexadiénique **109** soit sensible aux conditions d'oxydation, puisque une réaromatisation partielle du système a été observée, conduisant à la formation de vétratrole **108**. Une autre voie pour obtenir ce diol en deux étapes, par époxydation puis ouverture de l'époxyde, a ensuite été envisagée. Mais dans les conditions d'époxydation (*m*CPBA, Na_2CO_3 , benzène), une réaromatisation du système a également été observée et l'époxyde n'a pas été formé.

La réduction de Birch sur le composé **106** a tout de même été testée. Malheureusement, dans les mêmes conditions que celles testées pour le vétratrole, un mélange complexe ne contenant pas le produit réduit **107** a été obtenu. Il semblerait que la présence des groupements alkyles perturbe la réduction. Une perte partielle des groupements alkoxyles a également été observée.

Avec les résultats décevants obtenus lors de l'étape de réduction de **106**, ainsi que dans l'étape de *bis*-hydroxylation du composé modèle, cette voie d'accès vers les dérivés simplifiés d'acides pulviniques a été abandonnée.

III.1.2 A partir de l'acétal diéthylique de l'acroléine

III.1.2.1 Rétrosynthèse envisagée

Une seconde voie d'accès au système 1,2-dicétone a alors été envisagée (schéma 42).

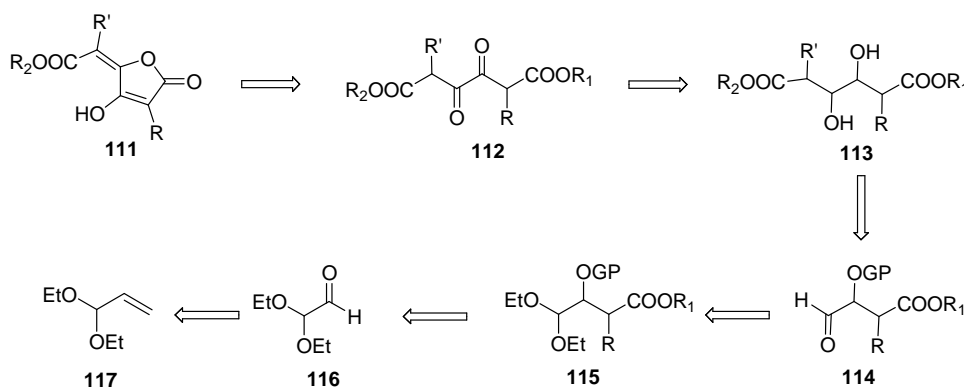


Schéma 42 : rétrosynthèse des acides pulviniques à partir de l'acétal de l'acroléine.

Comme décrit précédemment, la dicétone **112** pourrait être un bon précurseur de dérivés de type I et II, en choisissant de façon appropriée la nature des groupements R_1 et R_2 qui orienteraient la cyclisation vers l'un ou l'autre des dérivés. Le diol **113** pourrait être préparé par l'addition d'un énolate d'ester sur l'aldéhyde **114**, obtenu par déprotection de l'acétal **115**. Cet acétal serait lui-même préparé par addition d'un autre énolate d'ester sur l'aldéhyde **116**. L'intermédiaire clé de cette synthèse est donc le composé **116** qui possède une fonction aldéhyde réactive et une fonction aldéhyde masquée. Ce dernier est préparé par ozonolyse de l'acétal diéthylique de l'acroléine **117**, réactif commercial.

III.1.2.2 Résultats

a) ozonolyse

L'étape d'ozonolyse de l'acétal diéthylénique de l'acroléine **117** a tout d'abord été effectuée (schéma 43).⁸⁴

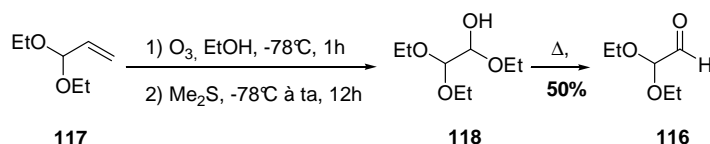


Schéma 43 : ozonolyse de 26

Dans les conditions classiques d'ozonolyse puis réduction au diméthylsulfure, l'hémiacétal **118** est obtenu. Une distillation à pression atmosphérique permet d'obtenir l'aldéhyde **116** avec un rendement global de 50%.

b) première condensation sur l'aldéhyde 116

L'aldéhyde **116** est additionné sur l'énolate lithié du phénylacétate de méthyle **119** pour former l'alcool correspondant **120**. La condensation s'effectue avec un bon rendement de 85% après purification et l'alcool est obtenu sous forme d'un mélange de diastéréoisomères (schéma 44). Lors de l'étape de protection de l'alcool, ce produit a été utilisé sans purification.

L'étape de silylation est lente, les meilleurs résultats ont été obtenus en 4 jours à température ambiante, et la conversion de l'alcool n'est pas complète. Ceci peut être dû à l'encombrement stérique de l'alcool secondaire formé qui gênerait l'approche du dérivé silylé, lui-même très encombré. A l'issue de ces deux étapes, l'alcool protégé **121** a tout de même pu être obtenu avec un rendement global de 23%, également sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères.

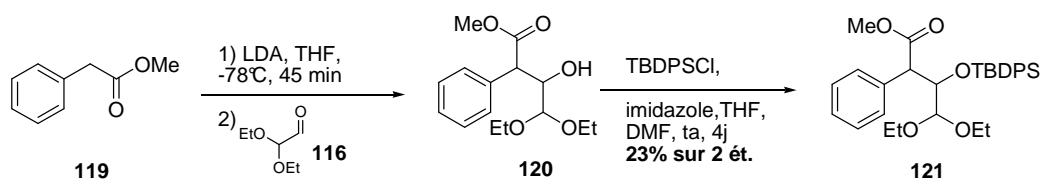


Schéma 44 : première condensation et protection de l'alcool 120

Notons que le choix du groupement protecteur a été guidé par la suite de la synthèse, car un groupement stable en milieu acide et basique était nécessaire. En effet, l'étape suivante consistera en la libération de la fonction aldéhyde de **121**, ici masquée par l'acétal. Cette déprotection s'effectue classiquement en milieu acide. De plus, la seconde condensation

s'effectue, comme la première, en milieu basique. Le groupement TBDPS semble donc bien approprié ici et sa déprotection pourrait s'effectuer par l'action d'ions fluorures.

c) déprotection de la fonction acétal de **121**

La déprotection de la fonction acétal diéthylique de **121** a ensuite été étudiée (schéma 45).

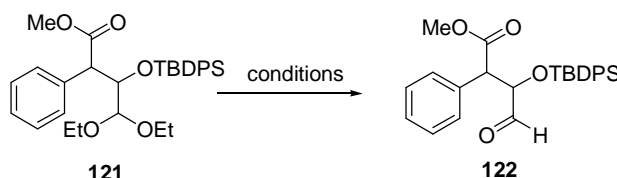


Schéma 45 : déprotection de l'acétal sur **121**

Un acétal de ce type est classiquement clivé dans des conditions acides. Plusieurs essais ont été effectués (tableau 2).

Tableau 2 : essais de déprotection de l'acétal **121**

| Entrée | Acide | Conditions | Aldéhyde |
|--------|-------------------|--|-------------|
| 1 | TFA | CHCl ₃ , H ₂ O, 20°C, 3h | Traces |
| 2 | TFA | CHCl ₃ , H ₂ O, 80°C, 2h | Traces |
| 3 | APTS | Acétone, H ₂ O, 80°C, 4h | Traces |
| 4 | Amberlyst 15 | Acétone, H ₂ O, 20°C, 4j | Traces |
| 5 | ZnCl ₂ | DCM, 20°C, 1h | Quantitatif |

Les conditions classiques de déprotection d'un tel acétal utilisent des acides plus ou moins forts dans l'eau. Ici, aucune des conditions testées (tableau 2, entrées 1-4) n'a permis d'obtenir le composé attendu (la formation de l'aldéhyde peut être facilement suivie par RMN ¹H, pic caractéristique à 9,53 ppm). Dans les conditions employant des acides forts (tableau 2, entrées 1-3), la disparition de l'acétal **121** est totale mais le mélange est très complexe et seules des traces de l'aldéhyde attendu ont pu être observées. Dans des conditions plus douces (tableau 2, entrée 4), l'acétal n'est que très peu déprotégé après 4 jours de réaction.

Finalement, les conditions optimales pour effectuer cette déprotection utilisent un acide de Lewis, le chlorure de zinc (tableau 2, entrée 5).⁸⁵ Cette réaction est très rapide et

efficace puisque l'aldéhyde **122** est obtenu en 1h à température ambiante de manière quantitative.

d) seconde condensation sur l'aldéhyde **122**

La seconde condensation a ensuite été envisagée. Dans ce cas, l'ester choisi est l'acétate de benzyle **123**. Le produit attendu **124** devait permettre l'accès à des acides pulviniques de type I, car la différence de nature des deux esters (méthyliques et benzyliques) devrait permettre une discrimination lors de l'étape finale de cyclisation. Cette condensation a été effectuée dans les mêmes conditions que la première (schéma 46).

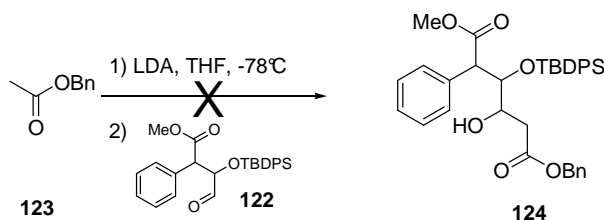


Schéma 46 : seconde addition sur l'aldéhyde **122**

Malheureusement, l'alcool désiré **124** n'a pas été formé. Une grande partie de l'aldéhyde **122** a été récupérée inchangée, ce qui laisse à supposer qu'il n'est pas suffisamment réactif. La présence du groupement OTBDPS pourrait gêner l'approche de l'énolate.

Devant l'échec de cette étape, celle-ci a été abandonnée et une nouvelle voie d'accès aux dérivés d'acides pulviniques a alors été étudiée. Néanmoins, le changement du groupement protecteur TBDPS par un groupement benzyle, moins encombré, pourrait être étudié afin de déterminer si l'encombrement stérique est bien à l'origine de l'échec de la dernière addition sur l'aldéhyde.

III.2 Approche B : à partir d'une condensation de type Dieckmann

III.2.1 Rétrosynthèse envisagée

La stratégie envisagée est inspirée des travaux de Weinstock, dont la voie de synthèse est intéressante car souple, mais qui souffre de rendements faibles. Une amélioration de cette voie semblait donc possible, en procédant à quelques adaptations (schéma 47). Une voie de synthèse dans laquelle les noyaux aromatiques seraient remplacés par des précurseurs pour effectuer des couplages métallo-catalysés de type Suzuki a été envisagée. Ces précurseurs peuvent être de différentes natures, mais les plus évidents semblent être des atomes d'halogène. Ceci devrait permettre d'avoir accès rapidement à une large gamme de dérivés.

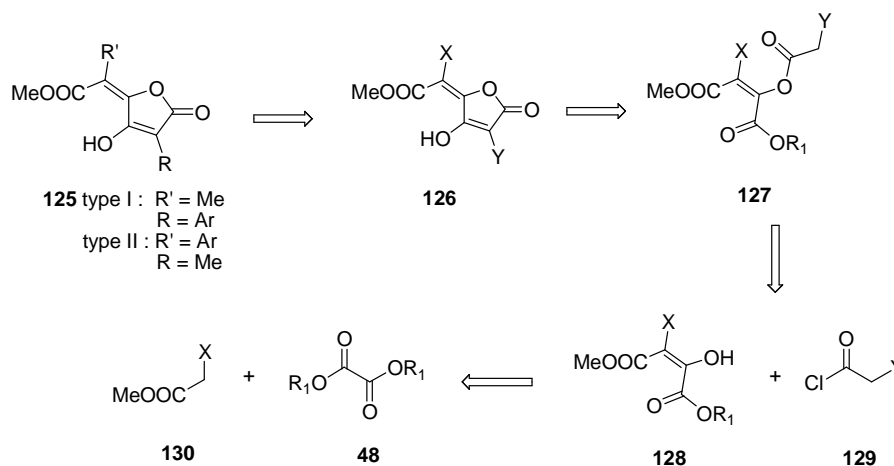


Schéma 47 : rétrosynthèse envisagée à partir des travaux de Weinstock

En utilisant le chloroacétate de méthyle comme ester de départ (**130**, X = Cl) et le chlorure de propionyle (**129**, Y = Me) comme chlorure d'acide, l'accès à des dérivés de type II serait possible, en effectuant un couplage métallo-catalysé pour introduire le groupement aromatique sur la partie « nord » de **126**.

A l'inverse, en utilisant le propionate de méthyle comme ester (**130**, X = Me) et le chlorure d'acétyl (**129**, Y = H) comme chlorure d'acide, les dérivés de type I pourraient être obtenus, car la position 3 de la lactone peut être fonctionnalisée par un atome d'iode, comme décrit précédemment,⁷³ et engagé dans un couplage de Suzuki-Miyaura pour introduire la partie aromatique de la partie « sud » sur **126**.

III.2.2 Résultats

L'acétate d'éthyle **131** a été utilisé comme ester modèle de départ, avant de passer aux autres esters **130** décrits précédemment.

III.2.2.1 Premiers essais

La condensation entre l'oxalate de diéthyle **12** et l'acétate d'éthyle **131** a été effectuée en utilisant les conditions décrites par Dreher,⁸⁶ c'est-à-dire en ajoutant la LDA sur une solution contenant les deux réactifs. Le produit est obtenu sous forme d'un mélange de formes cétoester **132a** (27% par intégration en RMN ¹H) et énol **132b** (73%). Le mélange obtenu après condensation a été engagé sans purification dans l'étape d'acylation (schéma 48).

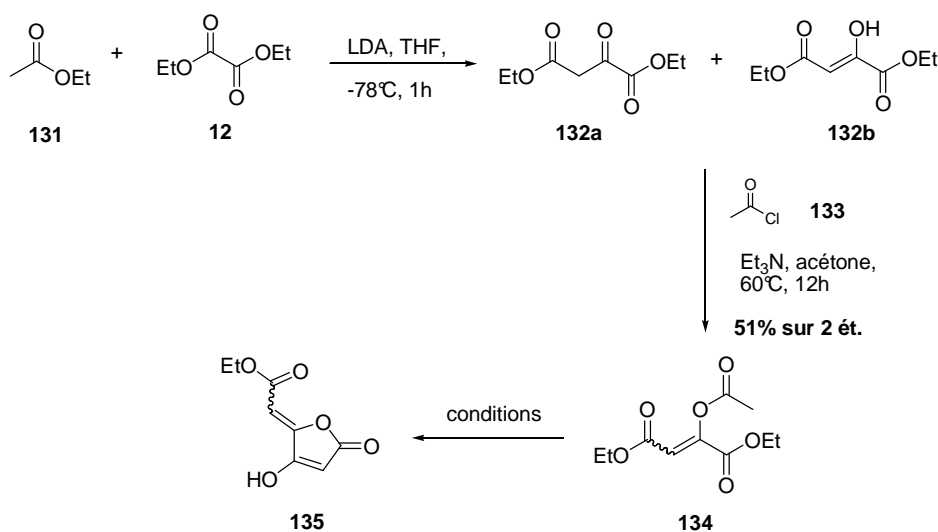


Schéma 48 : premiers essais d'acylation/cyclisation

L'acylation a été effectuée avec le chlorure d'acétyl **133**, dans l'acétone, en présence de triéthylamine. Le produit acylé **134** a pu être obtenu avec un rendement acceptable de 51% sur les 2 étapes, sous forme d'un mélange équimolaire des formes *E* et *Z*.

Le composé acylé **134** a ensuite été placé dans différentes conditions basiques afin d'effectuer la cyclisation et pour conduire à l'intermédiaire cyclisé **135** (tableau 3).

Tableau 3 : essais de cyclisation du produit acylé **134**

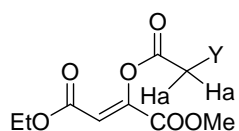
| Entrée | Base | Conditions | Résultats |
|--------|-------------------|-------------------------|-----------------|
| 1 | Et ₃ N | Acétone, 60°C, 12h | Pas de réaction |
| 2 | DBU | DMF, ta, 12h | Pas de réaction |
| 3 | <i>t</i> BuOK | <i>t</i> BuOH, ta, 12h | Pas de réaction |
| 4 | <i>t</i> BuOK | <i>t</i> BuOH, 80°C, 1h | Dégradation |
| 5 | LDA | THF, -78°C, 1h puis ta | Dégradation |
| 6 | LiHMDS | THF, -78°C, 1h puis ta | Dégradation |
| 7 | CIPA | THF, -78°C, 1h puis ta | Dégradation |

Malheureusement, aucune des conditions testées n'a permis d'obtenir le produit cyclisé attendu. Les conditions « douces » (tableau 3, entrées 1-3) ne semblent pas suffisantes pour enclencher la cyclisation alors que l'emploi de conditions plus fortes (tableau 3, entrées 4-7) provoque la dégradation de **134**.

III.2.2.2 Nouveaux substrats et essais de cyclisation

Une autre stratégie de cyclisation a donc été envisagée, en substituant le chlorure d'acétyle **133** par d'autres agents d'acylation.

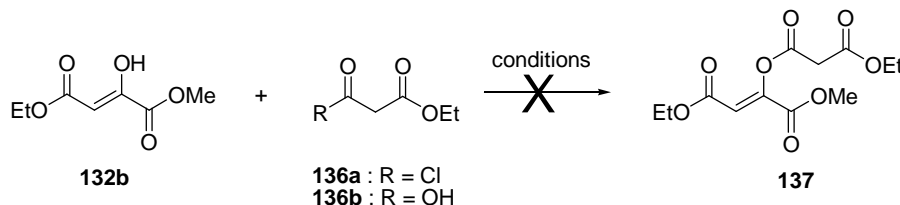
Des substrats pouvant permettre la cyclisation dans des conditions basiques douces ont été envisagés. Pour cela, il faudrait rendre les protons portés par le groupement acyle plus acides que dans le cas de **134**. Ceci peut être possible si le groupement Y est un groupement électroattracteur (schéma 49). Dans les cas proposés, le pKa des protons Ha est compris entre 10 et 15, ce qui signifie que des bases faibles, du type de la triéthylamine ou du carbonate de potassium, devraient permettre de déclencher la cyclisation.

**Schéma 49** : nouveaux composés envisagés

a) avec un groupement carbonylé

En premier lieu, la réaction entre l'alcool **132b** et un dérivé malonique **136** a été étudiée (Y = COOEt).

Tableau 4 : essais d'acylation avec un dérivé malonique



| Entrée | R | Conditions |
|--------|----|---|
| 1 | Cl | Et ₃ N, acétone, 0°C à ta, 12h |
| 2 | Cl | Et ₃ N, DCM, 0°C à ta, 12h |
| 3 | Cl | K ₂ CO ₃ , DMF, ta, 12H |
| 4 | Cl | Pyridine, DCM, ta, 12H |
| 5 | OH | Chlorure d'oxalyle, DMF, DCM, 0°C, 1h puis Et ₃ N, DCM, 0°C |
| 6 | OH | DCC, DMAP, DCM, ta, 12H |

Malheureusement, aucune des conditions testées n'a permis d'obtenir le produit acylé **137**. A partir du chlorure d'éthylmalonyle **136**, les conditions employées pour l'acylation par le chlorure d'acétyle (tableau 4, entrée 1) ne se sont pas révélées satisfaisantes, de même que les autres conditions testées (tableau 4, entrées 2-4). La préparation fraîche du chlorure d'acide **136a** à partir de l'acide carboxylique **136b** n'a pas non plus permis de réaliser l'acylation (tableau 4, entrée 5). Enfin, l'utilisation de l'acide **136b** en présence de DCC (tableau 4, entrée 6) n'a également pas donné satisfaction.

Ces résultats sont très décevants et les produits formés n'ont pu être clairement identifiés. D'autres groupements stabilisants ont donc été envisagés.

b) avec un groupement soufré

Les composés soufrés possèdent des propriétés particulièrement intéressantes. En effet, à partir de sulfures, il est aisé de modifier le degré d'oxydation du soufre et d'avoir

accès à des groupements électroattracteurs tels que les sulfoxydes, les sulfones ou les sels de sulfonium. De plus, il a récemment été mis au point des réactions de couplage organométalliques en utilisant comme substrat des sels de sulfoniums. Ainsi, le produit **138** réagit avec l'acide boronique **139** pour donner le produit de couplage **140** avec un très bon rendement (schéma 50).^{87, 88}

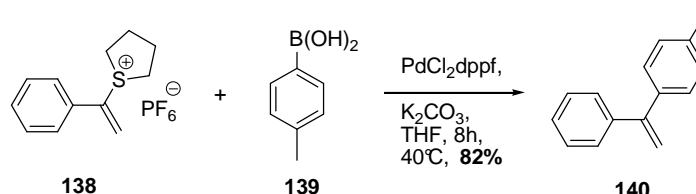


Schéma 50 : exemple de couplage de Suzuki utilisant un sel de sulfonium

Dans un premier temps, le sulfure **141** a été préparé, d'une manière similaire aux exemples précédents (schéma 51). L'acide thioglycolique **142** a tout d'abord été méthylié par l'iodure de méthyle, avec un bon rendement, pour fournir l'acide **143**, lequel a été transformé en chlorure d'acide **144** dans des conditions classiques. Ce chlorure d'acide a été mis en réaction avec l'énol **132b** pour fournir le composé **141**, dans les mêmes conditions qu'auparavant, mais avec un rendement beaucoup plus faible.

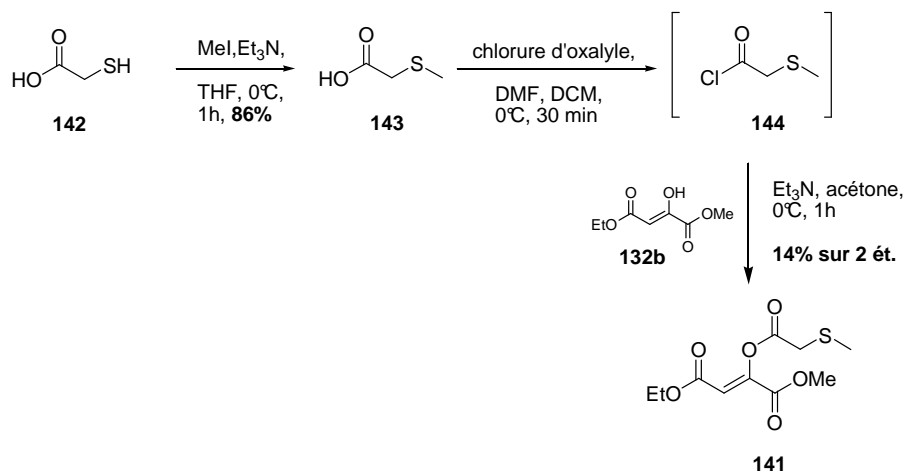
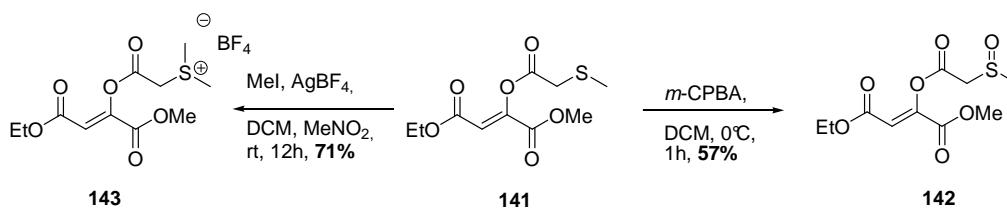
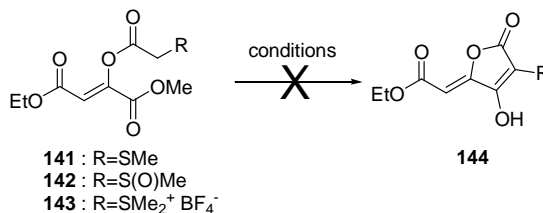


Schéma 51 : préparation du composé soufré **141**

Le sulfure **141** a ensuite été transformé en sulfoxyde **142**, par oxydation en présence de *m*-CPBA et en tétrafluoroborate de sulfonium **143**, par méthylation avec l'iodure de méthyle suivie d'un échange du contre-ion (schéma 52).

Schéma 52 : formation du sulfoxyde **142** et du sel de sulfonium **143**

Ces trois composés ont ensuite été soumis à différents essais de cyclisation (tableau 5). L'emploi de conditions basiques fortes sur le sulfure **141** ont provoqué la dégradation de la molécule (tableau 5, entrées 1,2). Avec le sulfoxyde **142**, des conditions plus douces ont été testées (tableau 5, entrées 3-6). Malheureusement, si le produit de départ est totalement consommé, le produit cyclisé n'a été détecté dans aucune des conditions testées et des mélanges complexes ont été obtenus après réaction. Le sel de sulfonium **143**, placé des conditions basiques, n'a lui non plus pas fourni le produit attendu (tableau 5, entrées 7-10), ce qui est probablement dû à sa dégradation dans les conditions testées.

Tableau 5 : Essais de cyclisation des composés **141**, **142** et **143**

| Entrée | Composé | Conditions |
|--------|---------|---|
| 1 | 141 | LDA, THF, -78°C, 30 min |
| 2 | 141 | LiHMDS, THF, -78°C, 30 min |
| 3 | 142 | Et ₃ N, acétone, 0°C, 30 min |
| 4 | 142 | K ₂ CO ₃ , DMF, ta, 12h |
| 5 | 142 | NaH, THF, 20°C, 1h |
| 6 | 142 | TBAF, THF, 20°C, 3h |
| 7 | 143 | NaOH, H ₂ O, reflux, 15 min |
| 8 | 143 | Et ₃ N, acétone, reflux, 2h |
| 9 | 143 | EtONa, EtOH, reflux, 1h |
| 10 | 143 | KOH, DCM, ta, 12h |

Aucune des conditions testées sur ces trois substrats n'a permis d'accéder à la lactone désirée, une autre stratégie de cyclisation a donc été envisagée.

c) composé acylé bromé

Une réaction de type Reformatsky intramoléculaire pour effectuer la cyclisation a ensuite été envisagée. Une telle cyclisation avait été décrite par Brandänge sur un substrat proche **145**, pour obtenir un dérivé de l'acide tétronique **146** (schéma 53).⁸⁹ Le traitement du composé bromé **145** par du zinc activé fournit un mélange de produit cyclisé **146** (36%) et de produit déhalogéné **147** (39%). Par la suite, le remplacement de l'ester éthylique par un *N*-acylpyrrole comme groupement électrophile a permis d'augmenter le rendement en produit cyclisé **146** à 87%.

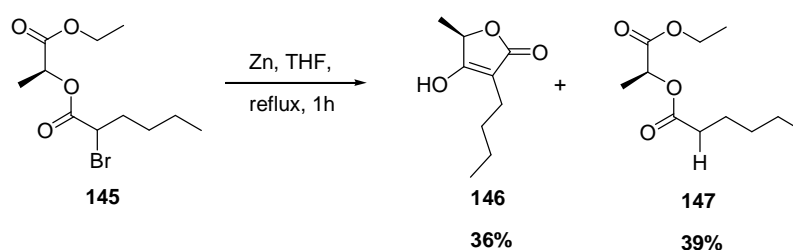
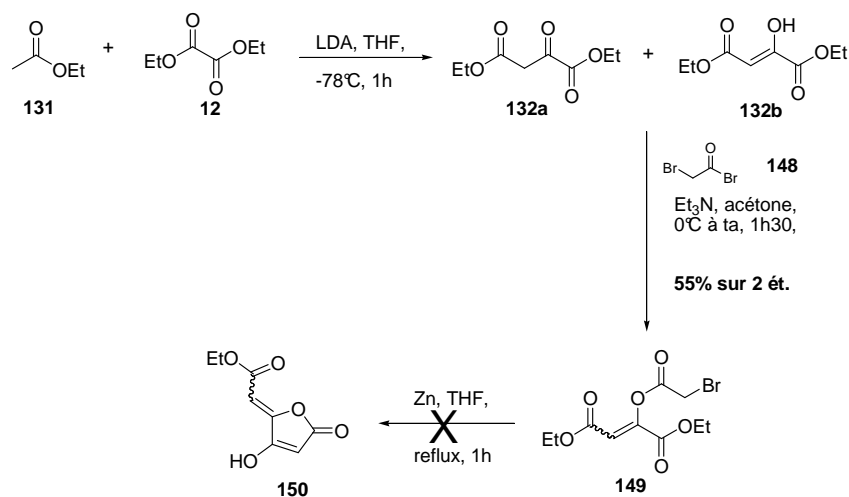


Schéma 53: cyclisation par réaction de Reformatsky intramoléculaire par Brandänge

Pour arriver au précurseur bromé souhaité, une séquence similaire à la précédente a été effectuée : l'acétate d'éthyle **131** a été condensé sur l'oxalate de diéthyle **12** et le brut réactionnel résultant a été traité par du bromure de bromoacétyle **148** (schéma 54).

Schéma 54 : synthèse de **149** et essai de cyclisation

De la même façon que précédemment le produit acylé bromé **149** a été obtenu avec un rendement global de 55% et sous la forme d'un mélange des formes *Z* et *E*. En présence de

zinc, le dérivé bromé devrait former le composé organozincique correspondant et ainsi permettre la cyclisation. Après 1h à reflux du THF en présence de zinc activé, le composé bromé est totalement consommé. Malheureusement, le produit formé n'est pas la lactone attendue **150** mais l'énol **132b** : seule la perte de l'atome de brome a eu lieu, ce qui laisse penser que l'insertion de zinc dans la liaison carbone-brome a bien eu lieu mais que l'organozincique formé n'a pas permis d'effectuer la cyclisation. Le remplacement de l'ester méthylique par un *N*-acylpyrrole pourrait être envisagé pour effectuer cette cyclisation.

Tous ces résultats négatifs, dans des conditions très variées ont montré les limitations de cette approche et celle-ci a donc été abandonnée. L'accès aux dérivés de type II n'a pas été étudié ici.

III.3 Approche C : à partir d'un anhydride maléique

Comme décrit dans le paragraphe II.2, Pattenden a observé une excellente régiosélectivité lors de l'addition d'énolates zinciques d'acétates d'aryles **40** sur des anhydrides 3-aryl-2-méthoxymaléiques **39** et a appliqué cette réactivité à la synthèse d'acides pulviniques naturels (schéma 22, p. 68).

Il a donc été envisagé d'étudier la régiosélectivité de cette réaction sur d'autres dérivés d'anhydrides maléiques, non arylés, afin d'ouvrir une voie de synthèse vers les dérivés pulviniques de type I ou II visés.

III.3.1 Rétrosynthèse envisagée

La synthèse de dérivés de type I peut être envisagée à partir de propionate de méthyle **151** et d'anhydride méthoxymaléique **93** (schéma 55). La position non-substituée de la lactone pourrait être halogénée pour conduire à **92**, qui semble un bon substrat pour participer à des réactions de couplage avec des acides boroniques aromatiques. Ceci permettrait d'avoir accès rapidement à une large gamme d'analogues de type I **152**, à partir d'acides boroniques commerciaux.

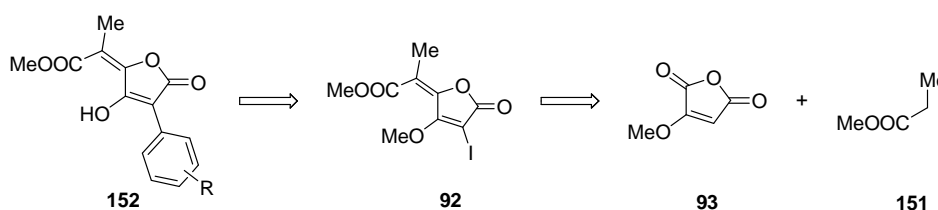


Schéma 55 : rétrosynthèse des produits de type I à partir de l'anhydride maléique **93**

Pour les dérivés de type II **153**, il faudrait faire réagir un acétate d'aryle **47** avec l'anhydride 2-méthoxy-3-méthylmaléique **154** (schéma 56).

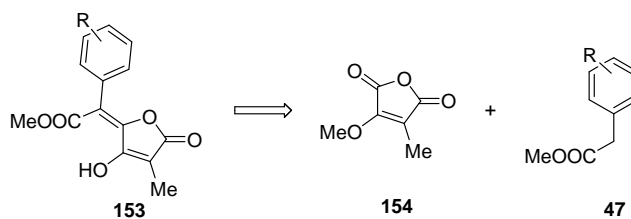


Schéma 56 : rétrosynthèse des produits de type II à partir de l'anhydride maléique **154**

Les résultats obtenus pour la préparation des dérivés de type I et de type II vont être présentés séparément.

III.3.2 Les dérivés de type I

III.3.2.1 Synthèse de l'anhydride méthoxymaléique **93**

La synthèse de l'anhydride méthoxymaléique **93** a été effectuée par la méthode décrite par Argade.⁹⁰ Celle-ci compte trois étapes à partir de l'acétylènedicarboxylate de diméthyle **155** (schéma 57).

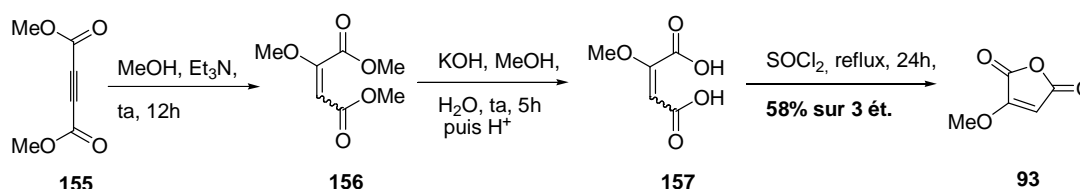


Schéma 57 : synthèse de l'anhydride méthoxymaléique **93** par Argade

L'acétylènedicarboxylate de diméthyle **155** subit une attaque de type oxo-Michaël par le méthanol en présence de triéthylamine, pour conduire au composé **156** sous forme d'un mélange *E/Z* dans les proportions 70/30 (par intégration en RMN ¹H). Ce diester est ensuite saponifié pour obtenir le diacide **157**. Ce diacide, placé en présence de chlorure de thionyle à reflux, s'isomérise et cyclise pour fournir l'anhydride désiré **93**. Cette séquence s'effectue avec un bon rendement global de 58% et est facilement applicable à grande échelle (la préparation de 150 g de **93** a été réalisée).

III.3.2.2 Synthèse du composé iodé **92**

L'énolate zincique du propionate de méthyle **151**, formé *in situ* par addition de LDA et de ZnCl_2 sur l'ester, est additionné sur l'anhydride méthoxymaléique **93** dans le THF pour donner l'alcool **158** sous forme d'un mélange de formes diastéréoisomères (schéma 58). Ce produit a pu être isolé par chromatographie sur gel de silice. Cependant, **158** peut être obtenu de façon très propre par extraction du milieu réactionnel hydrolysé par une solution aqueuse saturée en NH_4Cl (voir la partie expérimentale pour les détails).

Une telle addition n'est pas décrite dans la littérature, mais les travaux de Kayser avaient montré que la réduction régiosélective du carbonyle adjacent au groupement méthoxyle était possible sur l'anhydride **93**.⁵⁹ D'une façon similaire, l'addition de l'énolate zincique du propionate de méthyle sur **93** s'effectue de manière régiospécifique. Dans notre cas, le rendement d'addition est moyen (51%), mais il est à noter que les réactions du même type décrites par Pattenden s'effectuaient avec des rendements variant entre 21 et 29%.⁶³

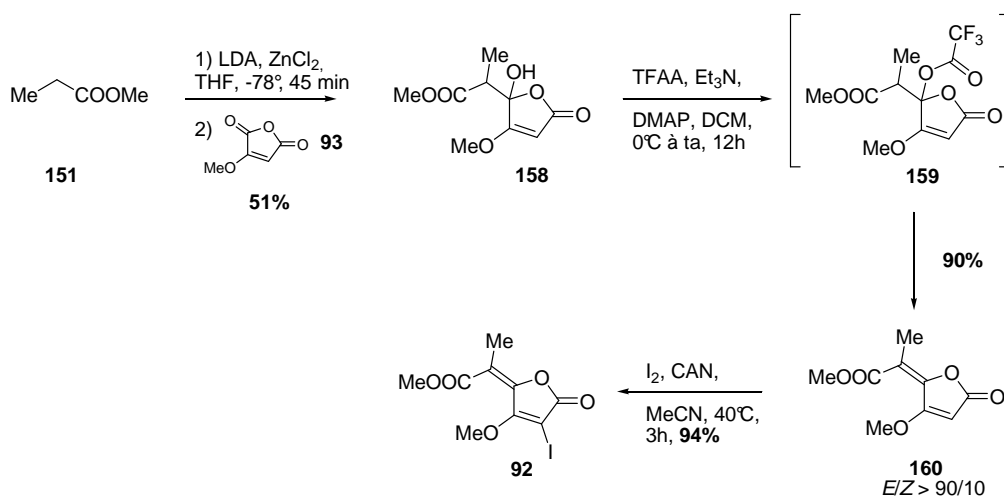


Schéma 58 : obtention du composé iodé **92** à partir de l'anhydride méthoxymaléique **93**

Les conditions utilisées pour les deux étapes suivantes sont inspirées de celles récemment décrites par Mioskowski et présentées dans le paragraphe II.4.2.⁷³ Ainsi, la déshydratation de **158** s'effectue *via* le trifluoroacétate correspondant **159** qui, en présence d'un excès de triéthylamine, s'élimine spontanément pour donner le pulvinate **160**. Celui-ci est obtenu avec un excellent rendement et un très bon excès pour l'isomère *E*. Enfin, la iodation s'effectue également de manière efficace, en présence d'iode et en utilisant le CAN

comme co-oxydant. Le composé iodé **92** est donc obtenu avec un bon rendement de 42% à partir de l'anhydride **93**.

III.3.2.3 Couplage de Suzuki sur le substrat 92

Le composé **92** est *a priori* un bon substrat pour une réaction de couplage métallo-catalysée, comme le couplage de Suzuki-Miyaura. Dans cette optique, l'utilisation d'un nouveau type de catalyseur, supporté sur une résine ionique et développé au laboratoire par les Drs Carine Thiot et Alain Wagner,⁹¹ a été étudié.

L'utilisation de liquides ioniques (LI) en chimie organique est en plein essor et le remplacement des solvants usuels par des LI se traduit souvent par des améliorations en termes de rendement, cinétique et/ou sélectivité.⁹²⁻⁹⁵ Les LI sont en général composés d'ions non coordinants, ce qui en fait des solvants très polaires. Les LI sont compatibles avec de nombreuses réactions (hydrogénation, Friedel-Cratts, formation de liaisons C-C...) et leurs bénéfices environnementaux ont été particulièrement mis en avant (pression de vapeur négligeable, inflammabilité réduite...). Toutefois, si la mise en œuvre est facile, la purification du produit de réaction, le recyclage du catalyseur et/ou du LI restent problématiques.

Dans le cadre de développement de nouveaux catalyseurs hétérogènes, notre groupe a étudié les gels de polymères ioniques, comme alternative aux LI. Ces gels ioniques présenteraient à la fois les propriétés des LI en termes de polarité et d'environnement ionique, tout en conservant les facilités de séparation, de purification du produit et du recyclage du catalyseur de par leur caractère hétérogène.

a) préparation et applications du catalyseur

La préparation de ce nouveau type de catalyseur est décrite au schéma 59 (dans le reste du manuscrit, ce catalyseur sera nommé *cat*). Un polymère ionique est préparé en traitant la résine de Merrifield par un excès de triéthylamine. Après lavages, le gel obtenu est mis en présence d'une solution d'acétate de palladium dans la DMF. Durant cette étape, le métal est absorbé sur la résine, par des interactions non-covalentes fortes entre le métal et la partie ionique du gel, ce qui va conduire à la formation du pré-catalyseur. La concentration en palladium de celui-ci a pu être déterminée par analyse élémentaire. Au cours de la réaction, le

métal passe de l'état d'oxydation (+II) à (0), ce qui provoque la formation de colloïdes de palladium. Ces colloïdes représentent également des espèces de palladium actives pour des réactions de couplage.

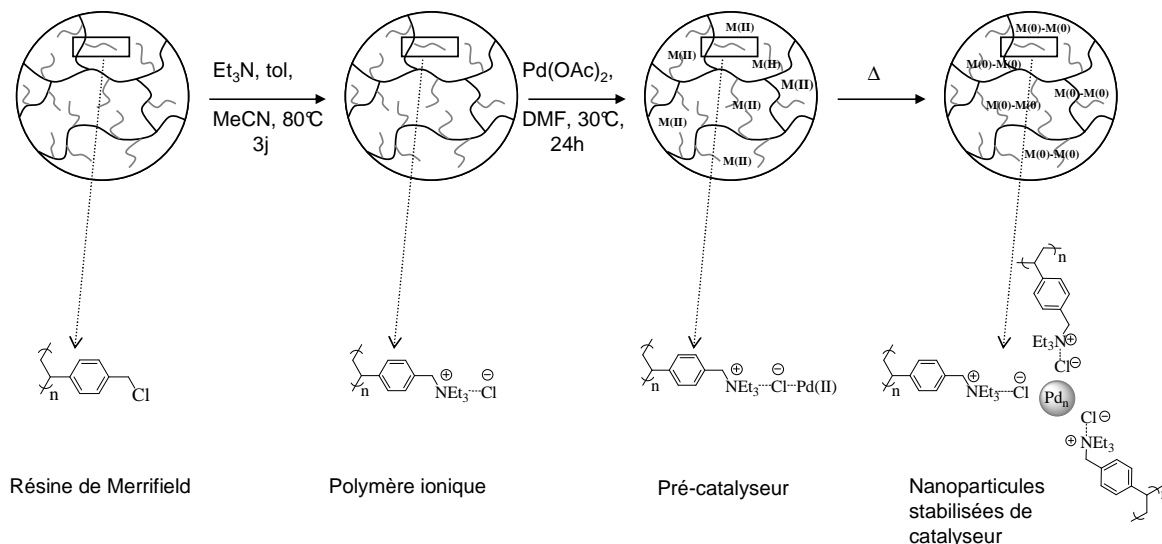


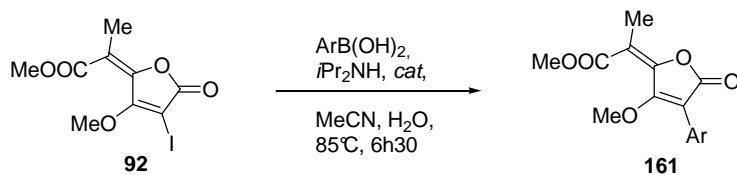
Schéma 59 : préparation du catalyseur *cat*

Les conditions optimisées pour le couplage de Suzuki sont les suivantes : dérivé halogéné (1 éq), acide boronique (1,2 éq), *i*Pr₂NH (2,5 éq), *cat* (0,7 mol%), MeCN/H₂O (3/1), 85°C, 6h30.

Ce catalyseur a été utilisé avec succès dans des couplages de Suzuki, montrant une très grande activité catalytique, puisque seulement 0,7 mol% de Pd sont utilisés. Les conversions observées sont bonnes (de 76 à > 99%) pour une grande gamme de substrats (halogénures d'aryles ou d'hétéroaryles et acides boroniques aromatiques ou hétéroaromatiques). De plus, ce catalyseur s'est montré stable avec les réactions conduites en milieu aqueux. Enfin, le recyclage du catalyseur est possible, sans perte notable d'activité (chute de 20% seulement de l'activité après 5 essais consécutifs).

b) Couplage de Suzuki sur **92**, catalysé par *cat*

Les conditions décrites précédemment ont été appliquées au couplage du substrat iodé **92** avec différents acides boroniques (tableau 6).

Tableau 6 : réaction du dérivé iodé **92** avec des acides boroniques

| Entrée | Produit | Rdt | Entrée | Produit | Rdt |
|--------|-----------------|-----|--------|-----------------|-----|
| 1 | 161a | 78% | 5 | 161e | 67% |
| 2 | 161b | 65% | 6 | 161f | 63% |
| 3 | 161c | 92% | 7 | 161g | 61% |
| 4 | 161d | 58% | 8 | 161h | 89% |

Le couplage s'effectue avec de bons rendements compris entre 58 et 92%. La réaction entre **92** et l'acide 4-méthoxyphénylboronique (tableau 6, entrée 2) a été plus particulièrement étudiée, car des problèmes de reproductibilité ont été observés, notamment lors du passage de cette réaction à l'échelle du gramme. Quelques essais ont donc été effectués, afin de pallier à ce problème. Malheureusement, ni le changement de base (NaOH à la place de $i\text{Pr}_2\text{NH}$), ni l'emploi de micro-ondes, ni l'utilisation de conditions plus classiques ($\text{Pd}_2(\text{dppf})_2\text{Cl}_2\text{-DCM}$ 5% mol, Na_2CO_3 ou K_3PO_4 , toluène, eau) n'a permis d'obtenir d'améliorations. Finalement, les résultats les plus satisfaisants ont été obtenus avec le système initial.

III.3.2.4 Déprotection de l'énol

Les différents pulvinate obtenus ont ensuite été placés dans des conditions de déprotection de l'énol, en présence de tribromure de bore dans le DCM à 0°C (tableau 7).

Tableau 7 : déprotection de l'énol par BBr₃



| Entrée | Produit | Rdt | Entrée | Produit | Rdt |
|--------|-----------------|-----|--------|-----------------|-----|
| 1 | 162a | 85% | 5 | 162e | 71% |
| 2 | 162b | 65% | 6 | 162f | 58% |
| 3 | 162c | / | 7 | 162g | 61% |
| 4 | 162d | 69% | 8 | 162h | 50% |

Les produits déprotégés ont été obtenus dans tous les cas, à une exception, avec des rendements acceptables compris entre 50 et 85%. Il est à noter que, dans la plupart des cas, environ 5 à 10% de l'acide correspondant sont également obtenus.

Dans le cas du pulvinate **161b**, une explication de la déprotection régiosélective de l'énol par rapport au groupement méthoxyle aromatique peut être proposée par analogie avec les études de Langer sur les acides pulviniques « classiques » (schéma 60).⁹⁹ La chélation de BBr_3 par la fonction ester provoque l'activation, puis la coupure de l'énol, qui libère l'acide pulvinique **162b**.

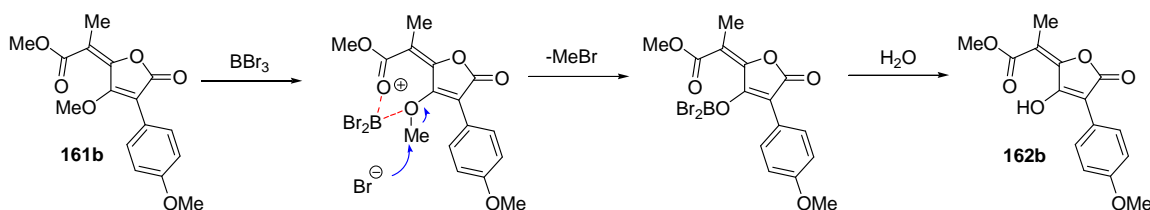


Schéma 60 : mécanisme de déprotection régiosélective de l'énol de **161b**

Dans le cas du pulvinate **161c**, le produit attendu **162c** n'a pu être obtenu. En effet, dans ce cas, c'est un des deux groupements méthoxyles portés par le noyau aromatique qui est déprotégé et non l'énol.

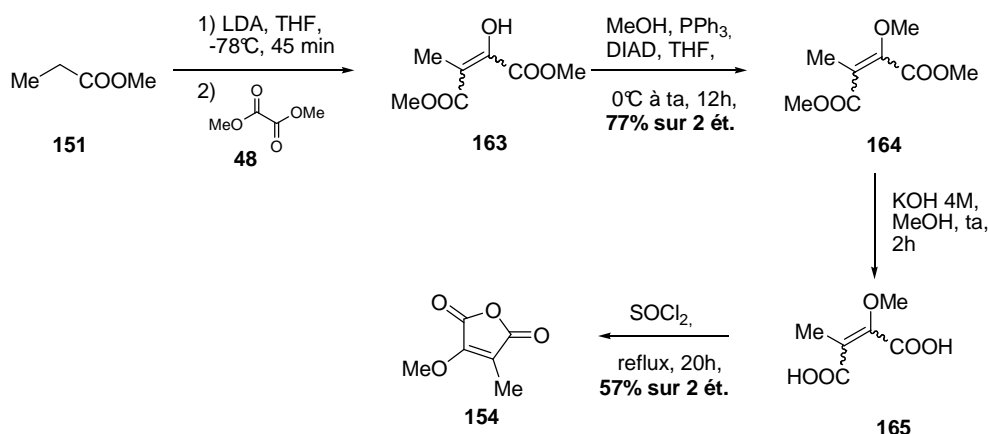
Les produits obtenus se caractérisent par une intense couleur jaune et un pic caractéristique en RMN ^1H : un singulet très fin vers 13 ppm correspondant à l'atome d'hydrogène de la fonction énol, lié par liaison hydrogène avec le carbonyle de l'ester voisin.

III.3.3 Les dérivés de type II

L'adaptation de la synthèse précédemment décrite a ensuite été envisagée pour accéder aux composés de type II en étudiant la réaction entre l'anhydride 2-méthoxy-3-méthylmaléique **154** et un énolate d'acétate d'aryle **47** (schéma 56, p. 95).

III.3.3.1 Synthèse de l'anhydride 2-méthoxy-3-méthylmaléique **154**

Dans un premier temps, l'anhydride 2-méthoxy-3-méthylmaléique **154** a été préparé, en adaptant la synthèse décrite par Kayser,⁶⁰ et en se basant sur les résultats obtenus pour la synthèse de l'anhydride 2-méthoxymaléique **93** (schéma 61).

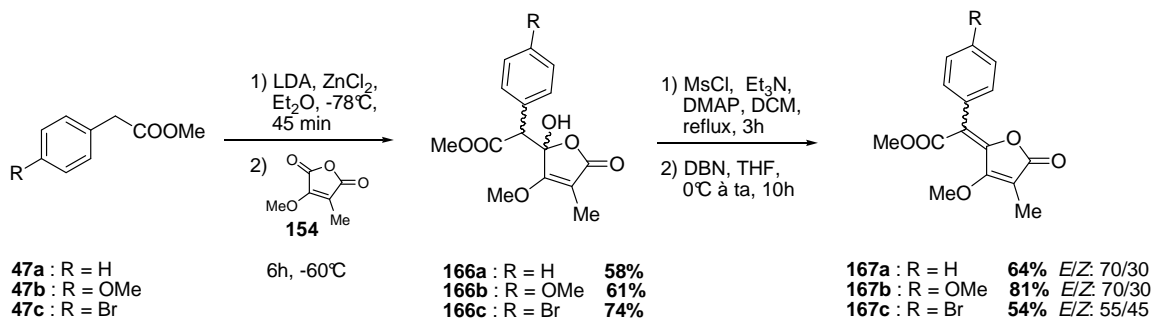

 Schéma 61 : préparation de l'anhydride **154**

L'énolate du propionate de méthyle **151** réagit avec l'oxalate de diméthyle **48** pour donner l'énol **163**, lequel est protégé sous forme d'éther méthylique par une réaction de Mitsunobu. Le diester **164** est ensuite saponifié en diacide **165** qui cyclise en présence de chlorure de thionyle pour donner l'anhydride **154** avec un bon rendement.

III.3.3.2 Addition d'acétates d'aryles sur **154** et déshydratation

Pour accéder aux dérivés de type II, les additions d'énolates zinciques d'acétates d'aryles **47** sur **154** ont été étudiées. De la même façon que dans le cas de l'anhydride méthoxymaléique **93**, de telles additions ne sont pas décrites dans la littérature. Cependant, les travaux de Pattenden et Kayser ont montré que, de la même façon que pour **93**, une réduction régiosélective de **154** sur le carbonyle adjacent au groupement méthoxyle était possible.

Trois acétates d'aryle ont été utilisés : le phénylacétate de méthyle **47a**, le 4-méthoxyphénylacétate de méthyle **47b** et le 4-bromophénylacétate de méthyle **47c** (schéma 62).


 Schéma 62 : réaction d'acétates d'aryles **47** sur **154** et déshydratation

En utilisant les conditions décrites par Pattenden,⁶³ et comme dans le cas étudié au paragraphe III.3.2.2, l'addition des énolates s'effectue de manière régiosélective sur le carbonyle situé en α du groupe méthoxyle de **154**, avec de bons rendements.

Ces alcools **166**, placés dans les conditions de déshydratation utilisées précédemment en présence d'anhydride trifluoroacétique, ne réagissent pas pour conduire au pulvinate **167**. La déshydratation en deux étapes, décrite par Pattenden, par activation de l'alcool sous forme de mésylate et élimination en milieu basique fournit bien le pulvinate **167**, sous forme d'un mélange de formes isomères *E* et *Z*. Ces deux isomères de **167** peuvent être partiellement séparés par chromatographie sur gel de silice.

III.3.3.3 Déprotection de l'énol

En plaçant les pulvinates **167** en présence d'un équivalent de BBr_3 , la déprotection de l'énol ne se produit pas, mais une substitution du méthoxyle par un atome de bore a été observée pour les composés **167a** et **167c** (schéma 63). Concernant le pulvinate **167b**, un mélange complexe a été récupéré après réaction, dont les produits n'ont pu être identifiés avec certitude.

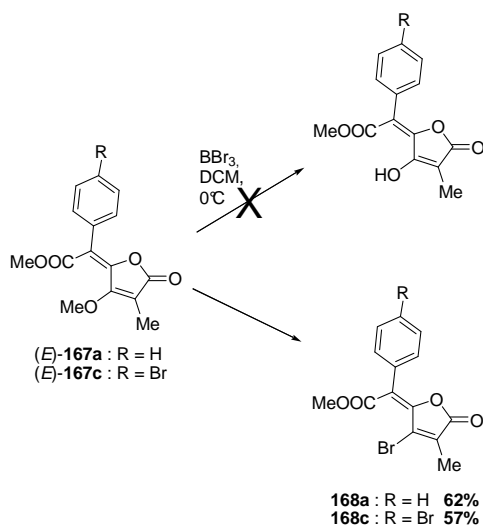


Schéma 63 : substitution de OMe par un atome de brome sur **167**, en présence de BBr_3

Cette réactivité est très différente de celle observée pour la série de type I, malgré la grande similarité des structures. De plus, seul l'isomère *E* de **167** subit cette transformation, l'isomère *Z* étant récupéré inchangé, même en présence d'un excès de BBr_3 .

Ce résultat est très décevant car il intervient à la dernière étape de la synthèse et il était difficilement prévisible. Les dérivés de type II ne peuvent donc pas être préparés à partir de l'anhydride 2-méthoxy-3-méthylmaléique **154** ; le changement du groupement protecteur sur celui-ci devrait être envisagé pour mener la synthèse à bien, avec par exemple un groupement benzyle.

III.3.4 Conclusions

Cette voie de synthèse a fourni des résultats contrastés. En effet, elle n'a pas permis d'obtenir des dérivés de type II, car la dernière étape de déprotection de l'énol n'a pas fourni le résultat attendu.

Malgré cela, cette voie a permis de préparer 7 dérivés de type I, substitués différemment sur le groupement aromatique. Ces composés vont donc pouvoir être testés pour leur activité antioxydante. Les produits **162a**, **162b**, **162e** et **162f** sont particulièrement intéressants car leur activité va pouvoir être comparée aux produits symétriques correspondants **169a**, **169b**, **169e** et **169f**, qui ont été préparés par B. Heurtaux au CEA de Saclay (schéma 64).

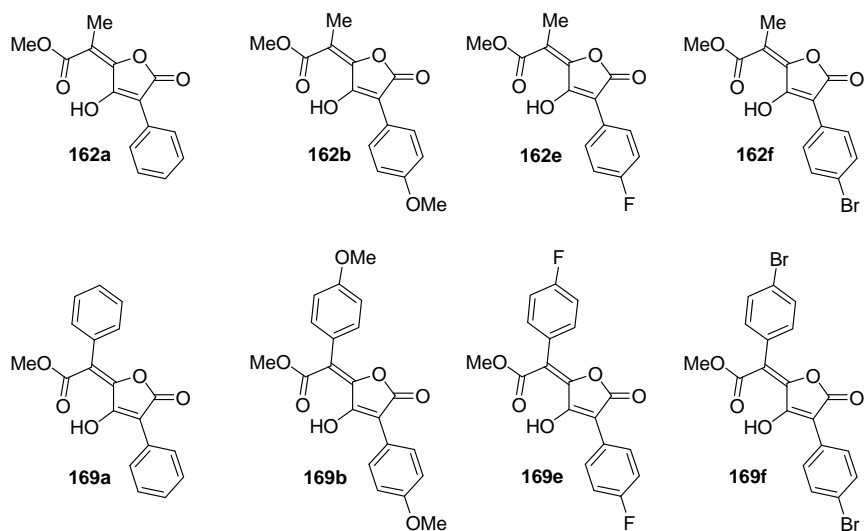


Schéma 64 : dérivés de type I synthétisés (haut) et produits symétriques correspondants (bas)

III.4 Approche D : à partir d'une dilactone pulvinique mono-aromatique

La voie de synthèse décrite dans ce paragraphe est très différente de la précédente. En effet, il s'agit ici d'une voie beaucoup plus convergente qui devrait permettre, à partir d'un intermédiaire commun, d'avoir accès en une seule étape aux composés de type I et II.

Comme décrit dans le premier paragraphe, de nombreux acides pulviniques naturels ont été préparés par hydrolyse ou méthanolyse d'une dilactone pulvinique.⁵⁰ Une adaptation de cette stratégie vers une dilactone pulvinique mono-aromatique a donc été envisagée, dont l'ouverture par un nucléophile donnerait accès simultanément aux dérivés de type I et II (schéma 65). Pour la préparation de cette dilactone **170**, un groupement 4-méthoxyse a été choisi comme substituant sur le noyau aromatique, car les dérivés pulviniques symétriques correspondants sont connus, ainsi que leur activité antioxydante. Il sera donc possible d'y comparer les activités des nouveaux produits synthétisés.

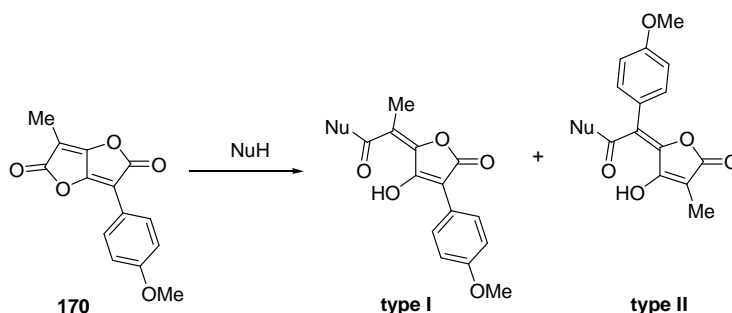


Schéma 65 : ouverture de la dilactone mono-aromatique **170** par un nucléophile NuH

Grâce à cette stratégie, un nouveau point de flexibilité structurale est introduit au niveau de la fonction carbonyle à l'extérieur du cycle. En effet, en faisant varier la nature du nucléophile NuH (alcools, amines...), une large gamme de substrats (esters, amides...) pourrait être obtenue. L'influence de la nature de cette fonction *exo*-cyclique sur l'activité antioxydante pourrait alors être étudiée.

III.4.1 Préparation de la dilactone **170**

III.4.1.1 Première synthèse

La stratégie envisagée est inspirée de travaux effectués au CEA de Saclay⁷³ et de ceux de Pattenden⁶¹ ; elle utilise la chimie des acides tétroniques.⁹⁶

L'acide tétronique **173** a été préparé suivant la méthode développée par A. Mallinger au CEA de Saclay (résultats non publiés). En effet, il a été montré que le 4-méthoxyphénylacétate de méthyle **171** réagit avec le glycolate d'éthyle **172**, en présence de deux équivalents de *tert*-butoxyde de potassium, pour fournir en une seule étape l'acide tétronique correspondant **173** (schéma 66). Celui-ci est ensuite protégé efficacement sous forme d'éther méthylique **174**, par action du sulfate de diméthyle dans l'acétone, en présence de carbonate de potassium.

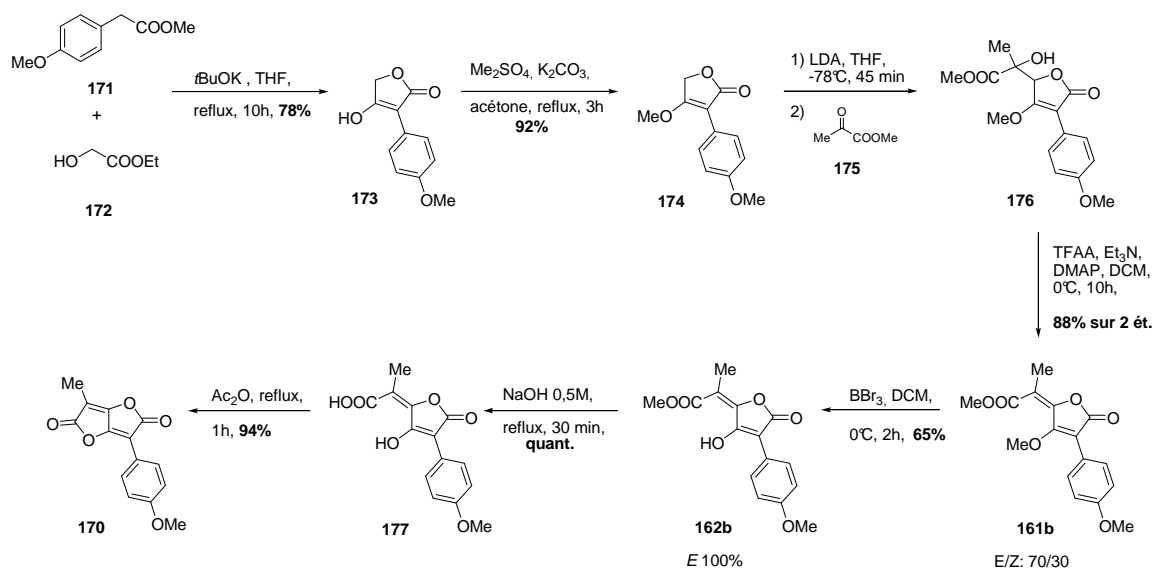


Schéma 66 : synthèse de la dilactone **170**

Le composé **174** est ensuite déprotoné en position 5 par action de la LDA, et l'anion résultant réagit avec le pyruvate de méthyle **175** pour donner l'alcool **176** sous forme d'un mélange de formes diastéréoisomères. Le brut réactionnel est ensuite engagé directement dans l'étape de déshydratation, en présence de TFAA, de triéthylamine et de DMAP. Ceci fournit un mélange du pulvinate **161b** sous ses formes *E* et *Z*, qui sont partiellement séparables par chromatographie sur gel de silice.

Ces pulvinates ont ensuite été engagés dans l'étape de déprotection par le tribromure de bore dans le DCM. Des essais en parallèle sur trois fractions différentes de **161b**, à savoir l'isomère *E* seul, le mélange des isomères *E* et *Z* et l'isomère *Z* seul, ont montré la formation d'un produit unique, qui correspond à l'isomère *E* du produit déprotégé **162b** (aucune trace de l'isomère *Z* n'a pu être détectée lors de ces trois réactions). Il semblerait donc qu'une isomérisation de l'isomère *Z* en isomère *E* se produise lors de la réaction. La faible barrière énergétique séparant les deux isomères, avec une préférence pour l'isomère *E*, avait déjà été observée sur des acides pulviniques classiques, à la fois sur des produits protégés par Pattenden⁶³ et sur des produits déprotégés par Ramage⁵⁵ (isomérisation par la lumière naturelle ou par irradiation UV). Ici, il semblerait plus probable que cette isomérisation soit induite par le tribromure de bore, donc avant la déprotection (schéma 67).

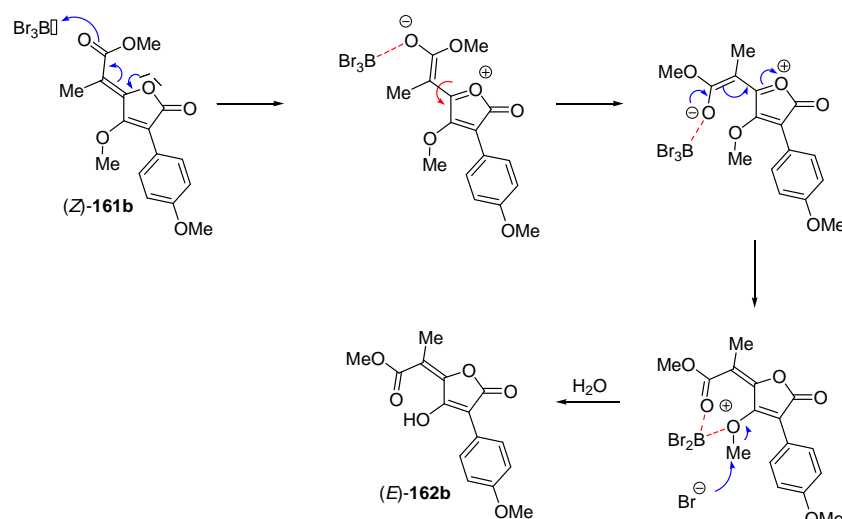


Schéma 67 : hypothèses sur l'isomérisation de (Z)-**161b** induite par BBr_3

Ce résultat permet de s'affranchir de l'étape de la séparation des deux isomères de **161b**. L'étape de déprotection est néanmoins assez délicate à mener, car, dans certains cas, le produit issu de la double déprotection de l'énol et du méthoxyle porté par l'aromatique est formé avant disparition totale du pulvinate. Il faut donc rester prudent quant à la quantité, mais également la qualité, de la solution de tribromure de bore utilisée. Cependant, la déprotection souhaitée a pu être réalisée, à partir d'un mélange *E/Z* : 70/30, avec un bon rendement de 65%, fournissant uniquement l'isomère *E* de **162b**.

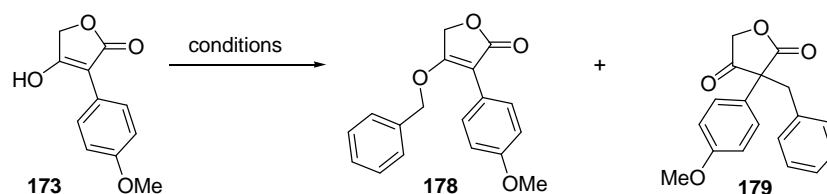
Une fois l'énol déprotégé, la fonction ester de **162b** a été saponifiée dans des conditions classiques. L'acide obtenu **177** cyclise efficacement au reflux de l'anhydride acétique pour fournir la dilactone attendue **170** (schéma 66).

Cette nouvelle voie de synthèse s'est donc révélée efficace pour la synthèse de la dilactone **170**, avec un rendement global sur 7 étapes de 39%. Il est à noter que cette voie passe par deux intermédiaires de type I qui sont l'ester **162b** et l'acide **177**. Les rendements de cette synthèse sont bons, la seule étape qui pose quelques problèmes de reproductibilité est la déprotection de l'énol par BBr_3 , qui de plus est un réactif relativement toxique et dont l'usage en milieu industriel est à éviter. La possibilité d'utiliser un nouveau groupement protecteur, le groupement benzyle, a été étudiée.

III.4.1.2 Utilisation d'un groupement benzyle

L'introduction du groupement benzyle sur l'acide tétronique **173** a été étudiée. Malheureusement, en utilisant un halogénure de benzyle, un mélange entre le produit de *O*-benzylation **178** et de *C*-benzylation **179** a été obtenu. Diverses conditions opératoires ont été testées, afin d'obtenir exclusivement le produit attendu de *O*-benzylation **178** (tableau 8).

Tableau 8 : Essais de protection de **173** par un groupement benzyle



| Entrée | Conditions | Ratio 178/179 |
|--------|---|----------------------|
| 1 | BnBr, K_2CO_3 , acétone, reflux, 5h | 35/65 |
| 2 | BnBr, Et_3N , THF, reflux, 40h | 27/73 |
| 3 | BnBr, K_2CO_3 , DMF, ta, 4h | 30/70 |
| 4 | BnBr, K_2CO_3 , HMPA, ta, 4h | 28/62 |
| 5 | BnBr, CsF, DMF, ta, 2j | 34/66 |
| 6 | BnCl, CsF, DMF, ta, 2j | 40/60 |

Les conditions classiques (tableau 8, entrée 1), utilisées pour la protection sous forme d'éther méthylique, ont fourni un mélange composé de 65% de **179** pour seulement 35% de **178** (ce ratio a été déterminé par intégration en RMN ^1H). L'utilisation de Et_3N dans le THF n'a pas permis d'améliorer ce ratio (tableau 8, entrée 2). Les tentatives pour augmenter ce ratio en faveur du produit *O*-benzylé **178**, dans des conditions plus polaires censées favoriser

les réactions de *O*-alkylations, n'ont pas permis d'améliorer cette sélectivité (tableau 8, entrées 3,4). Enfin, l'emploi de fluorure de césium, pourtant décrit sur des substrats proches,⁹⁷ n'a également pas fourni de résultats satisfaisants (tableau 8, entrées 5,6).

De nouvelles conditions ont alors été étudiées, où cette compétition *O*-alkylation/*C*-alkylation n'aurait pas lieu (tableau 9).

Tableau 9 : autres essais de protection de **173** par un groupement benzyle

| Entrée | Conditions | Rdt 178 |
|--------|---|----------------|
| 1 | BnOH, PPh ₃ , DIAD, THF, 0°C à ta, 12h | 40% |
| 2 | BnOH, PPh ₃ , DEAD, THF, 0°C à ta, 12h | 42% |
| 3 | BnOH, PPh ₃ , DEAD, THF, reflux, 12h | 47% |
| 4 | BnOH, Ph ₃ P(O), Tf ₂ O, <i>i</i> Pr ₂ NEt, DCM, ta, 12h ⁹⁸ | 39% |
| 5 | BnOH, PBU ₃ , DIAD, THF, 0°C à ta, 12h | 36% |
| 6 | Trichloroacétimide de benzyle, TfOH, DCM, Cy, ta, 12h | / |
| 7 | Réactif de Dudley, PhCF ₃ , MgO, 83°C, 24h | 13% |

La réaction, conduite dans les conditions de Mitsunobu, a permis d'éviter la formation du produit *C*-protégé **179**. Plusieurs conditions ont été testées en faisant varier la nature de la phosphine, le solvant ou la température. Malheureusement, le produit protégé **178** n'a pu être isolé qu'avec des rendements modestes (tableau 9, entrées 1-5). L'emploi de 2,2,2-trichloroacétimide de benzyle n'a pas permis d'obtenir le produit protégé attendu (tableau 9, entrée 6). Enfin, l'utilisation du réactif de Dudley, le triflate de 2-benzyloxy-1-méthylpyridinium,⁹⁹ récemment décrit comme étant un excellent réactif pour la protection d'alcools sous forme d'éther benzylique, ne s'est pas révélée satisfaisante non plus (tableau 9, entrée 7).

Parmi toutes les conditions testées, aucune n'a malheureusement permis de protéger efficacement l'acide tétronique **173** par un groupement benzyle. Les meilleures conditions obtenues pour cette protection utilisent une réaction de type Mitsunobu, avec un rendement moyen de 47% (tableau 9, entrée 3). Les résultats obtenus sont décevants, la synthèse avec le dérivé protégé **178** a tout de même été poursuivie, afin de pouvoir comparer les deux groupements protecteurs méthyle et benzyle sur l'ensemble de la synthèse (schéma 68).

La séquence addition de pyruvate de méthyle-déshydratation se fait avec un bon rendement de 56% pour les deux étapes. Le pulvinate **181** est également obtenu sous forme d'un mélange de deux formes isomères *E* et *Z*, séparables par chromatographie sur gel de silice. La déprotection par hydrogénation catalytique a permis d'obtenir de façon quantitative

les deux isomères de **162b**. Enfin, il est à noter qu'une solution de l'isomère (*Z*)-**162b** s'isomérise en (*E*)-**162b** au contact de la lumière naturelle en une semaine.

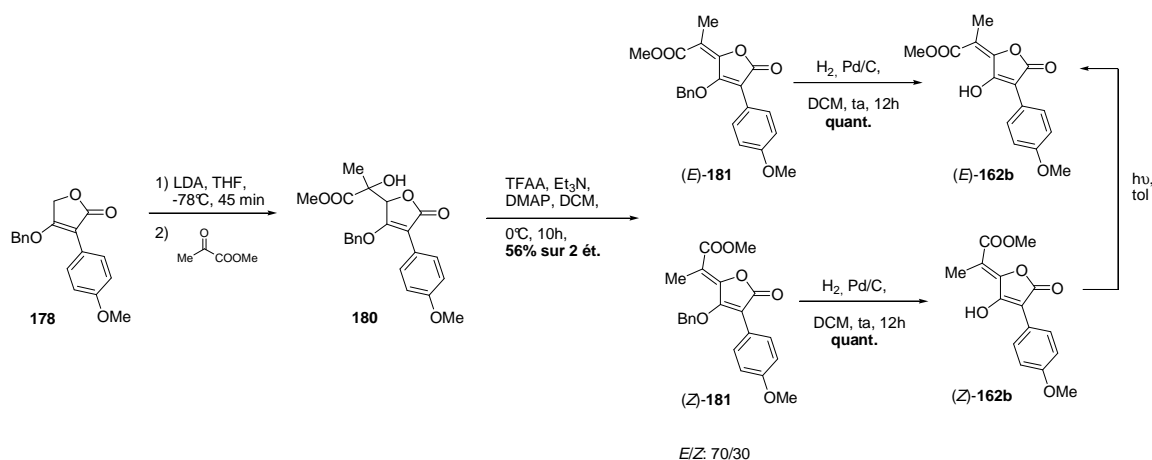


Schéma 68 : synthèse de **162b** à partir de **178**

L'utilisation du groupement benzyle a donc fourni des résultats contrastés. D'une part, l'introduction du groupement protecteur n'est pas très efficace et les meilleurs résultats ont été obtenus grâce aux conditions de Mitsunobu. Cette méthode ne pourra s'étendre facilement à grande échelle, du fait des nombreux produits secondaires générés (oxyde de triphénylphosphine et dérivés du DEAD), qui rendent la purification délicate et à cause de la toxicité du DEAD. En contrepartie, l'étape de déprotection, qui posait quelques problèmes avec le groupement méthoxyle, est ici aisée à mettre en œuvre et le produit déprotégé est obtenu de manière quantitative.

Le rendement global de la synthèse de la dilactone **170** en utilisant le groupement protecteur benzyle est de 19%, contre 39% pour le groupement méthoxyle. La protection par un éther méthylique s'est finalement révélée mieux adaptée pour cette synthèse.

III.4.2 Ouverture de la dilactone **170** par des amines

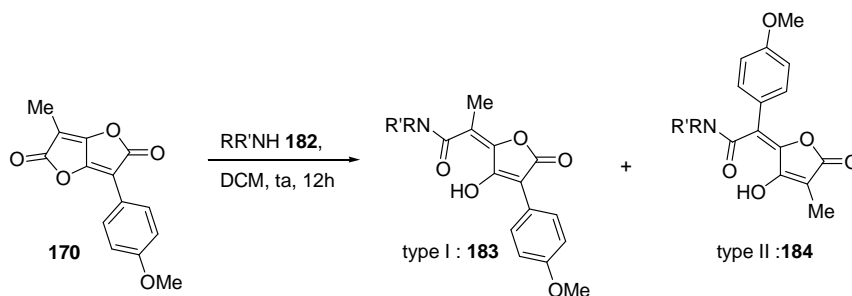
La réactivité de la dilactone **170** vis-à-vis de différents nucléophiles a été testée, en utilisant dans un premier temps des amines. L'ouverture de dilactones symétriques, c'est-à-dire portant deux groupements aromatiques identiques, par des amines est décrite dans la littérature, donnant accès à des produits appelés pulvamides.¹⁰⁰⁻¹⁰⁴

L'intérêt de la dilactone **170** réside dans le fait qu'elle permette d'obtenir, en une étape, les produits de type I et II utiles pour l'étude de la relation structure-activité antioxydante.

III.4.2.1 Ouverture directe par des amines

En premier lieu, la réaction de **170** avec trois amines différentes a été étudiée, en ajoutant la dilactone **170** (1 éq.) par portions sur une solution d'amine **182** (1 éq.) dans le DCM à température ambiante (tableau 10).

Tableau 10 : réactivité de **170** avec des amines



| Entrée | Amine 182 | 183 , rdt | 184 , rdt |
|--------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | $(C_4H_9)_2NH$ 182a | 183a 50% | 184a 36% |
| 2 | $C_4H_9NH_2$ 182b | 183b 42% | 184b 34% |
| 3 | $C_{12}H_{25}NH_2$ 182c | 183c 45% | 184c 35% |

La réaction de la dibutylamine **182a** avec la dilactone **170** donne accès aux deux produits de type I et II, avec des rendements isolés respectifs de 50 et 36% (tableau 10, entrée 1). Ces deux produits sont séparables par chromatographie sur gel de silice, ont des aspects très différents (**183a** étant un solide orange et **184a** un solide beige) et des spectres RMN différents. De façon notable, sur le spectre RMN ^1H , les protons aromatiques en *meta* du groupement méthoxyle pour **183a** ont un déplacement chimique très déblindé à 8,04 ppm (ce type de signal est généralement observé pour les acides pulviniques « classiques »), alors que ces mêmes protons pour **184a** ont un déplacement chimique de 7,50 ppm (figure 11).

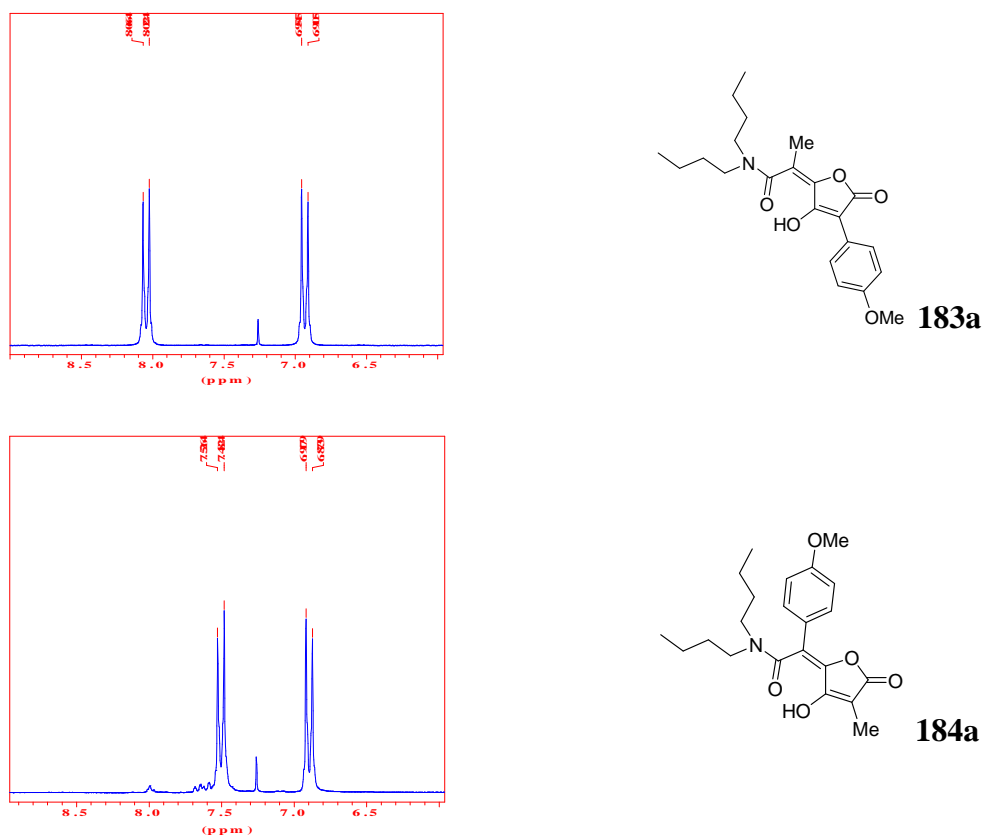


Figure 11: spectres RMN ^1H des protons aromatiques de **183a** et **184a** (CDCl_3 , 200 MHz)

Une analyse par RMN en deux dimensions a permis d'identifier sans ambiguïté chaque produit. Deux autres amines, la butylamine **182b** et la dodécylamine **182c**, ont été testées dans ces mêmes conditions et ont fourni des résultats comparables, à savoir que l'amide **183** est obtenu majoritairement par rapport à l'amide **184**, avec des rendements de l'ordre de 45% pour le type I et 35% pour le type II (tableau 10, entrées 2,3).

Il est intéressant de noter que les produits de type I sont toujours obtenus majoritairement lors de cette réaction, et que le rapport de rendements I/II est relativement constant avec les trois amines étudiées.

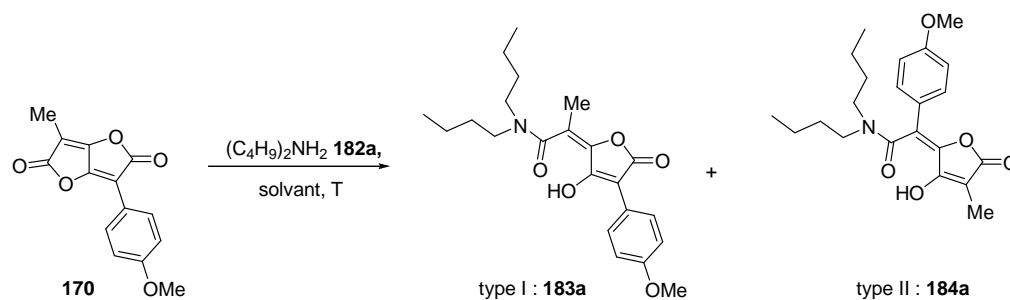
La possibilité d'effectuer cette transformation de manière régiosélective pour obtenir uniquement le produit de type I a donc été étudié. Aucune donnée de la littérature n'est disponible concernant cette transformation. En effet, dans le cas des acides pulviniques « classiques », c'est-à-dire avec deux groupements aromatiques, l'environnement chimique de la dilactone est trop similaire pour permettre une discrimination. Seul Weinstock décrit rapidement dans son introduction quelques essais pour tenter de contrôler cette régiosélectivité, en faisant varier des paramètres tels que le solvant ou la température, sans succès.⁴⁷ Dans le cas étudié, l'environnement autour de la dilactone **170** n'est pas identique puisqu'elle est substituée d'une part par un groupement aromatique et d'autre part par un groupement méthyle. Ces deux substituants sont différents d'un point de vue stérique et électronique, ce qui laisse penser qu'il serait possible d'orienter la réaction d'ouverture.

Dans cette optique, l'influence du solvant et de la température sur la régiosélectivité de l'addition de la dibutylamine sur la dilactone **170** a été étudiée. Le ratio entre les deux produits **183a** et **184a** a été déterminé par intégration des protons aromatiques en position *meta* par rapport au groupement méthoxy en RMN ¹H sur le brut réactionnel; les produits ayant déjà été caractérisés séparément. Dans ces expériences, la dilactone **170** (1 éq.) est ajoutée par portions, en une heure, à une solution d'amine **182a** (1 éq.) à des températures et dans des solvants variables (tableau 11).

Les premiers essais ont été conduits dans le DCM. A température ambiante, l'addition de dibutylamine conduit avec un léger excès (58%) au produit de type I **183a** (tableau 11, entrée 1). L'abaissement de la température à -35°C permet d'augmenter légèrement ce ratio (tableau 11, entrée 2). L'étude des solvants a donc été effectuée à cette température. Le passage à des solvants aprotiques moyennement polaires ne permet pas d'augmenter ce ratio (tableau 11, entrées 2-5). Les solvants très polaires comme le DMF (tableau 11, entrée 6) ou protiques comme l'éthanol (tableau 11, entrée 7) n'influencent pas la réaction. L'utilisation d'acétonitrile permet d'obtenir un résultat légèrement meilleur aux autres, avec 69% de produit de type I (tableau 11, entrée 8). L'emploi d'hexane ne permet pas la réaction, très probablement à cause de l'insolubilité de la dilactone dans ce solvant (tableau 11, entrée 9). La réaction sans solvant (tableau 11, entrée 10), en utilisant 20 équivalents d'amine, ne permet pas d'obtenir une amélioration significative de ce ratio, pas plus que l'utilisation de

conditions aqueuses (tableau 11, entrée 11) ou de liquide ionique (tableau 11, entrée 12). Finalement, l'acétonitrile étant le solvant qui donnait le meilleur résultat, il a été utilisé pour étudier l'influence de la température. Malheureusement, à chaud ou à température ambiante, la réaction conduit au même ratio qu'à -35°C (tableau 11, entrées 13,14).

Tableau 11 : influence du solvant et de la température sur l'addition de dibutylamine **182a** sur **170**



| Entrée | Solvant | T (°C) | Ratio 183a/184a | Entrée | Solvant | T (°C) | Ratio 183a/184a |
|--------|-------------------|--------|---------------------------|--------|--------------------------|--------|---------------------------|
| 1 | DCM | 20 | 58/42 | 8 | MeCN | -35 | 69/31 |
| 2 | DCM | -35 | 62/38 | 9 | Hexane | -35 | / |
| 3 | THF | -35 | 66/34 | 10 | / | 20 | 70/30 |
| 4 | Et ₂ O | -35 | 59/41 | 11 | H ₂ O | 5 | 63/37 |
| 5 | Acétone | -35 | 67/33 | 12 | [Bmin][BF ₄] | 20 | 70/30 |
| 6 | DMF | -35 | 59/41 | 13 | MeCN | 85 | 67/33 |
| 7 | EtOH | -35 | 61/39 | 14 | MeCN | 20 | 66/34 |

Ces expériences ont permis de montrer que le solvant et la température n'étaient pas des facteurs déterminants pour la régiosélectivité de l'addition de l'amine **182a** sur **170**. Cependant, il est à noter que cette addition est très efficace, puisqu'elle a lieu dans tous les solvants (à l'exception de l'hexane) avec une conversion totale et rapide, sauf dans le cas de [Bmin][BF₄] où 48h de réaction sont nécessaires pour transformer totalement la dilactone en amide.

III.4.2.2 Ouverture par des amines en présence d'un activateur

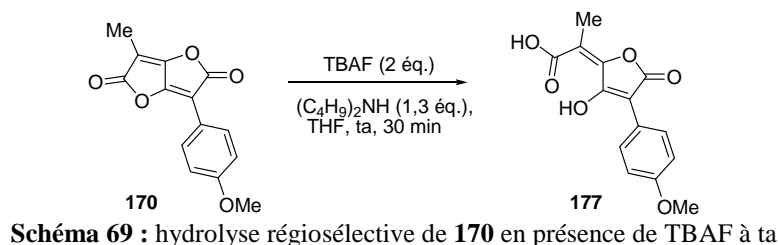
Afin d'orienter la régiosélectivité de l'ouverture de **170** par la dibutylamine, l'ajout d'une espèce activatrice, qui devrait modifier la réactivité de la dilactone ou du moins modifier l'environnement chimique des groupements carbonyles, a été envisagé. Il est nécessaire dans ce cas d'inverser l'ordre d'addition par rapport aux expériences précédentes et d'ajouter l'amine sur la dilactone, préalablement mise en contact de l'additif. Les différentes espèces étudiées et le ratio **183a/184a** sont présentés au tableau 12.

Tableau 12 : influence d'un additif sur l'addition de dibutylamine **182a** sur **170**

| Entrée | Additif (éq.) | Solvant, T | Ratio 183a/184a |
|--------|--------------------------------------|-------------|------------------------|
| 1 | / | MeCN, 20°C | 64/36 |
| 2 | PPh ₃ (0,2) | MeCN, 20°C | 67/33 |
| 3 | NaCN (0,2) | MeCN, 20°C | 67/33 |
| 4 | DABCO (0,2) | MeCN, 20°C | 66/34 |
| 5 | HMPA (0,2) | MeCN, 20°C | 62/38 |
| 6 | TMSOTf (0,2) | MeCN, 20°C | 62/38 |
| 7 | Ti(O <i>t</i> Pr) ₄ (0,2) | MeCN, 20°C | 69/31 |
| 8 | Al(O <i>t</i> Bu) ₃ (0,2) | MeCN, 20°C | 69/31 |
| 9 | Al(O <i>t</i> Bu) ₃ (0,2) | DCM, 20°C | 62/38 |
| 10 | Al(O <i>t</i> Bu) ₃ (0,2) | DMF, 20°C | 64/36 |
| 11 | Al(O <i>t</i> Bu) ₃ (0,2) | MeCN, -35°C | 68/32 |
| 12 | TBAF (2) | THF, 20°C | / |

Il a tout d'abord été confirmé que l'ordre d'addition des réactifs était sans conséquence sur la régiosélectivité (tableau 12, entrée 1). Ainsi, en ajoutant en 1 h une solution d'amine sur une solution de **170** dans l'acétonitrile à température ambiante, le ratio **183a/184a** est de 64/36 (contre 66/34 avec l'ordre d'addition inverse, voir le tableau 11, entrée 14). L'influence de différents additifs, préalablement mis en contact de la dilactone avant addition de l'amine, a ensuite été étudiée. Les bases de Lewis (tableau 12, entrées 2-6) sont sans effet sur la régiosélectivité, de même que les acides de Lewis (tableau 12, entrées 6-8). Avec le tri-*iso*-propoxyde d'aluminium, des changements de solvant et de température se sont également révélés être sans influence (tableau 12, entrée 8-11). Enfin, l'ajout de

fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) a donné un résultat surprenant, puisque aucune trace de l'amide attendu n'a pu être détectée. Il s'est formé le produit d'hydrolyse de la dilactone, qui correspond à l'acide **177**. L'observation intéressante dans ce résultat est que cet acide est obtenu quantitativement et sous forme du seul isomère, celui de type I (schéma 69).



L'hydrolyse de la dilactone peut être expliquée par le fait que la solution commerciale de TBAF dans le THF contient toujours, d'après les fournisseurs, environ 5% d'eau (ou alors de la présence d'hydroxyde de *tetra*-butylammonium comme impureté dans la solution de TBAF). Dans les conditions opératoires, c'est-à-dire deux équivalents de TBAF, l'eau est en excès par rapport à la dilactone, ce qui peut expliquer son hydrolyse complète. Cependant, lors de l'étude de l'influence du solvant, il a été remarqué que la réaction d'ouverture de **170** par la dibutylamine pouvait s'effectuer en milieu aqueux (tableau 11, entrée 11). Dans ce cas, aucune réaction d'hydrolyse de la dilactone n'avait été observée.

Ceci laisse donc penser que le TBAF réagit avec la dilactone pour former une espèce « activée » qui peut réagir avec l'eau présente dans le milieu. Le fait de n'avoir obtenu qu'un seul isomère de l'acide **177** laisse supposer que cette activation se fait de manière régiosélective.

Ainsi, l'influence de la quantité de TBAF ainsi que de la température sur la réaction a été étudiée, dans le but de limiter la réaction d'hydrolyse (tableau 13).

L'addition de 0,2 équivalent de TBAF à -78°C , suivi par l'ajout de l'amine **182a** à cette même température permet d'éviter la réaction d'hydrolyse et les deux amides sont obtenus avec un ratio de 73/27 en faveur du produit de type I (tableau 13, entrée 1), ce qui représente une légère augmentation par rapport aux conditions initiales dans le THF sans activateur (tableau 11, entrée 3). L'augmentation de la quantité de TBAF à -78°C permet d'augmenter encore la régiosélectivité pour obtenir des ratios supérieurs à 84% en produit de type I (tableau 13, entrées 2,3). Dans ces réactions, la source de TBAF n'a pas changé, mais le fait de se placer à basse température permet à l'amine, plus nucléophile, de réagir avant l'eau

présente dans le milieu. La même réaction à -35°C avec 1 équivalent de TBAF permet une légère augmentation du ratio I/II (tableau 13, entrée 4).

Tableau 13 : influence de la quantité de TBAF et de la température sur la réaction de **182a** et **170**

| Entrée | Additif (éq.) | Solvant, T | Ratio 183a/184a |
|--------|---------------|---|------------------------|
| 1 | TBAF (0,2) | THF, -78°C | 73/27 |
| 2 | TBAF (1) | THF, -78°C | 84/16 |
| 3 | TBAF (2) | THF, -78°C | 86/14 |
| 4 | TBAF (1) | THF, -35°C | 87/13 |
| 5 | TBAF (2) | THF, -35°C puis -78°C | 98/2 |
| 6 | TBAC (2) | THF, -35°C puis -78°C | 76/24 |
| 7 | CsF (2) | THF, -35°C puis -78°C | 64/36 |

Finalement, les meilleures conditions ont été obtenues en ajoutant lentement (en 15 min) la solution de TBAF sur la dilactone à -35°C et, après 15 min d'agitation, en ajoutant l'amine **182a** à -78°C . Après 15 min à cette température et retour à température ambiante, les amides **183a** et **184a** sont obtenus avec un excellent ratio de 98/2 en faveur du produit de type I (tableau 13, entrée 5). Ces mêmes conditions ont été appliquées en utilisant d'autres activateurs, afin de les comparer au TBAF. Ainsi le chlorure de tétrabutylammonium (TBAC, tableau 13, entrée 6) et le fluorure de césium (tableau 13, entrée 7) donnent de moins bons résultats que le TBAF, ce qui montre que la présence des deux ions du TBAF, soit l'anion fluorure et le cation tétrabutylammonium, est essentielle à la régiosélectivité de la réaction. Au vu de ces résultats, il est envisageable que les ions fluorures activent la dilactone, formant une espèce du type fluorure d'aryle, plus réactive, et que le contre-ion volumineux tétrabutylammonium est à l'origine de la régiosélectivité (schéma 70).

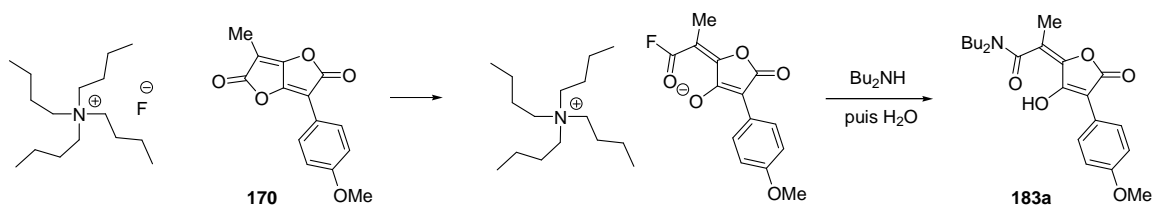
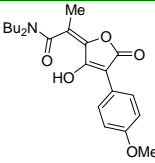
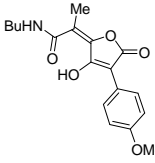
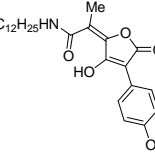
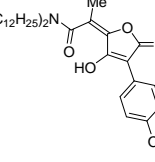
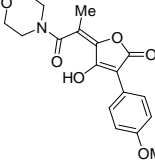
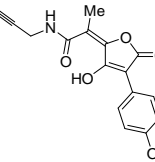


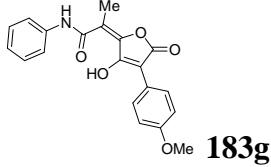
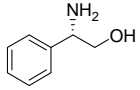
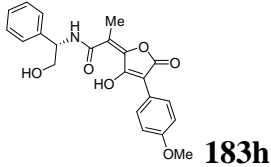
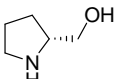
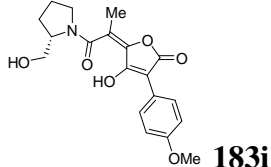
Schéma 70 : hypothèses sur l'activation de **170** par TBAF

III.4.2.3 Ouverture de **170** par diverses amines

Ces conditions optimisées ont ensuite été appliquées à différentes amines, en comparant les ratios obtenus en absence et en présence de TBAF (tableau 14). Les ratios I/II ont été déterminés par intégration en RMN ¹H du brut réactionnel, les rendements présentés sont des rendements isolés en composé de type I.

Tableau 14 : réactivité de la dilactone **170** avec différentes amines

| Entrée | Amine 182 (éq.) | Ratio 183/184 | | Produit type I 183 | Rdt 183 (%) |
|--------|---|----------------------|--------------|--|--------------------------|
| | | sans TBAF | avec TBAF | | |
| 1 | Bu ₂ NH 182a (1,3) | 58/42 | 98/2 |  183a | 94 |
| 2 | BuNH ₂ 182b (2,5) | 55/45 | 92/8 |  183b | 83 |
| 3 | C ₁₂ H ₂₅ NH ₂ 182c (2,5) | 52/48 | 92/8 |  183c | 88 |
| 4 | (C ₁₂ H ₂₅) ₂ NH 182d (2,5) | 64/36 | >99/1 |  183d | 80 |
| 5 | Morpholine 182e (2,5) | 52/48 | >99/1 |  183e | 96 |
| 6 | amine propargylique 182f (1,3) | 58/42 | >99/1 |  183f | 96 |

| | | | | | |
|---|--|-------|-------|--|----|
| 7 | Aniline 182g (1,3) | 85/15 | >99/1 |  | 25 |
| 8 |  182h (1,3) | 67/33 | 95/5 |  | 92 |
| 9 |  182i (2,5) | 69/31 | >99/1 |  | 98 |

Toutes ces réactions ont montré une amélioration significative du ratio type I/type II, grâce à l'ajout de TBAF et les produits de type I **183** ont pu être isolés avec de bons rendements. Les amines secondaires aliphatiques **182a** et **182d** réagissent avec une meilleure sélectivité que leur homologue primaire **182b** et **182c** (comparer au tableau 14 les entrées 1 et 4 aux entrées 2 et 3). La morpholine **182e** (tableau 14, entrée 5) et l'amine propargylique **182f** (tableau 14, entrée 6) réagissent avec un contrôle total de la régiosélectivité, aucune trace du produit de type II n'a pu être détecté par RMN ^1H , et le produit de type I a pu être obtenu avec d'excellents rendements. Le cas de l'aniline **182g** est particulier (tableau 14, entrée 7). Dans ce cas, la régiosélectivité sans TBAF est largement supérieure aux autres cas (ratio 85/15). Malheureusement, lorsque du TBAF est ajouté, le produit majoritaire obtenu est l'acide **177**. L'aniline étant beaucoup moins nucléophile que les amines aliphatiques (le doublet électronique de l'azote étant délocalisé sur le noyau aromatique), elle ne permet probablement pas d'empêcher l'attaque de l'eau contenue dans la solution commerciale de TBAF. Cependant, le produit de type I a tout de même pu être obtenu de manière satisfaisante, en absence de TBAF, avec un rendement de 78%. Enfin, en faisant réagir des amino-alcools **182h** et **182i**, la chimiosélectivité de la réaction a été étudiée (tableau 14, entrées 8 et 9). Des deux sites nucléophiles de ces molécules, c'est sans surprise l'amine qui réagit exclusivement, avec une très bonne régiosélectivité, pour donner les amides correspondants **183h** et **183i** avec d'excellents rendements.

L'activation régiosélective de la dilactone **170** par le TBAF s'est donc révélée être une méthode générale pour la formation d'amides de type I **183**, dans le cas d'amines non

aromatiques. L'ouverture de la dilactone **170** s'effectue avec une excellente régiosélectivité et les produits **183** ont pu être isolés avec de très bons rendements.

III.4.2.4 Cas d'une diamine

La préparation de dimères d'acide pulvinique a également été envisagée, par réaction d'une diamine sur la dilactone **170**. Le 1,3-diaminopropane **185** a été choisi comme modèle de diamine (schéma 71).

Le 1,3-diaminopropane **185** (1 éq.) a été ajouté à la dilactone **170** (2 éq.) dans le DCM, ce qui a immédiatement provoqué la formation d'un précipité. Après une nuit d'agitation à température ambiante et purification, ce précipité a été caractérisé comme étant le produit **187**, de type I, correspondant à la réaction d'ouverture d'un équivalent de dilactone par la diamine. Le fait que le produit précipite dans le DCM empêche probablement l'ouverture du second équivalent de dilactone. Le produit **187** est toutefois intéressant, puisqu'il s'agit d'un amide possédant une fonction amine libre, ce qui permet d'imaginer qu'il soit un antioxydant pouvant avoir de bonnes liaisons avec l'ADN.

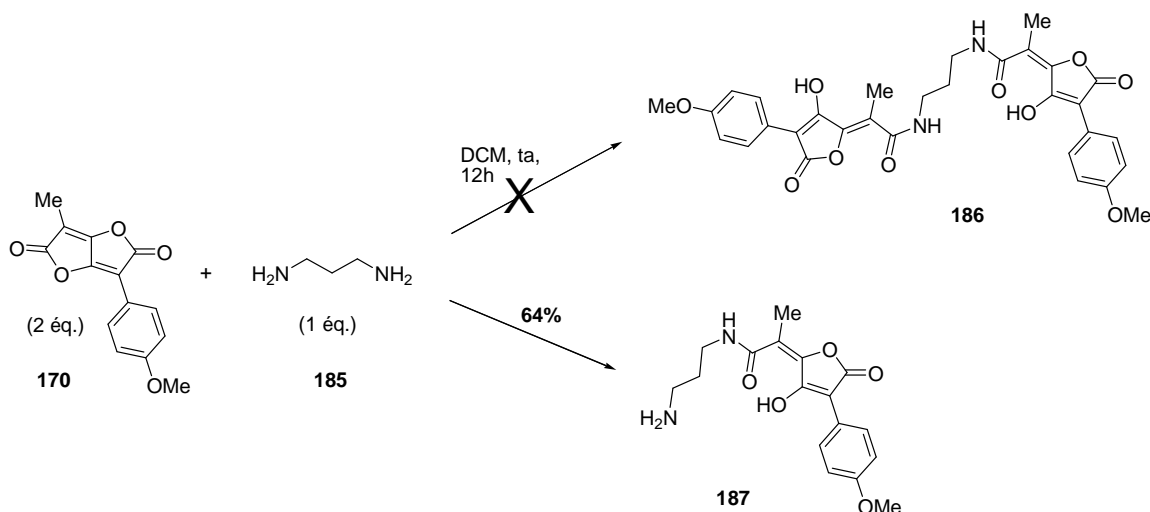


Schéma 71 : réactivité de la dilactone **170** avec une diamine **185**

Pour étudier la formation du dimère, cette réaction a été menée en deux temps. Dans un premier temps, 1 équivalent de dilactone est placé en présence de 1 équivalent de 1,3-diaminopropane dans le DCM : le produit **187** précipite. Après évaporation du DCM, ce précipité est repris dans du DMSO (partiellement soluble) et un second équivalent de

dilactone est ajouté. Le milieu devient progressivement limpide et le produit **187** se trouve totalement consommé pour fournir deux produits. Malheureusement, les produits obtenus sont délicats à extraire et à purifier, et l'analyse par RMN n'a pas permis de déterminer clairement leur structure. Une analyse par LC-MS a permis de détecter deux produits ayant la masse attendue. Ceci laisse donc penser que le dimère attendu **186** était bien formé, mais vu les difficultés rencontrées dans les étapes d'extraction et de purification, ainsi que la faible solubilité des produits obtenus dans les solvants usuels, cette étude n'a pas été menée plus loin.

III.4.3 Ouverture de la dilactone **170** par des alcools

La réactivité de la dilactone **170** a ensuite été étudiée en utilisant comme espèces nucléophiles des alcools.

III.4.3.1 Ouverture directe par des alcools

Les alcools **188** ne réagissent pas avec la dilactone à température ambiante, contrairement aux amines. Il est nécessaire de former l'alcoolate (1 éq.) avant addition par portions de la dilactone **170** (1 éq.) à -35°C dans le THF, afin de permettre la formation de des deux esters attendus **189** et **190** (tableau 15).

Tableau 15 : réactivité de **170** avec des alcools **188**

| Entrée | Alcool | 189 , rdt | 190 , rdt |
|--------|---|------------------------|------------------------|
| 1 | <i>i</i> PrOH 188a | 189a 69% | 190a 9% |
| 2 | PhCH ₂ OH 188b | 189b 55% | 190b 11% |
| 3 | C ₁₂ H ₂₅ OH 188c | 189c 34% | 190c 8% |

L'*isopropanol* **188a** a été le premier alcool étudié. En générant l'alcoolate à -78°C à l'aide de *n*-butyllithium, puis en ajoutant la dilactone **170** à -35°C , les deux esters **189a** et **190a** ont été obtenus, avec des rendements isolés de 69% pour le type I et 9% pour le type II (tableau 15, entrée 1). Les différences, remarquées pour les amines, entre ces deux types de produits sont également observées dans ce cas : aspect, polarité, spectre RMN (figure 12).

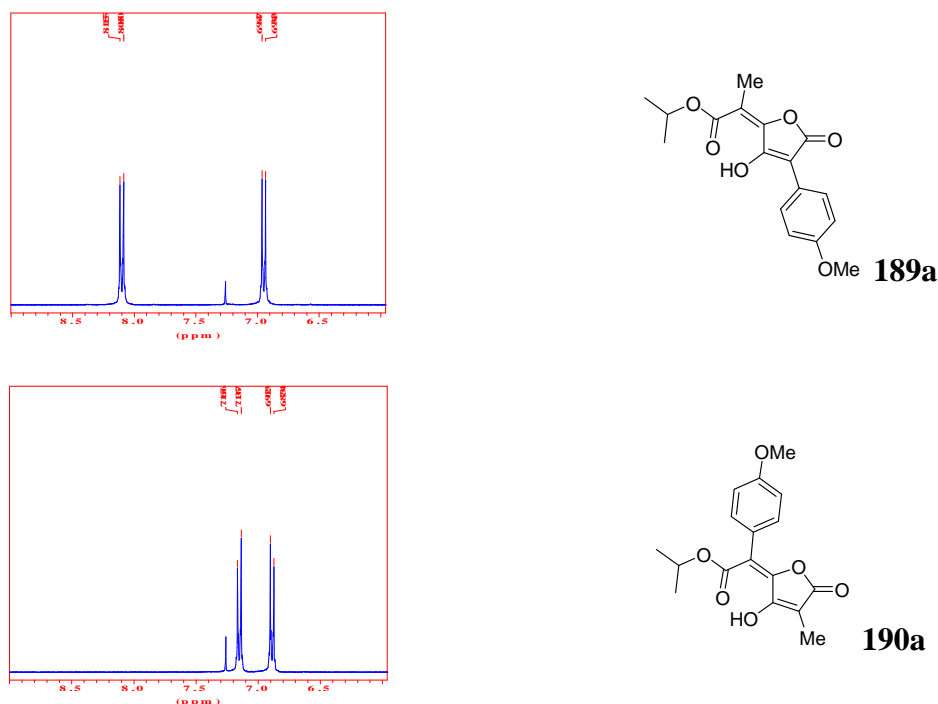


Figure 12 : spectres RMN ^1H des protons aromatiques de **189a** et **190a** (CDCl_3 , 300 MHz)

L'alcool benzylique **188b** a également été mis à réagir dans ces conditions et les esters ont été isolés avec des rendements comparables de 55% pour le type I **189b** et 11% pour le type II **190b** (tableau 15, entrée 2). Avec le dodécanol, les rendements sont plus faibles puisque 34% de l'ester de type I **189c** et 8% de type II **190c** ont été obtenus (tableau 15, entrée 3).

La réactivité de **170** avec le méthanol **188d** a été testée dans d'autres conditions. Ainsi, en utilisant un large excès de méthanol, sans solvant et après une nuit à reflux, les deux esters isomères **161b** et **190d** ont pu être obtenus dans des rapports quasiment équimolaires (schéma 72).

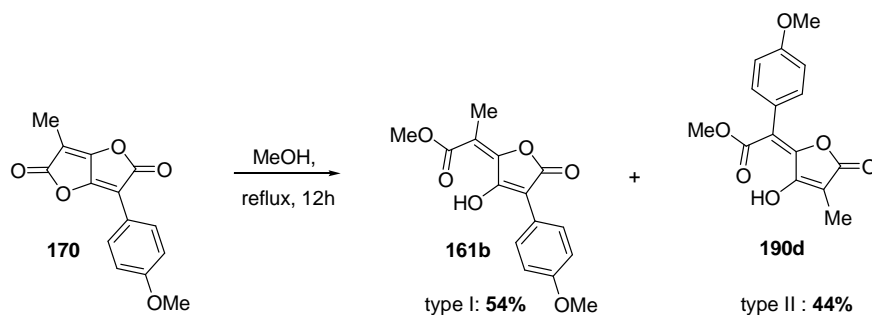


Schéma 72 : réactivité de **170** au reflux du méthanol

III.4.3.2 Etude de la régiosélectivité d'ouverture de **170** par l'isopropanol

L'*isopropanol* **188a** ne réagit pas avec la dilactone **170** dans les conditions neutres décrites pour les amines, l'ajout d'une base forte est nécessaire afin de former l'alcoolate correspondant qui est suffisamment nucléophile pour provoquer la réaction d'ouverture. Afin d'éviter l'utilisation d'une base forte et d'améliorer la régiosélectivité de la formation des esters *isopropyliques* **189a** et **189b**, plusieurs conditions ont été étudiées, inspirées des résultats obtenus dans le cas de amines (tableau 16).

Tableau 16 : influence des conditions réactionnelles sur la formation de **189a** et **189b** à partir de **170**

| Entrée | Conditions | Ratio 189a/189b/177 |
|--------|--|----------------------------|
| 1 | <i>i</i> PrOH (solvant), reflux, 12h | 59/41/0 |
| 2 | <i>i</i> PrOH (1 éq.), TBAF (1 éq.), THF, -35°C | 65/5/30 |
| 3 | <i>i</i> PrOH (1 éq.), TBAF (2 éq.), THF, -35°C | 51/0/49 |
| 4 | <i>i</i> PrOH (5 éq.), TBAF (1 éq.), THF, -35°C | 79/2/19 |
| 5 | <i>i</i> PrOH (5 éq.), TBAF (1 éq.), 4 ÅMS, THF, -35°C | 70/0/30 |
| 6 | <i>i</i> PrOH (10 éq.), TBAF (1 éq.), THF, -35°C à -78°C | 83/0/17 |
| 7 | <i>i</i> PrOH (1 éq.), CsF (2 éq.), THF, -35°C | 64/29/7 |
| 8 | <i>i</i> PrOH (2,5 éq.), TBAF* (2 éq.), THF, -35°C à -78°C | 95/5/0 |

L'utilisation d'*i*PrOH en tant que solvant permet d'effectuer la réaction d'ouverture ; cependant, les conditions réactionnelles doivent être dures (12h à reflux) et les deux esters **189a** et **190a** sont obtenus sans grande sélectivité (tableau 16, entrée 1). L'utilisation de TBAF a provoqué la formation d'un troisième produit, l'acide **177**, correspondant à l'hydrolyse de la dilactone par l'eau présente dans la solution de TBAF (voir paragraphe précédent). Dans ce cas, et même en se plaçant à basse température, la différence de réactivité entre l'alcool et l'eau est faible (contrairement aux cas des amines) et une part importante

d'acide **177** est obtenue (tableau 16, entrées 2,3). Cependant, il est à noter que dans le cas d'utilisation de TBAF, la régiosélectivité en faveur de l'ester de type I **189** est largement améliorée. L'utilisation d'une plus grande quantité d'alcool permet de diminuer la proportion d'acide **177** (tableau 16, entrée 4). L'ajout de tamis moléculaire 4Å, agent desséchant, n'a pas eu d'effet sur la formation du produit d'hydrolyse (tableau 16, entrée 5). Enfin, l'ajout de 10 équivalents d'*i*PrOH et l'abaissement de la température fournit de bons résultats puisque la proportion d'acide devient plus faible et le produit de type I **189a** a pu être isolé avec un très bon rendement de 83% (tableau 16, entrée 6).

Pour remédier à l'utilisation d'un large excès d'alcool, il semble nécessaire d'éliminer l'eau apportée par la solution de TBAF commerciale. L'utilisation de fluorure de césium a été envisagée (tableau 16, entrée 7). Malheureusement, comme dans le cas des amines, la régiosélectivité est moins bonne dans ce cas. Néanmoins, la réaction d'ouverture a bien eu lieu, ce qui semble confirmer une activation de la dilactone par les ions fluorures.

Récemment, DiMugno a décrit la préparation de TBAF anhydre (noté TBAF^{*}).¹⁰⁵ En effet, le TBAF est, dans les conditions classiques, toujours préparé sous forme d'hydrate. Une fois déshydraté, le TBAF a tendance à se décomposer via une dégradation d'Hoffmann à température ambiante et le sel obtenu est contaminé par la présence d'ions bifluorures (HF₂⁻) et de tributylamine.¹⁰⁶ DiMugno a donc étudié la génération de TBAF^{*} directement dans des solvants aprotiques, par une réaction de substitution nucléophile aromatique, à partir d'hexafluorobenzène et de cyanure de tétrabutylammonium (TBACN, schéma 73).

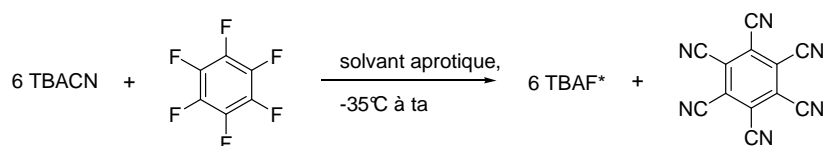


Schéma 73 : préparation de TBAF^{*} par S_NAr

Le TBACN peut lui être obtenu sans trace d'eau par chauffage à 40°C pendant 12h. Différents solvants ont pu être testés et évalués pour optimiser la stabilité du TBAF anhydre généré. Ainsi, il est décrit que :

- ◆ dans le THF, le TBAF^{*} se décompose lentement au-dessus de 0°C ; pour des températures inférieures, la solubilité n'est pas totale,
- ◆ dans l'acétonitrile, le TBAF^{*} est stable pendant plusieurs heures à 25°C,
- ◆ dans le DMSO, le TBAF^{*} est stable plus de 24h à 25°C.

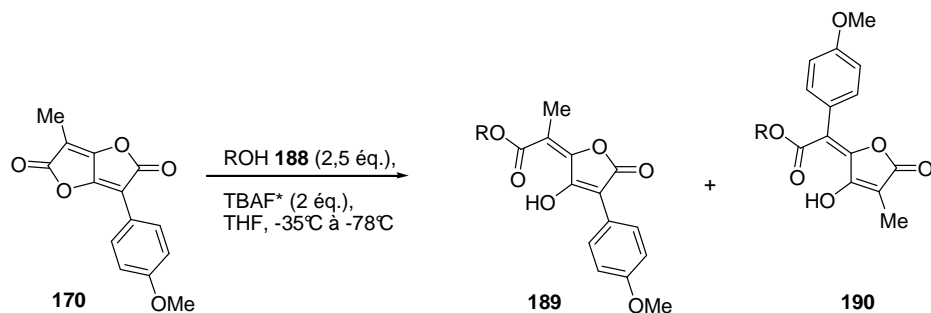
Avec ces informations, le TBAF* a été préparé en solution dans l'acétonitrile, afin d'éviter d'utiliser le DMSO. Le TBAF* est donc généré en mélangeant C₆F₆ (1 éq.) et TBACN (6 éq.) dans l'acétonitrile pendant 1h à température ambiante.

En utilisant cette méthode de génération de TBAF anhydre et avec les conditions optimisées d'ouverture de la dilactone par les amines, la formation de l'acide **177** a pu être évitée et le ratio entre les deux esters a atteint un très bon niveau de 95/5 en faveur de l'ester de type I (tableau 16, entrée 8).

III.4.3.4 Ouverture de **170** par divers alcools

Ces conditions optimisées ont été appliquées avec différents alcools **188** et les esters correspondant de type I **189** ont été isolés (tableau 17).

Les esters de type I **189** ont pu être isolés dans tous les cas avec des rendements convenables, et aucune trace du produit d'hydrolyse **177** n'a été détectée dans ces conditions. L'alcool *isopropylique* **188a** réagit avec une excellent régiosélectivité et l'ester **189a** a pu être obtenu avec un bon rendement de 69% (tableau 17, entrée 1). Dans les autres cas (tableau 17, entrées 2-4), la régiosélectivité est un peu moins bonne, puisque le produit de type II **190** a pu être détecté à hauteur de 15% environ. Ces conditions sont tout de même satisfaisantes, puisque les esters **189** issus de l'alcool benzylique **188b** (tableau 17, entrée 2), du dodécanol **188d** (tableau 17, entrée 3) et du solketal **188e** (tableau 17, entrée 4) ont été isolés avec de bons rendements.

Tableau 17 : ouverture de la dilactone **170** par divers alcools en présence de TBAF*

| Entrée | Alcool | Ratio 189/190 | Produit type I 189 | 189 Rdt (%) |
|--------|---|-------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 | <i>i</i> PrOH 188a | 95/5 | 189a | 69 |
| 2 | BnOH 188b | 85/15 | 189b | 83 |
| 3 | C ₁₂ H ₂₅ OH 188c | 85/15 | 189c | 65 |
| 4 | 188e | 87/13 | 189e | 58 |

III.4.4 Réactivité de 170 avec des nucléophiles carbonés

Dans le but d'obtenir des dérivés pulviniques avec une fonction cétone, la réactivité de la dilactone **170** avec des nucléophiles carbonés a été étudiée (schéma 74).

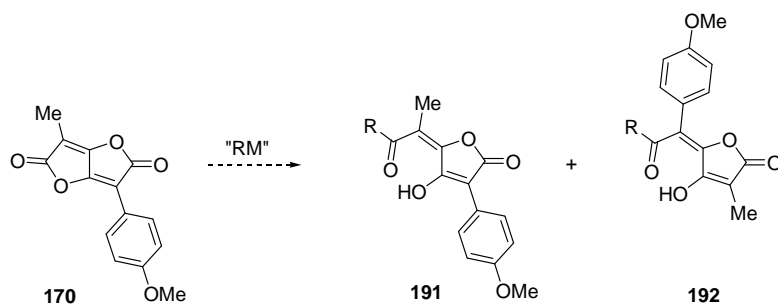


Schéma 74 : ouverture de la dilactone par une espèce organométallique

Plusieurs réactifs ont été testés pour cette réaction, les résultats obtenus sont présentés au tableau 18.

Tableau 18 : réactivité de la dilactone **170** avec des organométalliques

| Entrée | Réactif | Produit(s) et rdt |
|--------|-------------------|---|
| 1 | MeLi | 191a 4% 193a 64% |
| 2 | PhLi | 193b 28% |
| 3 | | 193c 26% |
| 4 | <i>tert</i> -BuLi | / |
| 5 | PhMgBr | / |

L'addition de méthyllithium (1,5 éq.) sur la dilactone a conduit à la formation de la cétone attendue **191a**, mais avec un rendement très faible (tableau 18, entrée 1). Le produit majoritaire de cette réaction est l'alcool **193a**, qui résulte d'une double attaque: le premier équivalent de MeLi ouvre la dilactone pour fournir la cétone **191a** qui réagit avec un second équivalent de MeLi pour donner l'alcool **193a**, avec un bon rendement de 64%, en considérant que seul cet isomère, de type I, a été observé. L'utilisation d'autres dérivés organométalliques a fourni de moins bons résultats. L'emploi de phényllithium (tableau 18, entrée 2) ou de chlorure d'allylmagnésium (tableau 18, entrée 3) ont fourni des mélanges complexes, dans lesquels les cétones attendues n'ont pu être détectées. De façon similaire au cas précédent, les alcools tertiaires **193b** et **193c**, résultant d'une double attaque du réactif, ont été isolés, mais avec des rendements plus faibles, probablement en raison de l'encombrement stérique plus important. L'utilisation de *tert*-butyllithium (tableau 18, entrée 4) ou de bromure de phénylmagnésium (tableau 18, entrée 5) a donné lieu à des mélanges complexes desquels n'ont pu être isolés ni les cétones, ni les alcools tertiaires attendus.

L'utilisation d'un amide de Weinreb pour obtenir les dérivés portant une fonction cétone avec de meilleurs rendements a ensuite été étudiée. L'addition de dérivés organométalliques sur de tels amides est connue pour donner la cétone correspondante ; la polyaddition étant évitée par formation d'un chélate stable après la première addition.¹⁰⁷ Le chlorhydrate de la *N,O*-diméthylhydroxylamine **194** a donc été mis en réaction avec la dilactone, dans le DCM, en présence d'un équivalent de triéthylamine, afin de neutraliser le chlorhydrate. L'amide attendu **195** a été isolé avec un excellent rendement de 90% et un contrôle total de la régiosélectivité (schéma 75).

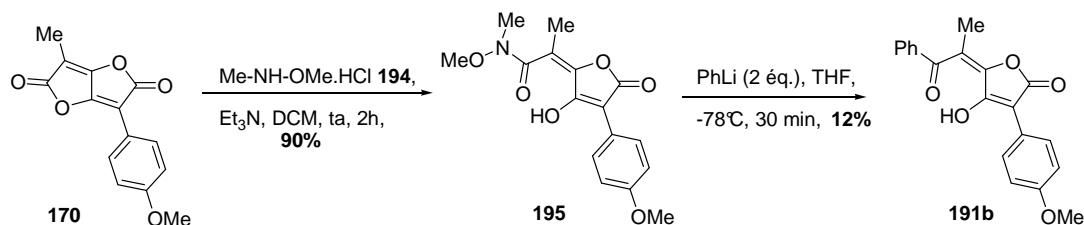
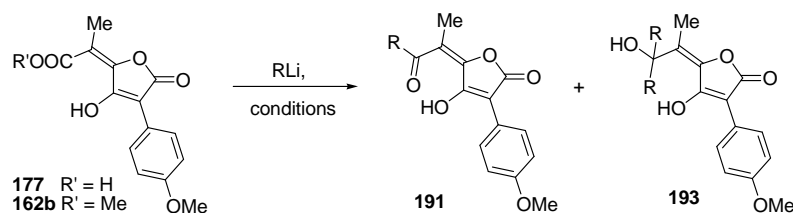


Schéma 75 : formation de l'amide de Weinreb **195** et réactivité avec PhLi

L'addition de phényllithium (2 éq.) à -78°C dans le THF sur **195** a permis d'obtenir la cétone **191b** avec un rendement de 12% seulement. En revanche, le produit de double addition **193b** n'a pas été formé. Les autres espèces organométalliques testées (PhMgBr, MeLi) n'ont pas conduit aux cétones attendues.

Une stratégie alternative a été envisagée, qui consiste à réaliser l'addition d'un organométallique sur un acide ou un ester, en présence de chlorure de triméthylsilyle (TMSCl), ce qui devrait permettre d'éviter la formation de produits de polyadditions.^{108, 109} Les réactivités de l'acide **177** et de l'ester **162b** ont donc été testées dans diverses conditions (tableau 19).

Tableau 19 : réactivité de **177** et **162b** avec des dérivés organolithiés



| Entrée | Substrat | Conditions | Produits |
|--------|-------------|--|--|
| 1 | 177 | MeLi (4 éq.), TMSCl (20 éq.), THF, 0°C, 2h | / |
| 2 | 177 | PhLi (4 éq.), TMSCl (20 éq.), THF, 0°C, 2h | / |
| 3 | 162b | MeLi (2 éq.), TMSCl (5 éq.), THF, -78°C, 1h | 191a (traces) |
| 4 | 162b | PhLi (6 éq.), TMSCl (5 éq.), THF, -78°C, 1h | 162b (maj.), 193b (min.) |
| 5 | 162b | MeLi (2 éq.), THF, -78°C, 10 min | 191a (26%) 193a (57%) 162b (10%) |
| 6 | 162b | PhLi (2 éq.), THF, -78°C, 10 min | 191a (traces) 193a (maj.) 162b (traces) |

Les conditions opératoires décrites pour l'addition du dérivé lithié sur l'acide **177** en présence de TMSCl n'ont pas permis d'obtenir la cétone attendue **191**, ni même l'alcool tertiaire **193** (tableau 19, entrées 1,2). De façon similaire, la même réaction conduite avec l'ester **162b** n'a fourni que des traces de la cétone **191a** en utilisant MeLi (tableau 19, entrée 3), alors que l'utilisation de PhLi n'a permis qu'une très faible conversion de l'ester de départ **162b** qui a été majoritairement récupéré intact (tableau 19, entrée 4). Il semblerait donc que les conditions employant TMSCl ne soient pas efficaces dans ce cas. En absence de TMSCl, l'action de MeLi sur **162b** conduit à trois produits séparés par chromatographie sur gel de silice. Le produit majoritaire est l'alcool tertiaire **193a**, obtenu avec un rendement de 57% (tableau 19, entrée 5). En plus de cet alcool ont pu être isolés la cétone désirée **191a** avec un rendement de 26%, ainsi que 10% d'ester **162b** n'ayant pas réagi. Ces mêmes conditions appliquées à PhLi ont fourni des résultats moins satisfaisants, puisque l'alcool **193b** est obtenu très majoritairement, seulement accompagné de traces de cétone **191b** et d'ester **162b** n'ayant pas réagi (tableau 19, entrée 6).

Les différentes conditions opératoires testées n'ont pas permis d'obtenir de façon efficace les cétones désirées. Seule la cétone **191a** a pu être obtenue avec un rendement suffisant pour permettre son isolement et sa caractérisation complète. Celle-ci sera donc testée pour son activité antioxydante et offre un nouveau point de modification structurale sur le motif pulvinique.

III.4.5 Conclusions

La synthèse de la dilactone **170** a été mise au point en 7 étapes, à partir d'un dérivé tétronique, avec un rendement global satisfaisant de 39%. Selon les conditions opératoires utilisées, l'ouverture de **170** par des amines et des alcools peut se faire avec une excellente régiosélectivité pour former des amides et des esters de type I. De plus, la réaction de **170** avec des nucléophiles carbonés a permis la préparation de nouveaux dérivés de type I, portant une fonction alcool ou cétone.

Cette méthode d'ouverture de **170** s'est avérée efficace et générale, ce qui a permis de préparer de nombreux produits diversifiés et qui laisse la porte ouverte pour la synthèse de nouveaux analogues. De plus, l'ouverture « non-contrôlée » a permis de préparer plusieurs produits de type II, dont il sera utile de tester l'activité antioxydante.

III.5 Autres produits synthétisés

III.5.1 Produits de type II

L'ouverture de la dilactone **170** a permis de préparer quelques produits de type II, portant une fonction amide ou ester. Tous ces produits sont substitués par un groupement méthoxyle sur l'aromatique. Afin de compléter la série de type II, il semblait important de disposer de quelques produits supplémentaires portant d'autres substituants sur le noyau aromatique, afin de pouvoir les comparer aux produits de type I.

La voie d'accès à la dilactone **170** *via* un intermédiaire de type tétronique a donc été adaptée pour préparer quelques esters de type II, différemment substitués au niveau du noyau aromatique (schéma 76).

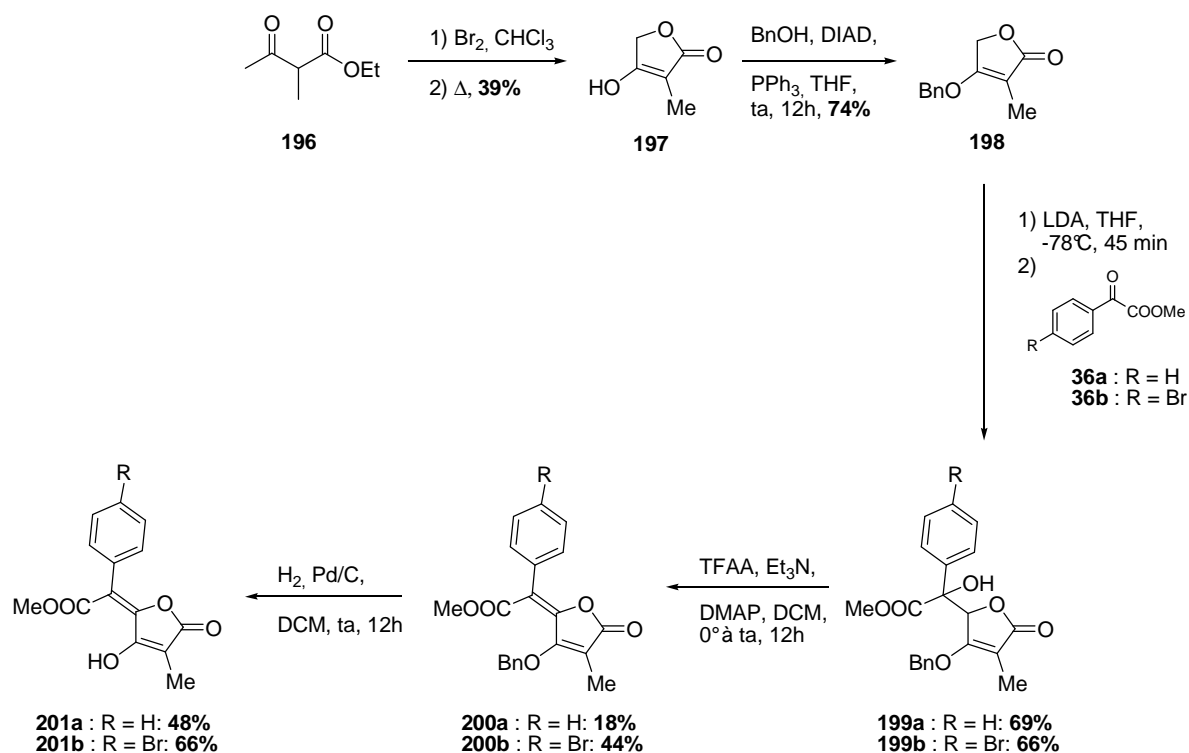


Schéma 76 : préparation de produit de type II **201** à partir d'un dérivé tétronique **197**

Le dérivé tétronique **197** a été préparé à partir du 2-méthylacétoacétate d'éthyle **196**, d'après la méthode décrite par Toshio, avec un rendement moyen.¹¹⁰ L'utilisation du groupement benzyle comme groupement protecteur a été guidée par les résultats obtenus sur ce type de substrat en utilisant un groupement méthoxyle (voir paragraphe III.3.3.3,

substitution de OMe par Br). La protection sous forme d'éther benzylique s'effectue de manière efficace dans les conditions de Mitsunobu, pour donner le composé **198**. La réaction de l'anion de **198** avec deux cétoesters aromatiques a ensuite été engagée. Pour R=H, le produit est commercial, il s'agit du formate de benzoyle **36a**. Pour R=Br, le produit **36b** n'est pas commercial et a donc dû être préparé. Ceci a été effectué à partir de 4-bromo-phénylacétate de méthyle, par oxydation de la position benzylique selon la méthode décrite par Wang, en passant par le composé diazo **202** correspondant (schéma 77).¹¹¹

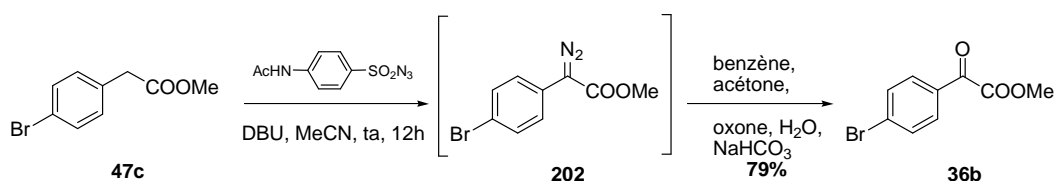


Schéma 77 : préparation du cétoester **36b**

L'addition de ces deux cétoesters **36** sur le dérivé tétronique **198** se fait avec de bons rendements et donne un mélange équimolaire de deux formes diastéréoisomères de **199**. L'étape qui a posé le plus de problème est l'étape de déshydratation. En effet, les conditions utilisées dans les cas précédents ne se sont pas révélées efficaces puisque le produit déshydraté **200** n'a pu être obtenu qu'avec des rendements faibles de 18% pour **200a** et 44% pour le composé bromé **200b**. La conversion de l'alcool de départ **199** n'est pas complète et ni des temps de réaction plus longs, ni un chauffage du milieu n'ont permis d'améliorer ce résultat. Dans le cas du produit **200a**, seul l'isomère *E* a été obtenu, alors que pour **200b**, les 2 isomères *E* et *Z* (*E/Z* : 75/25) ont été obtenus et séparés. Pour l'étape de déprotection par hydrogénation catalytique, seul l'isomère *E* du dérivé bromé a été engagé. La libération de l'énol se fait dans les deux cas avec des rendements moyens pour conduire aux deux nouveaux produits **201** de type II.

Cette voie de synthèse a permis la préparation de deux nouveaux esters méthyliques de type II **201a** et **201b**. Les rendements obtenus ici sont beaucoup moins satisfaisants que dans les synthèses précédemment décrites, mais l'important était ici d'obtenir ces produits dans des quantités suffisantes pour effectuer les tests d'activité antioxydante. Les conditions réactionnelles n'ont donc pas été optimisées.

III.5.2 Diester et diacide

La synthèse d'un dérivé portant deux fonctions acides carboxyliques a été étudiée. Pour cela, l'anion de l'acide tétronique **174** a été mis à réagir avec le cétomalonate de diéthyle **203**, pour fournir l'alcool **204** (schéma 78).

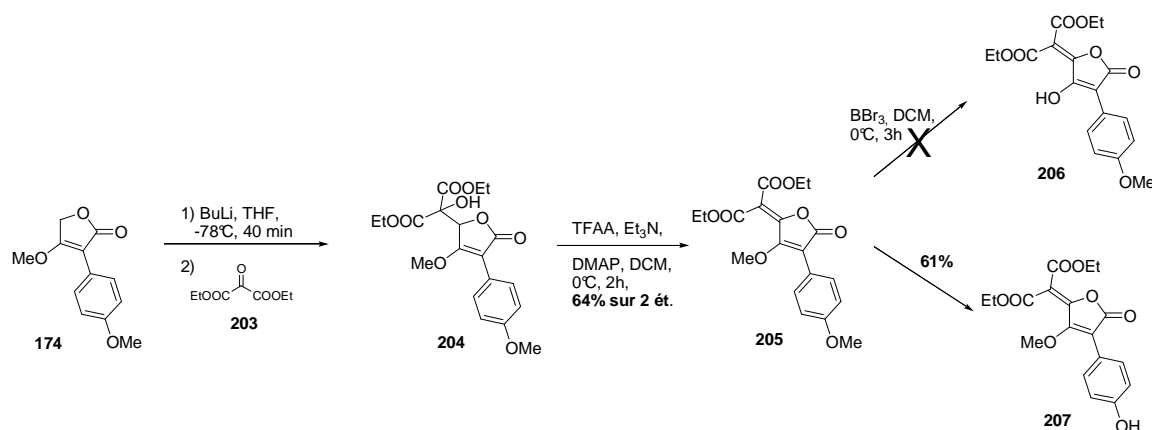


Schéma 78 : formation du diester **207** à partir de **174**

Après déshydratation, l'alcène correspondant **205** a été obtenu avec un bon rendement global de 64% sur les deux étapes. Lors de l'étape de déprotection avec le tribromure de bore, un produit légèrement jaune a été isolé, dont les caractéristiques du spectre RMN ^1H sont en accord avec un produit ayant perdu un groupement méthoxyle par rapport à **205**, mais qui ne correspond pas au produit attendu **206**. En effet, les protons aromatiques ne sont pas aussi déblindés que ce qui était attendu et le signal de l'énol caractéristique vers 14 ppm n'est pas présent. Par contre, un singulet élargi à 5,57 ppm est présent. Une analyse par RMN en deux dimensions a permis de démontrer que le groupement méthoxyle qui avait été déprotégé était celui porté par le noyau aromatique et que le produit formé était l'ester **207**.

La séquence réactionnelle a donc été adaptée, sans protéger la fonction énol du dérivé tétronique (schéma 79). Ainsi, l'acide tétronique non protégé **173** est traité par un excès de $n\text{BuLi}$ et le dianion résultant est mis à réagir avec le cétomalonate de diéthyle **203** pour donner l'alcool **208**. La réaction de déshydratation est engagée directement sur le brut réactionnel et le produit attendu **206** a pu être obtenu avec un rendement moyen de 27% pour les deux étapes. Dans ce cas, l'utilisation d'un large excès de pyridine (7 éq.) a permis d'obtenir de bien meilleurs résultats que la triéthylamine utilisée habituellement.

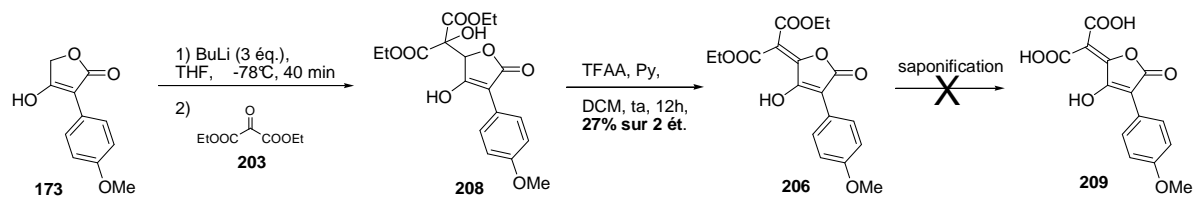
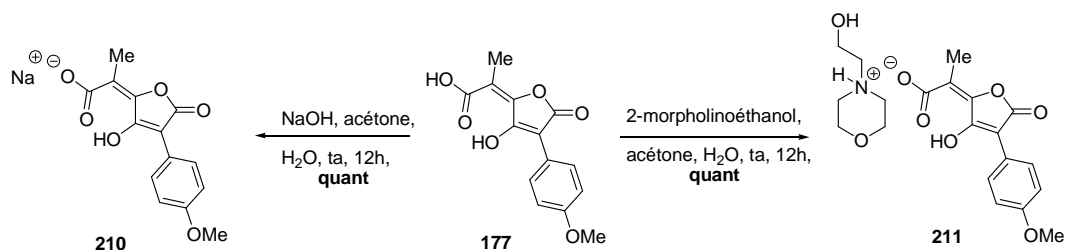


Schéma 79 : formation du diester à partir de 173

Le diester pulvinique **206** a ensuite été engagé dans une réaction de saponification, dans les conditions classiques (NaOH 0,5M, reflux, 30 min) ou des conditions modifiées (LiOH 1M, MeOH, THF). Malheureusement, ces conditions n'ont pas permis l'obtention du diacide souhaité **209** et des mélanges complexes ont été obtenus dans les deux cas. L'étude de la saponification de **206** n'a pas été poursuivie.

III.5.3 Sels de carboxylates

Afin d'améliorer la solubilité de nos produits dans l'eau, des sels de carboxylates de l'acide **177** ont été préparés : le sel de sodium **210** et le sel de 2-morpholinoéthanol **211** (schéma 80).

Schéma 80 : synthèse de sels de carboxylates **210** et **211**

L'acide **177** est dissout dans l'acétone, puis la base est ajoutée en solution dans l'eau. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le milieu est concentré puis lyophilisé. Les sels correspondants sont obtenus quantitativement, comme l'indiquent les spectres RMN, sous la forme de solides oranges

III.5.4 Conclusion

De nouveaux produits ont donc été préparés, par différentes voies de synthèse, avec des résultats variables. Ceci permet d'obtenir plusieurs modifications sur le motif pulvinique, à diverses positions clés pour l'étude de la relation structure-activité. En effet, deux nouveaux produits de type II, substitués différemment sur le noyau aromatique ont été préparés, ainsi qu'un dérivé de type diester et deux sels de carboxylates.

IV. Synthèse d'acides pulviniques lipophiles

Comme introduit au chapitre 1, les membranes cellulaires sont une cible particulièrement importante des EOR. La peroxydation lipidique provoque de multiples dommages sur les cellules. Les produits formés (diènes conjugués, peroxydes, aldéhydes, alcanes) lors de ce processus sont pour la plupart toxiques pour la cellule et parfois mutagènes. Cette formation de dérivés d'oxydation plus hydrophiles que les acides gras entraîne des perturbations de l'architecture de la membrane et altère les fonctions des enzymes et des transporteurs membranaires.

La peroxydation lipidique peut être interrompue dans certains cas par les antioxydants naturels présents dans les membranes, comme la vitamine E. Le radical tocophéryle formé est alors trop peu réactif pour continuer la propagation en chaîne et le tocophérol est régénéré par action de l'acide ascorbique (schéma 81).

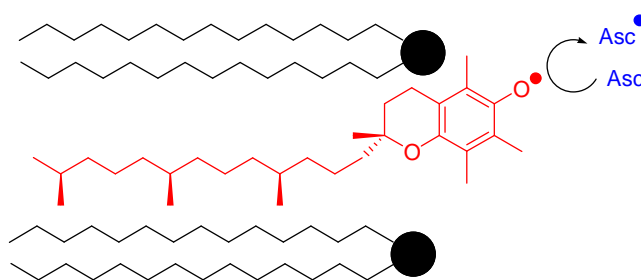


Schéma 81 : représentation schématique de la régénération du tocophérol

La préparation d'antioxydants dérivés d'acides pulviniques comportant une chaîne lipophile a donc été envisagée, ce qui leur permettrait de s'insérer dans les membranes lipidiques et ainsi agir d'une façon similaire à la vitamine E.

Sur la structure de base de l'ester **162b**, plusieurs sites d'insertion de la chaîne lipophile sont possibles (schéma 82).

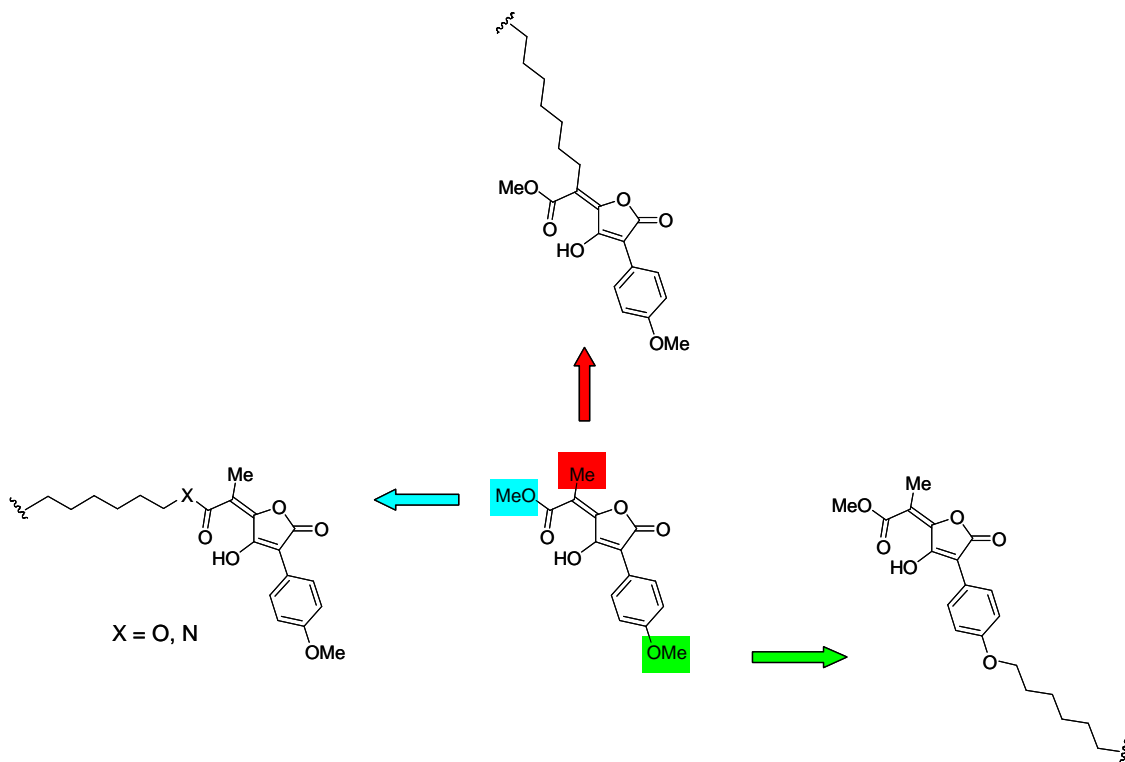


Schéma 82 : sites d'insertion de la chaîne lipidique

3 sites d'insertion de la chaîne lipidique sont envisageables :

- ◆ En remplaçant le groupement **OMe** porté par le noyau aromatique,
- ◆ En remplaçant le groupement **Me** porté par la double liaison *exo*-cyclique,
- ◆ En remplaçant l'ester **OMe**, soit par un ester, soit par un amide (dans ce cas, l'incorporation d'une chaîne unique ou d'une double chaîne est possible).

Suivant la position de la chaîne, des orientations différentes dans les membranes ainsi que des propriétés différentes peuvent être imaginées (schéma 83). Ainsi, l'objectif fixé est de préparer dans un premier temps les différents produits avec une chaîne lipophile de 12 atomes de carbone aux différentes positions.

Pour ce faire, les stratégies de synthèse C et D, présentées précédemment, ont été utilisées. Les synthèses n'ont concerné que la structure des dérivés de type I puisque, selon nos hypothèses, ces molécules devraient présenter une activité antioxydante plus marquée que celle des dérivés de type II.

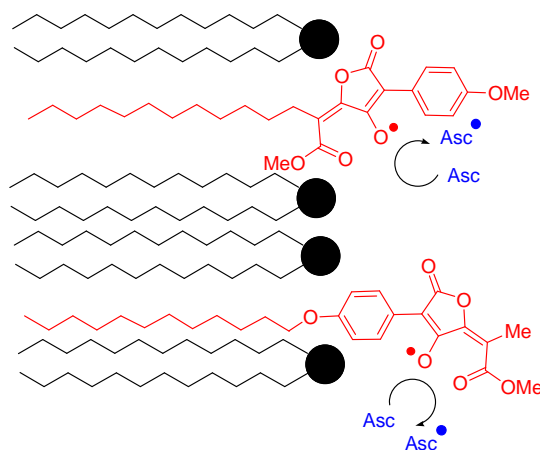
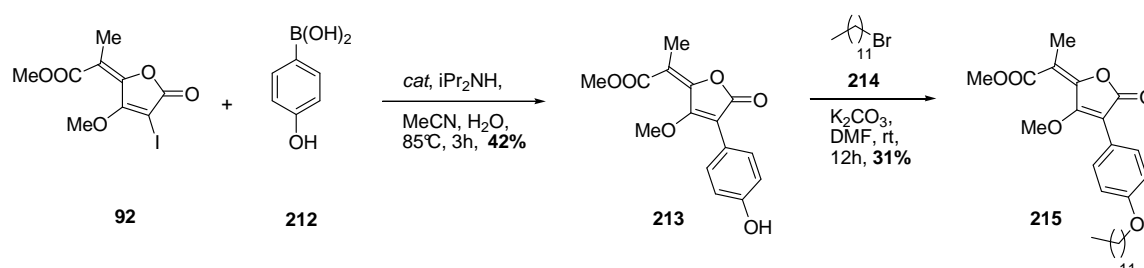


Schéma 83 : incorporation possible d'acides pulviniques lipophiles

IV.1 Chaîne grasse sur le noyau aromatique

L'approche C précédemment exposée a été employée ici. Ainsi, le dérivé iodé **92** a été engagé dans un couplage de Suzuki-Miyaura avec l'acide 4-hydroxyphényl boronique **212** (schéma 84).

Schéma 84 : couplage de Suzuki-Miyaura sur **92** et alkylation

En utilisant les mêmes conditions de couplage que précédemment, il a été nécessaire d'introduire une quantité de catalyseur plus importante afin d'obtenir une conversion totale du produit de départ (7% mol contre 0,7% mol dans les conditions classiques). Ceci a permis d'obtenir le produit souhaité **213** avec un rendement moyen de 42%. L'étape suivante a consisté à introduire la chaîne à 12 carbones sur le phénol. Dans les conditions classiques d'une telle alkylation avec le bromure de dodécyle **214**, en présence de K_2CO_3 dans le DMF et après une nuit à température ambiante, le phénol de départ **213** ne réagit que partiellement. Le produit alkylé **215** n'a pu être obtenu qu'avec un rendement faible de 31%.

Il a donc été décidé d'introduire la chaîne grasse plus tôt dans la synthèse, en la greffant directement sur l'acide boronique (schéma 85). Pour cela, le 4-bromophénol **216** a été alkylé par le bromure de dodécyle **213**, en présence de potasse au reflux de l'éthanol. Le produit alkylé **217** a été obtenu avec un bon rendement et a pu être converti en acide boronique **218**.

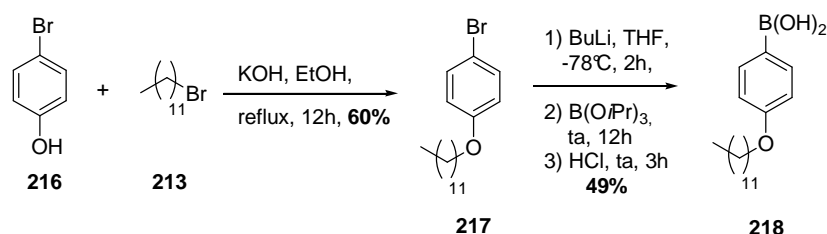


Schéma 85 : préparation de l'acide boronique **218**

Cet acide boronique **218** a ensuite été engagé dans la réaction de couplage avec **92** (schéma 86). La présence de la chaîne lipophile a provoqué de gros problèmes de solubilité ; la réaction s'effectuant dans un mélange acétonitrile/eau. Ce problème de solubilité est probablement à l'origine du rendement modeste obtenu pour **215**. Enfin, dans une dernière étape, le produit **215** a été engagé pour la déprotection de la fonction énol en présence de tribromure de bore. Le produit final déprotégé **219** a été obtenu avec un rendement de 37% seulement.

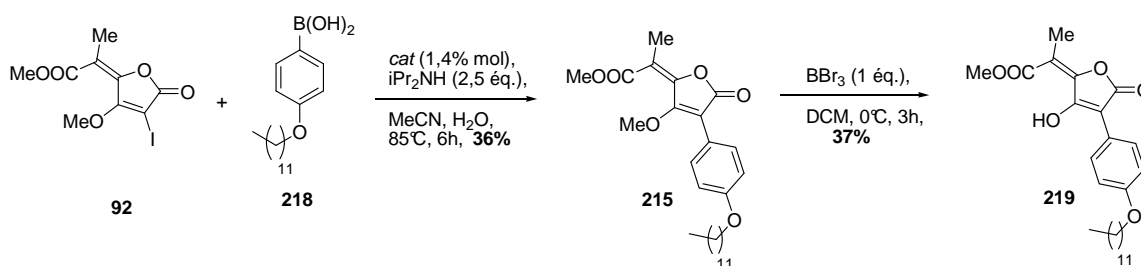


Schéma 86 : synthèse du composé **219**

Les deux stratégies envisagées ont permis de préparer le produit **219** avec des rendements comparables mais modestes. Cependant, une quantité suffisante (100 mg) de ce produit a été obtenue afin d'effectuer les premières analyses souhaitées.

IV.2 Chaîne grasse sur la double liaison exo-cyclique

Dans un premier temps, l'approche C a été adaptée à la préparation de la molécule visée. Dans ce cas, la chaîne à 12 carbones est portée par l'ester utilisé dans l'étape d'addition sur l'anhydride 2-méthoxymaléique **93** (schéma 87).

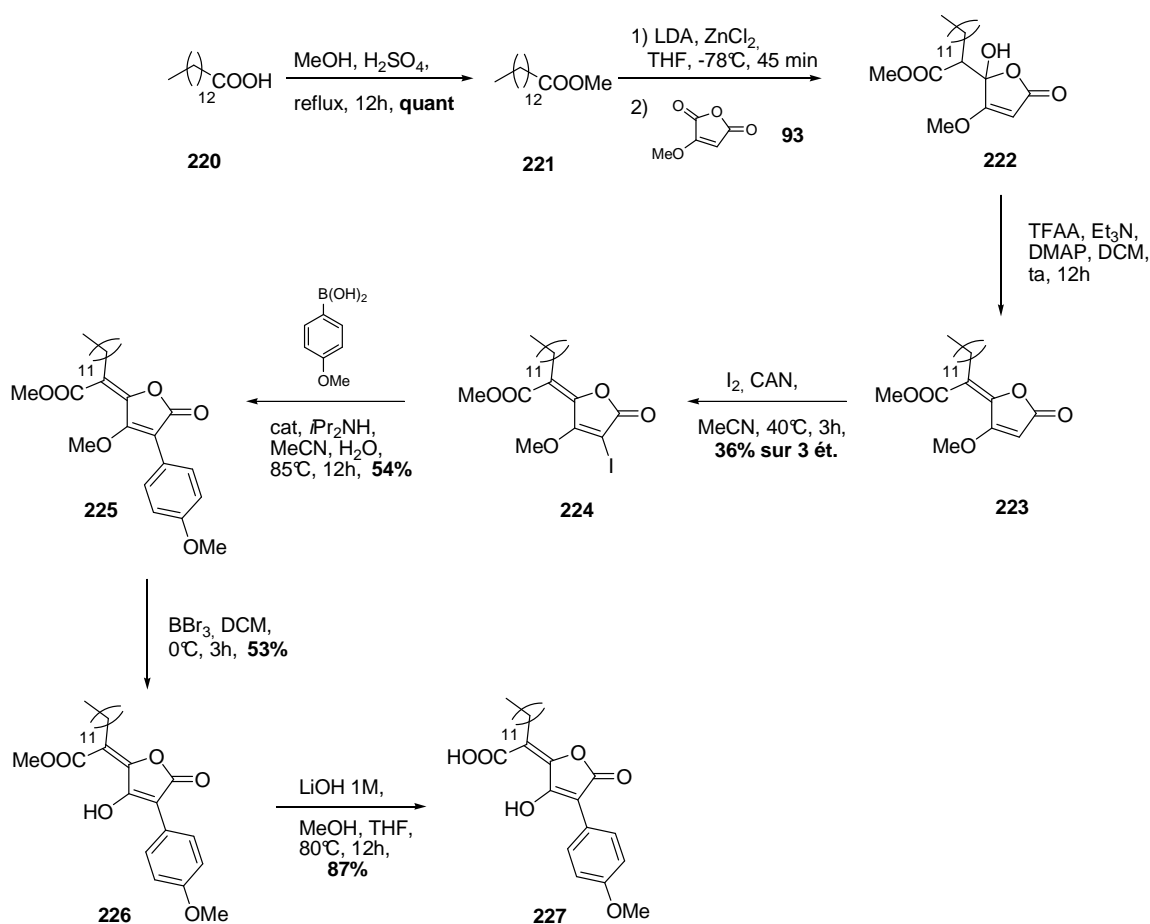


Schéma 87 : voie de synthèse de **226** et **227** par l'approche C

L'acide tétradécanoïque **220** est tout d'abord estérifié pour donner l'ester méthylique correspondant **221**. L'énolate zincique de cet ester est ensuite additionné sur l'anhydride méthoxymaléique **93**, pour donner l'alcool **222** sous forme d'un mélange de formes diastéréoisomères. Cet alcool n'a pas été isolé et a été engagé directement dans l'étape de déshydratation. Celle-ci s'effectue dans les conditions classiques, mais l'alcène obtenu **223** n'a pu être séparé des produits secondaires de la réaction. Le brut réactionnel a donc été mis en réaction avec l'iode et le CAN et le dérivé iodé **224** a pu être isolé avec un rendement global satisfaisant de 36% pour les 3 étapes, avec un rapport $E/Z = 90/10$.

Ce dérivé iodé **224** a ensuite été engagé dans l'étape de couplage de Suzuki-Miyaura avec l'acide 4-méthoxyphénylboronique. Là aussi, des problèmes de solubilité ont été rencontrés, mais le produit attendu **225** a tout de même pu être obtenu avec un rendement correct de 54%. Cependant, les rendements obtenus pour cette étape sont assez peu reproductibles et le passage à l'échelle du gramme s'est révélé délicat. La déprotection de l'énol a ensuite été effectuée comme précédemment et le produit déprotégé **226** a été isolé avec un rendement correct de 53%. L'ester **226** a ensuite été saponifié. L'utilisation d'une solution aqueuse de soude n'a pas permis d'effectuer cette saponification et l'ester a été récupéré inchangé. Cela peut s'expliquer par le fait que l'ester lipophile **226** est complètement insoluble dans ces conditions. Ce problème a été résolu en utilisant un mélange de méthanol et de THF, en présence d'une solution aqueuse d'hydroxyde de lithium. Après une nuit à 80°C, l'acide **227** a pu être obtenu avec un très bon rendement de 87% après recristallisation.

Cette voie a permis la préparation de deux nouveaux produits lipophiles **226** et **227**, avec un rendement global de 10%. Malheureusement, des problèmes ont été rencontrés, notamment dans l'étape de couplage, lors du passage à l'échelle du gramme, faisant encore baisser les rendements.

Une voie de synthèse alternative a alors été considérée, en se basant sur l'approche D qui utilise les dérivés d'acides tétroniques. Ainsi, en positionnant la chaîne à 12 carbones sur le cétoester, un accès aux mêmes types de dérivés que précédemment serait possible (schéma 88). Pour cela, le bromure de dodécyle **214** a été traité avec du magnésium et le réactif de Grignard formé a été additionné sur l'oxalate de diéthyle **12**, à -78°C dans le THF. Le cétoester **228** a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 84%.

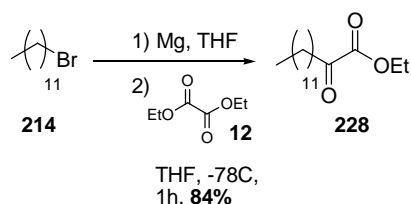


Schéma 88 : préparation du cétoester **228**

Ce cétoester **228** a ensuite été mis en réaction avec l'anion de l'acide tétronique **174** (schéma 89). Cette addition se fait avec un bon rendement de 79% et l'alcool **229** a été obtenu sous forme d'un mélange de forme diastéréoisomères. La déshydratation a ensuite été effectuée de manière classique et efficace, et les deux isomères *E* et *Z* de **230** ont été obtenus

et séparés par chromatographie sur gel de silice. Ces deux isomères ont été engagés séparément dans l'étape de déprotection. L'isomère *Z* n'a pas permis d'obtenir le produit déprotégé par traitement au tribromure de bore. Il se forme un autre produit que nous ne sommes pas parvenus à identifier de manière certaine. L'isomère *E*, par contre, se déprotège comme attendu avec le tribromure de bore pour donner l'acide pulvinique **231**, avec un rendement de 57%. A côté de ce produit se forme le produit **232** déprotégé deux fois, c'est-à-dire sur l'énol et sur l'aromatique, à hauteur de 19%. Celui-ci se forme avant la consommation totale du produit de départ **230**. Sa conversion en acide pulvinique **231** par méthylation sélective du phénol n'a pas été possible dans les conditions testées. Finalement, **232** a été reconverti en **230**, par traitement avec deux équivalents de sulfate de diméthyle, en présence de carbonate de potassium dans l'acétone. Ceci représente une méthode de recyclage efficace du produit secondaire formé au cours de la réaction de déprotection. Enfin, l'ester **231** a, comme précédemment, été efficacement saponifié pour fournir l'acide **227**. Le rendement global de cette synthèse est de 22%.

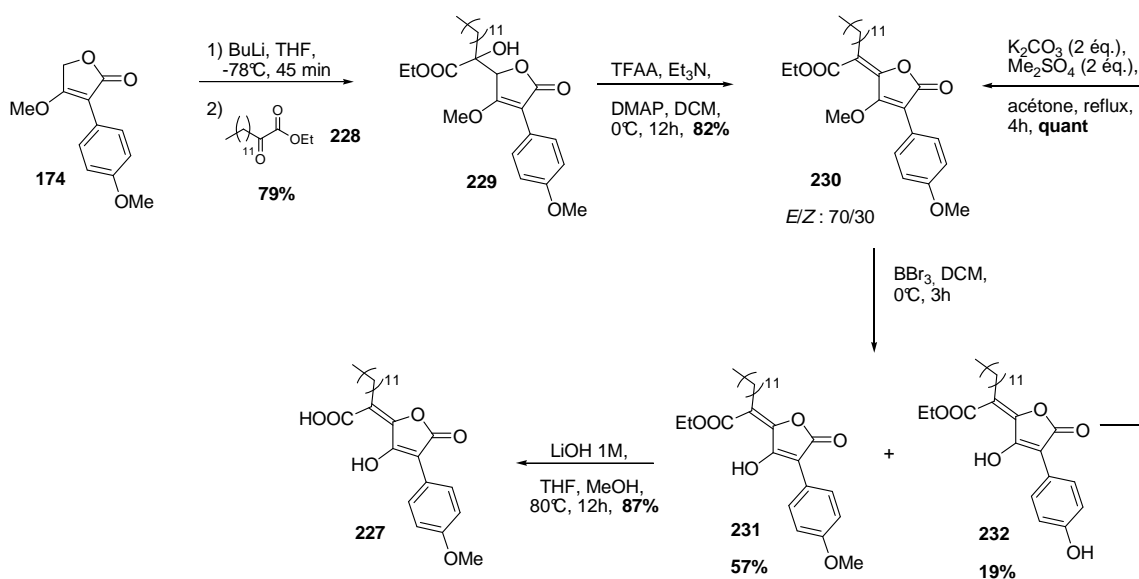


Schéma 89 : voie de synthèse de **231** et **227** par l'approche D

Deux voies de synthèse ont donc été développées, afin d'introduire la chaîne grasse au niveau de la double liaison *exo*-cyclique. Cela a permis la préparation de trois produits : l'ester méthylique **226**, l'ester éthylique **231** et l'acide **227**.

IV.3 Chaîne grasse greffée au niveau du groupement carbonyle

La préparation de ces produits a déjà été présentée au paragraphe précédent, ils ont été obtenus par ouverture régiosélective assistée par le TBAF de la dilactone **170**, selon la stratégie D (schéma 90).

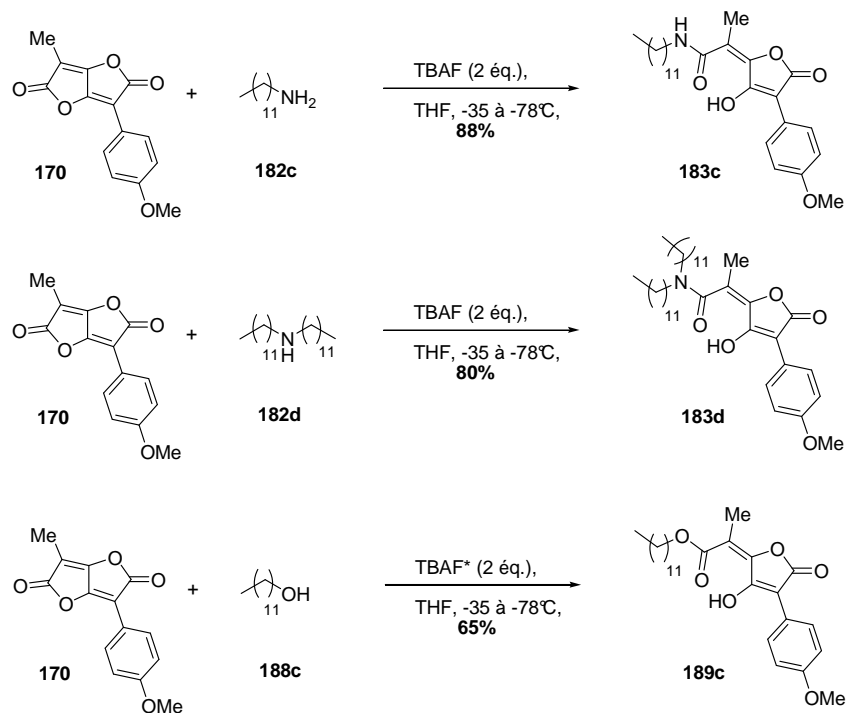


Schéma 90 : synthèse d'acides pulviniques lipophiles **183c**, **183d** et **189c** à partir de **170**

IV.4 Conclusions

Sept acides pulviniques lipophiles ont donc été préparés, en incorporant la chaîne grasse à différents endroits sur le noyau pulvinique. Chaque produit a été obtenu à hauteur de 100 mg au minimum. L'influence de la position de cette chaîne sur différents facteurs physico-chimiques va pouvoir donc être évaluée.

V. Conclusions

Deux nouvelles voies de synthèse d'acides pulviniques monoaromatiques ont été développées et appliquées à la préparation de 45 nouveaux composés.

La stratégie C utilise comme étape clé un couplage de type Suzuki-Miyaura sur le composé iodé **92**, qui permet d'introduire aisément des modifications au niveau du noyau aromatique. Cette voie a permis la préparation de produits de type I, différemment substitués en position 4 sur le noyau aromatique.

La stratégie D repose sur l'ouverture de la dilactone **170**. Différentes conditions d'ouverture par différents nucléophiles ont permis la synthèse de nombreux produits, de type I et de type II. Il a en outre été possible de contrôler la régiosélectivité de l'ouverture de la dilactone, par addition de TBAF.

Ces deux voies sont complémentaires car la première permet d'obtenir aisément des modifications au niveau du groupement aromatique des dérivés de type I, alors que la seconde permet de faire varier facilement la fonction latérale.

Pour compléter les travaux effectués sur la stratégie C et valoriser l'étape-clé de couplage de Suzuki-Miyaura, de nouveaux acides boroniques pourront être envisagés pour être couplé avec le produit iodé **92**, comme des dérivés comportant un groupement électroattracteur en *para*, des dérivés substitués en *ortho* ou *meta*, des dérivés polysubstitués ou des hétérocycles. Ceci devrait permettre d'une part d'explorer la gamme de substrats compatibles avec les conditions de couplages utilisées et d'autre part évaluer plus en détail l'influence de la nature et la substitution du noyau aromatique sur l'activité antioxydante.

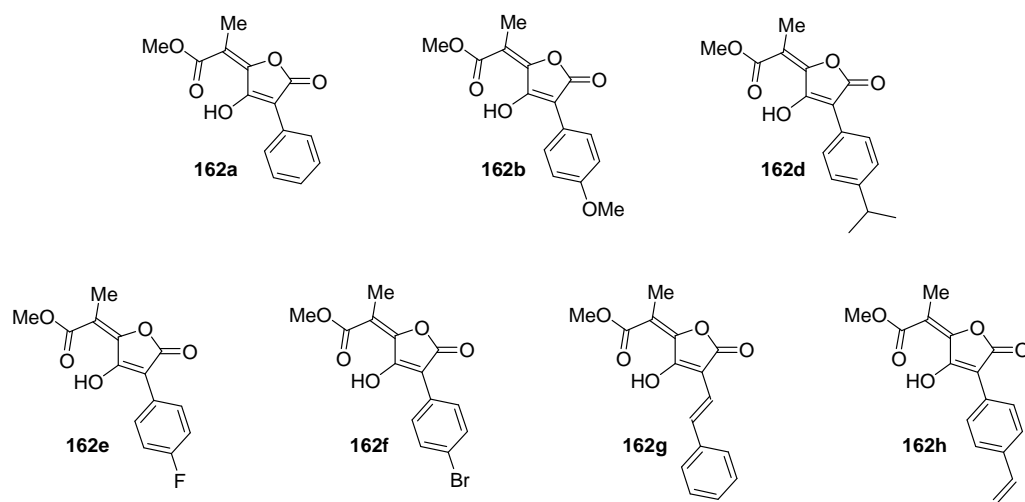
La réactivité de la dilactone **170**, en présence de TBAF, vis-à-vis d'autres nucléophiles, comme des organométalliques, des dérivés soufrés, des énolates d'esters ou des éthers d'énols silylés, est une perspective intéressante afin de poursuivre l'étude de la réactivité de ce substrat.

Enfin, dans le but d'améliorer les interactions avec les membranes lipidiques, plusieurs acides pulviniques lipophiles ont été imaginés et synthétisés, portant une chaîne grasse a à différentes positions du noyau pulvinique.

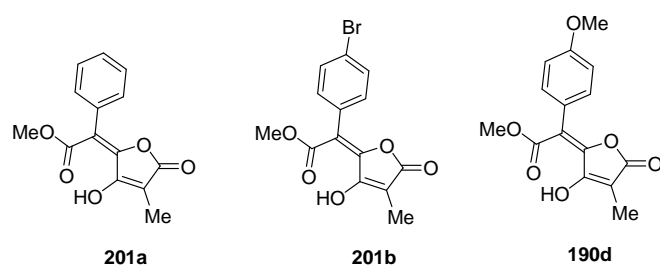
L'activité antioxydante de certains de ces produits a ensuite été testée, ce qui a permis de faire quelques observations intéressantes sur la relation structure-activité. Les résultats sont présentés au chapitre 3.

La structure de la totalité des produits préparés est rappelée ci-dessous :

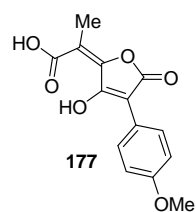
Type I, esters méthyliques avec variation du motif aromatique :



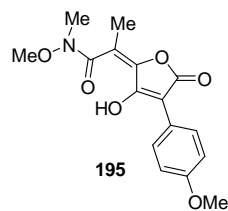
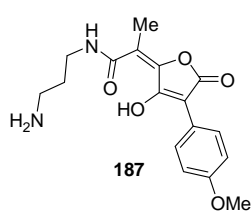
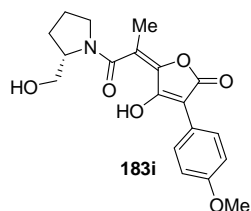
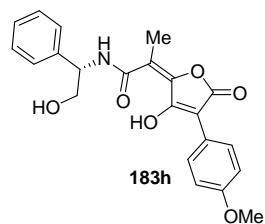
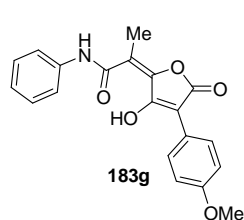
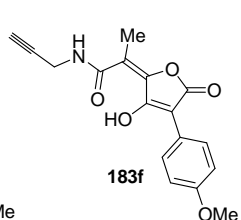
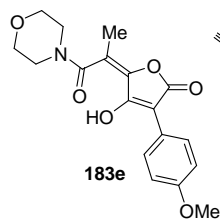
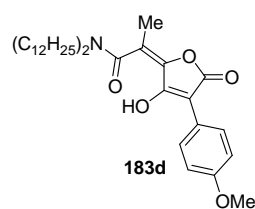
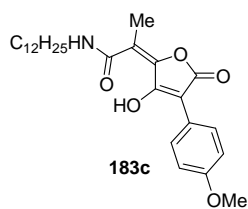
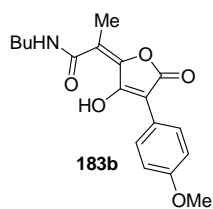
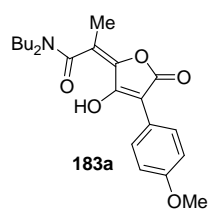
Type II, esters méthyliques avec variation du motif aromatique :



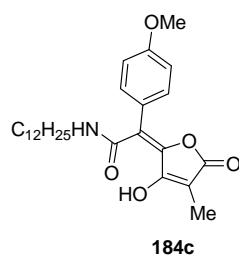
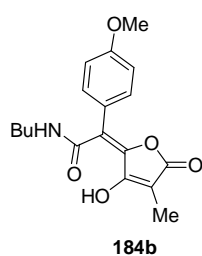
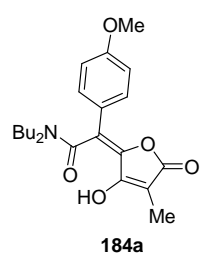
Type I, acide :



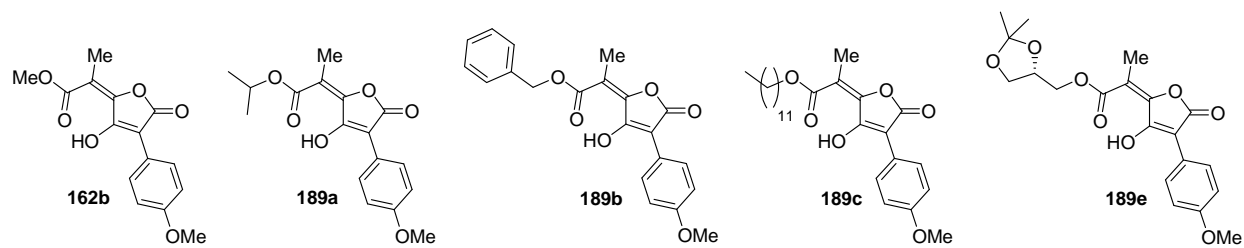
Type I, amides :



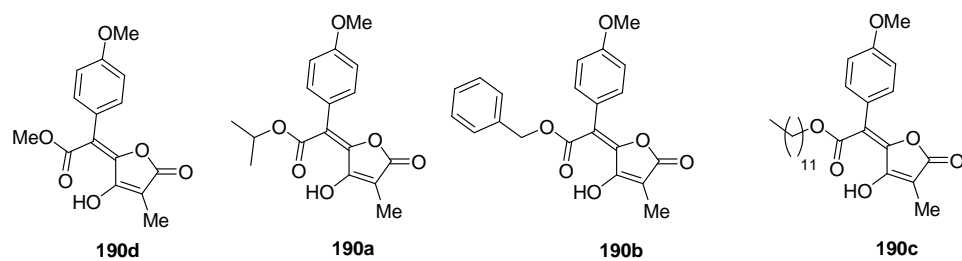
Type II, amides :



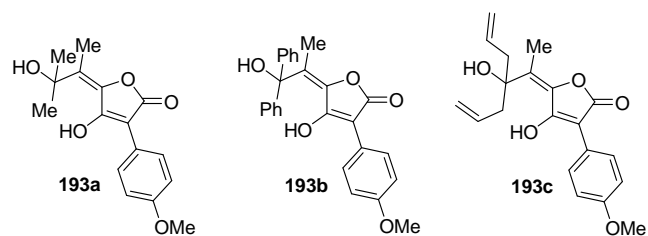
Type I, esters :



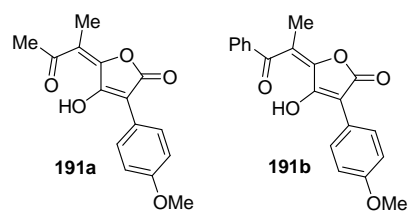
Type II, esters :



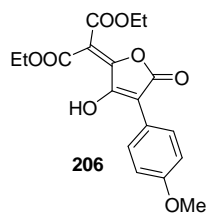
Type I, alcools tertiaires :



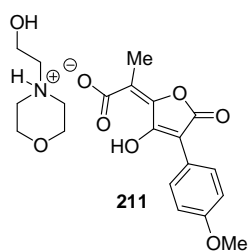
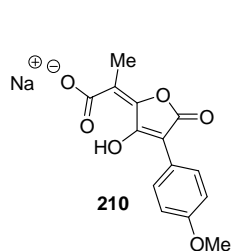
Type I, cétones :



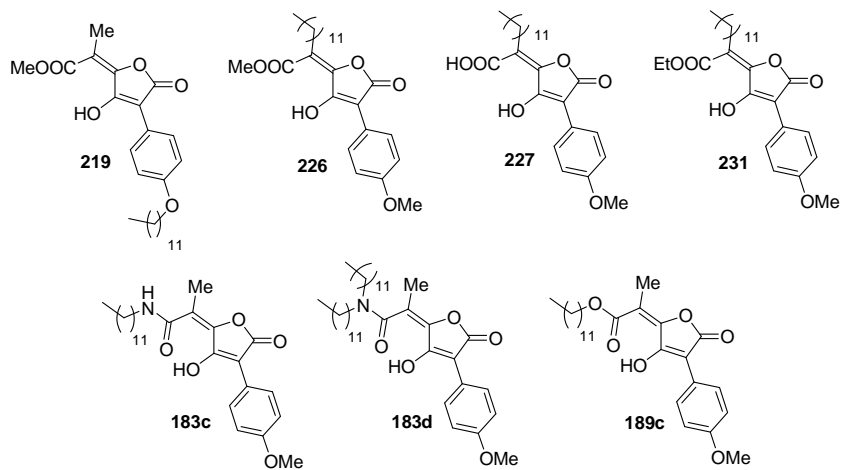
Type I, diester :



Type I, sels de carboxylates :



Type I, lipophiles:



CHAPITRE 3 :

ANALYSE DES

ACIDES

PULVINIQUES

I. Présentation

Les différentes voies de synthèse présentées au paragraphe précédent ont permis la préparation de 45 nouveaux dérivés mono-aromatiques d'acides pulviniques qui sont des antioxydants potentiels.

L'activité antioxydante a été évaluée sur ces composés, en utilisant cinq tests différents. Ces tests mettent en jeu des espèces radicalaires variées et les mécanismes mis en jeu sont également différents.

Ainsi, dans un premier temps, l'étude de la protection d'une cible biologique, la thymidine, a été entreprise, avec deux systèmes d'oxydation différents, soit par une irradiation UV, soit dans les conditions de Fenton. Ensuite, la protection d'un plasmide bactérien a été évaluée, dans les conditions de Fenton. L'étude de la capture du radical superoxyde a également été étudiée, de même que celle du radical DPPH[•]. Enfin, l'inhibition de la peroxydation lipidique a aussi été évaluée. Ces cinq tests se font dans des conditions très différentes et rendent compte des différents mécanismes d'actions classiques des antioxydants (présentés au chapitre 1) : donneur d'hydrogène, capture directe de radical, interruption de réaction en chaîne. L'intérêt porté à un agent antioxydant sera d'autant plus important qu'il révélera de bonnes activités suivant différents mécanismes. Tous les produits n'ont pu être testés dans chaque test, notamment pour des raisons de solubilité (les tests de protection de la thymidine et du plasmide s'effectuent en milieu aqueux, il a donc été impossible de tester les produits les plus lipophiles).

Dans chaque cas, les dérivés monoaromatiques de type I et de type II seront comparés entre eux, mais des acides pulviniques symétriques ainsi que des antioxydants de référence seront également testés afin d'enrichir l'étude structure-activité antioxydante.

Enfin, quelques critères complémentaires seront évalués, comme la photostabilité, la cytotoxicité ainsi que l'affinité des produits lipophiles pour des monocouches lipidiques.

II. Etude de la protection de la thymidine

Les tests ont été effectués au Service de Pharmacologie et d'Immunologie au CEA de Saclay.

II.1. Principe

De nombreux tests de mesure du pouvoir antioxydant existent (test au TBA,¹¹² à l'ABTS,¹¹³ au DPPH,¹¹⁴ mesures par RPE¹¹⁵ ou chimioluminescence,¹¹⁶ test 3D¹¹⁷ ou comète¹¹⁸...). La plupart de ces tests consistent à étudier la formation d'un produit spécifique de dégradation dans un système soumis à un stress oxydant. Or, l'action des EOR se révèle très complexe, les espèces réactives sont nombreuses et variées et les réactions en chaînes conduisent à de multiples produits (voir chapitre 1). Ainsi, en étudiant un seul produit d'oxydation, les tests classiques ne permettent de détecter qu'une activité antioxydante intervenant dans l'ensemble des cascades réactionnelles mises en jeu. De ce fait, ces tests ne fournissent que des informations partielles et l'information principale, à savoir si l'antioxydant protège efficacement ou non sa cible, n'est pas clairement élucidée (schéma 91).

Pour contourner ce problème, un test a été mis au point et développé au CEA de Saclay.^{43, 44} Ce test est basé non plus sur l'étude de l'apparition de produit(s) de dégradation, mais sur la disparition de la cible elle-même (schéma 91). Ainsi, la nature et le nombre de produits d'oxydation créés ne sont plus pris en compte. De plus, ce test s'adapte à des sources variables d'EOR (radiolyse, UV ou Fenton).

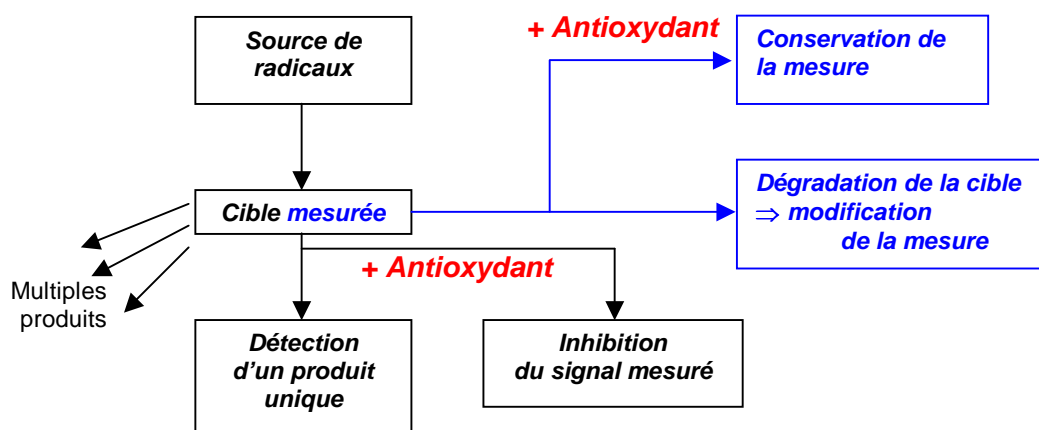


Schéma 91 : comparaison tests classiques (en noir) et nouveau test CEA (en bleu)

Quelque soit la cible et la source d'EOR, le milieu réactionnel après oxydation sera toujours très complexe. Il est donc indispensable de disposer d'un outil très sélectif et très sensible afin de mesurer la quantité de cible biologique intacte après réaction et ceci sans étape de purification. Les techniques d'immunoanalyse sont tout à fait adaptées pour réaliser la quantification d'un produit au sein de milieux complexes. Ce test repose donc sur un **dosage immunoenzymatique par compétition**.

La cible choisie est la thymidine, un des quatre nucléotides de l'ADN :

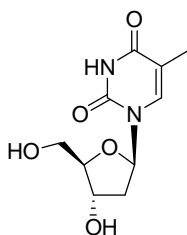
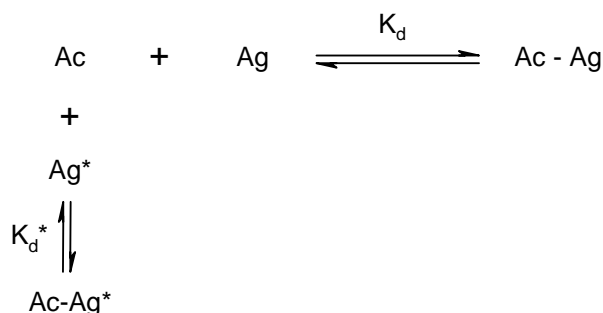


Figure 13: structure de la thymidine

Le dosage par compétition a pour but de déterminer la concentration en antigène (Ag) dans un milieu complexe grâce à l'utilisation d'un anticorps (Ac) et d'un antigène marqué (Ag*), dont on peut mesurer la concentration. Les anticorps sont des acteurs essentiels du système immunitaire et représentent le principal moyen de défense de l'organisme contre l'intrusion d'agents pathogènes. En effet, les organismes vivants sont capables de produire des anticorps, en réponse à la pénétration d'une substance étrangère, pour permettre son élimination. Ici, un anticorps monoclonal capable de reconnaître la thymidine a été produit chez la souris, en utilisant les défenses naturelles de l'animal.

Pour comprendre le principe de ce dosage, considérons un mélange Ac/Ag/Ag*. Si la concentration en anticorps Ac est inférieure à la concentration totale en antigène (Ag + Ag*), il y aura compétition vis-à-vis des sites de liaison sur l'anticorps, avec formation simultanée de complexes (Ac-Ag) et (Ac-Ag*), selon les équilibres suivants :



En maintenant fixes les concentrations en anticorps et antigène marqué, l'augmentation de la concentration en antigène entraîne l'augmentation de la concentration en complexe (Ac-Ag), au détriment du complexe (Ac-Ag*). La concentration [Ac-Ag*] est donc inversement proportionnelle à la concentration [Ag] dans le milieu.

Le test est effectué en format hétérogène, sur un support solide (plaques de 96 puits en polystyrène) utilisé pour fixer les complexes (Ac-Ag) et (Ac-Ag*), et les séparer des antigènes Ag et Ag* libres restés en solution.

Le marquage de l'antigène Ag* est effectué par liaison covalente avec une enzyme : l'acétylcholinestérase ou AChE. Cette enzyme a été sélectionnée en raison de sa très grande réactivité catalytique, qui confère aux traceurs Ag* une activité spécifique élevée. L'enzyme est détectée par la méthode d'Ellman, utilisant un mélange d'acétylthiocholine **233** et de DTNB (5,5'-dithiobisacide 2-nitrobenzoïque) **234** (schéma 92).¹¹⁹ L'hydrolyse de l'acétylthiocholine **233**, catalysée par l'AChE, conduit à la thiocoline **235**, qui réagit avec le DTNB **234** pour former un thiol aromatique **236** (déprotoné dans les conditions de pH utilisées). Ce dernier est un chromophore ($\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$; $\epsilon_M = 13600 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) qui absorbe dans le visible en produisant une lumière jaune.

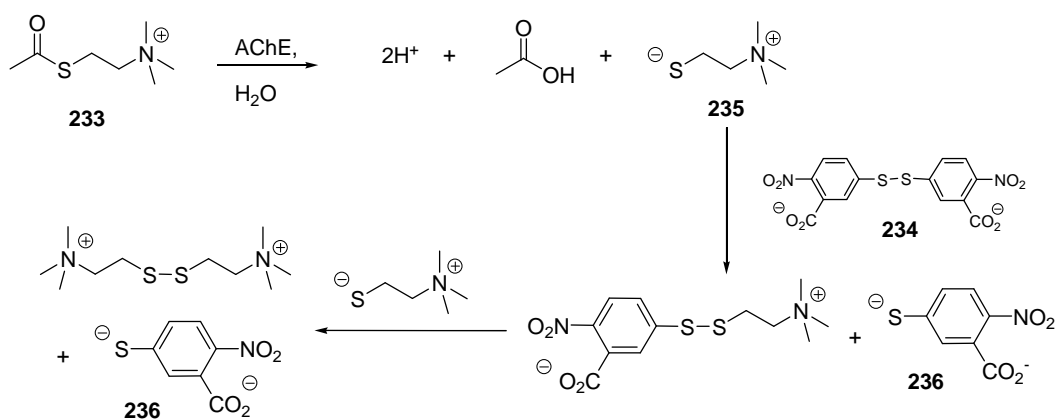


Schéma 92 : méthode colorimétrique d'Ellman

Le test est réalisé en deux étapes, effectuées chacune dans des plaques différentes (figure 14). Au cours du protocole, un transfert de la *plaque I* vers la *plaque II* est nécessaire.

◆ *Plaque I* : dégradation de la thymidine

Une solution contenant la thymidine (Ag) et l'agent protecteur à étudier est disposée dans les puits. Le mélange est soumis à une source d'EOR. Au cours de l'étape d'oxydation, la thymidine sera très dégradée dans le cas d'un mauvais agent protecteur (figure 14a) ou peu dégradée dans le cas d'un bon agent protecteur (figure 14b).

◆ *Plaque II* : dosage de la thymidine non dégradée

Après un temps précis d'oxydation, une aliquote des solutions de la *plaque I* est prélevée et transférée vers la *plaque II* (plaque de dosage recouverte d'anticorps Ac). Aux puits de la *plaque II* sont ajoutés l'anticorps puis le traceur enzymatique (Ag*), afin de doser la thymidine intacte dans le milieu. Une étape de lavage permet d'éliminer toutes les espèces qui ne sont pas fixées sur la plaque. Dans le cas d'un mauvais agent protecteur, une densité optique élevée sera mesurée, traduisant une grande quantité d'antigène traceur fixée sur les anticorps (Ac-Ag*, figure 14a). Au contraire, si l'agent antioxydant se révèle efficace, la densité optique mesurée sera faible, car les sites de l'anticorps seront occupés par la thymidine intacte (Ac-Ag, figure 14b).

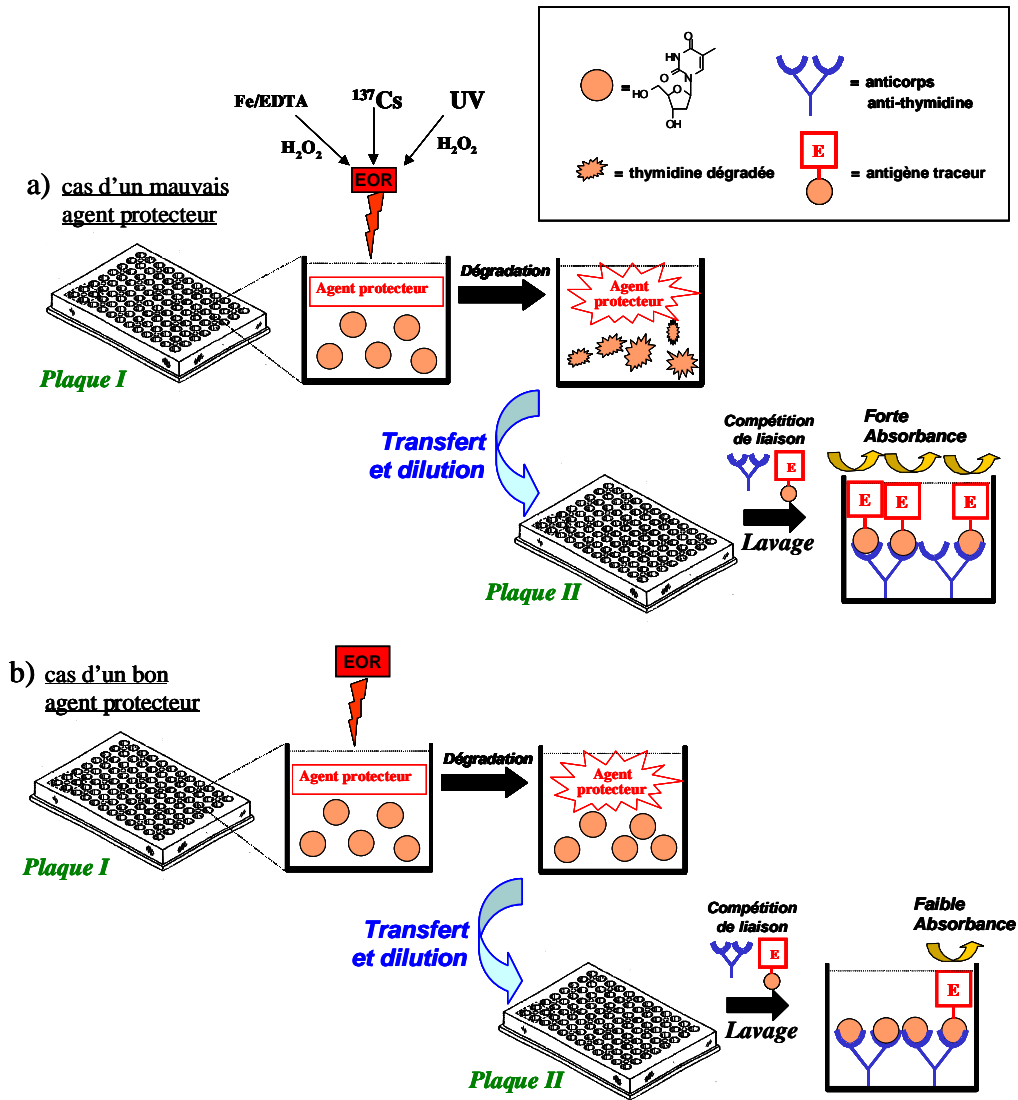


Figure 14 : principe du test

Les résultats finaux seront exprimés en pourcentage de protection de la thymidine, exprimé par rapport à une expérience réalisée en absence d'agent protecteur :

$$\% \text{ de protection} = \frac{[Thy]_{antiox} - [Thy]_{ox}}{[Thy]_{ini} - [Thy]_{ox}} * 100$$

Avec :

$[Thy]_{ini}$ = concentration initiale en thymidine,

$[Thy]_{ox}$ = concentration en thymidine mesurée en l'absence d'antioxydant,

$[Thy]_{antiox}$ = concentration en thymidine mesurée en présence de l'antioxydant.

En comparant les valeurs obtenues pour différents antioxydants, testés dans les mêmes conditions, il est donc possible d'établir une hiérarchie du pouvoir protecteur sur la thymidine de ces composés.

Sur ce principe général, trois tests utilisant trois sources différentes de génération d'EOR ont pu être mis au point. Ainsi, les EOR ont été générés :

- ◆ soit par irradiation γ au ^{137}Cs ,
- ◆ soit par irradiation UV à 254 nm en présence d'eau oxygénée,
- ◆ soit par un système métallique de type Fenton, en présence de Fe^{2+} et d'eau oxygénée.

Ici, l'irradiation γ n'a pas été utilisée, car elle est moins représentative du domaine d'application visé. Le test UV met en jeu la photolyse de H_2O_2 (irradiation à 254 nm), ce qui va produire la formation de radicaux hydroxyles HO^\bullet (qui peuvent évoluer en HOO^\bullet ou $\text{O}_2^{\bullet-}$). Dans les conditions de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4/\text{EDTA}$), la présence du système métallique peut conduire, en présence de H_2O_2 , à la formation de plusieurs espèces de haute valence dont la réactivité n'est pas identique aux EOR générées dans le test UV. Lors du test Fenton, la molécule étudiée peut donc piéger les espèces oxydantes du milieu, mais également modifier la capacité du métal à produire ces espèces, avec, par exemple, des mécanismes de complexation du métal.

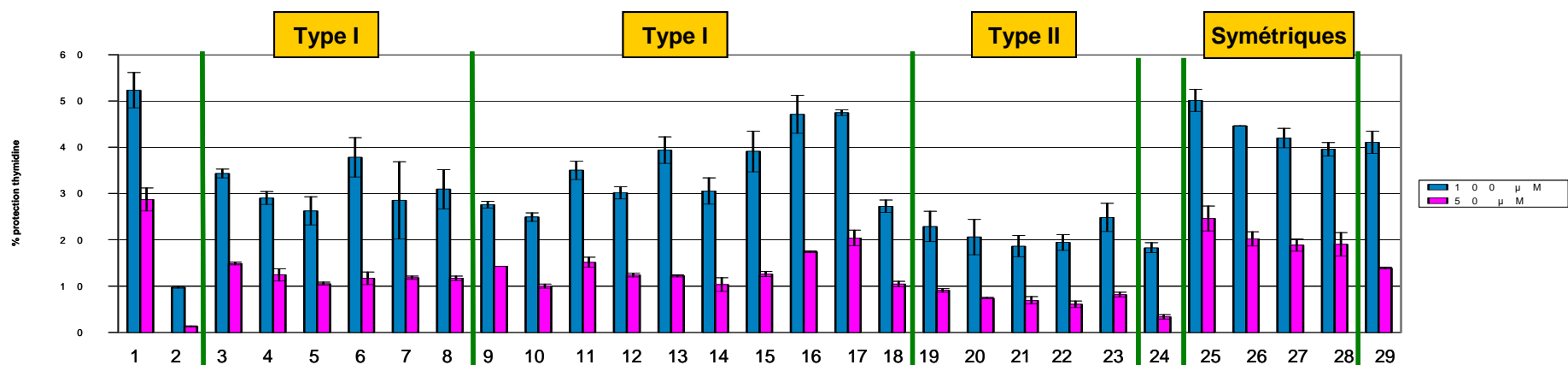
II.2. Résultats

Chaque expérience a été réalisée en duplicat. Des membres représentatifs des différentes familles chimiques des dérivés de type I et II ont été testés, afin de pouvoir recueillir le maximum d'informations. En plus des acides pulviniques mono-aromatiques ont été testés des témoins dont l'activité antioxydante dans ces conditions est connue (afin de valider l'expérience) : la norbadione A et le Trolox, ainsi que des acides pulviniques symétriques, préparés par B. Heurtaux, lors de sa thèse au CEA de Saclay.

II.2.1 Irradiation UV

La plaque a été irradiée à l'aide d'un irradiateur BIO-SUN.3W, à 254 nm, pendant 7 min (énergie 1,75 J/cm²). La présence d'H₂O₂ est nécessaire pour observer une dégradation de la thymidine. Les rayons UV permettent la rupture homolytique de la liaison oxygène-oxygène pour conduire, dans une première étape, à deux radicaux hydroxyles. Des EOR sont ainsi créés dans le milieu, capables de dégrader la thymidine par des effets indirects.

28 produits ont été testés, à deux concentrations différentes (figure 15). Les conditions opératoires exactes sont : thymidine, 70 µM; H₂O₂, 5 mM; antioxydant, 100 et 50 µM; Tp. Phosphate pH 7,4, 25 mM; 254 nm, 1,75 J/cm².



| | | X | R' | | | | | | |
|---|--------|----|-----|---|----|-----|---|-------------------------------|--|
| 1 | NBA | 9 | O | H | 19 | H | O | Me | |
| 2 | Trolox | 10 | Me | / | 20 | Br | O | Me | |
| R | | 11 | O | | 21 | OMe | O | Me | |
| 3 | H | 12 | O | Na | 22 | OMe | O | iPr | |
| 4 | OMe | 13 | | / | 23 | OMe | N | C ₄ H ₉ | |
| 5 | iPr | 14 | | / | R | | | 24 | |
| 6 | F | 15 | NH | C ₃ H ₆ NH ₂ | 25 | Br | | 29 | |
| 7 | Br | 16 | NMe | OMe | 26 | OMe | | | |
| | | 17 | NH | C ₄ H ₉ | 27 | H | | | |
| | | 18 | O | iPr | 28 | F | | | |

Figure 15 : protection de la thymidine sous irradiation UV : résultats globaux

Les résultats obtenus pour la norbadione A et le Trolox sont en accord avec des résultats antérieurs. En effet, dans ce test, la NBA est un composé puissant avec environ 50% (à 100 μM) de protection de la thymidine, alors que le Trolox ne protège pas efficacement (10% de protection). De plus, les résultats dupliqués pour chaque expérience sont relativement proches, ce qui démontre la reproductibilité du test. En outre, les hiérarchies observées à 100 μM et 50 μM de produit testé sont relativement bien conservées (dans la suite de ce paragraphe, seule la concentration à 100 μM sera discutée). Les informations apportées par ces résultats vont être détaillées par famille de composés.

II.2.1.1 Comparaison des dérivés de type I, de type II et des acides pulviniques symétriques

La comparaison des trois types de produits (type I, type II et symétriques) correspond à la première analyse des résultats. Trois séries de produits ont été testés, différemment substitués sur le noyau aromatique (figure 16).

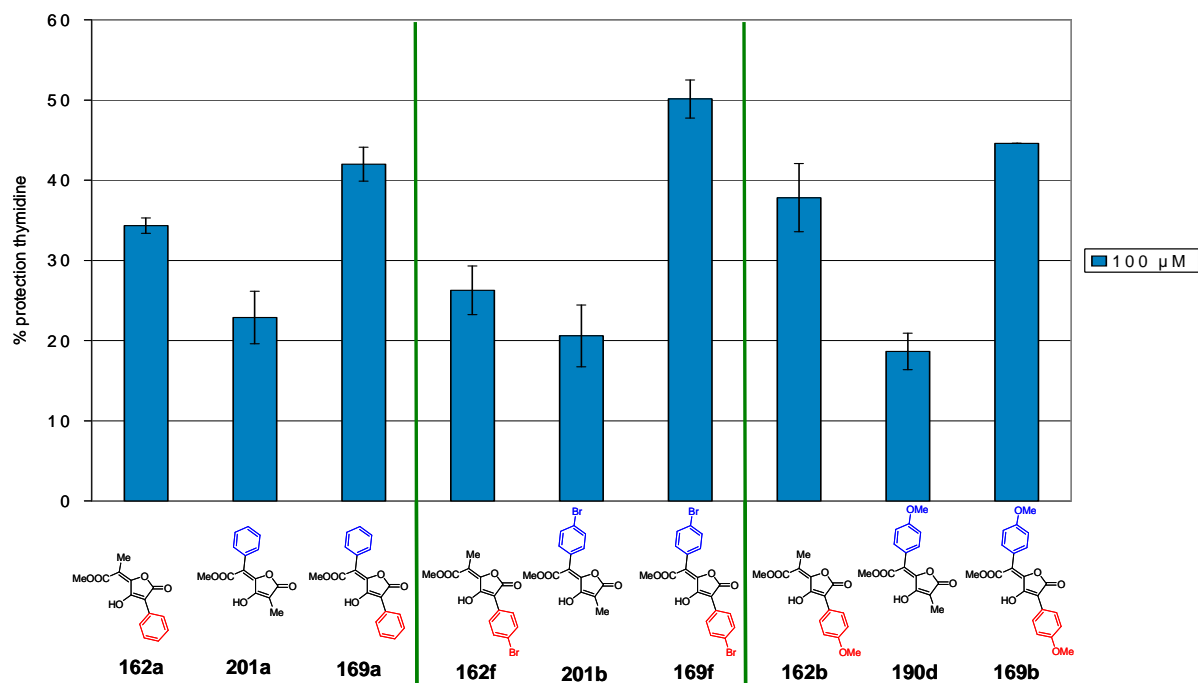


Figure 16 : protection de la thymidine sous irradiation UV : influence de la position du noyau aromatique

Les trois séries suivent toutes la même tendance, à savoir que le produit le plus actif est le produit symétrique, suivi par le produit de type I, puis le produit de type II.

Ainsi, sur les trois séries de produits, la perte du noyau aromatique « sud » (produits de type II) est plus défavorable que la perte du noyau aromatique « nord » (produits de type I). D'autre part, sur les dérivés de type I et les produits symétriques, des différences d'activité relativement importantes sont observées selon la nature du substituant sur le noyau aromatique.

En revanche, les trois dérivés de type II ont une activité identique (aux erreurs d'expérience près). Ceci semble montrer que le noyau aromatique sur ces produits a peu d'influence sur l'activité antioxydante, contrairement aux deux autres familles. Dans la série des composés de type II, l'activité observée serait donc uniquement due au motif conservé sur ces trois molécules, à savoir le motif céto-énolique de la lactone.

En prolongeant ces arguments, les hiérarchies et les intensités de protections entre les produits symétriques et de type I devraient être conservées. C'est le cas pour les composés de la famille phényle (produits **169a** et **162a**) et la famille méthoxylée (produits **169b** et **162b**). En revanche, dans la série bromée, le composé symétrique **169f** est beaucoup plus actif que le produit de type I **162f**. Ce résultat n'a pas pu être clairement rationalisé. Il semble que le produit **169f** ait une activité particulièrement forte, qui implique peut être d'autres mécanismes antioxydants (il est prévu de tester à nouveau les composés de cette série).

II.2.1.2 Influence du groupement porté par le noyau aromatique sur les composés de type I

Les produits testés, portant différents substituants en position 4 du noyau aromatique et le dérivé du styrène, possèdent tous une activité comparable, avec une protection de la thymidine comprise entre 26 et 38% à 100 μ M (figure 17).

Dans cette série, le produit offrant la meilleure protection est le produit **162b** substitué par un groupement méthoxyle, avec une bonne protection de 38%. Il semblerait que l'effet mésomère donneur du méthoxyle ait un effet positif, si l'on compare au dérivé phényle « simple » **162a**. L'effet mésomère donneur semble être supérieur à l'effet inductif donneur, comme le montre la plus faible protection obtenue pour le composé **162d**, substitué par un groupement *iso*-propyle (même si la barre d'erreur relativement importante dans ce cas ne permet pas de conclure de façon certaine). Enfin, les produits **162e** et **162f** portant des atomes d'halogène sont de moins bons protecteurs. Il est ici difficile de conclure s'il s'agit de l'effet

inductif attracteur ou mésomère donneur des halogènes qui entre en jeu et provoque cette différence par rapport aux autres produits.

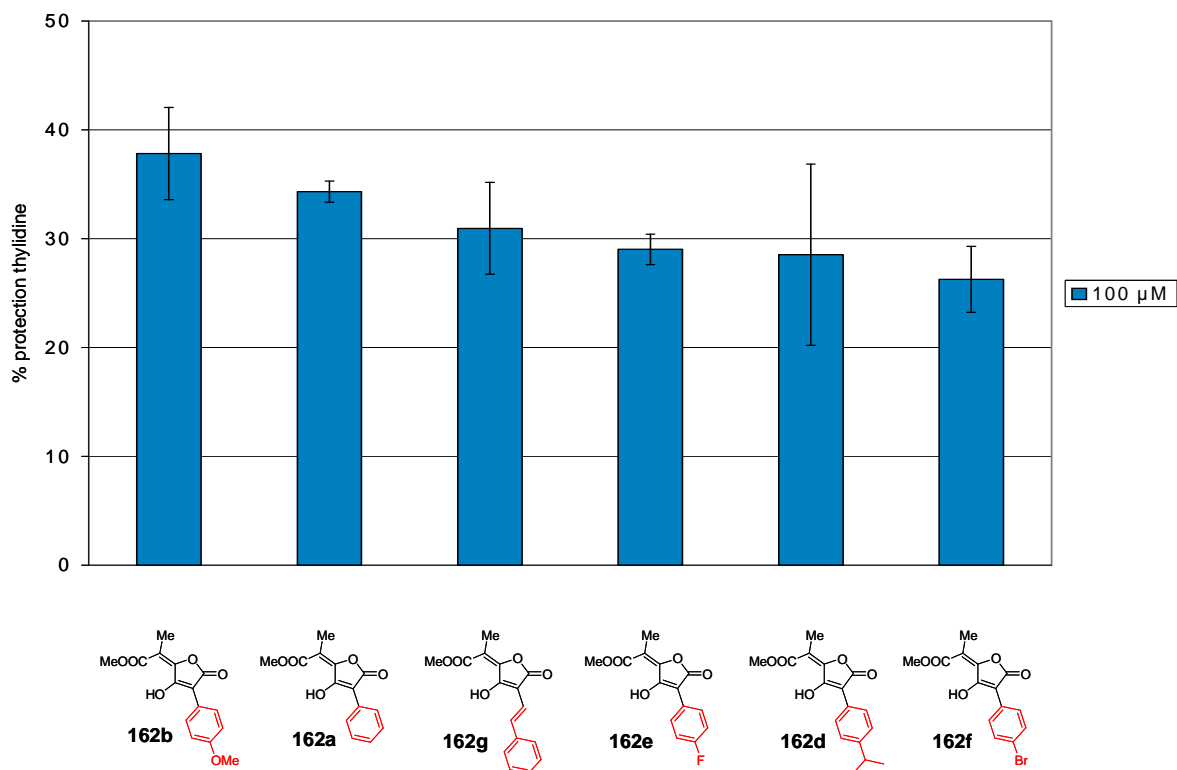


Figure 17 : protection de la thymidine sous irradiation UV: influence du substituant sur l'aromatique

Ces observations permettent de conclure que, avec les exemples étudiés, l'effet du substituant sur le noyau aromatique est relativement limité. Cependant, ici, le noyau aromatique est dans tous les cas substitué par un groupement ayant un effet donneur, inductif ou mésomère. Il serait donc intéressant de préparer de nouveaux dérivés portant des groupements attracteurs, afin d'étudier l'influence de ce paramètre sur l'activité antioxydante.

II.2.1.3 Influence de la fonction portée par la double liaison sur les composés de type I

Dans un troisième temps, l'influence de la fonction portée sur la double liaison *exo-*cyclique a été étudiée. Dans ce cas, le substituant porté par le noyau aromatique ne varie pas, il s'agit d'un groupement méthoxyle. Une influence notable est observée en fonction de la nature de cette fonction, puisque la protection peut varier du simple au double (figure 18).

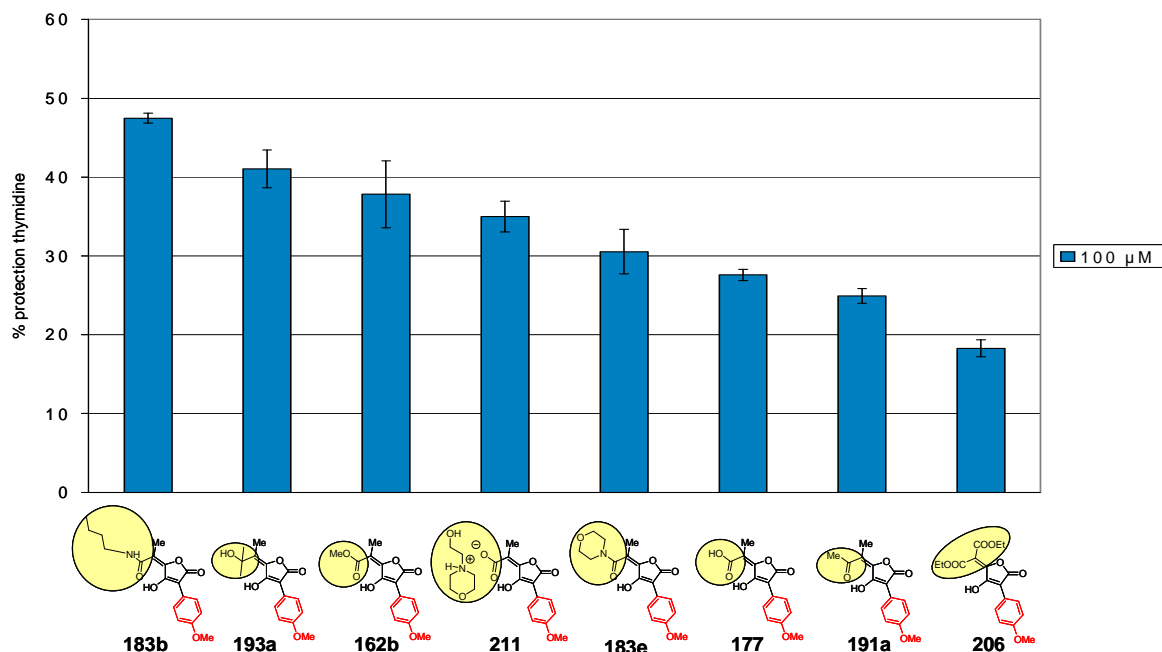


Figure 18 : protection de la thymidine sous irradiation UV : influence de la fonction *exo*-cyclique

Il est intéressant de noter que les produits montrant les moins bonnes protections sont le diester **206** et la cétone **191a**, qui représentent les deux groupements les plus électroattracteurs de cette série.

A l'inverse, le produit dont la fonction a le plus faible pouvoir électroattracteur, à savoir l'alcool **193a**, offre une très bonne protection supérieure à 40%. Ce dérivé a une caractéristique particulière, car c'est le seul à ne pas posséder de fonction carbonyle. Or, il était supposé que l'activité antioxydante des dérivés des acides pulviniques provenait en partie de la forte acidité du proton porté par la fonction énol. Il est probable que, dans le cas de cet alcool, le pKa de l'énol de **193a** soit très différent de celui des autres dérivés, et une activité antioxydante inférieure était donc *a priori* attendue (les calculs des constantes de protonation de certains dérivés sont actuellement en cours, en collaboration avec le laboratoire du Pr B. Spiess à l'ULP de Strasbourg).

Il est délicat de comparer les effets des autres fonctions. En effet, l'acide **177** et le sel **211** qui devraient générer les mêmes espèces dans le milieu tamponné, donnent des protections assez différentes (de l'ordre de 10% d'écart). De même, les deux amides testés ont donné des résultats différents, l'amide linéaire primaire **183b** offre la meilleure protection de cette série, alors que l'amide cyclique **183e** est bien moins efficace.

II.2.2 Irradiation en conditions de Fenton

Les produits testés sous stress UV ont également été testés dans les conditions de Fenton (figure 19). Pour cela, le milieu (thymidine + antioxydant) est mis en présence d'un mélange de sulfate de fer, de tétraacétate d'éthylènediamine (EDTA) et d'eau oxygénée, pendant 30 min. Les conditions opératoires précises sont les suivantes : thymidine, 70 μM ; $\text{FeSO}_4/\text{EDTA}/\text{H}_2\text{O}_2$ (1/1/100), 700 μM ; antioxydant, 500 et 250 μM ; Tp. Phosphate pH 7,4, 25 mM; 30 min.

Les résultats obtenus pour les deux témoins sont ceux attendus. En effet, dans les conditions de Fenton, la NBA ne présente qu'un très faible pouvoir protecteur, dû à ses propriétés prooxydantes. En revanche, le Trolox est très actif dans ces conditions. Ces deux témoins ont des comportements opposés dans les tests UV et Fenton, ce qui montre bien que les espèces réactives générées lors de ces tests sont différentes.

La reproductibilité des expériences est moins bonne que dans le cas du test UV, en raison de la grande sensibilité du système d'oxydation aux concentrations des différents réactifs (barres d'erreurs plus intenses). Seule la concentration de 500 μM sera discutée dans la suite de ce paragraphe.

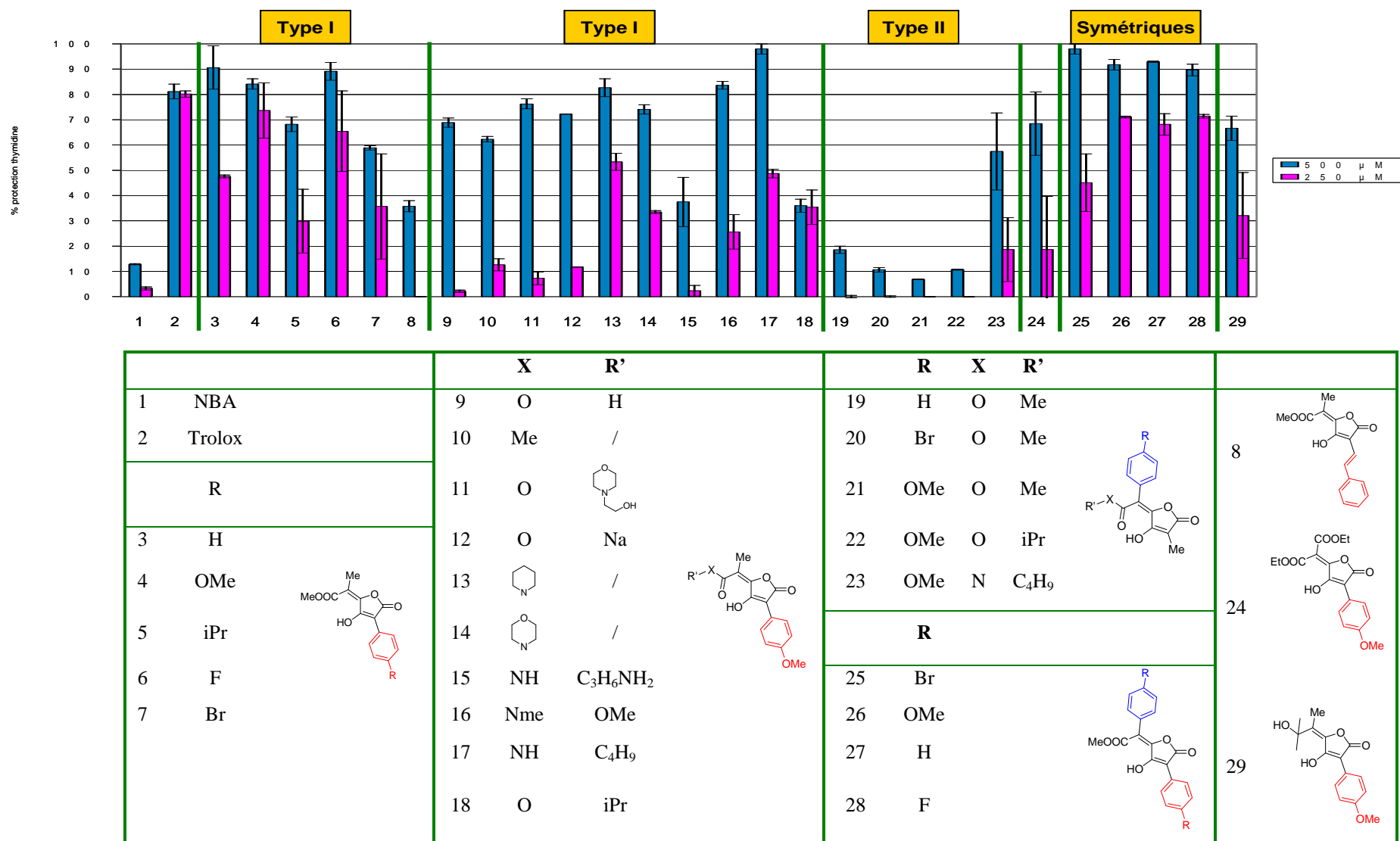


Figure 19 : protection de la thymidine dans les conditions de Fenton : résultats globaux

II.2.2.1 Comparaison des dérivés de type I, de type II et des acides pulviniques symétriques

Les différences observées entre les produits de type I, de type II et les composés symétriques sont beaucoup plus marquées que dans le cas de l'oxydation sous UV (figure 20). En effet, dans ce cas, une tendance générale est observée, selon laquelle les produits symétriques et de type I ont une activité importante et du même ordre de grandeur (supérieure à 70%), alors que les produits de type II n'offrent que des protections inférieures à 20%.

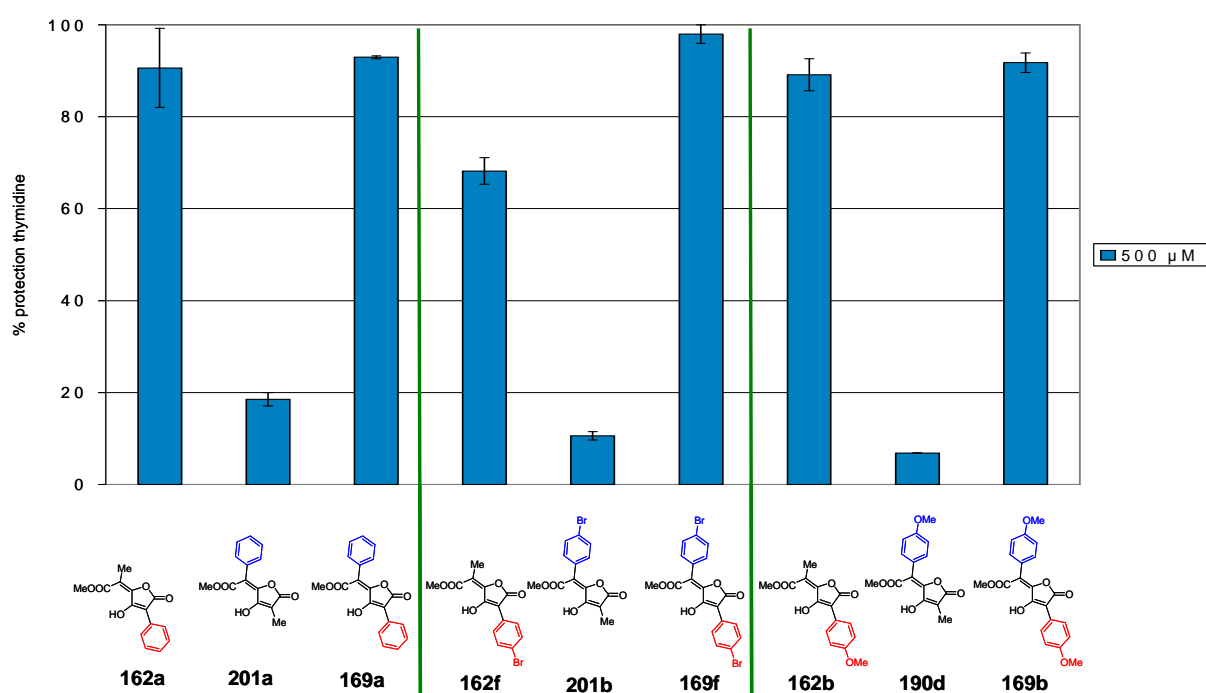


Figure 20 : protection de la thymidine dans les conditions de Fenton : influence de la position du noyau aromatique

Ainsi, le noyau aromatique « nord » ne semble pas être indispensable à la protection de la thymidine dans ces conditions. A l'inverse, la partie aromatique « sud » est essentielle, comme le montre la très faible activité apportée par les dérivés de type II.

A la concentration de 500 μM, l'effet de la nature du substituant est moins marqué que dans le cas de l'irradiation UV, puisque, à l'exception du produit de type I **162f**, tous les composés de type I et symétriques ont des activités proches, de l'ordre de 90%. Cette même expérience à 250 μM permet de mieux discriminer ces produits, avec des pourcentages de protection plus faibles et plus variables. Dans ce cas, les produits méthoxylés sont les plus efficaces de la série (voir figure 19 et annexe 1).

Pour les composés de type II, il est envisageable que, de la même façon que dans le cas UV, l'activité observée soit uniquement due au motif de la lactone, commun aux trois produits.

Sur la base de ces observations, il semblerait donc que la stabilisation du radical sur ces molécules s'effectue majoritairement sur le noyau aromatique et que la contribution de la délocalisation sur le motif céto-énolique de la lactone soit minoritaire.

II.2.2.2 Influence du groupement porté par le noyau aromatique sur les composés de type I

Les différences d'activité apportées par la nature du substituant sur le noyau aromatique sont plus importantes que dans le cas de l'irradiation UV, puisque les protections varient ici du simple au double (figure 21).

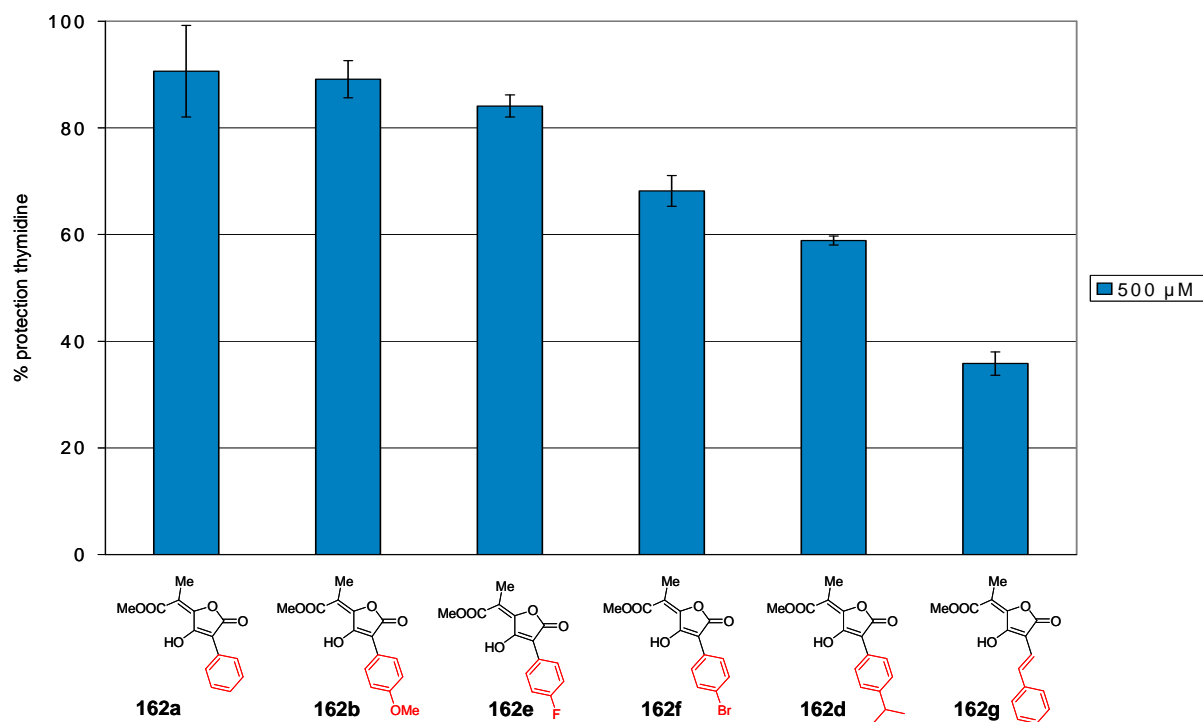


Figure 21 : protection de la thymidine dans les conditions de Fenton : influence du substituant sur l'aromatique

Les produits les plus actifs de la série sont le composé **162a**, portant un groupement phényle non substitué et le produit méthoxylé **162b**. De la même façon que dans le cas de l'UV, il semble que le caractère mésomère donneur du méthoxyle ait une influence positive

sur l'activité, par rapport aux autres substituants. Le caractère inductif donneur semble moins important, puisque le dérivé **162d** portant un groupement *iso*-propyle est beaucoup moins efficace.

Dans le cas des halogènes, le composé fluoré **162e** offre une meilleure protection que le composé bromé **162f**. L'atome de fluor est beaucoup plus électronégatif que l'atome de brome, et le caractère électroattracteur de **162e** devrait donc être plus marqué, ce qui peut être à l'origine de la différence observée.

Le composé vinylique **162g** est le moins efficace de la série, ce qui peut être dû à une mauvaise délocalisation du radical sur le système vinylique.

II.2.2.3 Influence de la fonction portée par la double liaison sur les composés de type I

Tous les produits offrent une excellente protection supérieure à 60% (figure 22). Les différences observées sont beaucoup moins importantes que dans le cas de l'irradiation UV.

Les différentes fonctions ne semblent donc pas amener de discrimination importante au niveau de la protection de la thymidine, puisque la cétone **191a**, l'alcool **193a**, le diester **206** et l'acide **177** montrent une activité similaire, aux erreurs d'expérience près.

Les produits les plus actifs de la série sont les composés **183b** et **183e**, possédant une fonction amide, ainsi que l'ester **162b**, qui ont tous les trois un caractère électroattracteur relativement faible (par comparaison avec la cétone **191a** par exemple). De la même façon que dans l'irradiation UV, le produit de type I le plus actif est l'amide butylique **183b**.

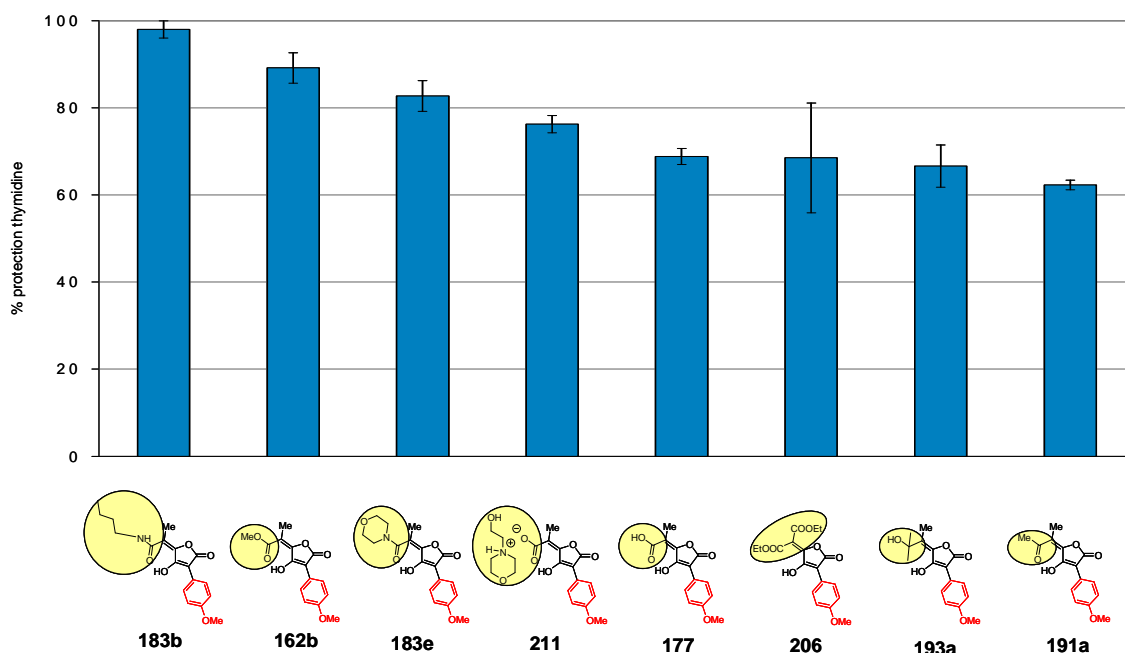


Figure 22 : protection de la thymidine dans les conditions de Fenton : influence de la fonction *exo*-cyclique

II.3. Conclusions

Ces tests ont permis de tirer plusieurs enseignements. Le premier est que les produits de type I ont une activité importante et proche de celle observée pour les acides pulviniques symétriques, contrairement aux produits de type II qui ne sont pas de bons protecteurs de la thymidine. Ce résultat est très intéressant et semble donc montrer que la délocalisation, et donc la stabilisation, du radical se fait très majoritairement sur l'aromatique porté par la partie « sud ». De plus, les différentes fonctionnalités introduites sur les produits de type I ont permis de faire ressortir un produit qui est plus actifs que les autres en conditions UV et Fenton : il s'agit de l'amide butylique **183b**. L'alcool **193a** a également montré un fort potentiel de protection, ce qui est intéressant car ce produit est différent de tous les autres testés, puisqu'il ne contient pas de fonction carbonyle.

Les tendances observées dans ces tests devront être vérifiées par l'étude de la protection de l'ADN.

III. Tests de protection de l'ADN

Ces tests ont été effectués au Laboratoire de Chimie Génétique à Illkirch.

III.1 Principe

Des tests complémentaires de protection de l'ADN ont été menés. Les dégradations de l'ADN sont probablement les effets des EOR les plus graves *in vivo*. L'étude de la protection de l'ADN par les antioxydants est donc particulièrement intéressante pour envisager une utilisation future de ces molécules dans l'organisme. En outre, cette méthode devrait permettre de mettre en avant d'éventuelles propriétés prooxydantes (comme dans le cas de la Norbadione A).

Ces expériences sont réalisées avec un plasmide bactérien super-enroulé, c'est-à-dire sous la forme d'une pelote très compacte. La dégradation de cet ADN conduit généralement à deux formes : un ADN circulaire, provenant d'une rupture simple-brin, et un ADN linéaire, provenant d'une rupture double-brin. Il est possible de séparer ces formes par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 23). En effet, le plasmide super-enroulé intact migre le plus vite à travers le gel d'agarose, car il est le plus compact. Les ruptures simple-brins entraînent le déploiement du plasmide qui adopte une conformation circulaire et migre donc moins vite. Enfin, la rupture double-brin conduit à un plasmide linéaire qui migre entre les deux espèces précédentes.

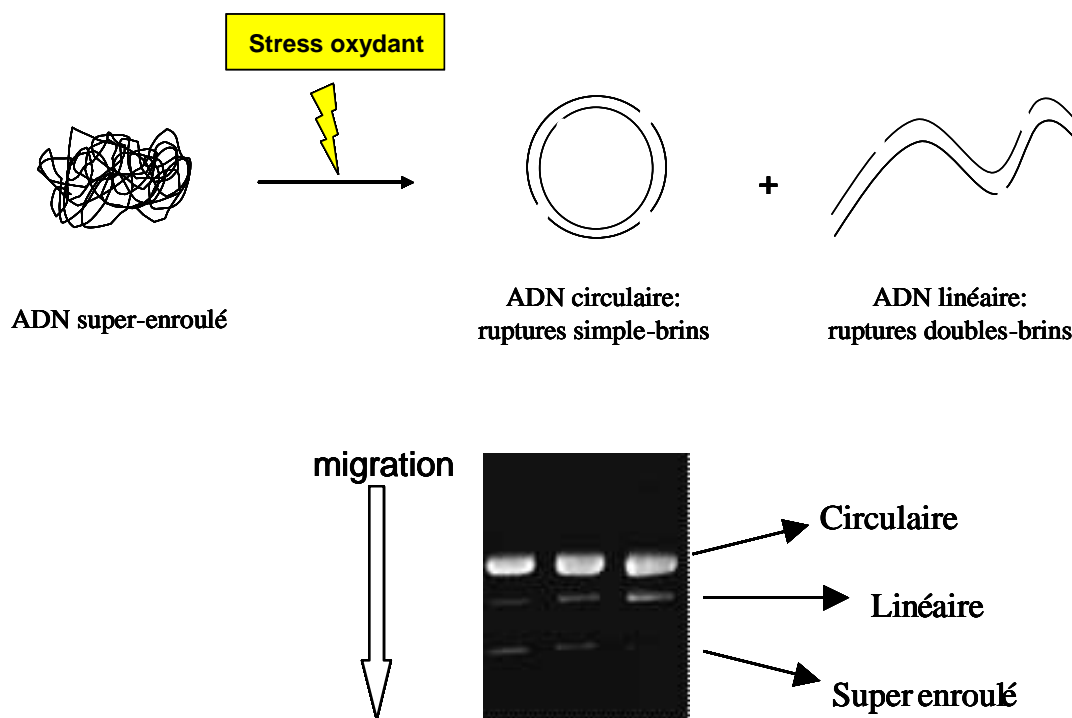


Figure 23 : nature et observation des différentes formes d'un plasmide soumis à un stress oxydant

Le plasmide utilisé est un plasmide pEGFP_{Luc} de 6337 paires de bases. Ce test a été effectué dans des conditions de Fenton, en présence d'un mélange Fe^{2+} /EDTA/ H_2O_2 .

La première étape de ce test consiste à déterminer les conditions de dégradation à utiliser. Pour cela, plusieurs concentrations du système FeSO_4 /EDTA/ H_2O_2 doivent être testées, ainsi que différents rapports H_2O_2 / FeSO_4 . Les meilleures conditions ont été obtenues en utilisant les conditions : FeSO_4 /EDTA/ H_2O_2 : 1/1/10. Différentes concentrations ont alors été testées et l'évolution de la dégradation du plasmide avec la concentration en H_2O_2 est représentée à la figure 24.

Aux concentrations les plus faibles (figure 24, puits 4 à 7), la dégradation du plasmide n'est pas totale, puisque la proportion de plasmide super-enroulé est toujours importante. Aux concentrations les plus fortes (figure 24, puits 1 et 2), le plasmide super-enroulé a été totalement dégradé, mais, en plus du plasmide circulaire et linéaire, des bandes diffuses sont visibles, qui sont le signe d'une dégradation importante de l'ADN c'est à dire sa coupure en de petits fragments. Les conditions sélectionnées sont celles obtenues au puits 3, où le plasmide est dégradé efficacement (une faible proportion de plasmide super-enroulé est tout de même visible), sans apparition de bandes diffuses.

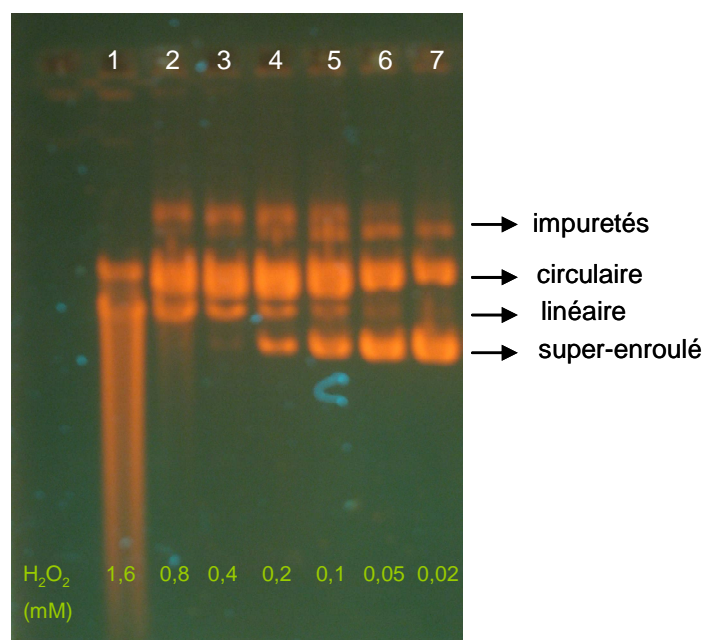


Figure 24 : évolution de la dégradation du plasmide en fonction de la concentration en H₂O₂
(FeSO₄/EDTA/H₂O₂ : 1/1/10)

Les conditions retenues pour les tests sont les suivantes : pEGFP_{Luc} 0,1 µg/µL ; Tp. phosphate pH 7,4, 20 mM, FeSO₄/EDTA/H₂O₂ : 1/1/10, 0,4 mM ; 30 min ; gel d'agarose 0,8%. Le gel d'électrophorèse est révélé au bromure d'éthidium.

Quatre expériences ont été réalisées. Les trois premières ont consisté à comparer les produits de type I, de type II et les acides pulviniques symétriques, sur les trois familles présentées au paragraphe précédent (phényle, bromée et méthoxylée). La quatrième expérience a permis d'étudier l'influence de la substitution de la double liaison *exo*-cyclique sur les dérivés de type I.

III.2 Résultats

III.2.1 Première expérience : Norbadione A et famille méthoxylée

Dans un premier temps, la NBA **1** ainsi que le produit symétrique **169b**, le produit de type I **162b** et le produit de type II **190d**, tous les trois substitués par un groupement méthoxyle, ont été étudiés (figure 25).

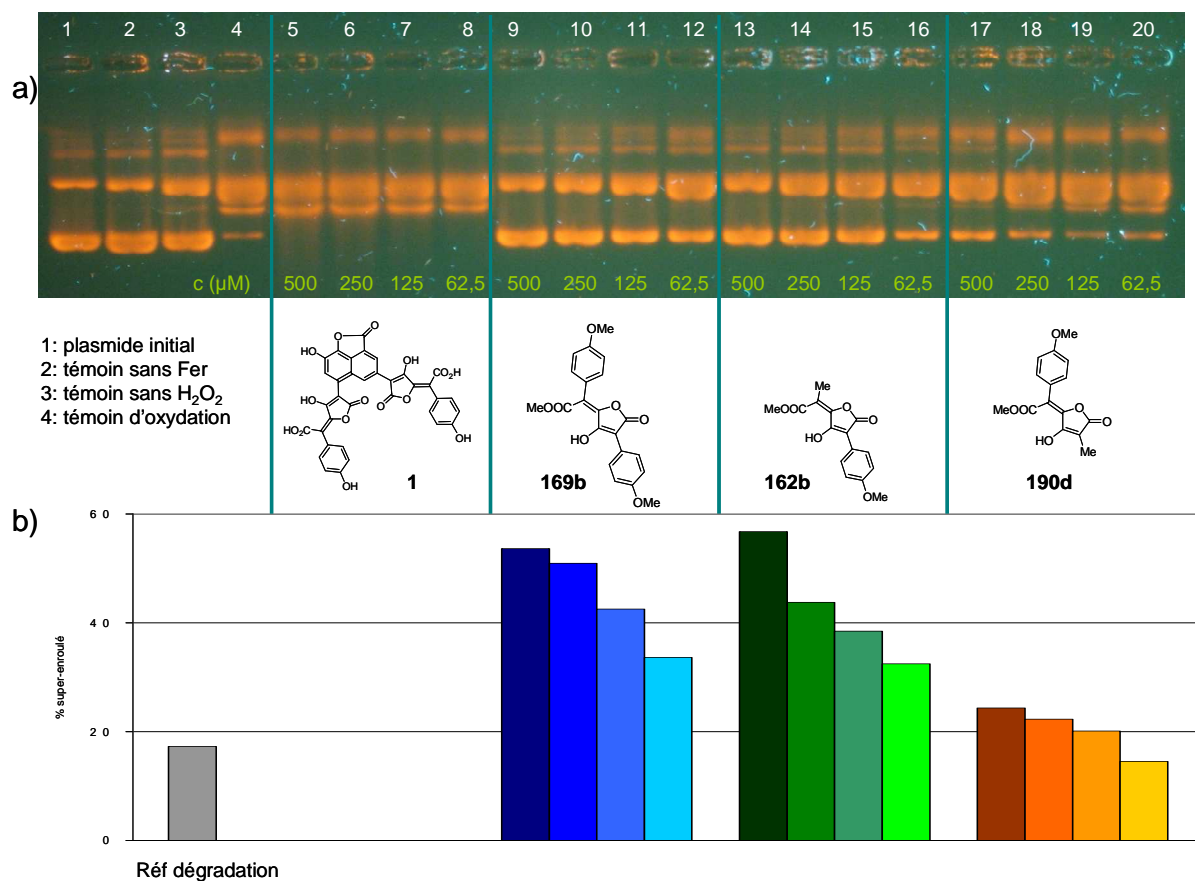


Figure 25 : protection du plasmide par NBA et série OMe

Les quatre premiers puits du gel sont utilisés pour des témoins (figure 25a, puits 1 à 4). Le puits 1 montre le plasmide qui n'a pas été soumis aux conditions d'oxydation. On remarque que celui-ci est, comme attendu, très largement sous sa forme super-enroulée. La forme circulaire est tout de même visible, ainsi que quelques impuretés migrant moins vite que la forme circulaire. Les témoins sans fer (figure 25a, puits 2) et sans eau oxygénée (figure 25a, puits 3) montrent une très faible dégradation du plasmide. Les conditions utilisées pour dégrader le plasmide (figure 25a, puits 4) ne permettent pas une dégradation totale, puisqu'une faible proportion de la forme super-enroulée est toujours visible. La forme circulaire est très majoritaire, mais la forme linéaire est également présente.

Les résultats obtenus pour la NBA **1** sont comparables à ceux décrits dans la littérature.⁴⁴ En effet, aucune protection n'est observée (figure 25a, puits 5 à 8). De plus, des bandes diffuses apparaissent aux deux concentrations maximales en NBA, ce qui est le signe d'une dégradation supplémentaire de l'ADN: la NBA a des propriétés prooxydantes dans ces conditions.

Le produit symétrique **169b** offre une bonne protection (figure 25a, puits 9 à 12). On remarque que la bande correspondant au plasmide intact est d'autant plus intense que la concentration en **169b** est forte.

Le produit de type I **162b** a un profil comparable au produit symétrique avec une bonne protection, « proportionnelle » à la concentration (figure 25a, puits 13 à 16).

Par contre, le produit de type II **190d** n'offre que très peu de protection (figure 25a, puits 17 à 20). Pour des concentrations de 62,5 à 250 μM , on observe très peu de différence entre le plasmide non protégé (figure 25a, puits 4) et protégé par **190d** (figure 25a, puits 18 à 20). A une concentration de 500 μM , une faible protection est visible (figure 25a, puits 17).

Afin de disposer de données numériques plus facilement exploitables à partir des gels d'électrophorèse, les images ont été analysées en intégrant les intensités lumineuses relatives des différentes bandes, à l'aide du logiciel ImageJ (figure 25b, la référence de dégradation correspond au puits 4 du gel).

Ce graphique montre bien le comportement similaire du produit symétrique et du produit de type I, avec plus de 50% de plasmide intact à 500 μM . Le produit de type II est comparable à la référence de dégradation (aux alentours de 15-20% de plasmide super-enroulé), donc n'apporte pratiquement aucune protection.

Ces résultats sont donc en accord avec ceux observés dans le test précédent sur la protection de la thymidine en conditions de Fenton, à savoir :

- ◆ la NBA a un effet prooxydant,
- ◆ le produit symétrique **169b** et le produit de type I **162b** ont une activité similaire et offrent une protection efficace,
- ◆ le produit de type II **190d** est très peu actif.

III.2.2 Deuxième expérience : famille phényle

Le produit symétrique **169a**, le produit de type I **162a** et le produit de type II **201a** ont ensuite été placés dans les mêmes conditions que précédemment. Le gel obtenu est représenté sur la figure 26.

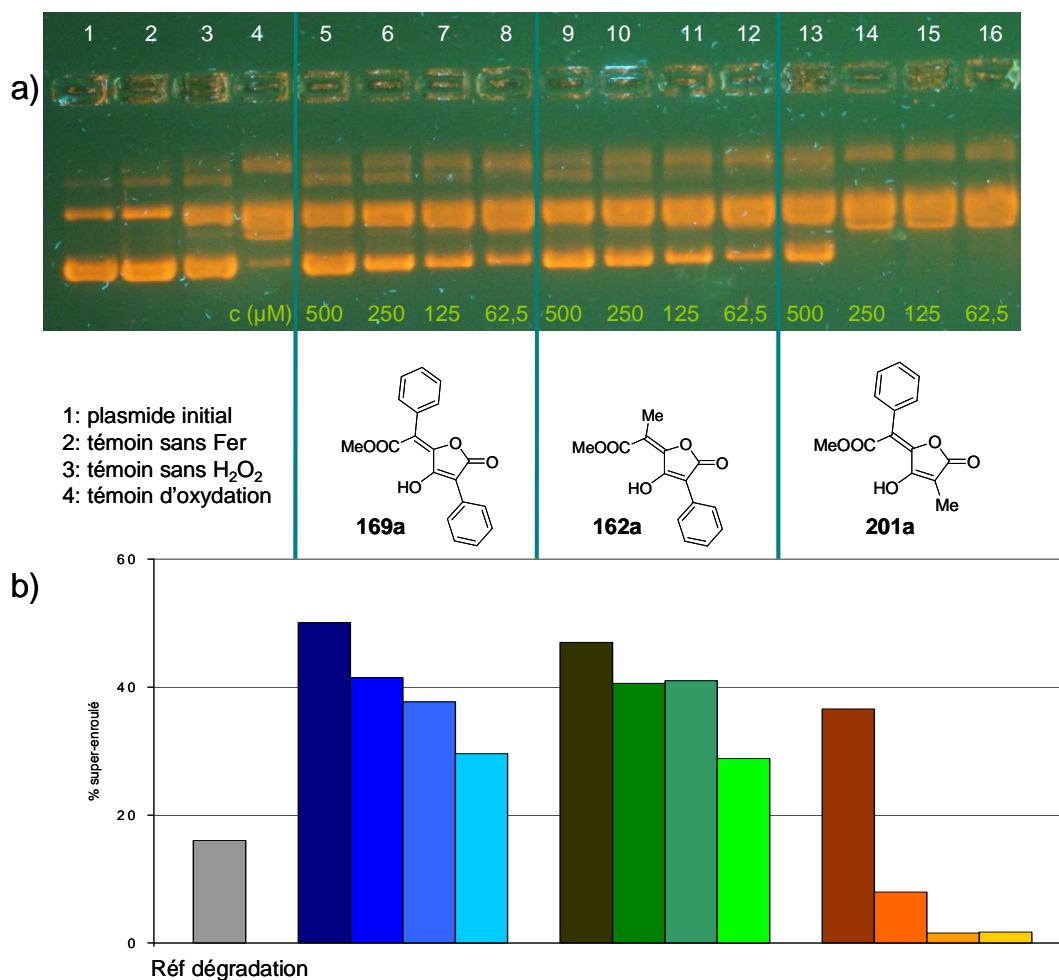


Figure 26 : protection du plasmide en série phényle

La tendance observée est la même que dans le cas de la série méthoxylée, à savoir que le produit symétrique **169a** et le produit de type I **162a** offrent tous les deux une bonne protection, qui augmente avec la concentration. Le produit de type II **201a** apporte une protection, qui n'est pas négligeable, uniquement à la plus forte concentration (figure 26a, puits 13).

III.2.3 Troisième expérience : famille bromée

La série des trois produits bromés **169f**, **162f** et **201b** a été testée, ainsi que le produit fluoré de type I **162e** (figure 27).

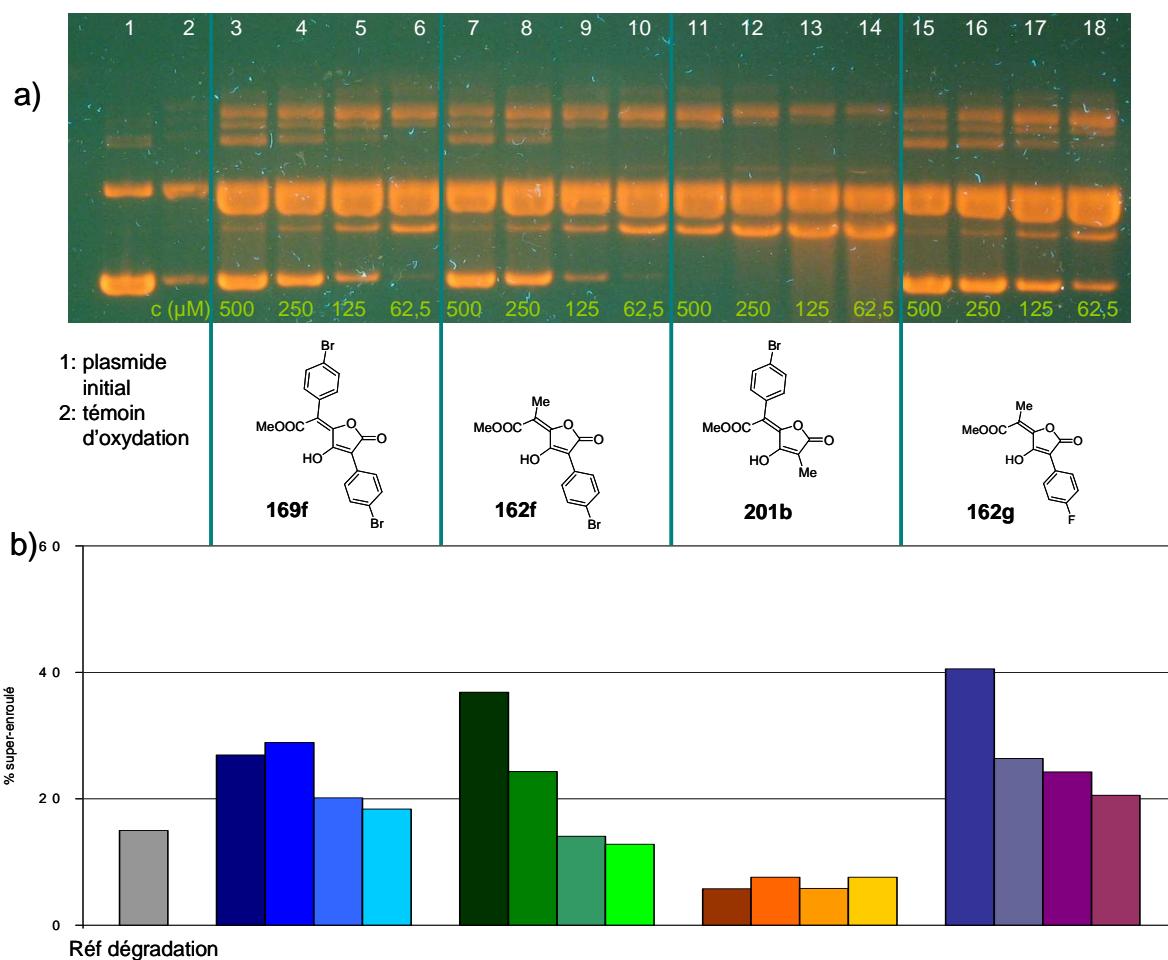


Figure 27 : protection du plasmide par des produits halogénés

Comme attendu, le produit symétrique **169f** (figure 27a, puits 3-6) et le produit de type I **162f** (figure 27a, puits 7-10) offrent une protection comparable. Le produit de type II **201b** provoque la formation de bandes diffuses aux faibles concentrations (figure 27a, puits 13 et 14) qui s'amenuisent et disparaissent complètement à 500 μM (figure 27a, puits 11). Aucune trace du plasmide intacte n'a pu être observée pour **201b**. Ainsi, il semblerait que ces résultats soient la conséquence de la superposition de deux effets de **201b** : un effet prooxydant aux faibles concentrations et un effet antioxydant qui devient plus prononcé à des concentrations supérieures. Le fait que le composé de type II semble prooxydant à certaines concentrations, alors que les deux autres composés de type II **190d** et **201a** ne le sont pas, est difficilement interprétable à ce stade de l'étude.

Le produit de type I fluoré **162e** semble offrir une meilleure protection que l'analogue bromé **162f**, notamment à faible concentration (comparer sur la figure 27a les puits 10 et 18).

III.2.4 Quatrième expérience : influence de la substitution de la fonction *exo*-cyclique sur les composés de type I

Trois amides, dérivés de la butylamine **183b**, de la morpholine **183e** et du 1,3-diaminopropane **187**, ainsi que l'alcool **193a** ont ensuite été évalués (figure 28).

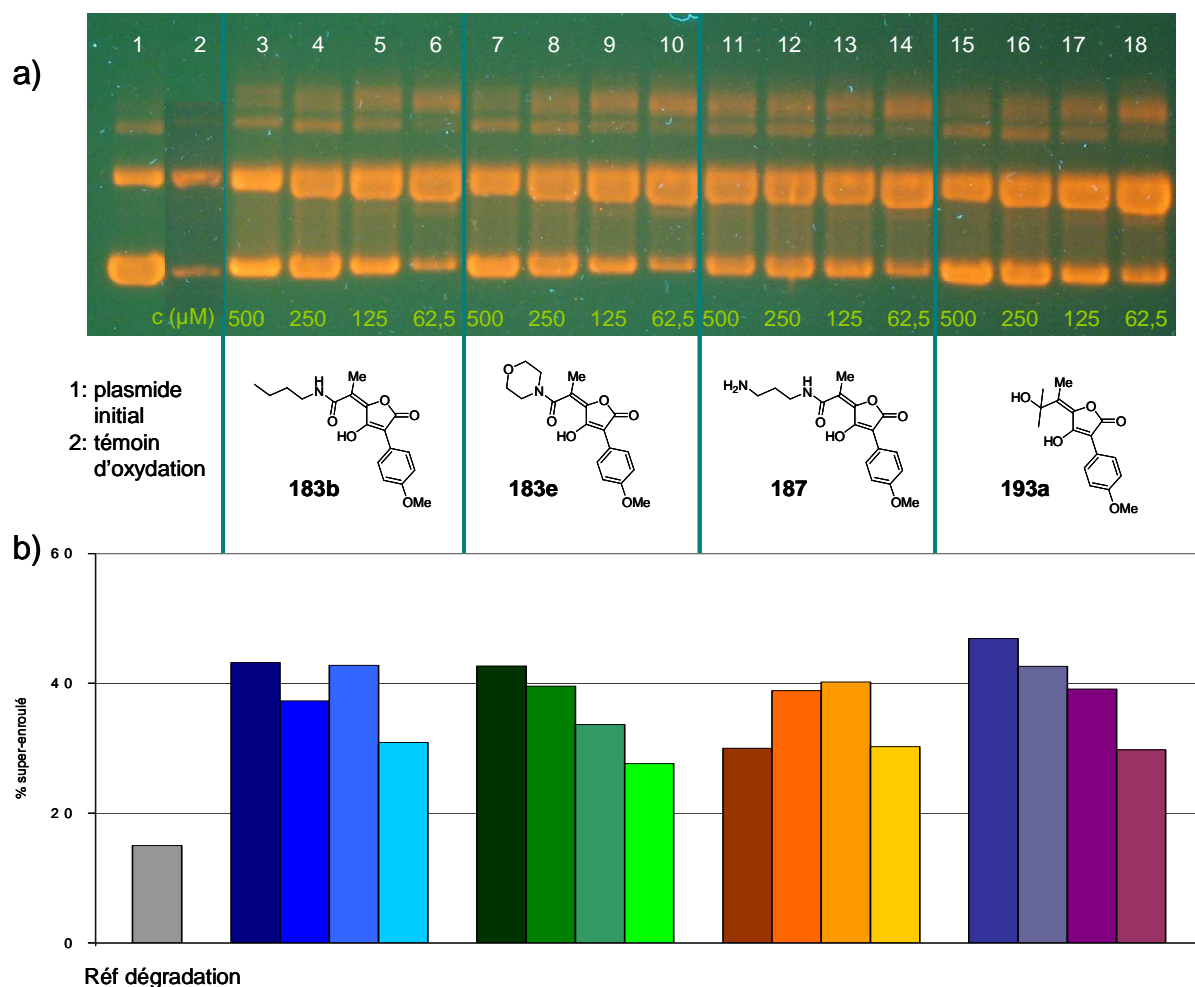


Figure 28 : protection du plasmide par des amides et un alcool

Ces quatre produits se sont révélés être tous de très bons protecteurs, même aux concentrations les plus faibles. La protection offerte par tous ces produits est comparable, avec un effet de concentration positif. Ces produits semblent donc être tous des antioxydants efficaces dans ces conditions. L'alcool **193a** confirme ici ces bonnes propriétés protectrices, déjà observées pour la protection de la thymidine.

III.3 Conclusions

Ce test de protection d'un plasmide bactérien a permis de confirmer les résultats obtenus avec la thymidine. Les produits de type I sont de très bons antioxydants, comparables aux acides pulviniques symétriques. Les produits de type II sont, par contre, très peu actifs dans ces deux tests. Ces résultats laissent donc supposer que, comme nous l'avions suggéré, la délocalisation du radical s'effectue majoritairement sur le noyau aromatique porté par la partie « sud » de la molécule.

De plus, aucun des produits de type I n'a montré de propriétés prooxydantes, ce qui est un résultat très encourageant pour le développement de nouveaux produits basés sur cette structure.

La comparaison entre les différents gels étant assez délicates, il est difficile d'établir une hiérarchie au niveau des fonctions portées par la double liaison à l'extérieur du cycle. La seule certitude est que tous les produits de type I sont particulièrement actifs, qu'ils portent une fonction ester méthylique, amide ou alcool tertiaire.

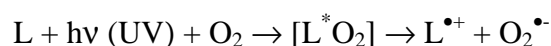
IV. Etude de la capture du radical superoxyde

Ces tests ont été effectués au Centre de Recherche Pierre Fabre Dermo-Cosmétique à Vigoulet, en collaboration avec Mmes Laure DUPRAT et Muriel SEGUR-DERAI.

IV.1 Principe

Cette étude, effectuée sur un appareil Photochem Analytic Jena[®], permet de mesurer l'activité antioxydante, en évaluant la capture du radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$.¹²⁰

Le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ est généré photochimiquement, par excitation d'un photosensibilisateur, le luminol **236** (L), en présence d'oxygène, suivant la réaction :



En présence d'une espèce antioxydante, une partie des radicaux $O_2^{\bullet-}$ va être captée ; les radicaux restés libres vont ensuite être détectés par luminescence. Le luminol **236**, qui est une molécule luminescente, va également être utilisé lors de l'étape de détection (schéma 93).

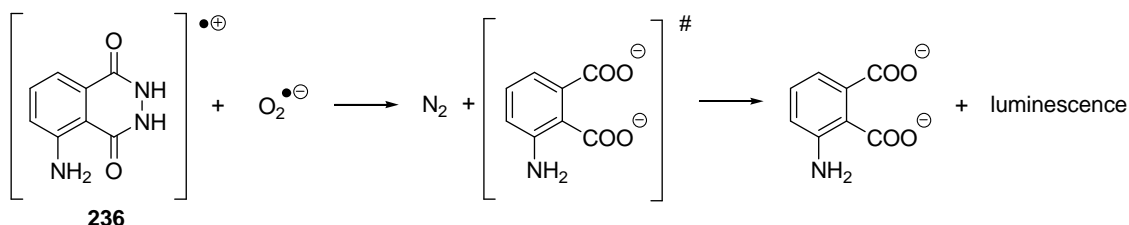


Schéma 93 : génération de luminescence par le luminol **236**

Le luminol **236** joue donc un double rôle, celui de photosensibilisateur et celui de « détecteur » en émettant de la luminescence. L'évolution de la luminescence est mesurée à 351 nm, sur une période de 180s.

L'avantage du Photochem réside d'une part dans la génération des radicaux par voie photochimique et d'autre part dans la méthode de détection par luminescence, ce qui permet une analyse précise et rapide. L'analyse est effectuée en milieu alcoolique, ce qui a permis d'analyser certains produits lipophiles, contrairement aux deux tests précédents.

La molécule de référence pour ce test est le Trolox. Une courbe de calibration est tracée avec différentes concentrations de Trolox et les résultats des échantillons testés seront exprimés en μg d'échantillon nécessaire pour obtenir une activité équivalente à l'activité détectée pour 1 μg de Trolox. L'analyse des résultats dépend essentiellement de deux critères qui sont l'allure de la courbe obtenue et la valeur numérique donnée par le logiciel.

Les produits sont ensuite classés selon leur activité (tableau 20).

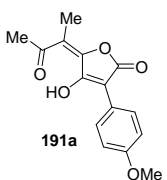
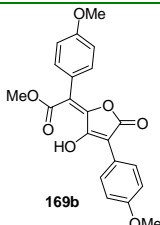
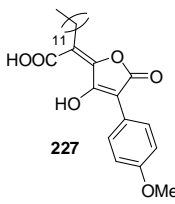
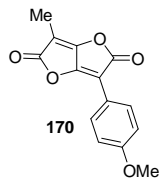
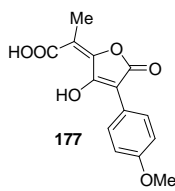
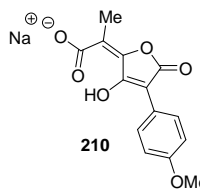
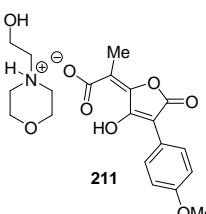
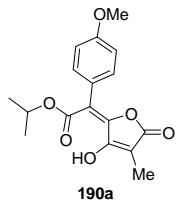
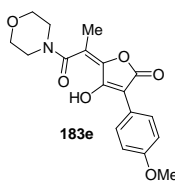
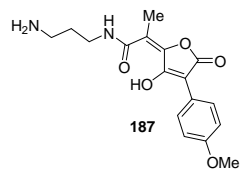
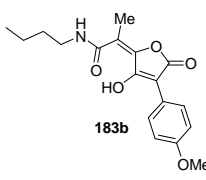
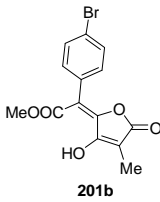
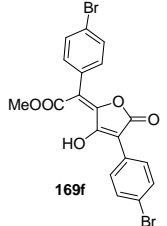
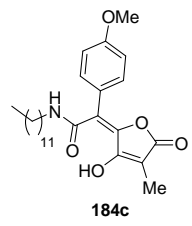
Tableau 20 : classement des produits pour Photochem

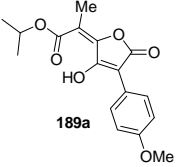
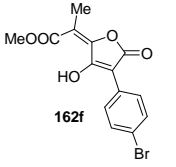
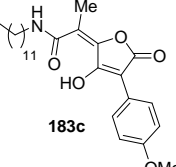
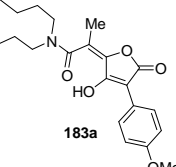
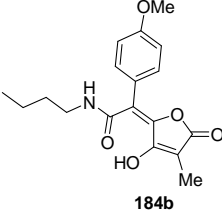
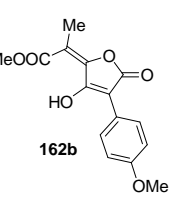
| Activité | μg éch pour 1 μg de Trolox | Exemple |
|------------|---|------------|
| Très bonne | 0,1 à 3,0 | Vitamine C |
| Bonne | 3,1 à 50 | BHT |
| Moyenne | 50,1 à 1000 | Cystéine |
| Faible | > 1000 | Albumine |

IV.2 Résultats

22 produits ont été testés. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 21. Les produits n'apparaissant pas dans ce tableau sont ceux pour lesquels les résultats étaient inhabituels, notamment l'allure des courbes (voir tableau 22).

Tableau 21 : résultats Photochem

| Entrée | Produit | µg éch pour 1 µg de Trolox | Entrée | Produit | µg éch pour 1 µg de Trolox |
|--------|---|-------------------------------|--------|--|-------------------------------|
| 1 |  191a | 46,9 | 2 |  169b | 54 |
| 3 |  227 | 56,7 | 4 |  170 | 60 |
| 5 |  177 | 61,1 | 6 |  210 | 66,8 |
| 7 |  211 | 69,9 | 8 |  190a | 77,4 |
| 9 |  183e | 79 | 10 |  187 | 81 |
| 11 |  183b | 86,4 | 12 |  201b | 87,3 |
| 13 |  169f | 88,8 | 14 |  184c | 105,1 |

| | | | | | |
|----|---|-------|----|--|-------|
| 15 |  | 105,2 | 16 |  | 112,9 |
| 17 |  | 117 | 18 |  | 121,6 |
| 19 |  | 124,3 | 20 |  | 141,5 |

Tous les produits testés ont des comportements proches, en termes de capture du radical superoxyde. Ils se situent tous dans la tranche « activité moyenne » avec des équivalences en Trolox comprises entre 50 et 150. Certaines observations peuvent toutefois être soulignées.

Le produit le plus actif de la série est la cétone méthylique **191a** (tableau 21, entrée 1). Ce produit est beaucoup plus actif que l'ester méthylique correspondant **162b** (tableau 21, entrée 20), produit le moins actif.

Parmi les produits les plus actifs se trouvent les deux acides **177** et **227** (tableau 21, entrées 3 et 5), ce qui montre l'importance de cette fonction. Les deux sels de carboxylates **210** et **211** (tableau 21, entrées 6 et 7) ont des activités similaires à l'acide **177**, ce qui prouve la bonne reproductibilité des tests.

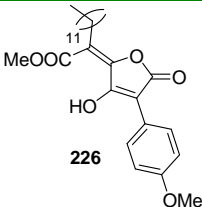
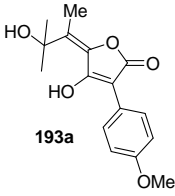
De façon surprenante, la dilactone **170** a une activité intéressante (tableau 21, entrée 4). Ce résultat n'était pas attendu car la structure de la dilactone ne semble pas offrir de sites susceptibles de capter un radical (contrairement aux autres produits possédant une fonction éno). Cette activité originale pourrait venir d'une réaction d'ouverture de la dilactone en présence d'anion superoxyde. L'activité antioxydante de **170** devra être évaluée dans d'autres systèmes afin de valider ou non cette hypothèse.

Contrairement aux tests précédents, les résultats obtenus dans une même série pour les produits symétriques, de type I et de type II ne sont pas discriminants. Pour la série bromée, ces trois produits ont des activités très proches (comparer dans le tableau 21 les entrées 12, 13 et 16). Une tendance inverse de celle observée précédemment a même été remarquée,

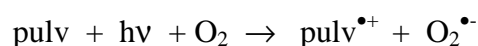
puisque'il semble que les produits de type II soient légèrement plus actifs que les produits de type I (comparer dans le tableau 21 les entrées 8 et 15, 12 et 16, 14 et 17). Cette tendance n'est pas observée dans le cas du butylamide (comparer dans le tableau 21 les entrées 11 et 19).

Deux autres produits ont montré un comportement particulier, il s'agit de l'ester **226** et de l'alcool **193a** (tableau 22).

Tableau 22 : produits au comportement particulier

| Entrée | Produit | µg éch pour 1 µg de Trolox | Entrée | Produit | µg éch pour 1 µg de Trolox |
|--------|---|-------------------------------|--------|---|-------------------------------|
| 1 |  226 | 2,5 | 2 |  193a | 4 |

En effet, selon la concentration, le comportement de ces produits n'est pas le même. Aux faibles concentrations (dix fois plus faibles que celles utilisées classiquement), ces produits offrent une excellente protection avec un effet-dose positif. Ils sont alors classés dans la catégorie « très bonne activité » avec une équivalence Trolox de 2,5 pour **226** et de 4 pour **193a**. Par contre, pour des concentrations plus élevées, une augmentation de la luminescence par rapport au témoin sans Trolox a été observée. Cette augmentation pourrait être expliquée par une libération de radicaux superoxydes plus importante que dans le système initial, selon la réaction :



Cette capacité à générer des radicaux superoxydes traduirait une activité prooxydante de ces dérivés. Ce résultat est surprenant car aucune activité prooxydante n'avait pu être observée pour ce type de produits dans les autres tests. Une autre explication serait que ces produits aient une émission propre de luminescence à la longueur d'onde de travail (351 nm).

Ce comportement variable en fonction de la concentration n'a donc pas permis de tirer des conclusions intéressantes sur la capacité de ces deux produits à piéger les radicaux superoxydes.

IV.3 Conclusions

Ces résultats indiquent que tous les produits testés sont des capteurs de radicaux O_2^{\bullet} d'activité moyenne, par rapport au composé de référence, le Trolox. La différence d'activité entre les produits symétriques et les produits de type I et II est beaucoup moins marquée que dans les tests précédents. Il n'est donc pas exclu que la capture des radicaux O_2^{\bullet} procède par un mécanisme différent de ceux observés dans les deux tests précédents. De plus, les produits ayant l'activité la plus intéressante à faible concentration ont un comportement inattendu à plus forte concentration.

L'information la plus intéressante apportée par ce test est que, pour la première fois, la dilactone **170** a montré une activité intéressante. Il est possible d'imaginer que **170** soit un précurseur direct d'acide pulvinique dans le milieu, après une première étape d'ouverture de la lactone en présence d'EOR.

V. Etude de la capture du radical DPPH[•]

Ces tests ont été effectués au CEA de Saclay par le Dr Thierry LE GALL et Brice NADAL.

V.1 Principe

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl **237** (DPPH[•]) est un radical stable sous forme solide disponible commercialement. Mis en solution dans l'éthanol, il est caractérisé par son spectre d'absorption UV-visible, avec une bande d'absorption à 515 nm. Le DPPH réagit par arrachement d'hydrogène avec des antioxydants, ce qui se traduit par la formation de 2,2-diphénylhydrazine **238** (DPPH₂, schéma 94).

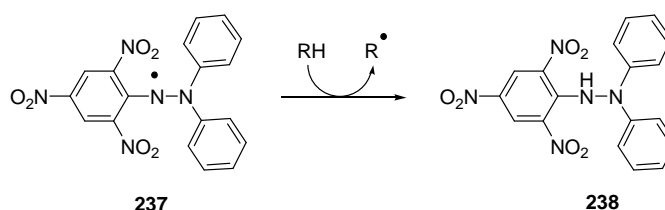


Schéma 94 : radical DPPH[•] et produit de réduction DPPH₂

Le test antioxydant consiste à suivre la disparition de la bande d'absorption à 515 nm, caractéristique de DPPH[•], en fonction du temps et en présence de l'antioxydant étudié. Ce test *in vitro* peut être adapté à un haut débit d'expérience et est devenu très populaire de par sa rapidité et sa simplicité de mise en œuvre.

Pour un antioxydant donné, une gamme de concentration (dans l'éthanol) est préparée (concentrations C1, C2, C3...) et, après addition de la solution de DPPH[•], l'absorbance à 515 nm est lue toutes les 5 min durant une heure. Les courbes obtenues ont les allures suivantes (figure 29) :

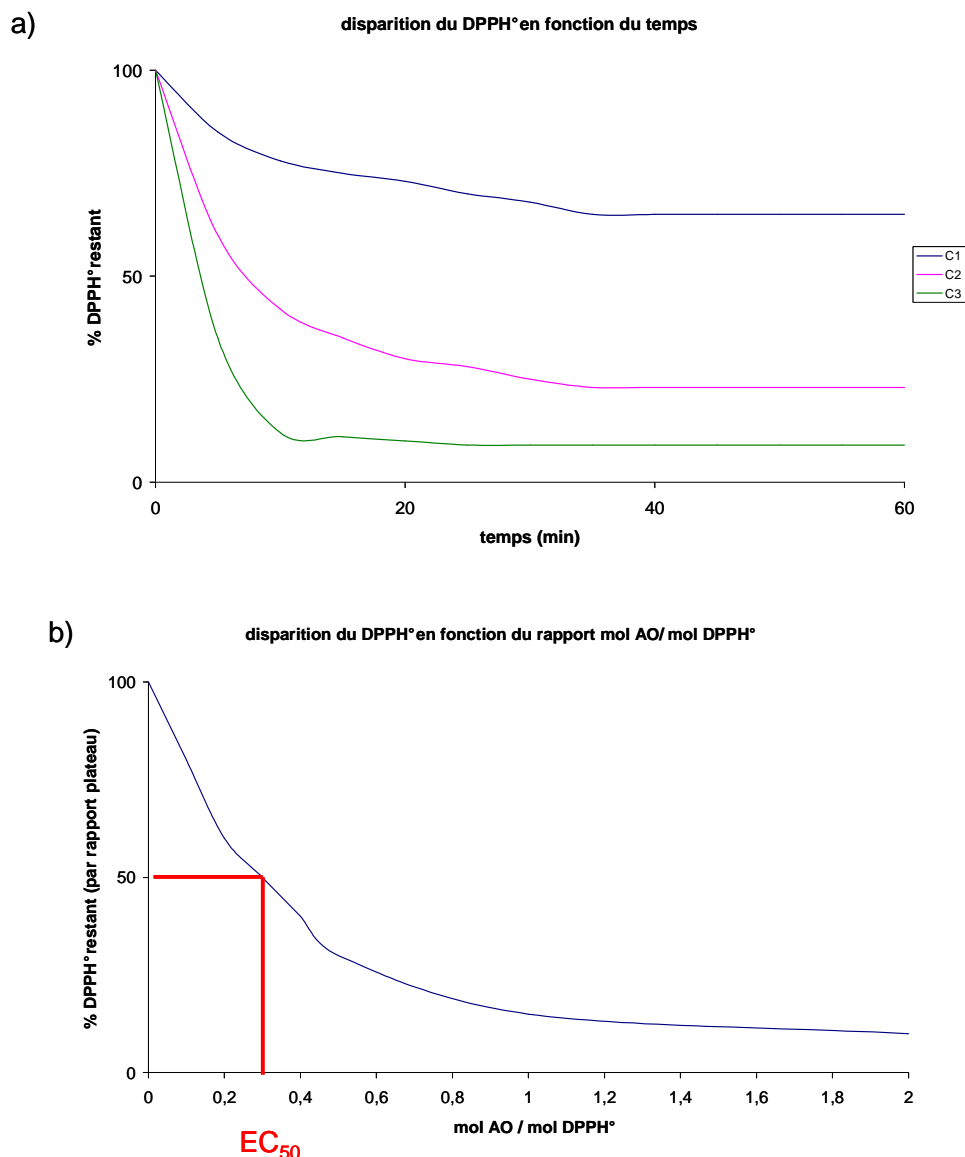


Figure 29 : courbes de disparition du DPPH[•] suivies par absorption UV-visible
a) en fonction du temps, b) calcul de la EC₅₀

A partir de l'étude de la courbe de disparition du radical DPPH[•], plusieurs informations sont disponibles :

- ◆ la cinétique de réduction du radical DPPH[•] (figure 29a) : plus le plateau est obtenu tôt, plus la cinétique de capture du radical par l'antioxydant est élevée,
- ◆ la « concentration efficace à 50% » (EC₅₀) qui correspond à la concentration en antioxydant qui permet la disparition de 50% du DPPH[•] initial (figure 29b) : ce calcul est effectué à partir de la concentration de DPPH[•] obtenue au plateau de chaque concentration (elle n'est donc calculable que pour des antioxydants ayant une

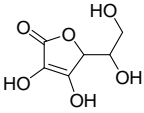
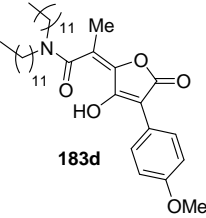
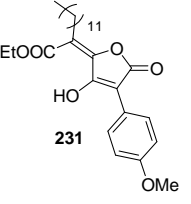
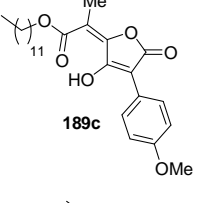
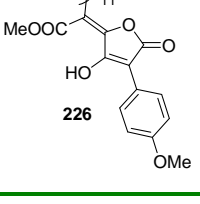
cinétique permettant d'obtenir le plateau pour une durée inférieure à une heure dans les conditions testées ici),

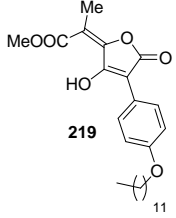
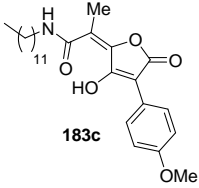
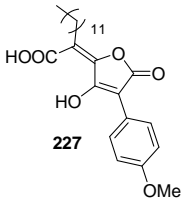
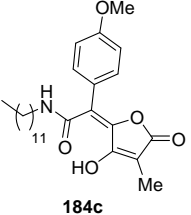
- ◆ le pouvoir antiradicalaire (ARP) : c'est l'inverse de la EC_{50} . En divisant ce nombre par deux, la stœchiométrie de la réaction peut être déterminée, c'est-à-dire le nombre de moles de DPPH[•] réduit par une mole d'antioxydant.

V.2 Résultats

Seuls les acides pulviniques lipophiles ont été évalués dans ce test. La référence utilisée est l'acide ascorbique **239**. Les résultats sont regroupés dans le tableau 23.

Tableau 23 : résultats DPPH

| Entrée | Produit | Plateau (min) | EC_{50} | ARP | Stœchiométrie |
|--------|--|---------------|-----------|------|---------------|
| 1 |  239 | 10 | 0,24 | 4,17 | 2,08 |
| 2 |  183d | 10 | 0,33 | 2,98 | 1,49 |
| 3 |  231 | 40 | 0,52 | 1,92 | 0,96 |
| 4 |  189c | 50 | 0,54 | 1,82 | 0,91 |
| 5 |  226 | 30 | 0,56 | 1,77 | 0,88 |

| | | | | | |
|---|--|------------------------------|------|------|------|
| 6 |  <p>219</p> | 50 | 0,60 | 1,67 | 0,83 |
| 7 |  <p>183c</p> | Pas de plateau au bout de 1h | | | |
| 8 |  <p>227</p> | Pas de plateau au bout de 1h | | | |
| 9 |  <p>184c</p> | Pas de plateau au bout de 1h | | | |

L'acide ascorbique **239** a fourni des résultats proches de ceux décrits dans la littérature, avec une cinétique rapide (plateau atteint après 10 min) et une stœchiométrie proche de 2, c'est-à-dire qu'une mole d'acide ascorbique est capable de réduire deux moles de DPPH[•] (tableau 23, entrée 1).

Les résultats obtenus ont permis de classer les acides pulviniques lipophiles en trois catégories :

- ◆ l'amide **183d** semble être le produit le plus actif de la série (tableau 23, entrée 2). En effet, il possède la cinétique la plus rapide, comparable à celle de l'acide ascorbique (plateau atteint au bout de 10 min) et la stœchiométrie est de 1,5. Ce résultat est particulièrement intéressant, puisque les acides pulviniques ne possèdent potentiellement qu'un atome d'hydrogène susceptible d'être transféré sur le DPPH[•], à savoir l'hydrogène porté par l'oxygène de la fonction énol. Une stœchiométrie de 1 était donc attendue pour cette série. De tels comportements sont décrits dans la littérature où la stœchiométrie est rationalisée par plusieurs hypothèses, comme la

donation d'un second hydrogène, la dimérisation de deux molécules d'antioxydants ou la complexation d'un radical aryle avec le DPPH[•].¹²¹

- ◆ Les produits **231**, **189c**, **226** et **219** ont des comportements similaires, avec une cinétique plus lente (plateau atteint entre 30 et 50 min) et avec une stœchiométrie proche de 1 (tableau 23, entrée 3-6). Il semblerait donc que pour ces composés, une mole d'antioxydant soit capable de réduire une mole de DPPH[•]. Les esters éthylique **231** et méthylique **226** ont une activité comparable, ce qui montre la bonne reproductibilité du test.
- ◆ Les produits **183c**, **227** et **184c** ont tous les trois des cinétiques lentes (le plateau n'est pas atteint après une heure de réaction), et la stœchiométrie n'a donc pas pu être déterminée (tableau 23, entrée 7-9). Ces produits semblent donc être les moins actifs de la série (un plateau a tout de même été observé après 72h de réaction, mais le témoin de DPPH[•] seul avait également évolué ; ces mesures ne sont donc pas exploitables).

V.3 Conclusions

Les résultats obtenus pour l'étude de la réduction du radical DPPH[•] ont montré des différences d'activité et de cinétique selon les produits lipophiles testés. Il est intéressant de noter que l'amide **183d** possédant une double chaîne lipophile est le produit le plus actif de la série alors que son analogue ne possédant qu'une chaîne simple **183c** n'est pas actif dans les conditions testées. La fonction ester semble importante car les produits **231**, **189c**, **226** et **219** ont tous une activité attendue c'est-à-dire avec une stœchiométrie de 1, alors que le produit **227** portant une fonction acide n'est pas actif dans ces conditions.

Ces premiers résultats sont encourageants et il serait intéressant de comparer ces dérivés lipophiles à leurs homologues ne possédant pas de chaîne grasse, afin de statuer sur l'importance de celle-ci dans ce test.

VI. Etude de la photostabilité

Ces tests ont été effectués au Centre de Recherche Pierre Fabre Dermo-Cosmétique à Vigoulet, en collaboration avec Mmes Laure DUPRAT et Muriel SEGUR-DERAI.

La photostabilité est un critère essentiel en vue de l'éventuelle incorporation d'un nouveau produit dans une formulation à usage cosmétique. En effet, la possible formation de produits de photodégradation doit être étudiée en détail, afin d'éviter tout effet secondaire (contrairement à l'industrie pharmaceutique, aucun effet secondaire n'est toléré au niveau de la législation dans le domaine cosmétique).

Dans cette optique, les laboratoires Pierre Fabre utilisent un appareillage spécifique appelé Suntest, qui reproduit l'irradiation du spectre solaire ; il est constitué d'une lampe au xénon et de filtres.

La Dose Erythémale Minimale (DEM) correspond à la dose minimale de lumière solaire provoquant l'apparition d'un coup de Soleil (qui correspond à 15 min d'exposition au Soleil à 13h dans le Sud de la France). Les échantillons ont été placés dans l'appareil Suntest pendant des temps d'irradiation correspondant à 5, 10 et 15 DEM. Les échantillons sont tout d'abord dissous dans le chloroforme, puis disposés dans des cristallisoirs. Après évaporation du solvant, une fine couche homogène de produit solide est obtenue.

Le suivi de l'évolution des produits est effectué par HPLC, CCM et UV. Trois produits lipophiles ont été évalués dans ces conditions :

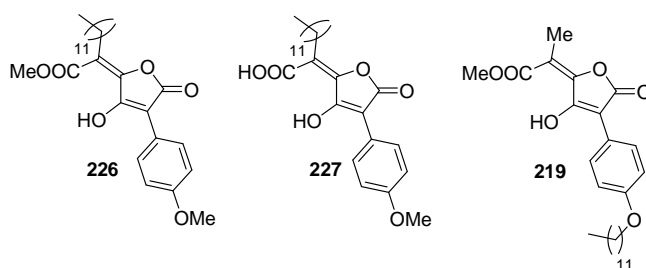


Schéma 95 : produits sélectionnés pour l'étude de la photostabilité

Lors de ces expériences, aucun produit de dégradation n'a été détecté de manière significative par HPLC, CCM ou UV. Les trois échantillons ont été récupérés inchangés, même après une irradiation correspondant à 15 DEM. Ces résultats indiquent que le noyau

pulvinique est photostable dans les conditions testées. Les acides pulviniques remplissent donc une condition essentielle pour une éventuelle utilisation dans une formulation cosmétique.

VII. Etude de l'inhibition de la peroxydation lipidique

Ces tests ont été effectués au Centre de Recherche Pierre Fabre Dermo-Cosmétique à Vigoulet, en collaboration avec Mmes Laure DUPRAT et Muriel SEGUR-DERAI.

VII.1 Principe

Comme introduit au chapitre 1, les membranes sont particulièrement sensibles à l'action des radicaux. Ainsi, les acides gras polyinsaturés (AGPI) contenus dans les membranes sont les cibles du phénomène de peroxydation lipidique en chaîne, initié par les EOR.

L'acide linoléique **240** (schéma 96) appartient à la famille AGPI :

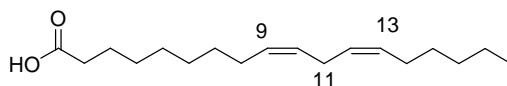


Schéma 96 : structure de l'acide linoléique **240**

L'initiation de la peroxydation lipidique correspond à la perte d'un atome d'hydrogène au niveau de la structure divinylméthane présente dans les AGPI (position 11, schéma 96). Cette position est particulièrement favorable à la perte d'un hydrogène car le radical formé est stabilisé par résonance sur les doubles liaisons voisines. Le radical carboné subit un réarrangement au niveau des doubles liaisons pour conduire à la formation de diènes conjugués qui réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde. Ce dernier forme à son tour un hydroperoxyde par réaction avec une autre molécule d'acide gras, régénérant ainsi le radical lipidique carboné, ce qui permet la propagation de la réaction en chaîne (schéma 97).

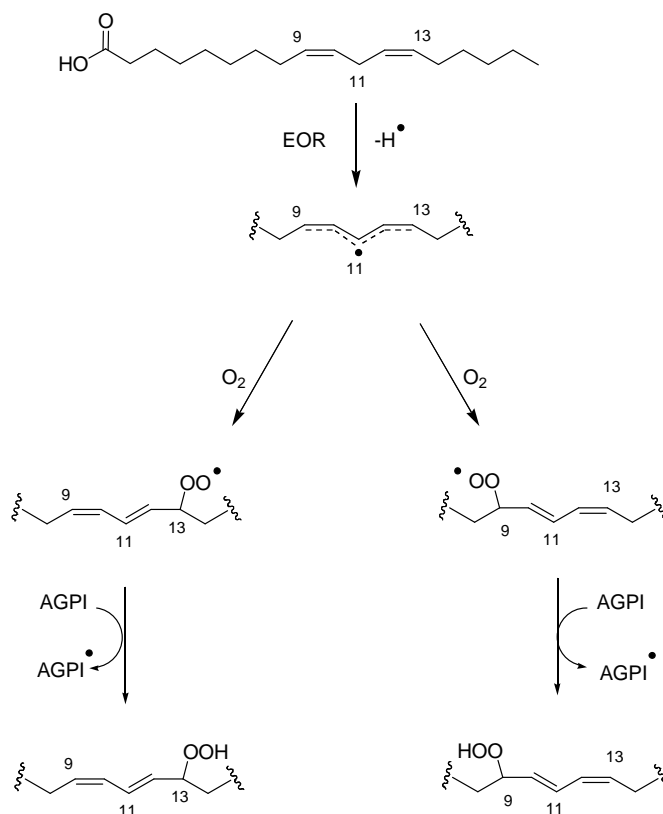


Schéma 97 : peroxydation lipidique

La décomposition ultérieure des hydroperoxydes est particulièrement complexe et conduit à une multitude de composés qui peuvent être des aldéhydes, des cétones, des peroxydes cycliques et des polymères.

Les méthodes utilisées pour évaluer la peroxydation lipidique reposent généralement sur l'identification et la quantification d'un des produits de dégradation de l'AGPI. Un des produits de dégradation est le malondialdéhyde **241** (MDA). Celui-ci peut être détecté par une réaction avec l'acide 2-thiobarbiturique **242** (TBA).¹²² Le principe de ce dosage consiste à former un chromogène stable **243**, adduit d'une molécule de MDA et de deux molécules de TBA (schéma 98). Ce chromogène est ensuite dosé par spectrofluorimétrie (excitation à 525 nm, détection à 549 nm).¹²³

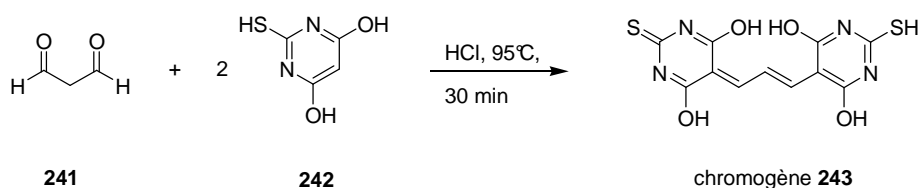


Schéma 98 : dosage du MDA par formation d'un chromogène avec le TBA

Brièvement, le protocole de ce test est le suivant : l'acide linoléique **240**, mélangé avec le produit à étudier, est soumis à une irradiation de 10 DEM à 37°C dans le Suntest, en présence d'eau oxygénée et de sulfate de fer (conditions de type Fenton).

Chaque expérience fait l'objet de l'étude comparative de cinq échantillons contenant tous une même concentration d'acide linoléique :

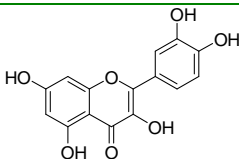
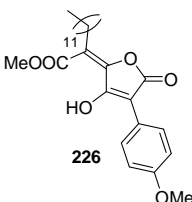
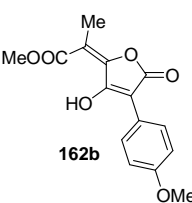
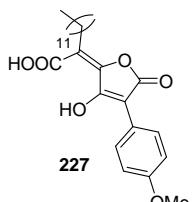
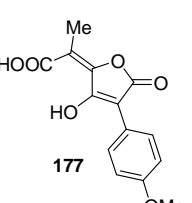
- ◆ contrôle négatif : acide linoléique protégé lors de l'irradiation par un film opaque noir,
- ◆ contrôle positif : acide linoléique, antioxydant de référence (la quercétine **244**), $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$,
- ◆ référence 1: acide linoléique seul,
- ◆ référence 2 : acide linoléique, $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$,
- ◆ acide linoléique, antioxydant à analyser, $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$.

Ce test est effectué en milieu alcoolique. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protection de l'acide linoléique. Ce test est particulièrement intéressant puisqu'il rend bien compte des phénomènes qui se produisent au niveau des membranes lipidiques et est tout à fait bien adapté pour l'étude des produits lipophiles, qui sont censés agir justement sur ces membranes.

VII.2 Résultats

Deux produits lipophiles et deux produits non lipophiles ont été étudiés pour l'inhibition de la peroxydation lipidique : les esters **162b** et **226** et les acides **177** et **227**. Le témoin positif est la quercétine **244** (tableau 24).

Tableau 24 : résultats de l'inhibition de la peroxydation lipidique

| Entrée | Produit (% massique/ac. linoléique) | % de protection |
|--------|---|-----------------|
| 1 |  244 (1%) | 86 |
| 2 |  226 (2%) | < 0 |
| 3 |  162b (2%) | 25 |
| 4 |  227 (5%) | 74 |
| 5 |  177 (10%) | 39 |

Remarque : tous les produits n'ont pas pu être testés à la même concentration, à cause de problèmes de solubilité.

La quercétine **244** montre, comme prévu, une bonne protection de 86% de l'acide linoléique (1% massique, tableau 24, entrée 1).

Le produit **226** n'a pas montré de propriétés protectrices dans ce test (2% massique, tableau 24, entrée 2). Au contraire, la quantité de MDA détectée était supérieure au témoin sans antioxydant. De la même façon que dans le test de capture de $O_2^{\bullet-}$, il semblerait que ce produit ait des propriétés prooxydantes dans les conditions de ce test.

L'ester **162b** n'a pas montré d'effet prooxydant, mais l'effet antioxydant est relativement faible, puisque ce produit offre une protection de 25% seulement (2% massique, tableau 24, entrée 3).

Le produit **227**, par contre, a montré des propriétés intéressantes, puisqu'il permet une protection de 74% (à 5% massique, tableau 24, entrée 4).

L'acide **177**, qui ne porte pas de chaîne grasse, a lui montré une protection de 39% (10% massique, tableau 24, entrée 5), ce qui est beaucoup moins bon.

VII. 3 Conclusions

Ces résultats ont permis de souligner la différence de comportement de l'ester et de l'acide, ainsi que l'importance d'avoir une longue chaîne carbonée pour avoir une bonne protection de l'acide linoléique. Ainsi, l'acide **227** s'est montré particulièrement efficace dans ce test.

VIII. Cytotoxicité

Ce test a été réalisé à l'IGBMC d'Ilkirch par le Dr Régis SALADIN et Axelle STREHLE.

VIII.1 Principe

Le test au MTT est une méthode rapide d'évaluation de la cytotoxicité, par numération des cellules vivantes.¹²⁴ Le MTT **245** (bromure de (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5- diphényl tétrazolium) est un sel de tétrazolium donnant une couleur jaune en solution. Il est réduit en formazan par les déshydrogénases mitochondriales actives des cellules vivantes (schéma 99). Les cellules mortes ne peuvent pas être le siège de cette réduction. Le formazan **246** formé, insoluble, donne une coloration violette. L'intensité de la coloration violette est directement proportionnelle au nombre de cellules viables à l'issue du test.

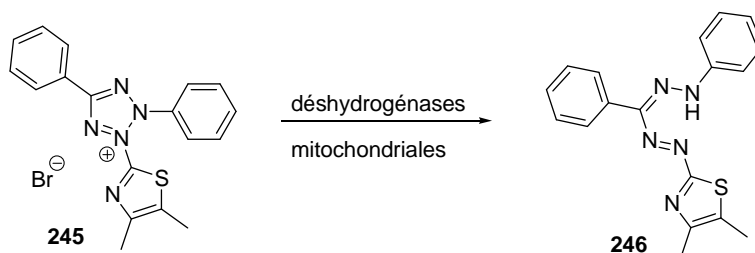


Schéma 99 : réduction du MTT en Formazan

Les cellules sontensemencées dans une plaque de 24 puits et sont mises au contact des produits à analyser pendant 24h. Puis, la solution de MTT est ajoutée. Après 4h d'incubation, le milieu est aspiré, puis les cristaux de formazan sont solubilisés dans du DMSO. L'intensité de la coloration violette est mesurée par un spectrophotomètre, à 540-630 nm. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration de MTT converti et est donc représentative du nombre de cellules viables.

VIII.2 Résultats

Ce test a été réalisé sur 35 des produits synthétisés, à des concentrations de 10 et 30 μM (conditions classiques). La sélection comprend des molécules symétriques, des produits de type I et II, contenant des chaînes grasses ou non (la liste est donnée en annexe). Les résultats sont représentés sur la figure 30.

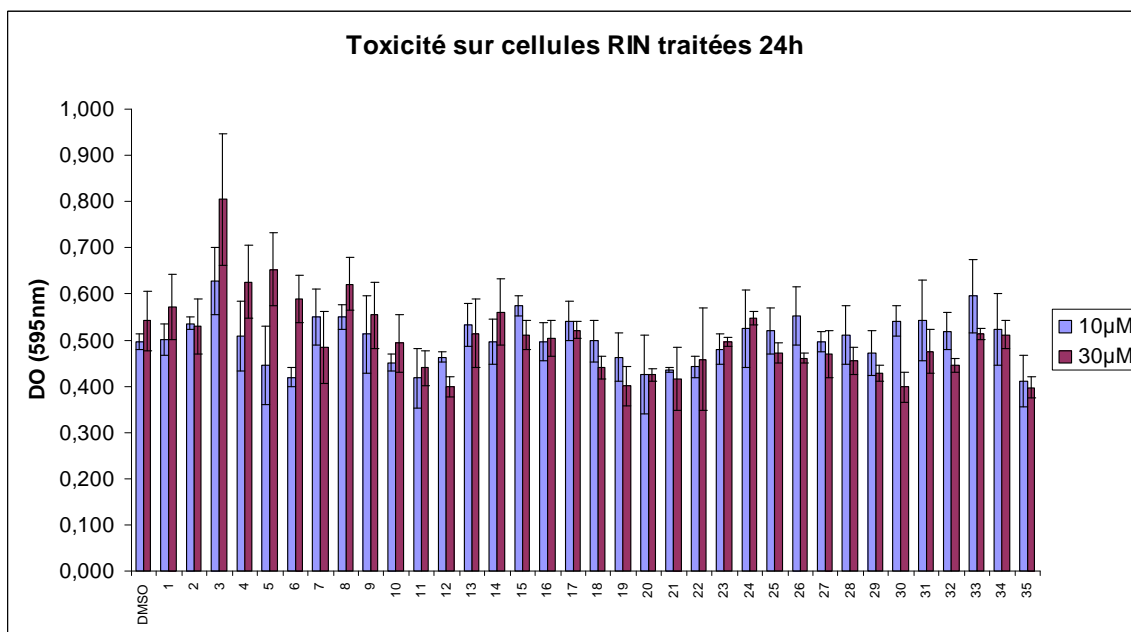


Figure 30 : résultats MTT

Aux concentrations testées, les produits ne semblent pas être cytotoxiques et ont tous un comportement similaire. En effet, l'absorbance mesurée est, pour chaque produit, très proche de l'absorbance mesurée par le témoin (DMSO seul). Un produit est considéré cytotoxique s'il induit une perte de 80% de la densité optique par rapport au témoin (ce qui correspondrait à une densité optique de l'ordre de 0,1 ici). Il ne semble donc pas que l'addition des produits ait provoqué la mort d'un grand nombre de cellules.

VIII.3 Conclusions

Les produits de type I et de type II testés ne sont pas cytotoxiques pour les cellules RIN, à 10 et 30 μM . Tous les produits ont ici un profil similaire, ce qui semble démontrer que le noyau central pulvinique n'est pas dangereux pour les cellules testées.

IX. Etude avec la balance de Langmuir

Ces tests ont été réalisés au Laboratoire de Pharmacie Biogalénique à Illkirch.

IX.1 Principe

Les « amphiphiles » sont des molécules constituées d'un groupe hydrophile (éventuellement ionique) et d'une partie hydrophobe constituée souvent d'une ou plusieurs chaînes linéaires carbonées. Une caractéristique des molécules amphiphiles est leur forte tendance à s'adsorber aux interfaces. A une interface air-eau, la partie hydrophile est en contact avec l'eau, la partie hydrophobe pointe vers l'air. Certains amphiphiles ont la propriété de s'organiser en films monomoléculaires à la surface de l'eau, également appelés monocouches.¹²⁵⁻¹³⁰

Le comportement de ces molécules est déterminé par les propriétés physiques et chimiques des groupements hydrophobes et hydrophiles.¹³¹ La taille de la chaîne lipophile, ainsi que la taille et la charge de la tête hydrophile sont donc très importantes. La notion de « balance » des propriétés hydrophile/hydrophobe est à l'origine des différences de comportements observées à l'interface. Il n'y a malheureusement pas de longueur de chaîne idéale pour former efficacement une monocouche, car la tête polaire hydrophile intervient également dans sa formation. Cependant, il est admis que si la chaîne grasse d'un produit comporte moins de 12 atomes de carbone, et même si le produit est insoluble dans l'eau, celui-ci aura tendance à former des micelles. Ces micelles sont solubles dans l'eau et empêchent la formation de la monocouche. A l'opposé, si la chaîne est trop longue, le produit a tendance à cristalliser à la surface de l'eau et ne forme pas de monocouche.

Le principe de l'expérience réalisée sur une balance de Langmuir est la suivant : lorsqu'une solution de composés tensioactifs est placée à la surface de l'eau (grâce à un solvant non miscible à l'eau et qui s'évapore rapidement, comme le chloroforme), cette solution s'étale rapidement et recouvre l'ensemble de l'aire disponible (figure 31a et 31b).¹³² Après évaporation du solvant, une monocouche d'agents tensioactifs est formée, également appelée film de Langmuir. La tête polaire du composé tensioactif est ancrée à la surface de l'eau et les chaînes hydrophobes s'orientent vers l'air. Lorsque la distance entre les composés tensioactifs est grande, leurs interactions sont faibles ; cet état est assimilé à un gaz à deux dimensions. Dans ces conditions, la monocouche a relativement peu d'effet sur la tension de

surface de l'eau. Lorsque l'aire disponible est réduite (par un système de barrières mobiles), les molécules sont comprimées et exercent des effets répulsifs entre elles (figure 31c). Cet analogue bidimensionnel de la pression est appelé pression de surface, notée π . Pour une surface plane à l'équilibre, π représente la différence entre la tension de surface en présence d'une monocouche, γ , et la tension de surface de l'eau seule, γ_0 :

$$\pi = \gamma - \gamma_0$$

La cuve de Langmuir permet de modifier l'aire d'une surface sur laquelle a été disposée une monocouche d'un agent tensioactif, grâce à deux barrières mobiles en Téflon. La cuve est remplie d'eau et la pression de surface est mesurée de manière continue lors de la compression. La pression de surface est mesurée par la méthode de la lame de Wilhelmy, en déterminant la force de tension de surface d'une lame partiellement immergée dans une phase liquide, ici l'eau. Cette mesure est comparée à la mesure absolue de la surface propre.

L'appareil est constitué :

- d'une cuve remplie d'eau
- de deux barrières mobiles
- d'une lame de Wilhelmy permettant la mesure de la pression de surface

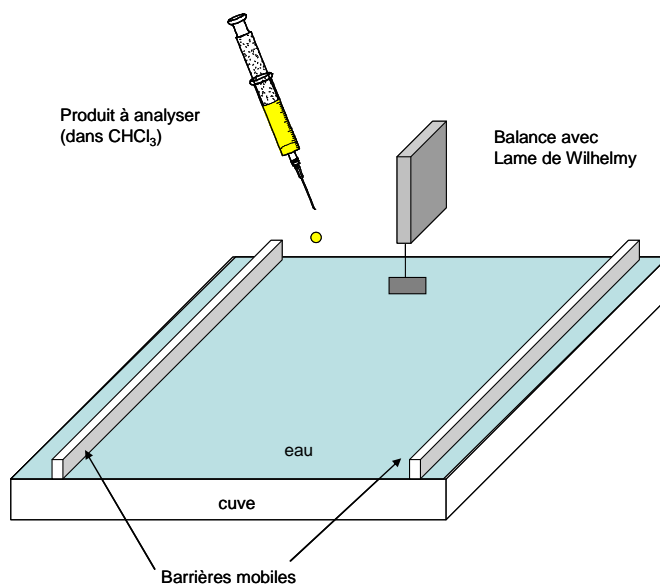


Figure 31a

Le produit amphiphile va se répandre de façon homogène sur l'aire disponible. Après évaporation du solvant, le produit tensioactif va former une fine monocouche.

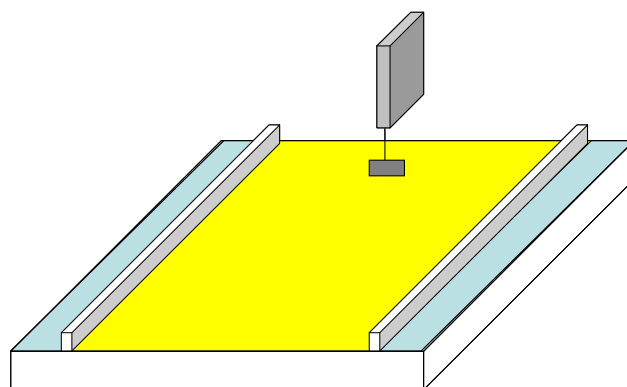


Figure 31b

Lorsque l'aire disponible va être réduite, grâce aux barrières mobiles, les molécules vont se rapprocher et créer des forces de répulsions qui vont être mesurées par la lame de Wilhelmy.

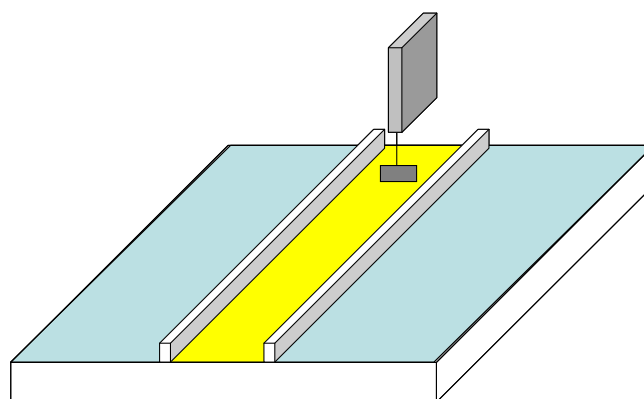


Figure 31c

Figure 31 : représentation schématique du principe de la balance de Langmuir

L'indicateur principal des propriétés d'une monocouche est donné par la courbe de pression de surface π en fonction de l'aire à la surface de l'eau disponible pour chaque molécule ou aire moléculaire A . Cette courbe est appelée isotherme de compression et permet de déterminer les différentes phases de l'organisation de la monocouche (figure 32).¹³³ Le comportement d'un produit amphiphile et ses différentes phases sont déterminés par plusieurs facteurs comme les propriétés physico-chimiques du produit ou la température.

Pour des densités moléculaires très faibles, une phase gazeuse prédomine. Les molécules ont une orientation préférentielle relative à la surface, mais les interactions entre les molécules sont très faibles. Cette phase n'est pas détectée en pratique.

La monocouche se trouve dans un état liquide expansé (LE) à l'état initial (barrières complètement ouvertes). Lors de la compression, les molécules se rapprochent, les chaînes peuvent encore bouger librement et des interactions entre les têtes hydrophiles peuvent exister. La pression de surface correspondant à cette région est très faible.

Un plateau marque la transition de la phase liquide expansé vers la phase liquide condensé (LC). Dans cette région, les chaînes hydrophobes, qui étaient distribuées à proximité de la surface de l'eau, commencent à se relever. Il y a coexistence de phases, la proportion de la phase LC augmente lorsque la surface disponible diminue.

En phase LC, l'isotherme continue par une transition abrupte, jusqu'à une région linéaire à forte pente. Les molécules sont inclinées et se redressent au fur et à mesure vers la verticale au cours de la compression.

Dans certains cas, un changement de phase est observé lors de la compression de la monocouche en phase LC : les molécules s'assemblent dans une phase ordonnée quasiment solide (S). Cette phase est analogue à une phase cristalline bidimensionnelle, les chaînes des molécules s'organisent perpendiculairement à la surface et occupent ainsi une surface minimale.

Aux plus faibles aires de surface, un phénomène dit de collapsus intervient ; la monocouche peut alors déborder de la cuve, former des multicouches ou se dissoudre dans l'eau. Le résultat est une perte de produit formant la monocouche.

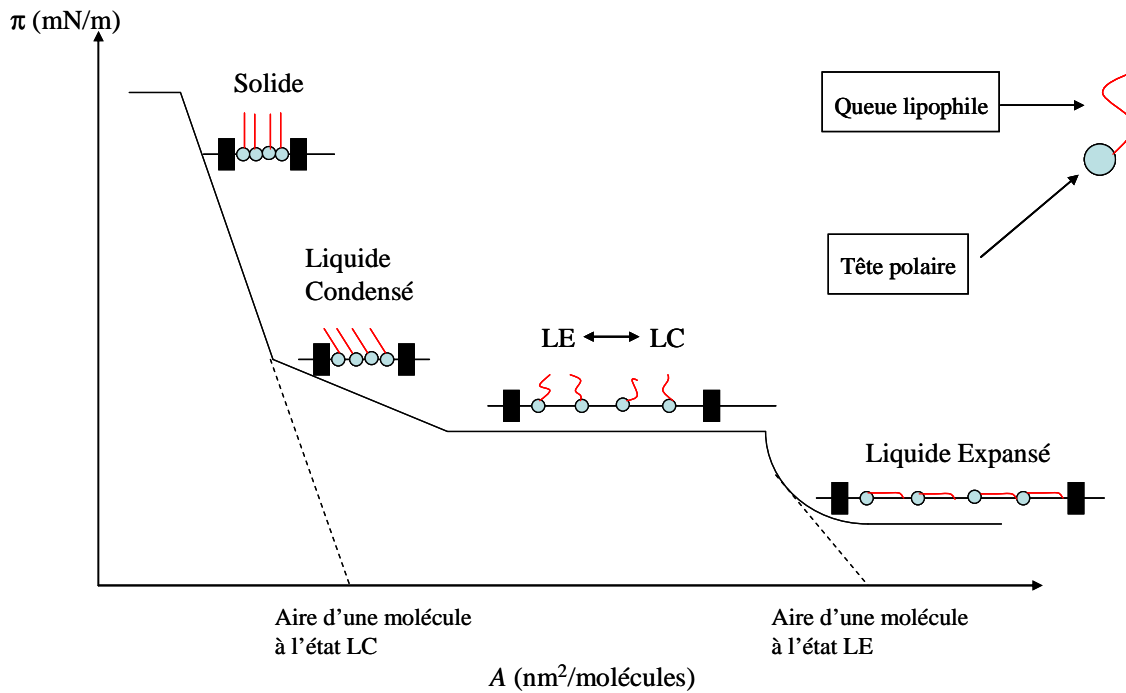
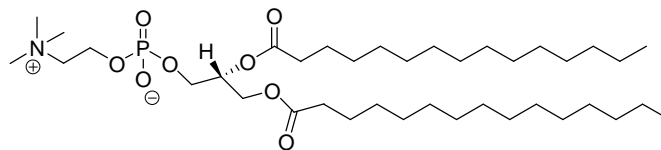


Figure 32 : isotherme de compression

IX.2 Objectifs des mesures

La dipalmitoyl phosphatidylcholine **247** (DPPC) est un surfactant pulmonaire (figure 33). A l'interface air/eau, le DPPC forme une monocouche qui est à l'état LC à faible aire moléculaire. Cette molécule peut être considérée comme un modèle de membrane lipidique.

Figure 33 : structure du DPPC **247**

L'absorption cutanée est un critère essentiel pour le développement d'un produit à usage topique. Ainsi, l'influence des acides pulviniques sur une monocouche de DPPC a été étudiée. Pour cela, une solution d'acide pulvinique lipophile a été mélangée au DPPC, à deux concentrations différentes, dans le but de comprendre les interactions pouvant exister entre ces deux produits. Les acides pulviniques seuls ont également été étudiés, afin de voir s'ils formaient ou non des monocouches.

Le DPPC ne peut pas être considéré comme un modèle membranaire pour rendre compte de l'absorption cutanée, car les lipides présents dans la peau sont beaucoup plus complexes, notamment les lipides présents dans la couche cornée.¹³⁴ Cependant, il peut servir de modèle pour cette étude préliminaire.

IX.3 Résultats

IX.3.1 DPPC

Une solution à 1mg/mL de DPPC dans le chloroforme a été préparée et 40 μ L de cette solution ont été déposés à la surface de la cuve de Langmuir. Après évaporation du solvant, le système a été comprimé (par « fermeture » des barrières), à 30°C (la température joue ici un rôle primordial). L'isotherme de compression obtenu est le suivant (figure 34):

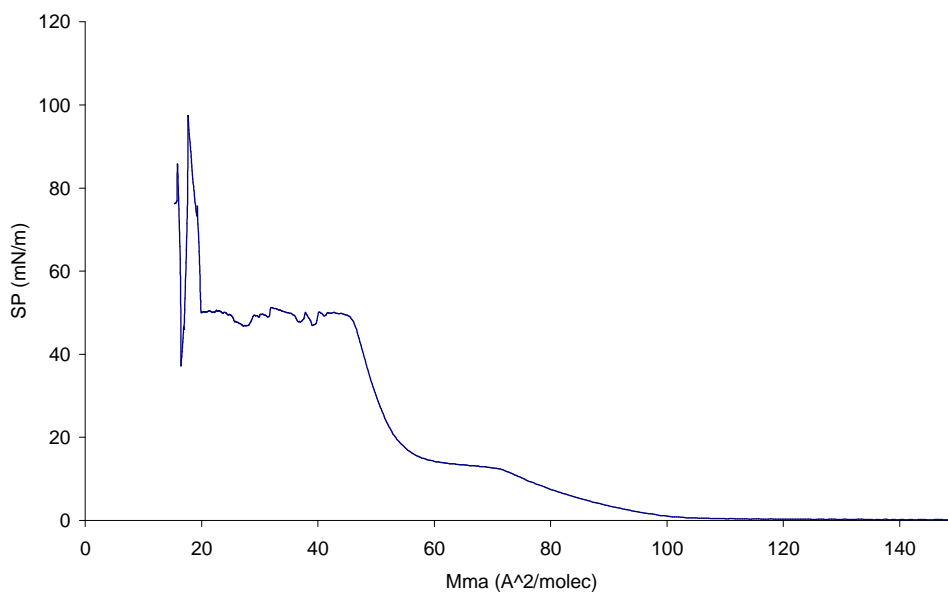


Figure 34 : isotherme de compression du DPPC à 30°C

Comme décrit dans la littérature, la phase LE, la transition LE/LC et la phase LC ont été observées.¹³⁵

Certains acides pulviniques lipophiles synthétisés ont ensuite été étudiés pour évaluer leur influence sur la monocouche de DPPC. Deux tendances sont ressorties de ces expériences : les produits formant des monocouches et les produits n'en formant pas.

IX.3.2 Produits formant des monocouches

Les deux produits **226** et **183d** ont des comportements proches (figures 35 et 36). Les produits seuls montrent la formation d'un plateau, qui pourrait correspondre à la transition LE/LC, sans que ces produits n'atteignent la phase LC avant le collapsus. A la concentration de 15% dans le DPPC, ces produits provoquent la disparition de la transition LE/LC (absence de plateau). Dans le cas de l'ester **226**, un effet de fluidification de la monocouche de DPPC est observé puisque l'augmentation de la pression de surface débute à des aires moléculaires plus faibles. A 40%, une tendance à la formation d'un nouveau plateau est observée, montrant l'apparition d'une nouvelle transition LE/LC (cet effet est bien marqué dans le cas de l'amide **183d**).

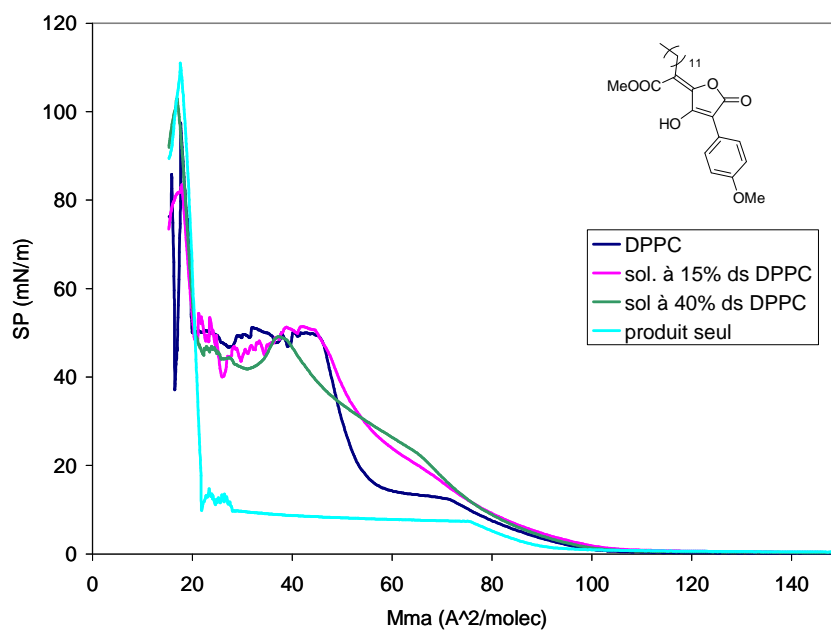


Figure 35 : isotherme de compression de **226** à 30°C

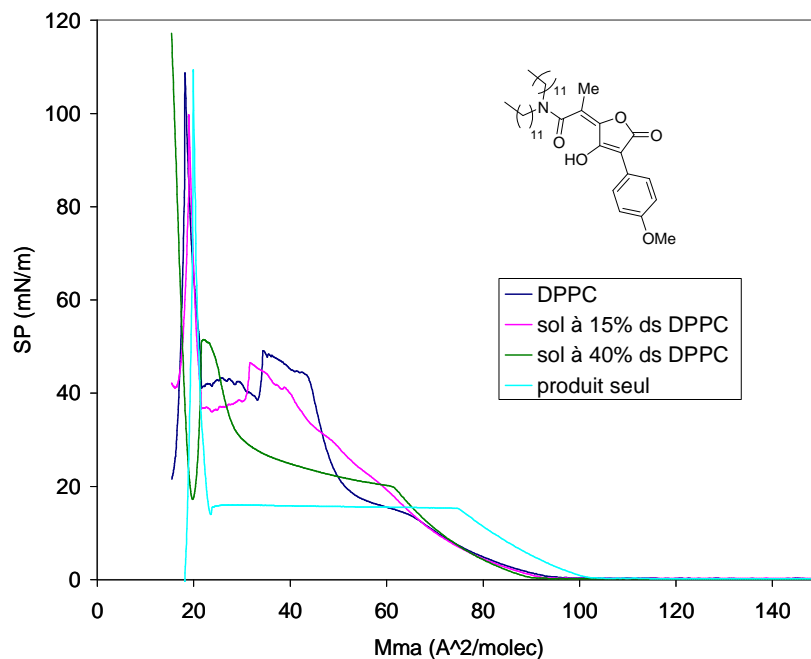


Figure 36 : isotherme de compression de **183d** à 30°C

IX.3.3 Produits ne formant pas de monocouches

Les trois produits **219**, **227** et **226** ont des comportements similaires (figures 37 à 39). En effet, les courbes correspondants aux produits seuls restent à la ligne de base jusqu'au collapsus, ce qui montre qu'il n'y a aucune organisation. Une autre explication de ce phénomène serait que les produits se solubilisent progressivement dans l'eau au fur et à mesure de la compression. En mélange avec le DPPC, une disparition de la transition LE/LC est observée dès 15%. On remarque un effet de concentration : plus la concentration du produit dans le DPPC est grande, plus la courbe se décale vers la gauche. Ceci pourrait provenir d'une insertion du produit dans la couche de DPPC et la formation de couches mixtes, moins bien organisées que le DPPC seul.

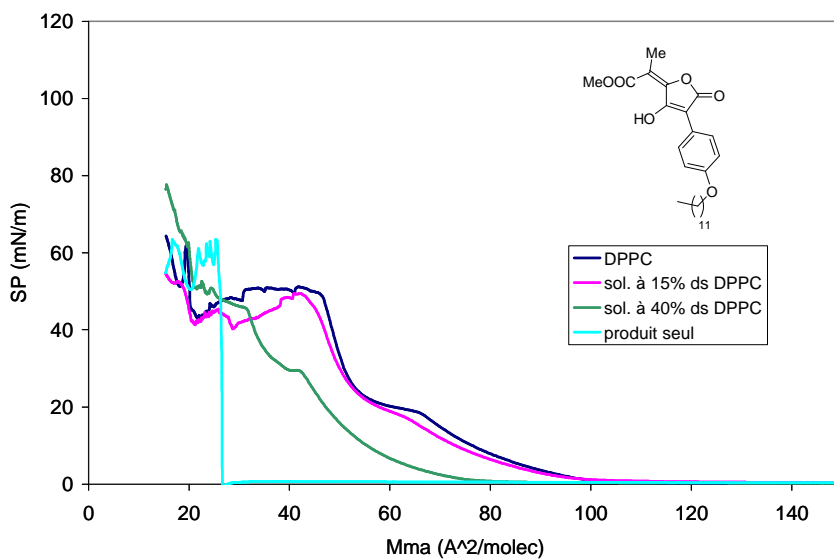


Figure 37 : isotherme de compression de **219** à 30°C

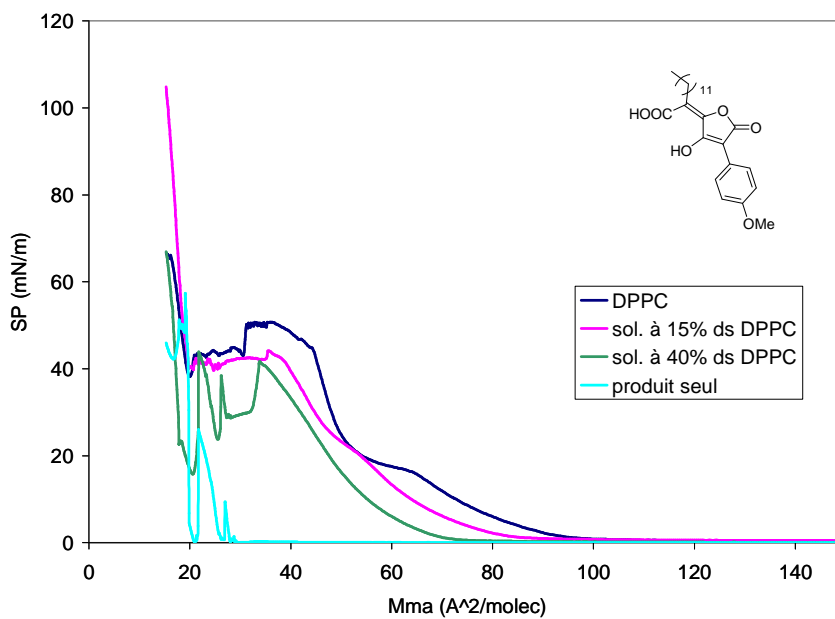


Figure 38 : isotherme de compression de **227** à 30°C

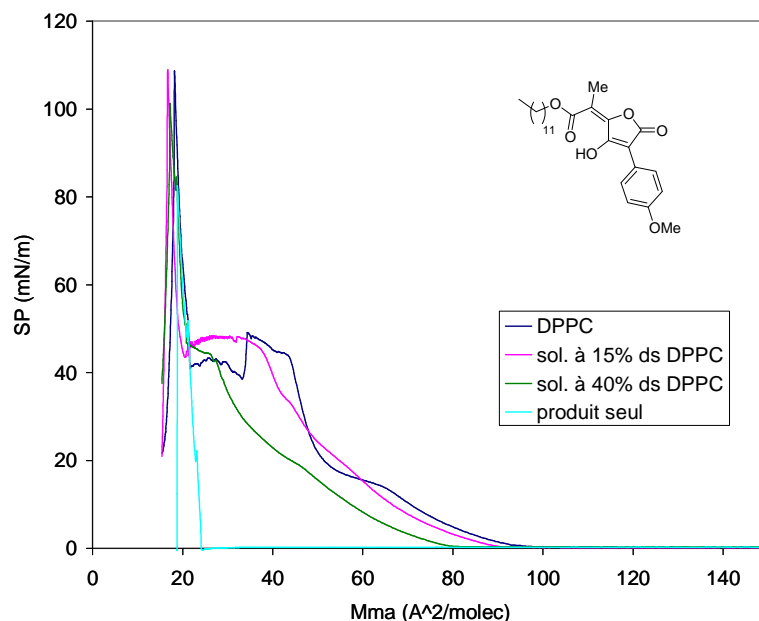


Figure 39 : isotherme de compression de **226** à 30°C

IX.4 Conclusions

Ces résultats préliminaires sont relativement difficiles à exploiter. En effet, de grandes différences de comportement ont été observées, malgré des structures proches. Ainsi, deux produits, l'ester **226** et l'amide **183d** semblent s'organiser et former des monocouches, lorsqu'ils sont seuls. A l'inverse, les trois autres produits **219**, **227** et **226** ne montrent aucune organisation. On remarque ici une grande importance de la balance hydrophilie/hydrophobie. En effet, l'acide **227** et l'ester méthylique correspondant **226** ont des comportements très différents. Il est possible que l'acide soit plus hydrosoluble que l'ester, ou que celui-ci forme des micelles. Comme énoncé dans l'introduction de ce paragraphe, une chaîne à 12 carbones est la longueur minimale pour éviter la formation de micelles solubles dans l'eau. Il est donc envisageable que les trois produits qui ne donnent aucune organisation se retrouvent en phase aqueuse. A l'opposé, l'amide **183d**, qui possède deux chaînes à 12 carbones, est plus lipophile et ne peut pas former de micelles, ce qui expliquerait l'allure de la courbe. Avec cette réflexion, l'allure de la courbe de l'ester **226** est délicate à justifier.

Ces expériences ont fourni des résultats préliminaires intéressants, mais ne permettent pas de conclure au niveau de la pénétration cutanée. Il faudrait construire des modèles de la couche cornée, mélanges complexes de lipides, et étudier l'influence de ces produits sur la

formation de monocouches pour pouvoir tirer des informations plus claires. Afin de statuer sur la formation de domaines cristallins organisés, de couches mixtes ou de micelles, il serait également intéressant d'étudier par microscopie de fluorescence l'organisation des produits lorsque les barrières sont fermées au maximum.

X. Conclusions

Les différents tests effectués sur les acides pulviniques mono-aromatiques, comparés à des acides pulviniques classiques et à des témoins dans chaque test, ont permis de tirer plusieurs enseignements.

Les études de la protection de la thymidine et du plasmide bactérien ont fourni des résultats convergents et très encourageants. En effet, les activités antioxydantes des trois types de produits testés sont bien différentes (figure 40 pour la série méthoxylée). Ainsi, il a été démontré que les produits de type I avaient une très bonne activité, comparable aux motifs symétriques. Au contraire, les produits de type II se sont révélés être des protecteurs peu efficaces dans ces conditions.

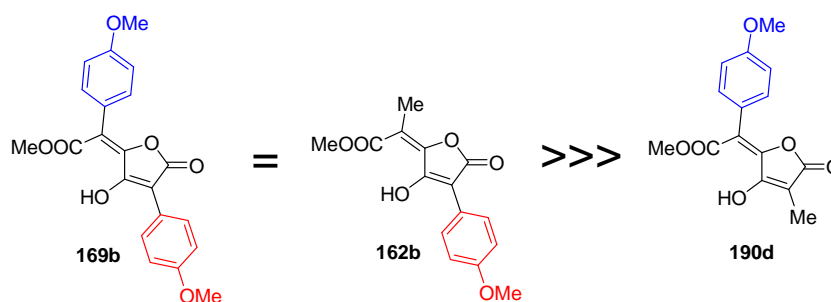
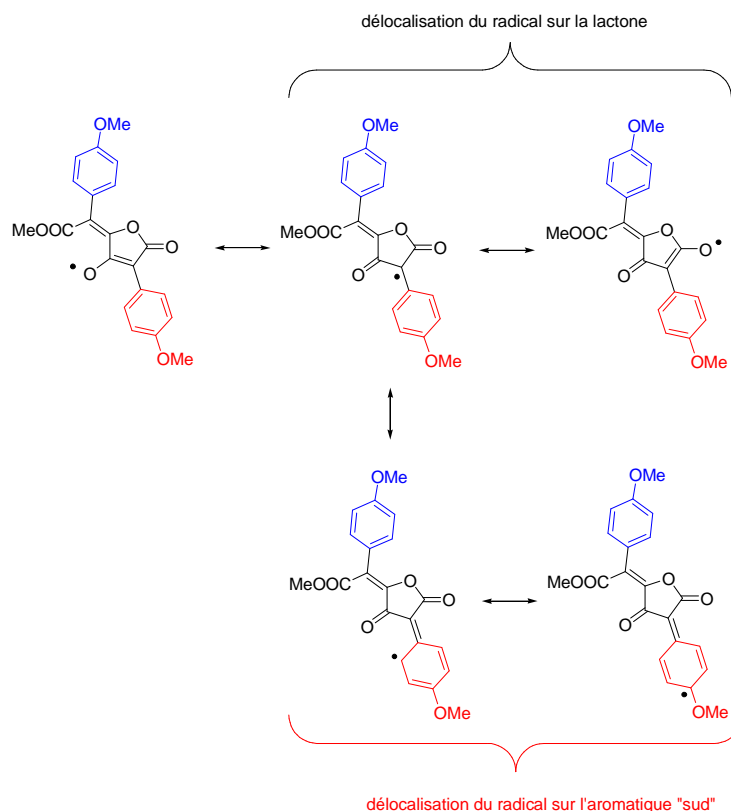


Figure 40 : hiérarchie du pouvoir antioxydant dans la série méthoxylée

Ces résultats confirment nos hypothèses initiales selon lesquelles la nature du pouvoir antioxydant des acides pulviniques provenait de leur capacité à délocaliser le radical sur la lactone mais également sur le noyau aromatique de la partie « sud » de la molécule (schéma 100). Il semblerait donc que le noyau aromatique « nord » ne soit pas un élément indispensable à l'activité antioxydante.

Schéma 100 : délocalisation du radical sur **169b**

Dans les conditions de Fenton, les produits de type I se sont révélés être très efficaces. L'influence de la fonction latérale n'est pas aussi primordiale, puisque les produits portant des fonctions acide, ester, amide ou alcool ont tous montré de bonnes activités ; le produit le plus actif étant l'amide butylique **183c**.

Les tests complémentaires ont confirmé l'activité antioxydante de nos molécules mais n'ont pas montré de différences aussi marquées entre les trois types de produits. Dans l'étude de la capture du radical superoxyde, tous les produits ont montré une activité moyenne, qu'ils soient de type I, de type II ou symétriques. La discrimination entre les produits est moins évidente que dans le cas de l'étude de la protection de la thymidine et du plasmide. Cependant, ce test a fourni quelques résultats intéressants, puisque la fonction acide semble être ici importante ; les deux acides **177** et **227** étant parmi les composés les plus actifs. Une autre information importante apportée par ce test est la découverte d'une activité antioxydante de la dilactone **170**, qui n'a pour le moment pas été étudiée dans les autres tests. L'étude de la capture du radical DPPH[•] par les acides pulviniques mono-aromatiques lipophiles a fourni des résultats variables en termes de cinétique et d'efficacité suivant la position de la chaîne grasse. En effet, l'amide double-brin **183d** est très efficace avec une stœchiométrie supérieure à 1 et

une cinétique rapide. Les produits portant une fonction ester ont une cinétique légèrement plus lente et une stœchiométrie de 1, alors que les amides simple-brin **183c** et **184c**, ainsi que l'acide **227** ont des cinétiques très lentes. Les résultats obtenus lors de ces deux tests ne permettent pas de tirer de conclusions claires quant à une éventuelle relation structure-activité.

L'étude de l'inhibition de la peroxydation lipidique a permis de mettre en évidence le comportement fortement inhibiteur de l'acide lipophile **227**. Ce test a permis de souligner l'influence de la chaîne lipophile et l'importance de la fonction acide.

Les études de la cytotoxicité et de la photostabilité ont fourni des résultats très encourageants. En effet, les nombreux produits testés ne se sont pas montrés cytotoxiques. De plus, les acides pulviniques lipophiles testés se sont révélés stables à une irradiation allant jusqu'à 15 DEM, ce qui laisse présager que le noyau pulvinique soit stable dans ces conditions pour l'ensemble de la famille de ces composés.

Enfin, l'étude du comportement supramoléculaire par la balance de Langmuir des acides pulviniques mono-aromatiques lipophiles a montré des comportements très différents malgré des structures très proches. Cette étude préliminaire a fourni des résultats assez délicats à interpréter et des études complémentaires sont à envisager afin de statuer si les produits forment bien des monocouches ou se solubilisent progressivement dans l'eau.

Ces différents tests ont permis de montrer que les dérivés d'acides pulviniques mono-aromatiques de type I étaient de puissants anti-oxydants, capables de réagir par différents mécanismes :

- ◆ par capture de radicaux, comme l'ont montré les résultats obtenus avec le radical superoxyde,
- ◆ par transfert d'atome d'hydrogène, par neutralisation du radical DPPH•,
- ◆ par terminaison de chaîne, en inhibant la peroxydation lipidique.

CONCLUSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a été consacré à la synthèse et à l'évaluation de nouveaux dérivés mono-aromatiques d'acides pulviniques, en tant qu'agents antioxydants. Deux nouvelles voies de synthèse ont été développées afin d'accéder aux structures cibles de type I et de type II.

La première voie s'appuie sur la chimie de l'anhydride méthoxymaléique **93**. L'addition régiosélective d'un énolate zincique sur **93** a permis de préparer efficacement un premier intermédiaire-clé, le produit iodé **92**. Celui-ci a pu être engagé dans une réaction de Suzuki-Miyaura avec différents acides boroniques, ce qui a permis la préparation de nouveaux dérivés de type I différemment substitués sur le noyau aromatique (schéma 101).

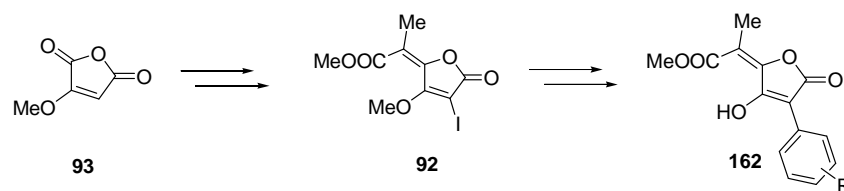


Schéma 101 : synthèse des produits de type I **162** à partir de l'anhydride **93**

La préparation par cette voie de nouveaux dérivés, portant des groupements électroattracteurs sur le noyau aromatique ou portant un noyau hétérocyclique, est à envisager. Ceci devrait permettre de mieux statuer sur l'influence de la nature du noyau aromatique sur l'activité antioxydante.

La seconde voie utilise un dérivé de l'acide tétronique **173**. La préparation du second intermédiaire-clé, la dilactone **170**, a été effectuée en 7 étapes avec un bon rendement global de 39%. L'ouverture de **170** par une espèce nucléophile a permis la préparation simultanée en une étape de nouveaux dérivés de type I et de type II. L'étude de cette réaction d'ouverture a permis d'effectuer cette transformation de façon régiosélective, par addition de TBAF (schéma 102). Cette voie a permis de préparer les deux types d'analogues, avec une diversité structurale au niveau de la fonction latérale.

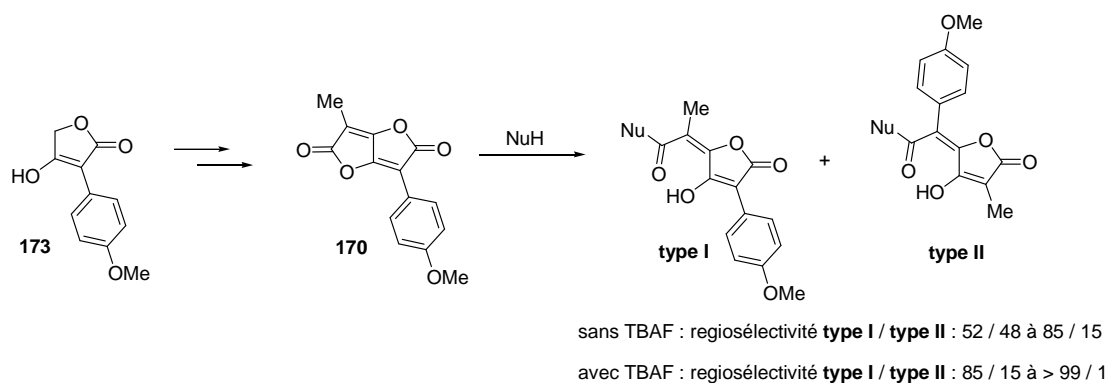


Schéma 102 : préparation de la dilactone **170** et réaction d'ouverture

L'étude du comportement de **170** vis-à-vis d'autres espèces nucléophiles, ainsi que l'étude du mécanisme de la régiosélectivité de l'ouverture apportée par l'addition de TBAF sont deux perspectives intéressantes.

Les méthodes de préparation des produits sont intéressantes car la diversité structurale est introduite, en général, vers la fin de la synthèse. Ces deux voies principales, ainsi que des adaptations effectuées sur celles-ci, ont permis la préparation de 45 nouveaux composés de type I et II.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de ces nouveaux dérivés non naturels a représenté la deuxième partie de ce travail. Cette étude devait notamment permettre de comprendre le fort pouvoir antioxydant des acides pulviniques naturels, en déterminant les sites privilégiés de délocalisation du radical.

Les études de protection de cibles biologiques, la thymidine et un plasmide bactérien, soumis à des sources de stress oxydant en conditions de Fenton ont permis d'établir une hiérarchie de pouvoir antioxydant pour les acides pulviniques (schéma 103).

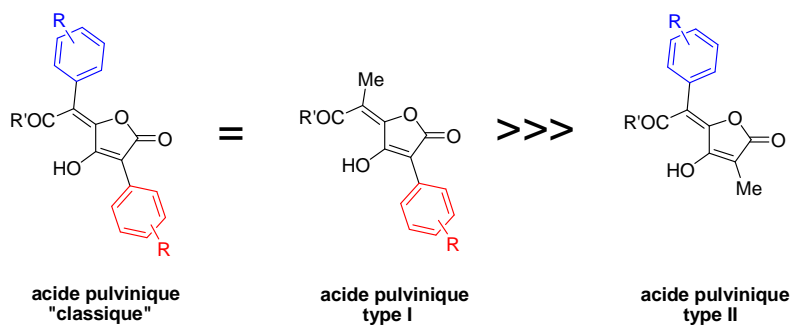


Schéma 103 : hiérarchie du pouvoir antioxydant

Ces résultats ont prouvé que le radical formé sur l'acide pulvinique « classique » se délocalisait majoritairement sur le noyau aromatique de la partie « sud » (en rouge). En effet, les dérivés de type I ont montré une activité similaire aux dérivés classiques. Ces observations semblent donc confirmer les hypothèses émises au chapitre 1 sur les sites de délocalisation du radical. La faible activité observée pour les dérivés de type II proviendrait uniquement de la structure céto-énolique de la lactone, puisque la nature du groupement aromatique s'est révélée être sans grande influence. Il semblerait donc que le noyau aromatique « sud » soit le site majoritaire de délocalisation, et que la contribution de la lactone soit moindre.

Des études complémentaires sur ces produits sont à envisager, afin d'améliorer la compréhension des grandes différences observées dans ces tests entre les trois types de produits. Des calculs théoriques au niveau des orbitales moléculaires ou la détermination des constantes de protonation de la fonction énol pourraient apporter des informations intéressantes dans cette optique.

Des tests supplémentaires effectués sur cette famille de composés ont montré que les dérivés d'acides pulviniques sont des antioxydants efficaces dans différentes conditions de stress oxydants et se sont révélés efficaces pour la neutralisation de plusieurs sources de radicaux libres, comme l'anion superoxyde ou le radical DPPH[•] et pour l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Ce programme très varié a permis, d'un point de vue fondamental, de mettre au point la préparation de dérivés non naturels d'acides pulviniques et d'apporter quelques enseignements au niveau de la relation structure-activité sur cette famille. D'un point de vue industriel, les voies de synthèses développées ne sont pour le moment pas vraiment adaptées : le nombre d'étapes est relativement élevé, les purifications par chromatographie sur gel de silice sont nombreuses et certains réactifs ne sont pas vraiment adaptés pour un passage à grande échelle. Un travail important d'optimisation est donc à prévoir, si une molécule est sélectionnée pour un développement futur.

Les premiers résultats d'activité sont plutôt encourageants et ces résultats ont fait l'objet de la rédaction d'un brevet, sur la structure des dérivés de type I et leur activité. Cependant, le chemin à parcourir est encore long et de nombreuses études sont à envisager, notamment en termes de toxicité, de formulation ou de pénétration cutanée, avant de pouvoir imaginer s'enduire le corps de dérivés d'acides pulviniques en tant que photoprotecteurs.

PARTIE

EXPERIMENTALE

Partie chimie : indications générales

Solvants

Toutes les réactions ont été réalisées sous atmosphère d'argon, à l'exception des réactions en milieu aqueux.

Les solvants suivants ont été préalablement distillés en continu, sous atmosphère d'argon, en présence d'un agent desséchant :

| Solvant | Desséchant |
|-----------------------------|-----------------------|
| Acétonitrile | Hydruure de calcium |
| Dichlorométhane | Hydruure de calcium |
| Di- <i>iso</i> -propylamine | Hydruure de calcium |
| Ether diéthylique | Sodium / Benzophénone |
| Tétrahydrofurane | Sodium / Benzophénone |

Les autres solvants ont été séchés par ajout de sodium filé ou de tamis moléculaire 4Å (préalablement activé par chauffage à 60°C sous vide pendant 10h):

| Fil de sodium | Tamis moléculaire 4Å |
|---------------|-------------------------------|
| Benzène | Acétate d'éthyle |
| Toluène | Acétone |
| Triéthylamine | Chloroforme |
| | <i>N,N</i> -Diméthylformamide |
| | Diméthylsulfoxyde |
| | Ethanol |
| | Méthanol |
| | <i>Isopropanol</i> |
| | Pyridine |

Chromatographies

Chromatographie sur couches minces (CCM)

Elles sont effectuées sur des plaques de gel de silice 60F-254 Merck, réf. 5715, d'épaisseur 0,25 mm. La révélation des plaques a été réalisée par illumination ultraviolette à 254 ou 365 nm, puis par traitement avec un révélateur (sulfate de cérium, vanilline, ninhydrine) suivi d'un chauffage à 200°C.

Chromatographie sur gel de silice

Elles sont effectuées sur des colonnes de gel de silice 60 Merck, réf. 9835, granulométrie 40-63 µm.

Chromatographie préparative sur gel de silice

Elles sont effectuées sur des plaques de gel de silice 60F-54 Merck, réf. 5717, d'épaisseur 2 mm.

Analyses

Température de fusion (Pf)

Elles ont été mesurées à l'aide d'un microscope à platine chauffante Reichert-Jung, modèle Thermo-Galen. Les températures ne sont pas corrigées.

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été enregistrés soit sur un spectrophotomètre Bruker WP-200 SY, soit sur un spectrophotomètre Bruker DPX-300 à transformée de Fourier. Les spectromètres sont équipés soit d'une sonde $^{13}\text{C}/^1\text{H}$, soit d'une sonde large bande à détection inverse et gradient-z 5 mm. Les fréquences d'irradiation sont respectivement de 200 et 300 MHz pour le noyau ^1H et de 50 et 75 MHz pour le noyau ^{13}C . Les spectres ^{13}C sont enregistrés en mode « proton découplé ». Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, par rapport à une référence interne non-deutérée, contenue dans le solvant deutéré, dont le déplacement est connu :

| Solvant | $\delta (^1\text{H})$ | $\delta (^{13}\text{C})$ |
|-------------------|-----------------------|--------------------------|
| Acétone | 2,05 ppm | 205,9 ppm |
| Chloroforme | 7,26 ppm | 77,2 ppm |
| Méthanol | 3,31 ppm | 49,0 ppm |
| Diméthylsulfoxyde | 2,50 ppm | 39,5 ppm |

La constante de couplage est exprimée en Hertz. Les multiplicités des signaux sont indiquées par les abréviations suivantes :

| | | | |
|---|------------|-----|-----------|
| s | singulet | | |
| d | doublet | spt | septuplet |
| t | triplet | l | large |
| q | quadruplet | m | multiplet |

Spectroscopie infrarouge (IR)

Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistré soit sur un spectromètre à transformée de Fourier Perkin-Elmer 2000 FT-IR, soit sur un spectromètre à transformée de Fourier Nicolet 380 FT-IR. Les nombres d'onde sont exprimés en cm^{-1} .

Analyses élémentaires

Elles ont été réalisées au Service d'Analyses de l'Institut de Chimie de Strasbourg.

Spectrométrie de masse (MS)

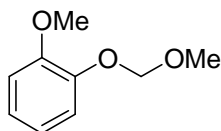
Pour les chromatographies en phase gazeuse couplées au spectromètre de masse (GC-MS), l'appareil Shimadzu GCMS-QP5050A est équipé d'une colonne capillaire (25*0,22 mm) SGE BPX5 (5% polysilphénylènesiloxane de phényle / 95% méthylpolysiloxane). Le gaz vecteur est l'hélium (29 mL/min ; 113 kPa). Les conditions d'élution sont : température de l'interface 260°C, température du détecteur 302°C, température de colonne 80°C pendant 2 min, puis augmentation de 25°C/min. L'ionisation se fait voie chimique.

Les autres spectrométries de masse, de haute et basse résolution, ont été effectuées à l'IFR85 de Strasbourg. L'ionisation se fait en mode électrospray.

Partie Chimie : Modes opératoires et analyses

104 1-méthoxy-2-méthoxyméthoxybenzène ¹³⁶

A une suspension d'hydrure de sodium (60% dans l'huile minérale, 0,35 g, 8,86 mmol, 1,1 éq.) dans 6 mL de THF est ajoutée goutte à goutte une solution de guajacol **103** (1 g, 8,05 mmol, 1 éq.) dans 9 mL de THF. La solution obtenue est agitée une heure à température ambiante. Le chlorure de méthoxyméthyle (0,67 mL, 8,86 mmol, 1,1 éq.) est ensuite ajouté sur le milieu et la solution est laissée sous agitation durant la nuit. Après addition d'eau, le produit est extrait 3 fois à l'éther. Les phases organiques réunies sont lavées 2 fois par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ puis de la saumure, séchées sur sulfate de sodium et concentrées. L'huile trouble obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM) pour fournir 1,14 g d'une huile jaune, qui correspond à un mélange du produit attendu **104** et de guajacol **103** (dans les proportions 80/20 par intégration en RMN ¹H et par GC-MS). L'huile obtenue est engagée tel quelle pour la réaction suivante.



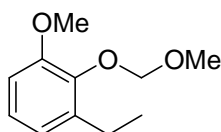
Formule brute : C₉H₁₂O₃
Masse molaire (g/mol) : 168,19
Rf : 0,46 (Cy/AcOEt : 90/10, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 3,53 (s, 3H) ; 3,89 (s, 3H) ; 5,25 (s, 2H) ; 6,86-7,19 (m, 4H).

GC-MS : tr = 5,58 min MS 168 [M]⁺

105 1-éthyl-3-méthoxy-2-méthoxyméthoxybenzène

Le mélange précédemment obtenu est dissout dans 10 mL de THF et est ajouté goutte à goutte à -78°C sur une solution de *s*-BuLi (0,94 M dans l'hexane, 7,0 mL, 7,45 mmol, 1,1 éq.) et de TMEDA (1,12 mL, 7,45 mmol, 1,1 éq.). La solution est agitée une heure à -78°C puis du bromoéthane (1 mL, 13,55 mmol, 2 éq.) est ajouté. Après retour à température ambiante, l'agitation est poursuivie durant 4h. Une solution aqueuse saturée en NH₄Cl est ajoutée et la phase aqueuse est extraite 3 fois à l'éther. Les phases organiques réunies sont lavées 2 fois à l'eau, séchées sur sulfate de sodium et concentrées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 95/5) pour fournir une huile jaune (m = 0,611 g, 61%). Une analyse RMN ¹H en deux dimensions a permis de confirmer la structure.



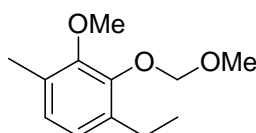
Formule brute : C₁₁H₁₆O₃
Masse molaire (g/mol) : 196,24
Rf : 0,60 (Cy/AcOEt : 90/10, UV + vanilline)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 1,24 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H) ; 2,74 (q, $J = 7,5$ Hz, 2H) ; 3,61 (s, 3H) ; 3,84 (s, 3H) ; 5,10 (s, 2H) ; 6,77-6,83 (m, 2H) ; 7,02 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H).

GC-MS : tr = 6,03 min MS 196 $[\text{M}]^+$

106 1-éthyl-3-méthoxy-2-méthoxyméthoxy-4-méthylbenzène

Le composé **105** (0,337 g, 1,71 mmol, 1 éq.) est dissout dans 5 mL d'éther, puis la TMEDA (0,28 mL, 1,90 mmol, 1,1 éq.) et le *s*-BuLi (0,98 M dans l'hexane, 2,0 mL, 1,90 mmol, 1,1 éq.) sont ajoutés goutte à goutte sur le milieu à température ambiante. Après une heure d'agitation à température ambiante, l'iodure de méthyle (0,21 mL, 3,42 mmol, 2 éq.) dans 2,5 mL d'éther est ajouté. Après deux jours d'agitation à température ambiante, le milieu est dilué avec 25 mL d'éther, puis 20 mL d'une solution aqueuse saturée en NH_4Cl sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite 3 fois à l'éther. Les phases organiques réunies sont lavées 2 fois à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10) pour obtenir le produit **106** sous forme d'une huile jaune ($m = 0,332$ g, 92%).



Formule brute : $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_3$

Masse molaire (g/mol) : 210,27

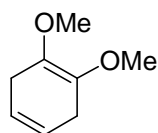
R_f = 0,51 (Cy/AcOEt : 90/10, UV + vanilline)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 1,23 (t, $J = 7,8$ Hz, 3H) ; 2,25 (s, 3H) ; 2,69 (q, $J = 7,8$ Hz, 2H) ; 3,61 (s, 3H) ; 3,79 (s, 3H) ; 5,12 (s, 2H) ; 6,87 (s, 2H).

GC-MS : tr = 6,34 min MS 210 $[\text{M}]^+$

109 1,2-diméthoxycyclohexa-1,4-diène ¹³⁷

Le vératrole **108** (0,92 mL, 7,23 mmol, 1 éq.) est dissout dans 2 mL d'EtOH et 10 mL de THF. Le mélange est refroidi à -78°C puis environ 30 mL de NH_3 liq sont ajoutés. Le lithium (0,5 g, 72,3 mmol, 10 éq.) est ensuite ajouté en plusieurs portions. La solution bleue est laissée sous agitation à -78°C jusqu'à disparition de la coloration (environ 2h). Le milieu est ensuite dilué avec 15 mL d'éther et laissé revenir à température ambiante, en laissant l'excès de NH_3 s'évaporer. La phase organique est lavée 3 fois avec de la saumure, séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 95/5) pour fournir le produit **109** sous forme d'une huile jaune ($m = 0,477$ g, 47%).



Formule brute : C₈H₁₂O₂

Masse molaire (g/mol) : 140,18

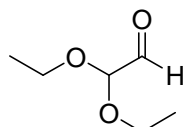
Rf = 0,80 (Cy/AcOEt : 90/10, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,88 (d, J = 1,47 Hz, 4H) ; 3,64 (s, 6H) ; 5,62 (t, J = 1,47 Hz, 2H).

GC-MS : tr = 4,75 min MS 140 [M]⁺

116 Diéthoxyacétaldéhyde⁸⁴

Une solution de l'acétal diéthylique de l'acroléine **117** (10 g, 76,8 mmol) dans 60 mL d'EtOH est refroidie à -78°C . Un courant d'ozone est mis à barboter dans la solution, jusqu'à obtention d'une coloration bleue (environ 45 min). Un courant d'oxygène est alors appliqué, jusqu'à disparition de cette coloration (10 min), puis un courant d'argon. 2 mL de diméthylsulfure sont alors ajoutés et le milieu est laissé revenir à température ambiante et laissé sous agitation pendant une nuit. Une première distillation conduit à l'hémiacétal **27**, une deuxième permet d'accéder à l'aldéhyde **116** (5 g, 50%) sous forme d'un liquide incolore.



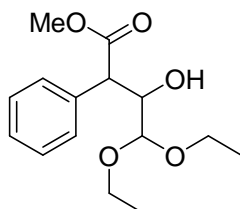
Formule brute : $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3$
Masse molaire (g/mol) : 132,16
Eb : 45°C

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 1,28 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H) ; 3,65 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H) ; 3,74 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H) ; 4,59 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H) ; 9,47 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 15,7 ; 63,6 ; 101,4 ; 197,3.

120 4,4-diéthoxy-3-hydroxy-2-phénylbutyrate de méthyle

3 mL de THF sont refroidis à 0°C , puis la DIPA (0,06 mL, 0,79 mmol, 1,08 éq.) et le *n*-BuLi (1,3 M dans l'hexane, 0,58 mL, 0,76 mmol, 1,04 éq.) sont ajoutés successivement. Après 15 min d'agitation à 0°C , le mélange est refroidi à -78°C , puis le phénylacétate de méthyle **119** (0,07 mL, 0,73 mmol, 1 éq.) est ajouté goutte à goutte. Après 45 min d'agitation à -78°C , l'aldéhyde **116** (0,1 g, 0,76 mmol, 1,04 éq.) est ajouté. Après 15 min d'agitation, une solution aqueuse saturée en NH_4Cl est ajoutée. Après retour à température ambiante, le THF est évaporé et le milieu est dilué avec de l'eau. La phase aqueuse est extraite 3 fois à l'éther. Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le brut résultant est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10) pour fournir l'alcool **120** sous forme d'une huile jaune ($m = 0,170$ g, 85%). Le produit est obtenu sous la forme d'un mélange de diastéréoisomères (66/34 par intégration en RMN ^1H).



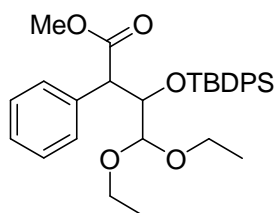
Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$
Masse molaire (g/mol) : 282,33
Rf : 0,25 (Cy/AcOEt : 80/20, UV + $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 1,14-1,43 (m, 6H) ; 3,45-4,35 (m, 10H) ; 7,31-7,41 (m, 5H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (2 dia) : δ : 15,6 ; 15,7 ; 27,3 ; 28,2 ; 52,4 ; 53,0 ; 53,5 ; 63,5 ; 63,9 ; 72,3 ; 74,9 ; 128,0 ; 128,8 ; 128,9 ; 129,1 ; 129,9 ; 135,5 ; 173,4.

121 3-(*tert*-butyldiphénylsilyloxy)-4,4-diéthoxy-2-phénylbutyrate de méthyle

30 mL de THF sont refroidis à 0°C, puis la DIPA (0,57 mL, 7,86 mmol, 1,08 éq.) et le *n*-BuLi (1,6 M dans l'hexane, 4,73 mL, 7,57 mmol, 1,04 éq.) sont ajoutés successivement. Après 15 min d'agitation à 0°C, le mélange est refroidi à -78°C, puis le phénylacétate de méthyle **28** (0,72 mL, 7,28 mmol, 1 éq.) est ajouté goutte à goutte. Après 45 min d'agitation à -78°C, l'aldéhyde **25** (1g, 7,57 mmol, 1,4 éq.) est ajouté. Après retour à température ambiante, une solution aqueuse saturée en NH₄Cl est ajoutée. Le THF est ensuite évaporé et le milieu est dilué avec de l'eau. La phase aqueuse est extraite 3 fois à l'éther. Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le brut résultant est dissout dans un mélange de 20 mL de THF et 7 mL de DMF. L'imidazole (1,54 g, 22,71 mmol, 3 éq.) et le chlorure de *tert*-butyldiphénylsilyle (3,41 mL, 22,71 mmol, 1,18 éq.) sont ajoutés successivement. Le mélange est laissé sous agitation 4j à température ambiante. Le milieu est ensuite dilué avec de l'éther et une solution aqueuse saturée en NH₄Cl est ajoutée. La phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃, séchée sur sulfate de sodium et concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 99/1 à 98/2), le produit protégé **30** (0,9 g, 23%) est obtenu sous forme d'une huile jaune, correspondant à un mélange de diastéréoisomères (66/34 par intégration en RMN ¹H).



Formule brute : C₃₁H₄₀O₅Si

Masse molaire (g/mol) : 520,73

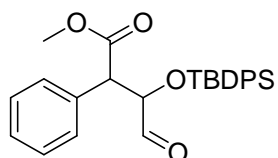
Rf : 0,66 et 0,76 (Cy/AcOEt : 80/20, UV + Ce(SO₄)₂)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 0,79 (s, 9H) ; 1,02-1,42 (m, 6H) ; 2,85-3,44 (m, 5H) ; 3,60 (s, 3H) ; 4,02-4,48 (m, 2H) ; 7,31-7,60 (m, 15H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) (2 dia) : δ : 14,9 ; 15,6 ; 19,1 ; 27,0 ; 52,2 ; 53,6 ; 62,9 ; 63,3 ; 74,7 ; 103,8 ; 127,4 ; 127,7 ; 128,5 ; 129,5 ; 129,9 ; 130,0 ; 136,1 ; 136,7 ; 169,3.

122 3-(*tert*-butyldiphénylsilyloxy)-4-oxo-2-phénylbutyrate de méthyle

Une solution de chlorure de zinc (1 M dans l'éther, 1,35 mL, 1,35 mmol, 5 éq.) est placée à l'évaporateur rotatif, afin d'éliminer l'éther. Le solide obtenu est mis en suspension dans 8 mL de DCM. L'acétal **121** (0,143 g, 0,27 mmol, 1 éq.) est alors ajouté dans 4 mL de DCM. Après une heure d'agitation à température ambiante, la réaction est stoppée par ajout d'une solution aqueuse saturée en NH₄Cl. La phase aqueuse est extraite 3 fois à l'éther. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ puis de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. L'aldéhyde **122** est obtenu (0,130 g, quantitatif) sous forme d'une huile jaune.



Formule brute : C₂₇H₃₀O₄Si

Masse molaire (g/mol) : 446,61

Rf : 0,50 (Cy/AcOEt : 80/20, UV + Ce(SO₄)₂)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,02 (s, 9H) ; 3,70 (s, 3H) ; 3,94 (d, J = 6,1 Hz, 1H) ; 4,45 (d, J = 6,1 Hz, 1H) ; 7,15-7,75 (m, 15H) ; 9,53 (s, 1H).

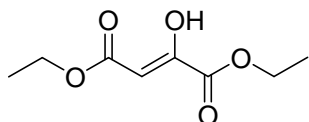
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 19,7 ; 27,2 ; 52,7 ; 56,2 ; 79,2 ; 128,3 ; 129,0 ; 129,7 ; 130,6 ; 136,2 ; 136,3 ; 144,1 ; 145,7 ; 146,8 ; 153,7 ; 172,0 ; 201,1.

132b 2-hydroxyfumarate de diéthyle⁸⁶

La LDA est préparée par addition de *n*-BuLi (1,6 M dans l'hexane, 1,9 mL, 3 mmol, 1,5 éq.) sur une solution de DIPA (0,22 mL, 3 mmol, 1,5 éq.) dans 1,2 mL de THF à 0°C et laissée sous agitation 15 min.

L'oxalate de diéthyle **12** (0,27 mL, 2 mmol, 1 éq.) et l'acétate d'éthyle **131** (0,29 mL, 3 mmol, 1,5 éq.) sont mis en solution dans 5 mL de THF. La solution est refroidie à -78°C puis la LDA est ajoutée rapidement par cannulation. Après 1h d'agitation à -78°C, le milieu est laissé revenir à température ambiante, puis laissé sous agitation 1h30. Le milieu est ensuite refroidi à 0°C et une solution d'acide chlorhydrique 1 M (5 mL, 5 mmol, 2,5 éq.) est ajoutée. Le milieu est ensuite dilué avec de l'AcOEt. La phase aqueuse est extraite 2 fois à l'AcOEt. Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM) pour fournir l'énol **132b** sous forme d'une huile jaune (m = 0,18 g, 48%).

Par la suite, cet énonol sera utilisé sans purification.



Formule brute : C₈H₁₂O₅

Masse molaire (g/mol) : 188,18

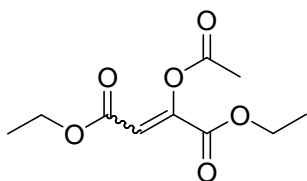
Rf : 0,49 (DCM, UV + vanilline)

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 1,33 (t, J = 7,3 Hz, 3H); 1,36 (t, J = 7,1 Hz, 3H) ; 4,28 (q, J = 7,3 Hz, 2H) ; 4,34 (q, J = 7,1 Hz, 2H) ; 6,01 (s, 1H) ; 11,66 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 14,1 ; 14,2 ; 61,4 ; 62,5 ; 97,0 ; 159,6 ; 161,8 ; 172,1.

134 2-acétoxybut-2-enedioate de diéthyle

L'énol **132b** (0,398 g, 2,11 mmol, 1 éq.) est dissout dans 5,2 mL d'acétone puis la solution est refroidie à 0°C. La triéthylamine (0,29 mL, 2,11 mmol, 1 éq.) et le chlorure d'acétyle **133** (0,15 mL, 2,11 mmol, 1 éq.) sont ajoutés successivement. Après 1h30 d'agitation à température ambiante, une seconde portion de triéthylamine (0,65 mL, 4,64 mmol, 2,2 éq.) est ajoutée et le milieu est chauffé à 60°C pendant la nuit. Le milieu est hydrolysé par une solution d'acide chlorhydrique 1 M, la phase aqueuse est extraite à l'éther puis la phase organique est lavée 2 fois par une solution d'acide chlorhydrique 1 M, séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Une purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10), a permis de séparer les deux isomères *Z* et *E* du composé acylé **134** (0,25 g, 51%, *E/Z* : 50/50) sous forme d'une huile jaune.



Formule brute : C₁₀H₁₄O₆
Masse molaire (g/mol) : 230,21
Rf : 0,51 et 0,60 (Cy/AcOEt : 90/10, UV + vanilline)

Isomère E :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,27 (t, J = 7,2 Hz, 3H) ; 1,30 (t, J = 6,9 Hz, 3H) ; 2,28 (s, 3H) ; 4,19 (q, J = 6,9 Hz, 2H) ; 4,27 (q, J = 7,2 Hz, 2H) ; 6,64 (s, 1H).

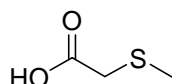
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 14,0 ; 14,1 ; 20,4 ; 61,1 ; 62,6 ; 117,2 ; 146,8 ; 161,2 ; 162,9 ; 167,8.

Isomère Z :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,28 (t, J = 7,2 Hz, 3H) ; 1,29 (t, J = 7,2 Hz, 3H) ; 2,21 (s, 3H) ; 4,21 (q, J = 7,2 Hz, 2H) ; 4,27 (q, J = 7,2 Hz, 2H) ; 6,06 (s, 1H).

143 Acide méthylsulfanylacétique ¹³⁸

L'acide thioglycolique **142** (6,94 mL, 100 mmol, 1 éq.) est dissout dans 100 mL de THF et la solution est refroidie à 0°C. La triéthylamine (29 mL, 208 mmol, 2,08 éq.) et l'iodure de méthyle (6,29 mL, 101 mmol, 1,01 éq.) dans 25 mL de THF sont ajoutés successivement. Après une heure d'agitation à température ambiante, le milieu est versé dans un mélange éther/acide chlorhydrique 0,5 M (0,5 L / 1 L). La phase aqueuse est extraite 2 fois à l'éther. Les phases organiques réunies sont lavées 2 fois avec de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. L'huile incolore obtenue (m = 9,15 g, 86%) correspond à l'acide S-méthylé **143**.



Formule brute : C₃H₆O₂S
Masse molaire (g/mol) : 106,14

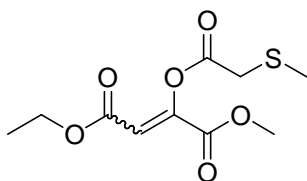
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,25 (s, 3H) ; 3,23 (s, 2H).

141 2-(2-méthylsulfanylacétoxy)but-2-enediacétate de 4-éthyle et de 1-méthyle

L'acide **143** (9,16 g, 86 mmol, 1 éq.) est dissout dans 100 mL de DCM, puis la solution est refroidie à 0°C et 3 gouttes de DMF puis le chlorure d'oxalyle (8,59 mL, 100 mmol, 1,16 éq.) sont ajoutés, provoquant un dégagement gazeux. Après 30 min d'agitation à 0°C, le milieu est laissé revenir à température ambiante, agité 30 min, puis concentré.

L'alcool **132b** (16,56 g, 94 mmol, 1,1 éq.) est dissout dans l'acétone, puis la solution est refroidie à 0°C. La triéthylamine (1,18 mL, 94 mmol, 1,1 éq.) puis le chlorure d'acide **144** fraîchement préparé sont ajoutés. Après une heure d'agitation à 0°C, le milieu est hydrolysé avec de l'eau. La phase aqueuse est extraite à l'AcOEt. La phase organique est lavée par une solution d'acide chlorhydrique 1 M, séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 95/5 à 90/10),

pour donner le sulfure **141** (3,21 g, 14%, *E/Z* : 58/42 par intégration en RMN ^1H) sous forme d'une huile jaune. Les deux isomères *Z* et *E* de ce produit ont pu être isolés.



Formule brute : $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_6\text{S}$
Masse molaire (g/mol) : 262,28
Rf : 0,47 et 0,53 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

Isomère E :

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 1,29 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H) ; 2,30 (s, 3H) ; 3,46 (s, 2H) ; 3,85 (s, 3H) ; 4,22 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H) ; 6,71 (s, 1H).

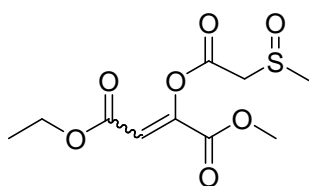
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 14,2 ; 16,2 ; 35,3 ; 53,4 ; 61,4 ; 117,9 ; 146,2 ; 161,5 ; 162,7 ; 167,3.

Isomère Z :

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 1,31 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H) ; 2,25 (s, 3H) ; 3,33 (s, 2H) ; 3,84 (s, 3H) ; 4,25 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H) ; 6,14 (s, 1H).

142 2-(2-méthanesulfinylacétoxy)-but-2-ènedioate de 4-éthyle et 1-méthyle

Le sulfure **141** (0,467 g, 1,78 mmol, 1 éq.) est dissout dans 60 mL de DCM puis le mélange est refroidi à 0°C . Le *m*CPBA (77%, 0,399 mL, 1,78 mmol, 1 éq.) est ajouté dans 25 mL de DCM et le milieu est agité 1h à 0°C , puis hydrolysé par une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 . La phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 , séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 80/20 à 70/30), pour donner le sulfoxyde **142** (0,28 g, 57%) sous forme d'une huile jaune. L'isomère *E* a pu être isolé.



Formule brute : $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_7\text{S}$
Masse molaire (g/mol) : 278,28
Rf : 0,13 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

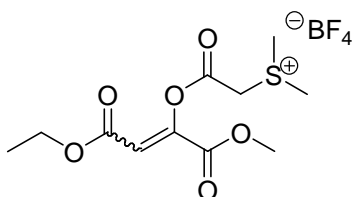
Isomère E :

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 1,30 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H) ; 2,89 (s, 3H) ; 3,83 (d, $J = 15,0$ Hz, 1H) ; 3,86 (s, 3H) ; 4,10 (d, $J = 15,0$ Hz, 1H) ; 4,22 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H) ; 6,74 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 14,1 ; 39,7 ; 53,5 ; 57,4 ; 62,5 ; 118,4 ; 145,5 ; 161,0 ; 162,0 ; 162,4.

143 Tétrahydroborate de (2-éthoxycarbonyl-1-méthoxycarbonylvinyloxy)carbonyl méthyl) diméthylsulfonium

Le sulfure **141** (0,107 g, 0,4 mmol, 1 éq.) et l'iodure de méthyle (0,25 mL, 4 mmol, 10 éq.) sont dissous dans 3 mL de DCM. Le tétrahydroborate d'argent (0,078 g, 0,4 mmol, 1 éq.) est dissout dans 4 mL de nitrométhane et ajouté sur le mélange. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le précipité qui s'est formé est filtré et lavé avec du nitrométhane. Le filtrat est concentré pour fournir le sel de sulfonium **143** (0,103 g, 71%) sous forme d'une huile jaune.



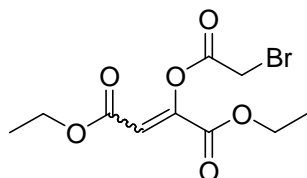
Formule brute : C₁₁H₁₇BF₄O₆S
Masse molaire (g/mol) : 364,12
Rf : 0 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,30 (t, J = 7,2 Hz, 3H) ; 3,19 (s, 6H) ; 3,89 (s, 3H) ; 4,23 (q, J = 7,2 Hz, 2H) ; 4,58 (s, 2H) ; 6,78 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 14,0 ; 24,9 ; 43,3 ; 53,8 ; 62,1 ; 118,8 ; 145,0 ; 160,7 ; 161,4 ; 162,4.

149 2-(2-bromoacétoxy)but-2-ènedioate de diéthyle

L'énol **136b** (0,281 g, 1,49 mmol, 1 éq.) est dissout dans 5 mL d'acétone et la solution est refroidie à 0°C. La triéthylamine (0,25 mL, 1,79 mmol, 1,2 éq.) et le bromure de bromoacétyle **148** (0,15 mL, 1,79 mmol, 1,2 éq.) sont ajoutés successivement. Après 1h30 d'agitation à température ambiante, le milieu est hydrolysé par de l'eau, la phase aqueuse est extraite à l'AcOEt, puis la phase organique est lavée 2 fois par une solution d'acide chlorhydrique 1 M, séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Une purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 80/20), a permis de mettre en évidence la formation des deux isomères *Z* et *E* du composé bromé **149** (0,25 g, 55%, *E/Z* : 65/35 par intégration en RMN ¹H). L'isomère *E* a pu être isolé.



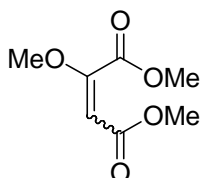
Formule brute : C₁₀H₁₃BrO₆
Masse molaire (g/mol) : 309,11
Rf : 0,55 et 0,64 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,27 (t, J = 7,2 Hz, 3H) ; 1,30 (t, J = 7,2 Hz, 3H) ; 4,06 (s, 2H) ; 4,19 (q, J = 7,2 Hz, 2H) ; 4,27 (q, J = 7,2 Hz, 2H) ; 6,69 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 14,1 ; 14,2 ; 24,9 ; 61,6 ; 63,0 ; 118,0 ; 146,2 ; 162,7 ; 164,2 ; 167,0.

156 Méthoxyfumarate de diméthyle⁹⁰

La triéthylamine (5,36 mL, 38,5 mmol, 0,55 éq.) est ajoutée à une solution d'acétylènedicarboxylate de diméthyle **155** (8,58 mL, 70 mmol, 1 éq.) dans 50 mL de MeOH. Le mélange est laissé sous agitation pendant la nuit, concentré puis purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant Cy/AcOEt : 90/10), pour fournir une huile jaune qui correspond à un mélange des deux isomères *Z* et *E* du fumarate **155** (10,2 g, quantitatif, *E/Z* : 70/30 par intégration en RMN ¹H).



Formule brute : C₇H₁₀O₅
Masse molaire (g/mol) : 174,15
Rf : 0,29 et 0,34 (Cy/AcOEt : 80/20, UV + vanilline)

Isomère E :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 3,70 (s, 3H) ; 3,74 (s, 3H) ; 3,89 (s, 3H) ; 5,20 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 51,1 ; 52,3 ; 60,5 ; 107,3 ; 154,4 ; 162,7 ; 164,2.

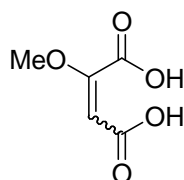
Isomère Z :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 3,75 (s, 3H) ; 3,84 (s, 3H) ; 3,94 (s, 3H) ; 6,18 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 51,1 ; 52,4 ; 56,6 ; 92,7 ; 162,1 ; 163,5 ; 165,8.

157 Acide méthoxymaléique⁹⁰

L'ester **156** (10,2 g, 70 mmol) est dissout dans 180 mL de MeOH. Une solution aqueuse de KOH 4 M est ajoutée et le mélange est laissé sous agitation pendant 10h. Après acidification par une solution d'acide chlorhydrique 10 M jusqu'à pH 2, la phase aqueuse est extraite 5 fois à l'éther. Les phases organiques sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées pour donner l'acide **157** (7,06 g, 69%), sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : C₅H₆O₅
Masse molaire (g/mol) : 146,10
Rf : 0 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

Isomère E :

RMN ¹H (300 MHz, Acétone-d₆) : δ : 3,81 (s, 3H) ; 5,33 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, Acétone-d₆) : δ : 60,3 ; 108,7 ; 154,9 ; 164,2 ; 165,7.

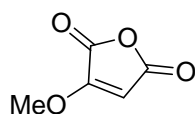
Isomère Z :

RMN ^1H (300 MHz, Acétone- d_6) : δ : 3,92 (s, 3H) ; 6,18 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, Acétone- d_6) : δ : 57,4 ; 93,8 ; 164,0 ; 164,2 ; 168,0.

93 Anhydride méthoxymaléique⁹⁰

Sur l'acide **157** (6,4 g, 43,8 mmol) sont ajoutés 100 mL de chlorure de thionyle. Le milieu est chauffé à reflux durant 24h. Après élimination de l'excès de chlorure de thionyle à l'évaporateur rotatif, une distillation permet d'obtenir l'anhydride **93** (4,7 g, 84%) sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_4$

Masse molaire (g/mol) : 128,08

Eb : 155°C

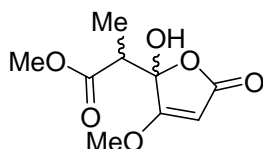
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 4,04 (s, 3H) ; 5,76 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 60,5 ; 98,7 ; 153,1 ; 161,6 ; 162,9.

GC-MS : tr = 4,56 min MS 129 $[\text{M}+\text{H}]^+$

158 2-(2-hydroxy-3-méthoxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)propanoate de méthyle

Une solution de DIPA (2,14 mL, 15,30 mmol, 1,1 éq.) dans 60 mL de THF est refroidie à -78°C , puis le *n*-BuLi (1,5M dans l'hexane, 10,2 mL, 15,30 mmol, 1,1 éq.) est ajouté. La solution est agitée 20 min à -20°C avant d'être refroidie à -78°C . Le propionate de méthyle **151** (1,34 mL, 13,91 mmol, 1 éq.) dans 10 mL de THF est ajouté goutte à goutte. Après 45 min d'agitation à -78°C , le chlorure de zinc (1 M dans l'éther, 13,91 mL, 13,91 mmol, 1 éq.) et 20 mL de THF sont ajoutés, puis l'anhydride méthoxymaléique **93** (2,13 g, 16,69 mmol, 1,2 éq.) dans 5 mL de THF. Après 30 min d'agitation, le milieu est laissé revenir à température ambiante et laissé sous agitation 2h. Après ajout de 50 mL d'eau, la phase aqueuse est extraite une première fois à l'AcOEt. La phase aqueuse est ensuite neutralisée par ajout d'une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium, puis extraite à nouveau deux fois à l'AcOEt. Cette phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée, pour donner une huile jaune (m = 1,52 g, 51%) correspondant à l'alcool **158** sous forme d'un mélange de forme diastéréomères (70/30 par intégration en RMN ^1H).



Formule brute : $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_6$

Masse molaire (g/mol) : 216,19

R_f : 0,28 (Cy/AcOEt: 30/70, UV+vanilline)

Isomère majoritaire :

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 1,12 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ; 3,04 (q, J = 7,1 Hz, 1H) ; 3,79 (s, 3H) ; 3,91 (s, 3H) ; 5,11 (s, 1H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ : 11,2 ; 43,3 ; 53,2 ; 60,2 ; 90,7 ; 103,3 ; 170,0 ; 173,9 ; 177,3.

Isomère minoritaire :

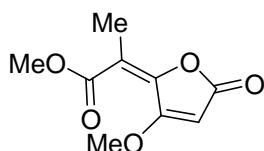
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 1,36 (d, J = 7,1 Hz, 3H) ; 2,93 (q, J = 7,1 Hz, 1H) ; 3,74 (s, 3H) ; 3,89 (s, 3H) ; 5,07 (s, 1H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ : 12,3 ; 45,4 ; 52,9 ; 60,2 ; 90,3 ; 102,6 ; 169,5 ; 174,5 ; 178,8.

Mode opératoire de déshydratation

160 2-(3-méthoxy-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)propanoate de méthyle

Une solution d'alcool **158** (0,643 g, 2,97 mmol, 1 éq.) dans 30 mL de DCM est refroidie à 0°C. La triéthylamine (2,49 mL, 17,85 mmol, 6 éq.) et une quantité catalytique de DMAP (36 mg, 0,30 mmol, 0,1 éq.) sont ajoutées. L'anhydride trifluoroacétique (1,24 mL, 8,92 mmol, 3 éq.) dans 5 mL de DCM est alors additionné goutte à goutte. Après 2h d'agitation à 0°C, le milieu est hydrolysé par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1M. La phase aqueuse est extraite 2 fois à l'AcOEt. Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le brut est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10 à 70/30) pour fournir l'alcène **160** (0,525 g, 90%, *E/Z* : 90/10 par intégration en RMN ¹H) sous forme d'un solide beige. L'isomère *E* a pu être isolé.



Formule brute : C₉H₁₀O₅

Masse molaire (g/mol) : 198,17

R_f : 0,6 (Cy/AcOEt: 30/70, UV+vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,08 (s, 3H) ; 3,77 (s, 3H) ; 3,88 (s, 3H) ; 5,28 (s, 1H).

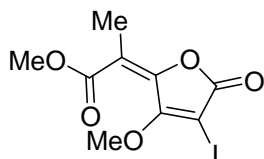
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 15,2 ; 52,7 ; 60,0 ; 91,2 ; 114,0 ; 143,9 ; 167,4 ; 168,0 ; 169,2.

MS (ES, pos) : 199,1 [M+H]⁺

92 2-(4-iodo-3-méthoxy-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)propanoate de méthyle

A une solution d'alcène **160** (0,116 g, 0,59 mmol, 1 éq.) dans 12 mL de MeCN sont ajoutés successivement l'iode (0,45 g, 1,76 mmol, 3 éq.) et le CAN (0,97 g, 1,76 mmol, 3 éq.). La solution est chauffée à 40°C durant 3h. Après ajout d'une solution aqueuse saturée en thiosulfate de sodium, la phase aqueuse est extraite trois fois à l'AcOEt. Les phases

organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée en thiosulfate de sodium, de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10 à 80/20) et le produit iodé **92** (0,197 g, 94%) est obtenu sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : C₉H₉O₅I
Masse molaire (g/mol) : 324,07
Rf : 0,61 (Cy/AcOEt: 50/50, UV+vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,05 (s, 3H) ; 3,77 (s, 3H) ; 4,34 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 15,1 ; 52,2 ; 52,9 ; 60,6 ; 114,2 ; 144,0 ; 165,9 ; 167,1 ; 168,0.

GC-MS : tr = 8,8 min MS 325 [M+H]⁺

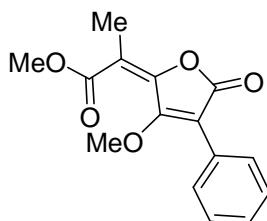
Procédure générale A: couplage de Suzuki-Miyaura

L'acétonitrile, l'eau et la DIPA utilisés sont dégazés sous courant d'argon durant 5h avant utilisation.

Le composé iodé **92** (0,042 g, 0,15 mmol, 1 éq.), l'acide boronique (0,18 mmol, 1,2 éq.), le catalyseur *cat*⁹¹ (0,007 g, 0,7 mol%) et la DIPA (0,050 mL, 0,37 mmol, 2,5 éq.) sont dissous dans 3 mL d'ACN et 1 mL d'eau. Le milieu est dégazé pendant 1h sous argon, puis chauffé pendant 6h30 à 85°C. Le milieu est ensuite filtré sur célite et rincé à l'AcOEt. Après addition d'eau, la phase aqueuse est extraite à l'AcOEt. Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cy/AcOEt : 80/20).

161a 2-(3-méthoxy-5-oxo-4-phényl-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

La procédure générale A, à partir de **92** et d'acide phénylboronique, permet d'obtenir, après chromatographie sur gel de silice, le composé **161a** (0,028 g, 78%) sous forme d'un solide blanc.



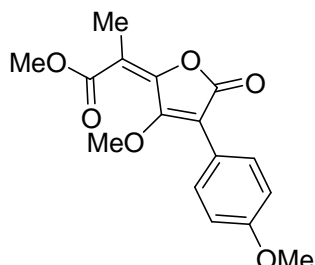
Formule brute : C₁₅H₁₄O₅
Masse molaire (g/mol) : 275,27
Rf : 0,76 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,16 (s, 3H) ; 3,72 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 7,36-7,46 (m, 5H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 14,9 ; 52,4 ; 61,1 ; 108,3 ; 113,5 ; 128,3 ; 128,5 ; 128,8 ; 130,0 ; 142,8 ; 161,5 ; 167,6 ; 168,2.

161b 2-(3-méthoxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

La procédure générale A, à partir de **92** et d'acide 4-méthoxyphénylboronique, permet d'obtenir, après chromatographie sur gel de silice, le composé **161b** (0,030 g, 65%) sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : C₁₆H₁₆O₆
Masse molaire (g/mol) : 304,29
Rf : 0,81 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,14 (s, 3H) ; 3,71 (s, 3H) ; 3,81 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 6,93 (d, J = 9,1 Hz, 2H) ; 7,41 (d, J = 9,1 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 15,0 ; 52,6 ; 55,4 ; 60,9 ; 108,8 ; 113,2 ; 114,0 ; 120,6 ; 131,2 ; 143,1 ; 160,1 ; 161,1 ; 168,0 ; 168,5.

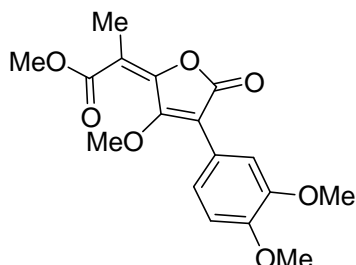
GC-MS : tr = 11,0 min MS 305 [M+H]⁺

IR : 2951, 2839, 2324, 177, 1728, 1605, 1250, 1101, 957 cm⁻¹.

HRMS (ES) : Calculée pour C₁₆H₁₇O₆: 305,1020 [M+H]⁺
 Trouvée : 305,1009

161c 2-(4-(3,4-diméthoxyphényl)-3-méthoxy-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

La procédure générale A, à partir de **92** et d'acide 3,4-diméthoxyphénylboronique, permet d'obtenir, après chromatographie sur gel de silice, le composé **161c** (0,047 g, 92%) sous forme d'un solide jaune.



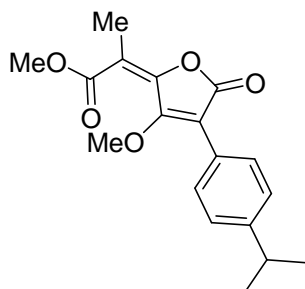
Formule brute : C₁₇H₁₈O₇
Masse molaire (g/mol) : 334,32
Rf : 0,28 (Cy/AcOEt : 60/40, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,15 (s, 3H) ; 3,73 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 3,88 (s, 3H) ; 3,89 (s, 3H) ; 6,89 (d, J = 8,2 Hz, 1H) ; 7,02-7,08 (m, 2H).

GC-MS : tr = 11,5 min MS 335 [M+H]⁺

161d 2-(4-(4-isopropylphényl)-3-méthoxy-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

La procédure générale A, à partir de **92** et d'acide 4-isopropylphénylboronique, permet d'obtenir, après chromatographie sur gel de silice, le composé **161d** (0,027 g, 58%) sous forme d'un solide beige.



Formule brute : C₁₈H₂₀O₅
Masse molaire (g/mol) : 316,13
Rf : 0,87 (Cy/AcOEt : 60/40, UV + vanilline)

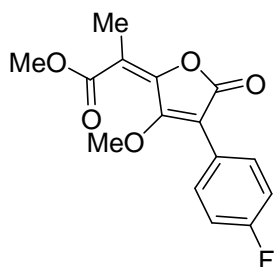
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 1,25 (d, J = 6,8 Hz, 6H) ; 2,15 (s, 3H) ; 2,91 (spt, J = 6,8 Hz, 1H) ; 3,73 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 7,26 (d, J = 8,3 Hz, 2H) ; 7,38 (d, J = 8,3 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 15,1 ; 24,1 ; 34,1 ; 52,7 ; 61,1 ; 108,7 ; 113,3 ; 126,3 ; 127,5 ; 130,0 ; 143,0 ; 149,8 ; 163,8 ; 168,0 ; 168,5.

GC-MS : tr = 11,0 min MS 317 [M+H]⁺

161e 2-(4-(4-fluorophényl)-3-méthoxy-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

La procédure générale A, à partir de **92** et d'acide 4-fluorophénylboronique, permet d'obtenir, après chromatographie sur gel de silice, le composé **161e** (0,029 g, 67%) sous forme d'un solide beige.



Formule brute : C₁₅H₁₃FO₅
Masse molaire (g/mol) : 292,26
Rf : 0,74 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

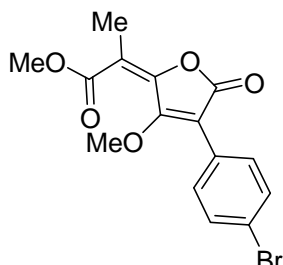
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,16 (s, 3H) ; 3,72 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 7,09-7,15 (m, 2H) ; 7,45-7,50 (m, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 15,1 ; 52,6 ; 61,2 ; 108,1 ; 114,0 ; 115,6 ; 115,9 ; 124,6 ; 124,7 ; 131,9 ; 132,0 ; 142,9 ; 161,4 ; 161,8 ; 164,7 ; 167,6 ; 168,3.

GC-MS : tr = 9,8 min MS 293 [M+H]⁺

161f 2-(4-(4-bromophényl)-3-méthoxy-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

La procédure générale A, à partir de **92** et d'acide 4-bromophénylboronique, permet d'obtenir, après chromatographie sur gel de silice, le composé **161f** (0,033 g, 63%) sous forme d'un solide beige.



Formule brute : C₁₅H₁₃BrO₅
Masse molaire (g/mol) : 353,16
Rf : 0,73 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

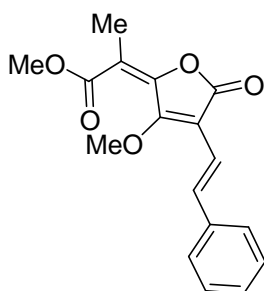
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 2,15 (s, 3H) ; 3,72 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 7,34 (d, J = 8,5 Hz, 2H) ; 7,56 (d, J = 8,5 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 15,2 ; 52,7 ; 61,3 ; 107,6 ; 114,3 ; 123,4 ; 127,6 ; 131,6 ; 131,7 ; 142,7 ; 162,0 ; 167,4 ; 168,3.

GC-MS : tr = 11,1 min MS 353 ; 355 [M+H]⁺

161g 2-(3-méthoxy-5-oxo-4-(E)-styrylfuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

La procédure générale A, à partir de **92** et d'acide trans-2-phénylvinylboronique, permet d'obtenir, après chromatographie sur gel de silice, le composé **161g** (0,027 g, 61%) sous forme d'un solide beige.



Formule brute : C₁₇H₁₆O₅
Masse molaire (g/mol) : 300,31
Rf : 0,52 (Cy/AcOEt : 60/40, UV + vanilline)

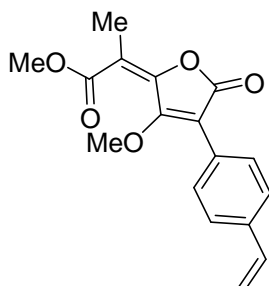
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,12 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 4,15 (s, 3H) ; 6,95 (d, J = 16,1 Hz, 1H) ; 7,27-7,43 (m, 5H) ; 7,63 (d, J = 16,1 Hz, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 15,4 ; 52,8 ; 61,7 ; 107,3 ; 113,7 ; 114,3 ; 127,0 ; 129,1 ; 135,5 ; 135,9 ; 137,1 ; 143,1 ; 160,1 ; 166,9 ; 167,5 ; 168,6.

GC-MS : tr = 11,3 min MS 301 [M+H]⁺

161h 2-(3-méthoxy-5-oxo-4-(4-vinylphényl)furan-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

La procédure générale A, à partir de **92** et d'acide 4-vinylphénylboronique, permet d'obtenir, après chromatographie sur gel de silice, le composé **161h** (0,041 g, 89%) sous forme d'un solide beige.



Formule brute : C₁₇H₁₆O₅
Masse molaire (g/mol) : 300,31
Rf : 0,73 (Cy/AcOEt : 60/40, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,15 (s, 3H) ; 3,73 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 5,31 (d, J = 10,9 Hz, 1H) ; 5,80 (d, J = 17,5 Hz, 1H) ; 6,72 (dd, J = 17,5 Hz, J = 10,9 Hz, 1H) ; 7,43-7,45 (m, 4H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 15,3 ; 52,8 ; 61,4 ; 108,7 ; 113,9 ; 115,4 ; 126,5 ; 128,1 ; 130,4 ; 136,4 ; 138,4 ; 143,2 ; 161,9 ; 167,9 ; 168,6.

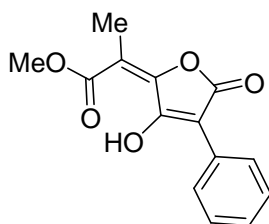
GC-MS : tr = 11,1 min MS 301 [M+H]⁺

Procédure générale B : déprotection de l'énol par BBr₃

Le produit protégé (1 éq.) est solubilisé dans du DCM (15 mL/mmol de substrat). Le milieu est refroidi à 0°C et une solution de BBr₃ (1M dans DCM, 1 éq.) est ajoutée. La solution est agitée pendant 2h à 0°C (lorsque la conversion du produit protégé n'est pas totale, la quantité nécessaire de BBr₃ est ajoutée avec précaution). La réaction est ensuite stoppée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1M. La phase aqueuse est extraite à l'EtOAc. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM) pour fournir le produit déprotégé.

162a 2-(3-hydroxy-5-oxo-4-phénylfuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

A partir de **161a**, la procédure générale B permet d'obtenir le composé **162a** (85%) sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₁₄H₁₂O₅
Masse molaire (g/mol) : 260,24
Rf : 0,88 (DCM, UV + vanilline)

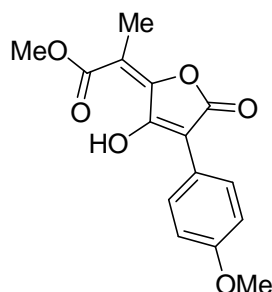
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 2,17 (s, 3H) ; 3,95 (s, 3H) ; 7,29-7,45 (m, 3H) ; 8,12 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H) ; 13,69 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 14,0 ; 54,3 ; 104,5 ; 111,9 ; 127,8 ; 128,2 ; 128,5 ; 129,3 ; 154,3 ; 160,2 ; 166,3 ; 172,1.

HRMS (ES, pos) : Calculée pour $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_5$: 261,0757 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 Trouvée : 261,0754

162b 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

A partir de **161b**, la procédure générale B permet d'obtenir le composé **162b** (65%) sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$
Masse molaire (g/mol) : 290,27
Rf : 0,72 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 2,16 (s, 3H) ; 3,84 (s, 3H) ; 3,95 (s, 3H) ; 6,95 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H) ; 8,09 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H) ; 13,46 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 14,1 ; 54,4 ; 55,6 ; 104,6 ; 111,3 ; 114,2 ; 122,3 ; 129,4 ; 154,5 ; 159,3 ; 159,6 ; 166,9 ; 172,4.

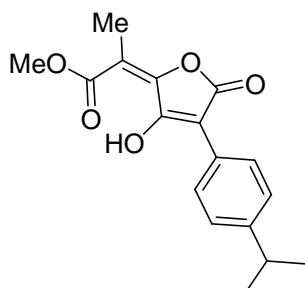
IR : 2957, 2528, 2358, 2340, 1769, 1624, 1604, 1308, 1248, 1078, 838 cm^{-1} .

MS (ES, nég) : 289,2 $[\text{M}-\text{H}]^-$

Analyse élémentaire : Théorique : C : 62,07 H : 4,86
 Calculée : C : 61,91 H : 4,89

162d 2-(3-hydroxy-4-(4-isopropylphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

A partir de **161d**, la procédure générale B permet d'obtenir le composé **162d** (69%) sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : $C_{17}H_{18}O_5$
 Masse molaire (g/mol) : 302,32
 Rf : 0,86 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

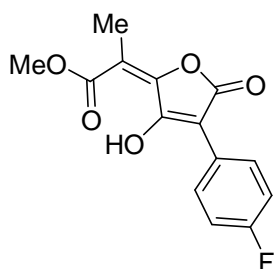
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ : 1,26 (d, J = 7,0 Hz, 6H) ; 2,18 (s, 3H) ; 2,93 (spt, J = 7,0 Hz, 1H) ; 3,96 (s, 3H) ; 7,29 (d, J = 8,5 Hz, 2H) ; 8,03 (d, J = 8,5 Hz, 2H) ; 13,57 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ : 13,9 ; 24,0 ; 34,2 ; 54,3 ; 104,9 ; 111,6 ; 126,6 ; 126,7 ; 127,9 ; 149,2 ; 154,5 ; 159,6 ; 166,4 ; 172,2.

HRMS (ES, pos) : Calculée pour $C_{17}H_{19}O_5$: 303,1227 $[M+H]^+$
 Trouvée : 303,1220

162e 2-(4-(4-fluorophényl)-3-hydroxy-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

A partir de **161e**, la procédure générale B permet d'obtenir le composé **162e** (71%) sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : $C_{14}H_{11}FO_5$
 Masse molaire (g/mol) : 278,23
 Rf : 0,60 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

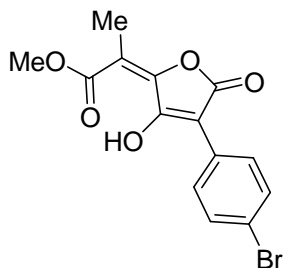
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ : 2,18 (s, 3H) ; 3,98 (s, 3H) ; 7,08-7,14 (m, 2H) ; 8,11-8,16 (m, 2H) ; 13,71 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ : 14,0 ; 54,4 ; 103,8 ; 112,1 ; 115,4 ; 115,7 ; 125,4 ; 129,8 ; 154,3 ; 159,6 ; 160,7 ; 164,0 ; 166,3 ; 172,2.

HRMS (ES, pos) : Calculée pour $C_{14}H_{12}FO_5$: 279,0663 $[M+H]^+$
 Trouvée : 279,0657

162f 2-(4-(4-bromophényl)- 3-hydroxy-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

A partir de **161f**, la procédure générale B permet d'obtenir le composé **162f** (58%) sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₁₄H₁₁BrO₅
Masse molaire (g/mol) : 339,14
Rf : 0,53 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

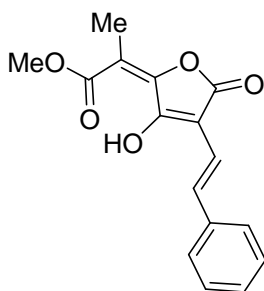
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,18 (s, 3H) ; 3,98 (s, 3H) ; 7,54 (d, J = 8,8 Hz, 2H) ; 8,03 (d, J = 8,8 Hz, 2H) ; 13,81 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 14,0 ; 54,4 ; 103,6 ; 112,4 ; 122,3 ; 128,9 ; 129,3 ; 131,7 ; 154,2 ; 160,5 ; 166,0 ; 172,2.

HRMS (ES, pos) : Calculée pour C₁₄H₁₂BrO₅ : 338,9854 ; 340,9844 [M+H]⁺
 Trouvée : 338,9863 ; 340,9842

162g 2-(3-hydroxy-5-oxo-4-(E)-styrylfuran-2-(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

A partir de **161g**, la procédure générale B permet d'obtenir le composé **162g** (61%) sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₁₆H₁₄O₅
Masse molaire (g/mol) : 286,28
Rf : 0,57 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

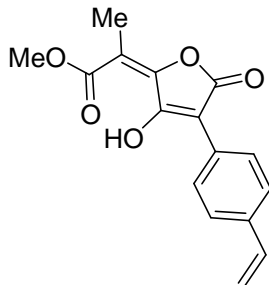
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 2,15 (s, 3H) ; 3,96 (s, 3H) ; 6,88 (d, J = 16,5 Hz, 1H) ; 7,26-7,35 (m, 3H) ; 7,50-7,53 (m, 3H) ; 7,58 (d, J = 16,1 Hz, 1H) ; 13,34 (s, 1H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ : 13,9 ; 54,2 ; 105,3 ; 111,7 ; 114,7 ; 126,8 ; 128,3 ; 128,8 ; 133,7 ; 137,4 ; 154,2 ; 159,0 ; 166,2 ; 172,0.

HRMS (ES, pos) : Calculée pour C₁₆H₁₅O₅ : 287,0914 [M+H]⁺
 Trouvée : 287,0907

162h 2-(3-hydroxy-5-oxo-4-(4-vinylphényl)furan-2-(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

A partir de **161h**, la procédure générale B permet d'obtenir le composé **162h** (50%) sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₁₆H₁₄O₅

Masse molaire (g/mol) : 286,28

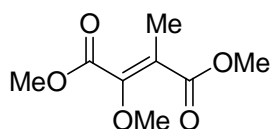
Rf : 0,67 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,18 (s, 3H) ; 3,97 (s, 3H) ; 5,28 (d, J = 10,9 Hz, 1H) ; 5,80 (d, J = 17,8 Hz, 1H) ; 6,73 (dd, J = 17,8 Hz, J = 10,9 Hz, 1H) ; 7,46 (d, J = 8,4 Hz, 2H) ; 8,11 (d, J = 8,4 Hz, 2H) ; 13,70 (s, 1H).

164 2-méthoxy-3-méthylfumarate de diméthyle

Une solution de DIPA (2,91 mL, 20,76 mmol, 1,5 éq.) dans 30 mL de THF est refroidie à -78°C , puis le *n*-BuLi (1,5 M dans l'hexane, 13,84 mL, 20,76 mmol, 1,5 éq.) est ajouté. La solution est agitée 20 min à -20°C avant d'être refroidie à -78°C . Le propionate de méthyle **151** (2 mL, 20,76 mmol, 1,5 éq.) dans 5 mL de THF est ajouté au goutte à goutte. La solution est agitée 45 min à -78°C puis une solution d'oxalate de diméthyle **48** (1,63 g, 13,84 mmol, 1 éq.) est ajoutée. La solution est agitée 1h à -78°C puis est laissée revenir à température ambiante. Le milieu est acidifié par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M et la phase aqueuse est extraite trois fois à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées.

Le résidu **163** est ensuite dissout dans 70 mL de THF. La solution est refroidie à 0°C , puis le méthanol (0,67 mL, 16,61 mmol, 1,2 éq.), la triphénylphosphine (4,35 g, 16,61 mmol, 1,2 éq.) et l'azodicarboxylate de diisopropyle (3,29 mL, 16,61 mmol, 1,2 éq.) sont ajoutés successivement. Le milieu est agité 10h à température ambiante, concentré et purifié sur chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10 à 80/20). Le produit **164** (2,01 g, 77%) est obtenu sous forme d'un liquide incolore.



Formule brute : $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_5$
Masse molaire (g/mol) : 188,18
Rf : 0,57 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 1,82 (s, 3H) ; 3,71 (s, 3H) ; 3,72 (s, 3H) ; 3,88 (s, 3H).

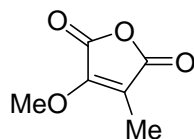
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 10,5 ; 51,7 ; 53,4 ; 57,4 ; 109,9 ; 155,0 ; 164,2 ; 167,9.

154 Anhydride 2-méthoxy-3-méthylmaléique

Le diester **164** (2,01g, 10,68 mmol, 1 éq.) est dissout dans 25 mL de MeOH, puis 25 mL d'une solution aqueuse 4 M d'hydroxyde de potassium sont ajoutés. La solution orange obtenue est agitée 2h à température ambiante, puis acidifiée jusqu'à pH 1 avec de l'acide chlorhydrique concentré. La phase aqueuse est extraite 5 fois à l'éther. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées.

Le résidu **165** est repris par 25 mL de chlorure de thionyle et la solution est chauffée à reflux pendant 10h. Après retour à température ambiante, le chlorure de thionyle est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 70/30). Le produit **154** (0,859 g, 57%) est obtenu sous forme d'un solide beige.

Les données spectrales sont en accord avec celles de la littérature.⁶⁰



Formule brute : $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$
Masse molaire (g/mol) : 142,11
Rf : 0,38 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

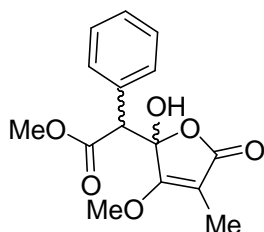
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 2,02 (s, 3H) ; 4,25 (s, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) : δ : 7,7 ; 59,9 ; 113,3 ; 153,6 ; 161,0 ; 165,5.

Mode opératoire d'addition d'un acétate d'aryle sur 154

166a 2-(2-hydroxy-3-méthoxy-4-méthyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-phénylacétate de méthyle

Une solution de DIPA (0,031 mL, 0,43 mmol, 1,1 éq.) dans 5 mL d'éther est refroidie à -78°C , puis le *n*-BuLi (1,5 M dans l'hexane, 10,2 mL, 15,30 mmol, 1,1 éq.) est ajouté. La solution est agitée 20 min à -20°C avant d'être refroidie à -78°C . Le phénylacétate de méthyle **47a** (0,056 mL, 0,39 mmol, 1 éq.) dans 1 mL d'éther est ajouté et le milieu est agité 45 min à -78°C . Le chlorure de zinc (1 M dans l'éther, 0,39 mL, 0,39 mmol, 1 éq.), 20 mL d'éther et l'anhydride 2-méthoxy-3-méthylmaléique **154** (0,056 g, 0,39 mmol, 1 éq.) sont ajoutés successivement. La solution est agitée 6h à -60°C , puis 5 mL d'une solution aqueuse saturée en NH_4Cl sont ajoutés. Après retour à température ambiante, la phase aqueuse est extraite trois fois à l'éther. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Une purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10 à 60/40) permet d'isoler le composé **166a** (0,066 g, 58%), sous forme d'un mélange de formes diastéréomères (75/25 par intégration en RMN ^1H).



Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_6$
 Masse molaire (g/mol) : 292,28
 Rf : 0,40 (Cy/AcOEt : 30/70, UV + vanilline)

Isomère majoritaire :

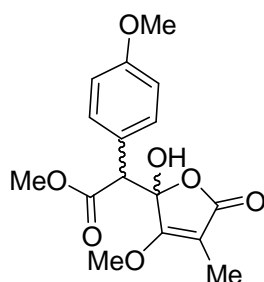
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 1,65 (s, 3H) ; 3,79 (s, 3H) ; 3,99 (s, 3H) ; 4,24 (s, 1H), 6,45 (sl, 1H) ; 7,24-7,39 (m, 5H).

Isomère minoritaire :

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 1,99 (s, 3H) ; 3,72 (s, 3H) ; 3,88 (s, 3H) ; 4,02 (s, 1H), 5,55 (s, 1H) ; 7,24-7,39 (m, 5H).

166b 2-(2-hydroxy-3-méthoxy-4-méthyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-(4-méthoxyphényl)acétate de méthyle

Suivant le mode opératoire décrit pour le composé **166a**, le 4-méthoxyphénylacétate de méthyle **47b** (0,15 mL, 0,93 mmol, 1 éq.) réagit avec l'anhydride 2-méthoxy-3-méthylmaléique **154** (0,132 g, 0,93 mmol, 1 éq.) pour donner le composé **166b** (0,185 g, 61%) sous forme d'un mélange de formes diastéréomères (75/25 par intégration en RMN ^1H).



Formule brute : C₁₆H₁₈O₇

Masse molaire (g/mol) : 322,31

Rf : 0,31 (Cy/AcOEt : 40/60, UV + vanilline)

Isomère majoritaire :

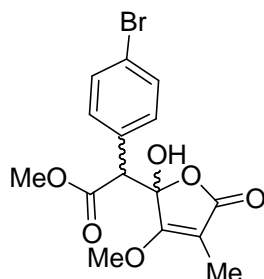
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,68 (s, 3H) ; 3,77 (s, 3H) ; 3,79 (s, 3H) ; 4,01 (s, 3H) ; 4,21 (s, 1H) ; 6,37 (sl, 1H) ; 6,84 (d, J = 8,7 Hz, 2H) ; 7,18 (d, J = 8,7 Hz, 2H).

Isomère minoritaire :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,98 (s, 3H) ; 3,69 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 3,97 (s, 3H) ; 4,04 (s, 1H) ; 5,46 (sl, 1H) ; 6,90 (d, J = 8,7 Hz, 2H) ; 7,39 (d, J = 8,7 Hz, 2H).

166c 2-(4-bromophényl)-2-(2-hydroxy-3-méthoxy-4-méthyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)acétate de méthyle

Suivant le mode opératoire décrit pour le composé **166a**, le 4-bromophénylacétate de méthyle **47c** (0,180 g, 0,77 mmol, 1 éq.) réagit avec l'anhydride 2-méthoxy-3-méthylmaléique **154** (0,110 g, 0,77 mmol, 1 éq.) pour donner le composé **166c** (0,212 g, 74%) sous forme d'un mélange de formes diastéréomères (70/30 par intégration en RMN ¹H).



Formule brute : C₁₅H₁₅BrO₆

Masse molaire (g/mol) : 371,18

Rf : 0,38 (Cy/AcOEt : 40/60, UV + vanilline)

Isomère majoritaire :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,68 (s, 3H) ; 3,77 (s, 3H) ; 3,98 (s, 3H) ; 4,17 (s, 1H) ; 6,39 (sl, 1H) ; 7,10 (d, J = 8,2 Hz, 2H) ; 7,45 (d, J = 8,2 Hz, 2H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ : 8,1 ; 53,6 ; 55,0 ; 59,3 ; 100,2 ; 123,2 ; 130,9 ; 131,5 ; 131,8 ; 132,0 ; 167,8 ; 171,9 ; 172,4.

Isomère minoritaire :

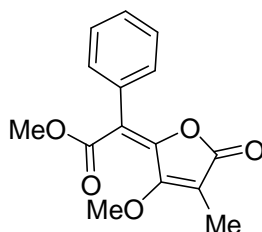
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,97 (s, 3H) ; 3,70 (s, 3H) ; 3,90 (s, 3H) ; 3,97 (s, 1H) ; 5,43 (sl, 1H) ; 7,31-7,46 (m, 4H).

Mode opératoire de déshydratation par méthylation / élimination

167a 2-(3-méthoxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)-2-phénylacétate de méthyle

L'alcool **166a** (0,026 g, 0,088 mmol, 1 éq.) est dissout dans 15 mL de DCM. La triéthylamine (0,013 mL, 0,097 mmol, 1,1 éq.), le DMAP (0,002 g, 0,01 mmol, 0,1 éq.) et le chlorure de méthanesulfonyle (0,007 mL, 0,097 mmol, 1,1 éq.) sont ajoutés successivement et le milieu est chauffé à reflux pendant 2h. Le milieu est hydrolysé par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 0,2 M. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium et concentrée.

Le résidu est dissout dans 15 mL de THF, puis refroidi à 0°C. Le 1,5-diaza bicyclo[4,3.0]non-5-ène (DBN, 0,020 mL, 0,132 mmol, 1,5 éq.) est ajouté. Après 3h d'agitation à température ambiante, 15 mL d'éther sont ajoutés. Le milieu est lavé par une solution d'acide chlorhydrique 0,2 M, puis par de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Une purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10 à 80/20) permet d'obtenir le composé **167a** (0,013 g, 64%, *E/Z* : 70/30 par intégration en RMN ¹H).



Formule brute : C₁₅H₁₄O₅

Masse molaire (g/mol) : 229,07

Rf : 0,46 et 0,57 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

Isomère E :

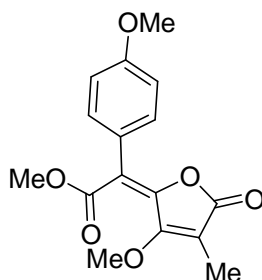
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,07 (s, 3H) ; 3,72 (s, 3H) ; 3,81 (s, 3H) ; 7,30-7,33 (m, 5H).

Isomère Z :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,12 (s, 3H) ; 3,86 (s, 3H) ; 4,15 (s, 3H) ; 7,58-7,61 (m, 5H).

167b 2-(3-méthoxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)-2-(4-méthoxyphényl)acétate de méthyle

Suivant le mode opératoire décrit pour le produit **167a**, la déshydratation de l'alcool **166b** (0,185 g, 0,57 mmol) fournit le composé **167b** (0,140 g, 81%, *E/Z* : 70/30 par intégration en RMN ¹H).



Formule brute : C₁₆H₁₆O₅
Masse molaire (g/mol) : 304,29
Rf : 0,52 et 0,60 (Cy/AcOEt : 40/60, UV + vanilline)

Isomère E :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,05 (s, 3H) ; 3,71 (s, 3H) ; 3,78 (s, 3H) ; 3,81 (s, 3H) ; 6,85 (d, J = 8,7 Hz, 2H) ; 7,23 (d, J = 8,7 Hz, 2H).

GC-MS : tr = 11,2 min MS 305 [M+H]⁺

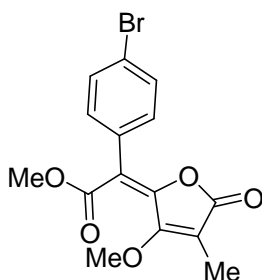
Isomère Z :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,11 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 3,86 (s, 3H) ; 4,13 (s, 3H) ; 6,90 (d, J = 9,1 Hz, 2H) ; 7,57 (d, J = 9,1 Hz, 2H).

GC-MS : tr = 11,4 min MS 305 [M+H]⁺

167c 2-(4-bromophényl)-2-(3-méthoxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)acétate de méthyle

Suivant le mode opératoire décrit pour le produit **167a**, la déshydratation de l'alcool **166c** (0,212 g, 0,57 mmol) fournit le composé **167c** (0,110 g, 54%, *E/Z* : 55/45 par intégration en RMN ¹H).



Formule brute : C₁₅H₁₃BrO₅
Masse molaire (g/mol) : 353,16
Rf : 0,57 et 0,75 (Cy/AcOEt : 40/60, UV + vanilline)

Isomère E :

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 2,08 (s, 3H) ; 3,77 (s, 3H) ; 3,80 (s, 3H) ; 7,17 (d, J = 8,3 Hz, 2H) ; 7,46 (d, J = 8,3 Hz, 2H).

GC-MS : tr = 11,1 min MS 353 ; 355 [M+H]⁺

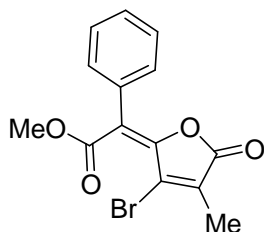
Isomère Z :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,12 (s, 3H) ; 3,86 (s, 3H) ; 4,15 (s, 3H) ; 7,46-7,50 (m, 4H).

GC-MS : tr = 11,4 min MS 353 ; 355 [M+H]⁺

168a 2-(3-bromo-4-méthyl-5-oxofuran-2-(5H)-ylidène)-2-phénylacétate de méthyle

Suivant la procédure générale B décrite pour le composé **162**, le traitement du produit protégé (*E*)-**167a** (0,015 g, 0,05 mmol) par BBr₃ fournit le composé bromé **168a** (0,010 g, 62%) sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : C₁₄H₁₁BrO₄
Masse molaire (g/mol) : 323,14
Rf : 0,76 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

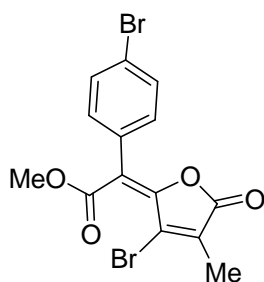
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,00 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 7,34-7,42 (m, 5H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 11,4 ; 53,3 ; 118,9 ; 128,6 ; 129,7 ; 130,4 ; 130,9 ; 135,0 ; 146,3 ; 165,8 ; 166,5.

MS (ES, pos) : 360,9 ; 362,8 [M+K]⁺

168c 2-(3-bromo-4-méthyl-5-oxofuran-2-(5H)-ylidène)-2-(4-bromophényl)acétate de méthyle

Suivant la procédure générale B décrite pour le composé **162**, le traitement du produit protégé (*E*)-**167c** (0,025 g, 0,07 mmol) par BBr₃ fournit le composé dibromé **168c** (0,016 g, 57%) sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : C₁₄H₁₀Br₂O₄
Masse molaire (g/mol) : 402,03
Rf : 0,76 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,99 (s, 3H) ; 3,81 (s, 3H) ; 7,22 (d, J = 6,0 Hz, 2H) ; 7,52 (d, J = 6,0 Hz, 2H).

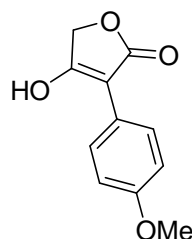
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 11,3 ; 53,2 ; 117,3 ; 124,0 ; 129,8 ; 130,0 ; 131,7 ; 132,5 ; 135,3 ; 146,6 ; 165,2 ; 166,0.

MS (ES, pos) : 438,8 ; 440,8 ; 442,8 [M+K]⁺

173 4-hydroxy-3-(4-méthoxyphényl)furan-2(5H)-one

A une solution de 4-méthoxyphénylacétate de méthyle **171** (24,5 mL, 154,3 mmol, 1 éq.) dans 1 L de THF sont ajoutés successivement le glycolate d'éthyle **172** (14,6 mL, 154,3 mmol, 1 éq.) et le *tert*-butoxyde de potassium (34,62 g, 308,6 mmol, 2 éq.). La solution est portée à reflux durant une nuit. Après retour à température ambiante, le milieu est acidifié par ajout d'acide chlorhydrique concentré et extrait 3 fois à l'AcOEt. Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Les cristaux qui se forment pendant l'évaporation du solvant sont filtrés sur verre fritté et rincés à l'éther. L'opération est répétée jusqu'à ce que les eaux-mères ne contiennent plus de produit. L'acide tétronique **173** (24,8 g, 78%) est obtenu sous forme de cristaux blancs.

Les données spectrales sont en accord avec celles de la littérature.¹³⁹



Formule brute : C₁₁H₁₀O₄

Masse molaire (g/mol) : 206,19

Rf : 0,3 (DCM/MeOH : 90/10 ; UV + vanilline)

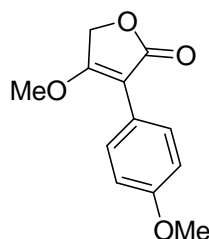
RMN ¹H (300 MHz, DMSO d₆) : δ : 3,75 (s, 3H) ; 4,74 (s, 2H) ; 6,94 (d, J = 8,7 Hz, 2H) ; 7,85 (d, J = 8,7 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO d₆) : δ : 55,0 ; 66,0 ; 97,3 ; 113,5 ; 122,9 ; 127,6 ; 157,6 ; 173,1 ; 173,3.

MS (ES, pos) : 207,1 [M+H]⁺

174 4-méthoxy-3-(4-méthoxyphényl)furan-2(5H)-one¹³⁹

A une suspension d'acide tétronique **173** (7,24 g, 35,12 mmol, 1 éq.) dans 150 mL d'acétone sont ajoutés successivement le carbonate de potassium (4,85 g, 35,12 mmol, 1 éq.) et le sulfate de diméthyle (3,33 mL, 35,12 mmol, 1 éq.). Après 4h d'agitation à reflux, la solution est filtrée sur célite et concentrée. Le produit protégé **174** (7,12 g, 92%) est obtenu sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : C₁₂H₁₂O₄

Masse molaire (g/mol) : 220,22

Rf : 0,36 (Cy/AcOEt : 80/20, UV + vanilline)

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 3,76 (s, 3H) ; 3,86 (s, 3H) ; 4,72 (s, 2H) ; 6,86 (d, J = 8,8 Hz, 2H) ; 7,77 (d, J = 8,8 Hz, 2H).

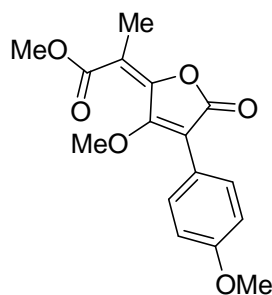
RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) : δ : 55,3 ; 58,0 ; 64,6 ; 102,1 ; 113,7 ; 121,9 ; 128,9 ; 158,9 ; 172,3 ; 173,1.

MS (ES, pos) : 221,1 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 243,0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

161b 2-(3-méthoxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

Une solution de DIPA (16,89 mL, 120,52 mmol, 1,5 éq.) dans 500 mL de THF est refroidie à -78°C , puis le *n*-BuLi (1,5 M dans l'hexane, 80,35 mL, 120,52 mmol, 1,5 éq.) est ajouté. La solution est agitée 20 min à -20°C avant d'être refroidie à -78°C . L'acide tétronique protégé **174** (17,09 g, 80,35 mmol, 1 éq.) dans 250 mL de THF est ajouté lentement. La solution est agitée 30 min à -78°C puis le pyruvate de méthyle (21,77 mL, 241,05 mmol, 3 éq.) est ajouté. Après 30 min d'agitation à -78°C , la solution est laissée revenir à température ambiante. Après ajout d'une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium, la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée.

L'huile obtenue est solubilisée dans 750 mL de DCM. A cette solution refroidie à 0°C sont ajoutés successivement la triéthylamine (67 mL, 482,10 mmol, 6 éq.), le DMAP (1g, 8,03 mmol, 0,1 éq.) et lentement le TFAA (34 mL, 241,05 mmol, 3 éq.). Après une nuit d'agitation à température ambiante, le milieu est hydrolysé par ajout d'une solution aqueuse 1 M d'acide chlorhydrique. La phase aqueuse est extraite au DCM. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10 à 50/50). Le produit **161b** (17,29 g, 88%, *E/Z* : 70/30 par intégration en RMN ^1H) est obtenu sous forme d'une huile orange.



Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_6$

Masse molaire (g/mol) : 304,29

Rf : 0,6 (Cy/AcOEt : 50/50, UV+vanilline)

Isomère E :

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 2,14 (s, 3H) ; 3,71 (s, 3H) ; 3,81 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 6,93 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H) ; 7,41 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 15,0 ; 52,6 ; 55,4 ; 60,9 ; 108,8 ; 113,2 ; 114,0 ; 120,6 ; 131,2 ; 143,1 ; 160,1 ; 161,1 ; 168,0 ; 168,5.

GC-MS : tr = 11,0 min MS 305 $[\text{M} + \text{H}]^+$

IR : 2951, 2839, 2324, 177, 1728, 1605, 1250, 1101, 957 cm^{-1} .

HRMS (ES) : Calculée pour $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_6$: 305,1020 $[\text{M} + \text{H}]^+$
 Trouvée : 305,1009

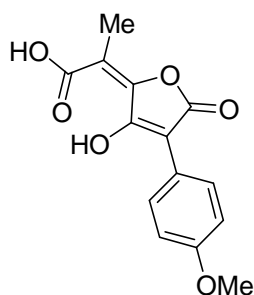
Isomère Z :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,27 (s, 3H) ; 3,80 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 3,86 (s, 3H) ; 6,95 (d, J = 8,7 Hz, 2H) ; 7,41 (d, J = 8,7 Hz, 2H).

GC-MS : tr = 11,5 min MS 305 [M + H]⁺

177 Acide 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène) propanoïque

L'ester **162b** (1,68 g, 5,79 mmol) est mis en suspension dans 100 mL d'une solution aqueuse 0,5 M de soude. Le milieu est chauffé à reflux durant 30 min et devient homogène. Après retour à température ambiante, la phase aqueuse est extraite à l'AcOEt. La phase aqueuse est ensuite acidifiée jusqu'à pH 1 avec de l'acide chlorhydrique concentré. Le précipité formé est extrait deux fois à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. L'acide **177** (1,59 g, quantitatif) est obtenu sous forme d'un solide orange.



Formule brute : C₁₄H₁₂O₆

Masse molaire (g/mol) : 276,24

Rf : 0,2 (DCM/MeOH : 90/10, UV + vanilline)

RMN ¹H (200 MHz, MeOD) : δ : 2,11 (s, 3H) ; 3,81 (s, 3H) ; 6,92 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 8,02 (d, J = 9,0 Hz, 2H).

RMN ¹³C (50 MHz, MeOD) : δ : 14,5 ; 55,6 ; 103,9 ; 114,1 ; 114,6 ; 123,4 ; 129,9 ; 154,6 ; 160,6 ; 160,9 ; 168,3 ; 174,7.

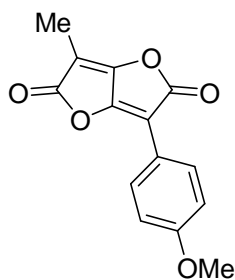
MS (ES, nég) : 231,0 [M-CO₂]⁻

Analyse Élémentaire : *Théorique* : C : 60,87 H : 4,38

Calculée : C : 60,54 H : 4,43

170 3-(4-méthoxyphényl)-6-méthylfuro[3,2-b]furan-2,5-dione

L'acide **177** (0,9 g, 3,36 mmol) est mis en suspension dans 15 mL d'anhydride acétique. Le mélange est chauffé à reflux pendant 10 min et devient homogène. Le milieu est ensuite laissé revenir à température ambiante et un précipité jaune se forme. Celui-ci est filtré sur verre fritté et rincé au pentane. La dilactone **170** (0,80 g, 94%) est obtenue sous forme de cristaux jaunes.



Formule brute : C₁₄H₁₀O₅

Masse molaire (g/mol) : 258,23

Rf : 0,7 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ : 2,06 (s, 3H) ; 3,86 (s, 3H) ; 6,98 (d, J = 9,1 Hz, 2H) ; 7,94 (d, J = 9,1 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ : 7,6 ; 55,5 ; 98,8 ; 101,1 ; 114,8 ; 119,0 ; 129,9 ; 155,6 ; 159,3 ; 161,0 ; 166,1 ; 168,8.

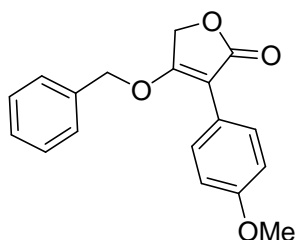
MS (ES, pos): 258,0 [M]⁺

Analyse Élémentaire :

| | | |
|--------------------|-----------|----------|
| <i>Théorique :</i> | C : 65,12 | H : 3,90 |
| <i>Calculée :</i> | C : 65,00 | H : 3,92 |

178 4-(benzyloxy)-3-(4-méthoxyphenyl)furan-2(5H)-one

L'acide tétronique **173** (0,245 g, 1,18 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 6 mL de THF. L'alcool benzylique (0,15 mL, 1,42 mmol, 1,2 éq.) et la triphénylphosphine (0,371 g, 1,42 mmol, 1,2 éq.) sont ajoutés successivement. La solution est refroidie à 0°C puis l'azodicarboxylate de diéthyle (40% dans le toluène, 0,65 mL, 1,42 mmol, 1,2 éq.) est ajouté lentement. Le milieu est chauffé à reflux pendant 12h puis le THF est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 80/20) pour donner le produit *O*-protégé **178** (0,163g, 47%) sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : C₁₈H₁₆O₄

Masse molaire (g/mol) : 296,32

Rf : 0,53 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

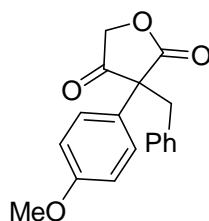
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 3,81 (s, 3H) ; 4,79 (s, 2H) ; 5,16 (s, 2H) ; 6,93 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 7,32-7,41 (m, 5H) ; 7,85 (d, J = 9,0 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 55,3 ; 65,1 ; 72,7 ; 103,4 ; 113,9 ; 121,9 ; 127,4 ; 129,1 ; 129,4 ; 134,8 ; 159,1 ; 170,8 ; 172,8.

GC-MS : tr = 10,90 min MS 314 [M+NH₄]⁺

179 3-benzyl-3-(4-méthoxyphenyl)furan-2,4(3H, 5H)-dione

A une suspension d'acide tétronique **173** (0,231 g, 1,12 mmol, 1 éq.) dans 5 mL d'acétone sont ajoutés successivement le carbonate de potassium (0,155 g, 1,12 mmol, 1 éq.) et le bromure de benzyle (0,13 mL, 1,12 mmol, 1 éq.). Après 2h d'agitation à reflux, la solution est filtrée sur célite et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM) et le produit *C*-protégé **179** (0,047 g, 15%) est obtenu sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : C₁₈H₁₆O₄

Masse molaire (g/mol) : 296,32

Rf : 0,8 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 3,46 (dd, J = 30,5 Hz, J = 13,2 Hz, 2H) ; 3,8 (s, 3H) ; 3,91 (d, J = 16,9 Hz, 1H) ; 4,45 (d, J = 16,9 Hz, 1H) ; 6,96 (d, J = 9,1 Hz, 2H) ; 7,24-7,31 (m, 5H) ; 7,50 (d, J = 9,1 Hz, 2H).

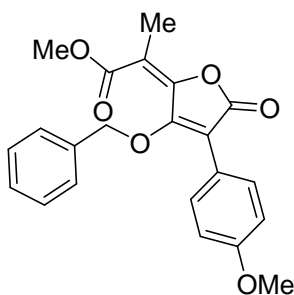
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 43,5 ; 55,5 ; 58,8 ; 72,6 ; 114,8 ; 125,7 ; 127,8 ; 128,0 ; 128,9 ; 130,3 ; 134,4 ; 159,9 ; 174,6 ; 207,7.

GC-MS : tr = 10,94 min MS 314 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

181 2-(3-benzyloxy)-4-(4-méthoxyphenyl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

Une solution de DIPA (1,12 mL, 7,99 mmol, 1,5 éq.) dans 35 mL de THF est refroidie à -78°C , puis le *n*-BuLi (1,6 M dans l'hexane, 5,0 mL, 7,99 mmol, 1,5 éq.) est ajouté. La solution est agitée 20 min à -20°C avant d'être refroidie à -78°C . L'acide tétronique protégé **178** (1,58 g, 5,32 mmol, 1 éq.) dans 15 mL de THF est ajouté lentement. La solution est agitée 30 min à -78°C puis le pyruvate de méthyle (2,44 mL, 26,97 mmol, 5 éq.) est ajouté. Après 30 min d'agitation à -78°C , la solution est laissée revenir à température ambiante. Après ajout d'une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium, la phase aqueuse est extraite trois fois à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée.

L'huile obtenue est solubilisée dans 60 mL de DCM. A cette solution refroidie à 0°C sont ajoutés successivement la triéthylamine (4,44 mL, 31,92 mmol, 6 éq.), le DMAP (0,01g, 0,8 mmol, 0,1 éq.) et lentement le TFAA (2,25 mL, 15,96 mmol, 3 éq.). Après 2h d'agitation à température ambiante, le milieu est hydrolysé par ajout d'une solution aqueuse 1 M d'acide chlorhydrique. La phase aqueuse est extraite deux fois au DCM. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/éther : 100/0 à 95/5). Le produit **181** (1,14 g, 56%, *E/Z* : 70/30 par intégration en RMN ^1H) est obtenu sous forme d'une huile jaune. L'isomère *E* a pu être isolé.



Formule brute : $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_6$

Masse molaire (g/mol) : 380,39

Rf : 0,63 et 0,71 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

Isomère E :

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 2,12 (s, 3H) ; 3,35 (s, 3H) ; 3,80 (s, 3H) ; 4,89 (s, 2H) ; 6,94 (d, J = 8,4 Hz, 2H) ; 7,15-7,18 (m, 2H) ; 7,30-7,32 (m, 3H) ; 7,41 (d, J = 8,4 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 15,0 ; 52,1 ; 55,3 ; 74,8 ; 108,8 ; 113,3 ; 114,0 ; 120,8 ; 128,4 ; 128,5 ; 128,9 ; 131,3 ; 135,5 ; 142,9 ; 159,8 ; 160,0 ; 167,9 ; 168,2.

MS (ES, pos) : 381,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

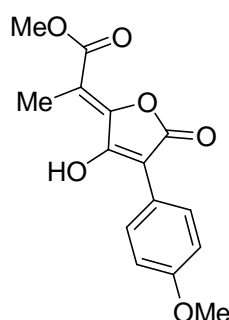
Isomère Z :

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 2,23 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 5,00 (s, 2H) ; 6,96 (d, J = 8,7 Hz, 2H) ; 7,13-7,16 (m, 2H) ; 7,31-7,33 (m, 3H) ; 7,45 (d, J = 8,7 Hz, 2H).

Mode opératoire d'hydrogénation catalytique

162b 2-(3-méthoxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

Le produit protégé **181** (mélange 50/50 des isomères *Z* et *E*, 0,645 g, 1,70 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 80 mL de DCM. Le palladium sur charbon (10%, 0,17 g, 0,1 éq.) est ajouté. Le milieu est ensuite purgé par 3 cycles vide/argon, puis l'hydrogène est introduit par un cycle vide/H₂. Le milieu est agité pendant 12h à température ambiante, filtré sur célite, rincé à l'éthanol et concentré. Un solide jaune (0,486 g, quantitatif) est obtenu, correspondant à un mélange des deux isomères *Z* et *E* de **162b**. Ceux-ci peuvent être séparés par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM puis AcOEt/MeOH : 95/5).



Formule brute : C₁₅H₁₄O₆

Masse molaire (g/mol) : 290,27

Rf : 0,26 (AcOEt/MeOH : 95/5, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,30 (s, 3H) ; 3,81 (s, 3H) ; 3,84 (s, 3H) ; 6,95 (d, J = 8,1 Hz, 2H) ; 7,43 (d, J = 8,1 Hz, 2H).

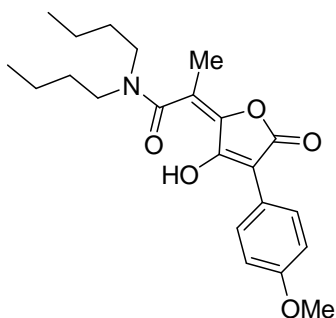
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 13,0 ; 52,7 ; 55,4 ; 107,3 ; 112,2 ; 114,4 ; 119,7 ; 129,7 ; 145,1 ; 159,8 ; 161,7 ; 167,4 ; 167,9.

MS (ES, nég) : 289,2 [M-H]⁻

Ouverture directe de la dilactone **170** par la dibutylamine

La dilactone **170** (25,1 mg, 0,010 mmol, 1 éq.) est mise en solution dans 2 mL de DCM. La dibutylamine **182a** (0,020 mL, 0,010 mmol, 1 éq.) est ajoutée et le milieu est agité 1h à température ambiante. Après concentration, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/Et₂O : 90/10 à 50/50 puis DCM/MeOH : 95/5). Le produit de type I **183a** (19 mg, 50%) est obtenu sous forme d'un solide jaune. Le produit de type II **184a** (13 mg, 36%) est obtenu sous forme d'un solide blanc.

183a *N,N*-dibutyl-2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)propanamide



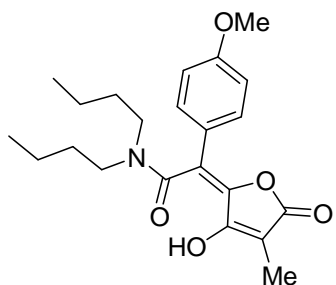
Formule brute : C₂₂H₂₉N₂O₅
Masse molaire (g/mol) : 387,47
Rf : 0,32 (DCM/Et₂O: 70/30, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 0,94 (t, J = 7,1 Hz, 6H) ; 1,24-1,38 (m, 4H) ; 1,53-1,68 (m, 4H) ; 2,13 (s, 3H) ; 3,38 (t, J = 7,6 Hz, 4H) ; 3,82 (s, 3H) ; 6,93 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 8,04 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 11,3 (brs, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 13,8 ; 16,2 ; 20,1 ; 29,9 ; 47,6 ; 55,3 ; 104,2 ; 113,9 ; 114,3 ; 122,1 ; 129,1 ; 148,6 ; 159,1 ; 159,2 ; 162,0 ; 167,2 ; 172,1.

MS (ES, pos) : 388,1 [M+H]⁺

184a *N,N*-dibutyl-2-(3-hydroxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)-2-(4-méthoxyphényl)acétamide



Formule brute : C₂₂H₂₉N₂O₅
Masse molaire (g/mol) : 387,47
Rf : 0,16 (DCM/Et₂O: 70/30, UV + vanilline)

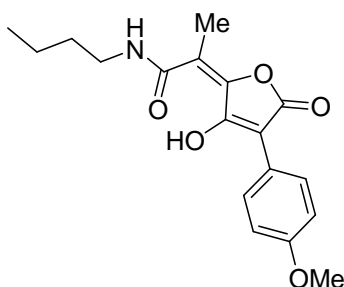
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 0,68 (t, J = 6,6 Hz, 6H) ; 1,17-1,61 (m, 8H) ; 1,77 (s, 3H) ; 3,38 (t, J = 7,6 Hz, 4H) ; 3,81 (s, 3H) ; 6,89 (d, J = 8,8 Hz, 2H) ; 7,50 (d, J = 8,8 Hz, 2H).

MS (ES, pos) : 388,1 [M+H]⁺

Ouverture directe de la dilactone **170** par la butylamine

La dilactone **170** (78,4 mg, 0,3 mmol, 1 éq.) est mise en solution dans 3 mL de DCM. La butylamine **182b** (0,030 mL, 0,3 mmol, 1 éq.) est ajoutée et le milieu est agité 1h à température ambiante. Après concentration, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 80/20 à 60/40). Le produit de type I **183b** (42 mg, 42%) est obtenu sous forme d'un solide orange. Le produit de type II **184b** (34 mg, 34%) est obtenu sous forme d'un solide blanc.

183b *N*-butyl-2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)propanamide



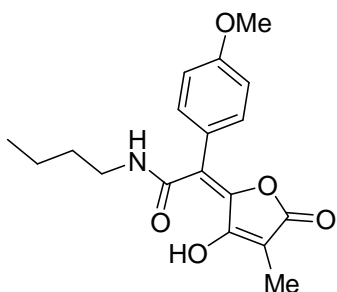
Formule brute : C₁₈H₂₁N₀₅
 Masse molaire (g/mol) : 331,36
 Rf : 0,20 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 0,97 (t, J = 7,4 Hz, 3H) ; 1,25-1,65 (m, 4H) ; 2,18 (s, 3H) ; 3,40-3,50 (m, 2H) ; 3,83 (s, 3H) ; 6,32 (sl, 1H) ; 6,95 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 8,11 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 15,82 (s, 1H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ : 13,7 ; 13,8 ; 20,2 ; 31,2 ; 40,8 ; 55,4 ; 102,8 ; 111,3 ; 113,9 ; 122,6 ; 128,9 ; 152,9 ; 159,1 ; 160,8 ; 167,5 ; 169,0.

MS (ES, pos) : 332,2 [M+H]⁺

184b *N*-butyl-2-(3-hydroxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)-2-(4-méthoxyphényl)acétamide



Formule brute : C₁₈H₂₁N₀₅
 Masse molaire (g/mol) : 331,36
 Rf : 0,33 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 0,89 (t, J = 7,1 Hz, 3H) ; 1,21-1,55 (m, 4H) ; 1,85 (s, 3H) ; 3,26-3,35 (m, 2H) ; 3,85 (s, 3H) ; 5,98 (sl, 1H) ; 6,97 (d, J = 8,6 Hz, 2H) ; 7,18 (d, J = 8,6 Hz, 2H) ; 15,09 (s, 1H).

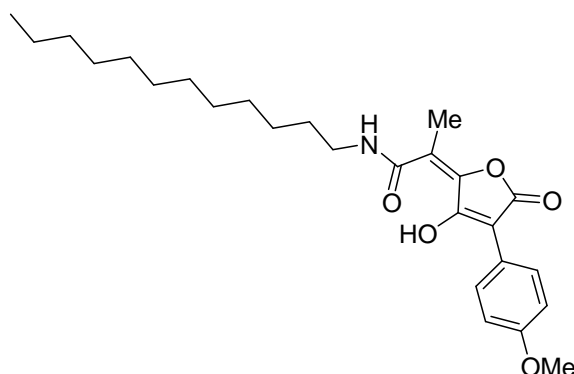
RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) : δ : 6,4 ; 13,7 ; 20,1 ; 31,1 ; 40,6 ; 55,5 ; 102,0 ; 114,9 ; 116,4 ; 124,1 ; 131,5 ; 153,0 ; 160,4 ; 163,1 ; 168,8 ; 169,3.

MS (ES, pos) : 332,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Ouverture directe de la dilactone **170** par la dodécylamine

La dilactone **170** (88,8 mg, 0,34 mmol, 1 éq.) est mise en solution dans 4 mL de DCM. La dodécylamine **182c** (189,1 mg, 1,02 mmol, 3 éq.) est ajoutée et le milieu est agité 2h à température ambiante. Après concentration, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 80/20 à 70/30). Le produit de type I **183c** (68 mg, 45%) est obtenu sous forme d'un solide jaune. Le produit de type II **184c** (53 mg, 35%) est obtenu sous forme d'un solide blanc.

183c *N*-dodécyl-2-(3-hydroxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)-2-(4-méthoxyphényl)acétamide



Formule brute : $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_5$

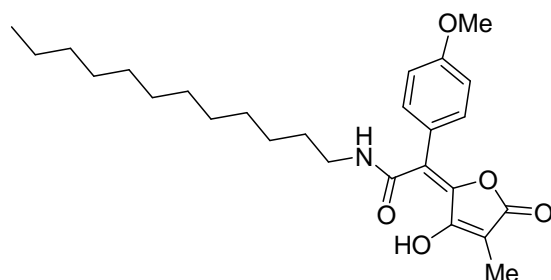
Masse molaire (g/mol) : 443,58

Rf : 0,42 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 0,88 (t, $J = 6,1$ Hz, 3H) ; 1,26-1,32 (m, 20H) ; 1,58-1,64 (m, 2H) ; 2,18 (s, 3H) ; 3,38-3,48 (m, 2H) ; 3,83 (s, 3H) ; 6,33 (sl, 1H) ; 6,95 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H) ; 8,11 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H) ; 15,84 (s, 1H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) : δ : 13,6 ; 14,2 ; 22,8 ; 27,0 ; 29,0 ; 29,4 ; 29,7 ; 32,0 ; 41,1 ; 55,3 ; 102,4 ; 111,9 ; 113,8 ; 114,8 ; 122,6 ; 126,8 ; 152,6 ; 158,9 ; 161,1 ; 167,7 ; 168,8.

MS (ES, pos) : 444,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

184c *N*-dodécyl-2-(3-hydroxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)-2-(4-méthoxyphényl)acétamideFormule brute : C₂₆H₃₇N₀₅

Masse molaire (g/mol) : 443,58

R_f : 0,56 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 0,87 (t, J = 6,2 Hz, 3H) ; 1,23-1,26 (m, 20H) ; 1,42-1,47 (m, 2H) ; 1,83 (s, 3H) ; 3,25-3,31 (m, 2H) ; 3,84 (s, 3H) ; 6,02 (sl, 1H) ; 6,96 (d, J = 8,7 Hz, 2H) ; 7,17 (d, J = 8,6 Hz, 2H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ : 6,5 ; 14,2 ; 22,8 ; 26,8 ; 29,0 ; 29,2 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 32,0 ; 40,9 ; 55,5 ; 101,9 ; 114,8 ; 116,4 ; 123,9 ; 131,4 ; 152,8 ; 160,4 ; 163,1 ; 168,7 ; 169,4.

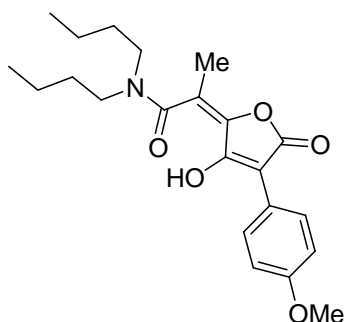
MS (ES, pos) : 444,4 [M+H]⁺

Procédure générale C: ouverture contrôlée par le TBAF de la dilactone 170 par une amine

La dilactone **170** (1 éq.) est mise en solution dans 1,5 mL de THF. Le milieu est refroidi à -35°C et le TBAF (1 M dans le THF, 2 éq.) est ajouté au goutte à goutte. Après 15 min d'agitation à -35°C, la solution est refroidie à -78°C. L'amine **182** (1,3 à 2,5 éq.) dans 1 mL de THF est alors ajoutée. Après 15 min à -78°C, la solution est laissée revenir à température ambiante. Après concentration, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice.

183a *N,N*-dibutyl-2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)propanamide

Le composé **183a** est préparé à partir de **170** (19,7 mg, 0,08 mmol, 1 éq.) et de dibutylamine **182a** (9,7 μL, 0,10 mmol, 1,3 éq.), suivant la procédure générale C. Après purification sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH : 95/5), l'amide **183a** (31,0 mg, 94%) est obtenu sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₂₂H₂₉N₀₅
Masse molaire (g/mol) : 387,47
Rf : 0,32 (DCM/Et₂O: 70/30, UV + vanilline)
Pf : 86-87°C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 0,94 (t, J = 7,1 Hz, 6H) ; 1,24-1,38 (m, 4H) ; 1,53-1,68 (m, 4H) ; 2,13 (s, 3H) ; 3,38 (t, J = 7,6 Hz, 4H) ; 3,82 (s, 3H) ; 6,93 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 8,04 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 11,30 (sl, 1H).

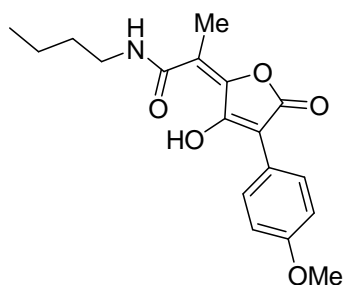
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 13,8 ; 16,2 ; 20,1 ; 29,9 ; 47,6 ; 55,3 ; 104,2 ; 113,9 ; 114,3 ; 122,1 ; 129,1 ; 148,6 ; 159,1 ; 159,2 ; 162,0 ; 167,2 ; 172,1.

IR : 2959, 2932, 2871, 2837, 1759, 1604, 1537, 1432, 1249, 1094, 1072, 827 cm⁻¹.

HRMS (ES) : Calculée pour C₂₂H₃₀N₀₅: 388,2118 [M+H]⁺
 Trouvée : 388,2144

183b N-butyl-2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanamide

Le composé **183b** est préparé à partir de **170** (23,6 mg, 0,09 mmol, 1 équ.) et de butylamine **182b** (23 μL, 0,22 mmol, 2,5 équ.), suivant la procédure générale C. Après purification sur gel de silice (éluant : DCM), l'amide **183b** (27,4 mg, 83%) est obtenu sous forme d'un solide orange.



Formule brute : C₁₈H₂₁N₀₅
Masse molaire (g/mol) : 331,36
Rf : 0,20 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)
Pf : 177-178°C

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 0,97 (t, J = 7,4 Hz, 3H) ; 1,25-1,65 (m, 4H) ; 2,18 (s, 3H) ; 3,40-3,50 (m, 2H) ; 3,83 (s, 3H) ; 6,32 (sl, 1H) ; 6,95 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 8,11 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 15,82 (s, 1H).

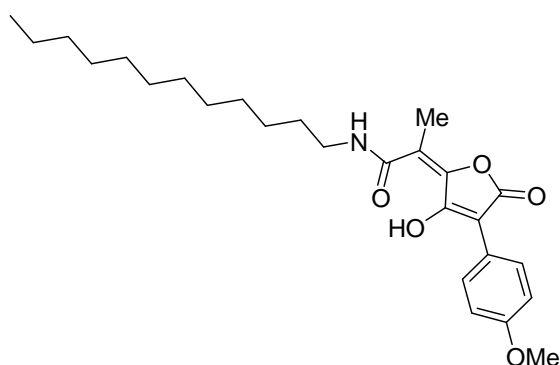
RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ : 13,7 ; 13,8 ; 20,2 ; 31,2 ; 40,8 ; 55,4 ; 102,8 ; 111,3 ; 113,9 ; 122,6 ; 128,9 ; 152,9 ; 159,1 ; 160,8 ; 167,5 ; 169,0.

IR : 3385, 2963, 2934, 2874, 2837, 1737, 1619, 1506, 1453, 1253, 1182, 772 cm^{-1} .

HRMS (ES) : Calculée pour $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_5$: 332,1466 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 Trouvée : 332,1480

183c *N*-dodécyl-2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)propanamide

Le composé **183c** est préparé à partir de **170** (23,5 mg, 0,09 mmol, 1 éq.) et de dodécylamine **182c** (53 μL , 0,23 mmol, 2,5 éq.), suivant la procédure générale C. Après purification sur gel de silice (éluant : DCM), l'amide **183c** (38,5 mg, 88%) est obtenu sous forme d'un solide orange.



Formule brute : $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_5$
Masse molaire (g/mol) : 443,58
Rf : 0,42 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)
Pf : 91-92°C

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 0,88 (t, $J = 6,1$ Hz, 3H) ; 1,26-1,32 (m, 20H) ; 1,58-1,64 (m, 2H) ; 2,18 (s, 3H) ; 3,38-3,48 (m, 2H) ; 3,83 (s, 3H) ; 6,33 (sl, 1H) ; 6,95 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H) ; 8,11 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H) ; 15,84 (s, 1H).

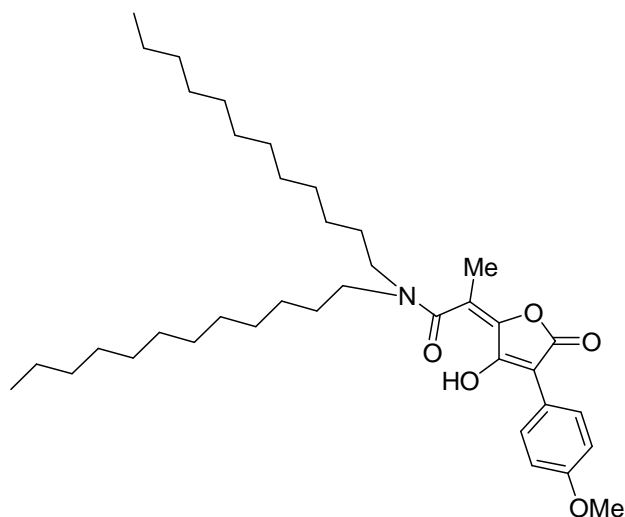
RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) : δ : 13,6 ; 14,2 ; 22,8 ; 27,0 ; 29,0 ; 29,4 ; 29,7 ; 32,0 ; 41,1 ; 55,3 ; 102,4 ; 111,9 ; 113,8 ; 114,8 ; 122,6 ; 126,8 ; 152,6 ; 158,9 ; 161,1 ; 167,7 ; 168,8.

IR : 3348, 2923, 2852, 1745, 1603, 1563, 1510, 1250, 1177, 1034, 834 cm^{-1} .

HRMS (ES) Calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{NO}_5$: 444,2744 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 Trouvée : 444,2733

183d *N,N*-didodécyl-2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)propanamide

Le composé **183d** est préparé à partir de **170** (20,2 mg, 0,08 mmol, 1 éq.) et de didodécylamine **182d** (70 mg, 0,19 mmol, 2,5 éq.), suivant la procédure générale C. Après purification sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH : 95/5), l'amide **183d** (38,2 mg, 80%) est obtenu sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : $C_{38}H_{61}NO_5$
Masse molaire (g/mol) : 611,89
Rf : 0,50 (Cy/AcOEt: 90/10, UV + vanilline)
Pf : 48-49°C

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ : 0,88 (t, $J = 6,0$ Hz, 6H) ; 1,24-1,29 (m, 36H) ; 1,60-1,62 (m, 4H) ; 2,17 (s, 3H) ; 3,38 (t, $J = 9,0$ Hz, 4H) ; 3,83 (s, 3H) ; 6,94 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H) ; 8,05 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H) ; 11,26 (sl, 1H).

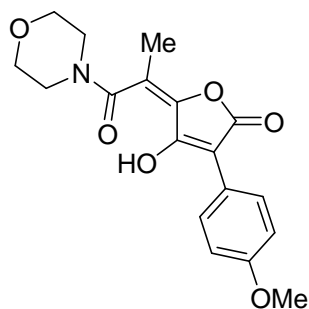
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ : 14,3 ; 16,3 ; 22,8 ; 26,9 ; 27,9 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,7 ; 29,8 ; 32,0 ; 47,9 ; 55,4 ; 104,2 ; 113,9 ; 114,3 ; 122,2 ; 129,1 ; 148,8 ; 159,1 ; 159,2 ; 167,2 ; 172,2.

IR : 2921, 2850, 1769, 1468, 1454, 1250, 1182, 1079, 828 cm^{-1} .

HRMS (ES) : Calculée pour $C_{38}H_{62}NO_5$: 612,4623 $[M+H]^+$
 Trouvée : 612,4631

183e 4-hydroxy-3-(4-méthoxyphényl)-5-(1-morpholino-1-oxopropan-2-ylidène)furan-2(5H)-one

Le composé **183e** est préparé à partir de **170** (25,5 mg, 0,10 mmol, 1 éq.) et de morpholine **182e** (22 μL , 0,25 mmol, 2,5 éq.), suivant la procédure générale C. Après évaporation, le milieu est repris par AcOEt et lavé deux fois avec une solution d'acide chlorhydrique 0,5 M. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Après purification sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH : 95/5), l'amide **183e** (32,9 mg, 96%) est obtenu sous forme d'un solide orange.



Formule brute : $C_{18}H_{19}NO_6$
Masse molaire (g/mol) : 345,35
Rf : 0,25 (DCM/MeOH : 90/10, UV + vanilline)
Pf : 134-135°C

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ : 2,16 (s, 3H) ; 3,63-3,67 (m, 4H) ; 3,74-3,77 (m, 4H) ; 3,83 (s, 3H) ; 6,94 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H) ; 8,05 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 16,3 ; 29,8 ; 46,2 ; 66,9 ; 104,6 ; 112,5 ; 114,0 ; 122,0 ; 129,2 ; 150,3 ; 158,9 ; 159,3 ; 167,0 ; 171,3.

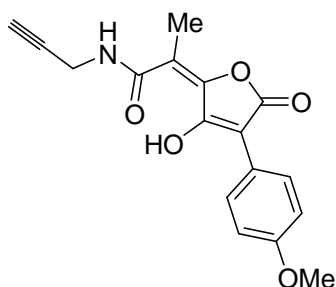
IR : 2919, 2851, 1757, 1634, 1558, 1436, 1246, 1105, 1026, 835 cm^{-1} .

MS (ES, pos) : 346,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

HRMS (ES, pos) : Calculée pour $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NO}_6$: 346,1285 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 Trouvée : 346,1291

183f 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)-N-(prop-2-ynyl)propanamide

Le composé **183f** est préparé à partir de **170** (32,4 mg, 0,12 mmol, 1 éq.) et d'amine propargylique **182f** (10 μL , 0,16 mmol, 1,3 éq.), suivant la procédure générale C. Après purification sur gel de silice (éluant : $\text{DCM}/\text{Et}_2\text{O}$: 80/20), l'amide **183f** (37,7 mg, 96%) est obtenu sous forme d'un solide orange.



Formule brute : $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5$
Masse molaire (g/mol) : 313,30
Rf : 0,56 ($\text{DCM}/\text{Et}_2\text{O}$: 80/20, UV+ vanilline)
Pf : 227-228°C

RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ : 2,12 (s, 3H) ; 3,77 (s, 3H) ; 4,09 (d, $J = 5,0$ Hz, 2H) ; 7,00 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H) ; 7,97 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H) ; 9,57 (sl, 1H).

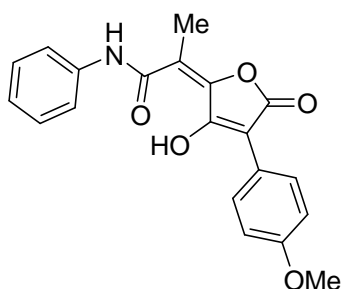
RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ : 13,5 ; 29,7 ; 55,1 ; 73,8 ; 79,1 ; 100,8 ; 113,3 ; 113,8 ; 122,2 ; 128,1 ; 151,3 ; 158,4 ; 160,9 ; 166,6 ; 168,5.

IR : 3405, 3249, 2967, 2921, 2847, 2565, 2533, 1747, 1603, 1494, 1249, 1182, 1025, 837 cm^{-1}

HRMS (ES) : Calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{NO}_5$: 312,0877 $[\text{M}-\text{H}]^-$
 Trouvée : 312,0868

183g 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)-N-phénylpropanamide

La dilactone **170** (32,0 mg, 0,12 mmol, 1 éq.) est mise en solution dans 1,5 mL de DCM. Une solution d'aniline **182g** (11,3 μ L, 0,12 mmol, 1 éq.) dans 1 mL de THF est ajoutée à -78°C. Après 15 min à -78°C, le milieu est laissé revenir à température ambiante. Après concentration, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/Et₂O : 90/10) pour donner l'amide **183g** (34,0 mg, 78%) sous forme d'un solide orange.



Formule brute : C₂₀H₁₇N₂O₅
Masse molaire (g/mol) : 351,35
Rf : 0,65 (DCM/Et₂O : 70/30, UV + vanilline)
Pf : 234-235°C

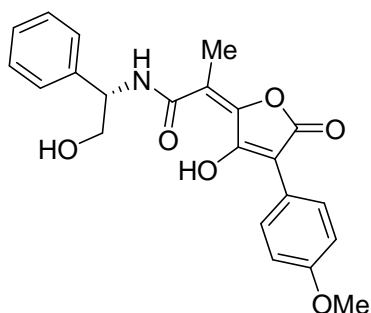
RMN ¹H (300 MHz, DMSO d₆) : δ : 2,27 (s, 3H) ; 3,77 (s, 3H) ; 6,99 (d, J = 8,5 Hz, 2H) ; 7,24 (m, 1H) ; 7,42 (m, 2H) ; 7,61 (d, J = 7,8 Hz, 2H) ; 7,98 (d, J = 8,5 Hz, 2H) ; 10,96 (sl, 1H).
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO d₆) : δ : 14,1 ; 55,1 ; 100,4 ; 113,8 ; 114,5 ; 122,6 ; 123,1 ; 125,7 ; 127,9 ; 128,7 ; 137,0 ; 151,1 ; 158,2 ; 161,9 ; 166,8 ; 167,3.

IR : 3394, 3953, 2919, 2837, 2523, 1745, 1595, 1430, 1167, 1109, 864 cm⁻¹.

HRMS (ES) : Calculée pour C₂₀H₁₈N₂O₅: 352,1179 [M+H]⁺
 Trouvée : 352,1169

183h (S)-N-(2-hydroxy-1-phényléthyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanamide

Le composé **183h** est préparé à partir de **170** (32,0 mg, 0,12 mmol, 1 éq.) et de (S)-(+)-phénylglycinol **182h** (21 mg, 0,16 mmol, 1,3 éq.), suivant la procédure générale C. Après purification sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH : 95/5), l'amide **183h** (45,1 mg, 92%) est obtenu sous forme d'un solide orange.



Formule brute : C₂₂H₂₁N₂O₆
Masse molaire (g/mol) : 395,40
Rf : 0,46 (DCM/MeOH : 95/5, UV + vanilline)
Pf : 155-156°C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,17 (s, 3H) ; 3,73 (s, 3H) ; 3,75-3,91 (m, 2H) ; 5,13-5,08 (m, 1H) ; 6,84 (d, J = 6,8 Hz, 2H) ; 7,18 -7,31 (m, 5H) ; 7,99 (d, J = 6,8 Hz, 2H).

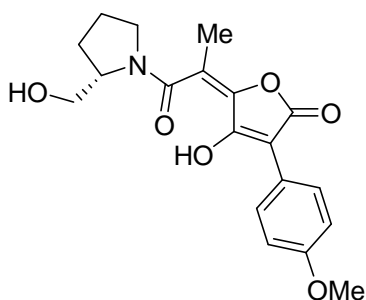
RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) : δ : 13,8 ; 55,4 ; 56,1 ; 65,3 ; 103,0 ; 111,5 ; 113,9 ; 122,4 ; 126,7 ; 128,4 ; 128,9 ; 129,2 ; 137,9 ; 153,1 ; 159,0 ; 160,5 ; 167,5 ; 168,9.

IR : 3480, 3354, 1737, 1619, 1278, 1025, 834 cm^{-1} .

HRMS (ES, pos) : Calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_6$: 396,1442 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 Trouvée : 396,1441

183i (S)-4-hydroxy-5-(1-(2-(hydroxyméthyl)pyrrolidin-1-yl)-1-oxopropan-2-ylidène)-3-(4-méthoxyphényl)furan-2(5H)-one

Le composé **183i** est préparé à partir de **170** (31,3 mg, 0,12 mmol, 1 éq.) et de (R)-(-)-pyrrolidinéméthanol **182i** (30 μL , 0,30 mmol, 2,5 éq.), suivant la procédure générale C. Après évaporation, le milieu est repris par AcOEt et lavé deux fois avec une solution d'acide chlorhydrique 0,5 M. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Après purification sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH : 95/5), l'amide **183i** (43,5 mg, 98%) est obtenu sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_6$
Masse molaire (g/mol) : 359,37
R_f : 0,38 (DCM/MeOH : 90/10, UV + vanilline)
Pf : 186-187°C

^1H NMR (300 MHz, acétone d_6) : δ : 1,75-1,81 (m, 2H) ; 1,95-1,99 (m, 5H) ; 3,26-3,56 (m, 3H) ; 3,73 (s, 3H) ; 4,01-4,21 (m, 2H) ; 6,80 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 8,24 (d, J = 9,0 Hz, 2H).

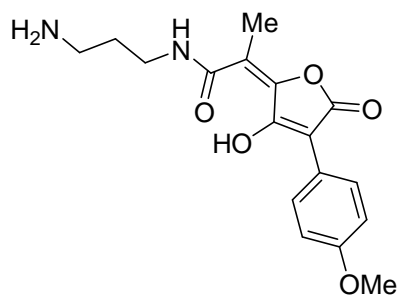
^{13}C NMR (75 MHz, acétone d_6) : δ : 14,2 ; 24,8 ; 28,1 ; 42,3 ; 53,3 ; 59,8 ; 63,3 ; 94,3 ; 109,6 ; 113,7 ; 127,1 ; 128,4 ; 147,8 ; 157,3 ; 171,2 ; 171,5 ; 173,0

IR : 2929, 1722, 1681, 1579, 1514, 1242, 1077, 835 cm^{-1} .

HRMS (ES, pos) : Calculée pour $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NO}_6$: 360,1442 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 Trouvée : 360,1448

187 N-(3-aminopropyl)-2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanamide

La dilactone **170** (89,1 mg, 0,34 mmol, 1 éq.) est mise en suspension dans 3 mL de DCM. Le 1,3-diaminopropane **185** (0,014 mL, 0,17 mmol, 0,5 éq.) est ajouté, provoquant la formation immédiate d'un précipité. Le milieu est laissé sous agitation durant 12h, puis le milieu est concentré. Après chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH : 100/0 à 80/20), l'amide **187** (36 mg, 64%) est obtenu sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₁₇H₂₀N₂O₅
Masse molaire (g/mol) : 332,35

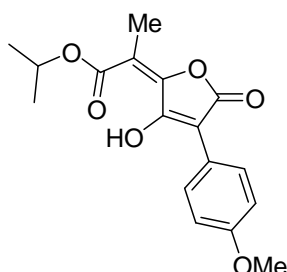
RMN ¹H (200 MHz, MeOD) : δ : 1,87-1,97 (m, 2H) ; 2,07 (s, 3H) ; 3,03 (t, J = 7,3 Hz, 2H) ; 3,42 (t, J = 6,1 Hz, 2H) ; 3,78 (s, 3H) ; 6,86 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 7,95 (d, J = 9,0 Hz, 2H).

MS (ES, pos) : 333,0 [M+H]⁺

Ouverture directe de la dilactone **170** par l'*isopropanol*

L'*isopropanol* **188a** (5 μ L, 0,073 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 1,5 mL de THF. La solution est refroidie à -78°C et le *n*-BuLi (1,4 M dans l'hexane, 0,05 mL, 0,073 mmol, 1 éq.) est ajouté. Le mélange est laissé remonter à -35°C et la dilactone **170** (18,8 mg, 0,073 mmol, 1 éq.) est ajoutée par portions en 1h. Après retour à température ambiante, la solution est hydrolysée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M. La phase aqueuse est extraite 2 fois à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 85/15 à 50/50). Le produit de type I **189a** (16 mg, 69%) est obtenu sous forme d'un solide jaune. Le produit de type II **190a** (2 mg, 9%) est obtenu sous forme d'un solide blanc.

189a 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)propanoate d'*isopropyle*



Formule brute : $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$

Masse molaire (g/mol) : 318,32

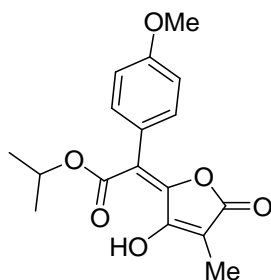
Rf : 0,62 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 1,38 (d, $J = 6,4$ Hz, 6H) ; 2,14 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 5,21 (spt, $J = 6,4$ Hz, 1H) ; 6,95 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H) ; 8,10 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H) ; 13,74 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 13,9 ; 21,7 ; 55,3 ; 72,0 ; 104,3 ; 112,1 ; 113,9 ; 122,1 ; 129,2 ; 154,2 ; 158,9 ; 159,3 ; 166,7 ; 171,2.

MS (ES, pos) : 319,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

190a 2-(3-hydroxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)2-(4-méthoxyphényl)acétate d'*isopropyle*



Formule brute : $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$

Masse molaire (g/mol) : 318,32

Rf : 0,28 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

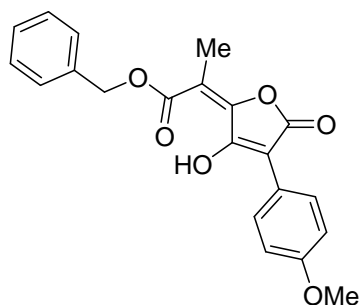
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 1,24 (d, $J = 6,4$ Hz, 6H) ; 1,87 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 5,18 (spt, $J = 6,4$ Hz, 1H) ; 6,89 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H) ; 8,10 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H) ; 13,03 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 6,6 ; 21,5 ; 55,4 ; 72,1 ; 103,9 ; 113,4 ; 115,6 ; 124,4 ; 131,6 ; 154,4 ; 159,6 ; 161,8 ; 168,4 ; 170,7.

Ouverture directe de la dilactone **170** par l'alcool benzylique

L'alcool benzylique **188b** (0,017 mL, 0,17 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 2 mL de THF. La solution est refroidie à -78°C et le $n\text{-BuLi}$ (1,6 M dans l'hexane, 0,1 mL, 0,17 mmol, 1 éq.) est ajouté. Le mélange est laissé remonter à -35°C et la dilactone **170** (44 mg, 0,17 mmol, 1 éq.) est ajoutée par portions en 1h. Après retour à température ambiante, la solution est hydrolysée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M. La phase aqueuse est extraite 2 fois à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 85/15 à 50/50). Le produit de type I **189b** (34 mg, 55%) est obtenu sous forme d'un solide jaune. Le produit de type II **189c** (7 mg, 11%) est obtenu sous forme d'un solide blanc.

189b 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de benzyle



Formule brute : $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_6$

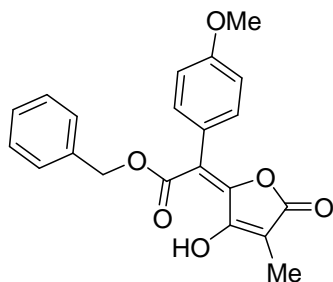
Masse molaire (g/mol) : 366,36

Rf : 0,74 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 2,17 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 5,34 (s, 2H) ; 6,95 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H) ; 7,41 (m, 5H) ; 8,11 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H) ; 13,49 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 14,0 ; 55,4 ; 69,1 ; 104,6 ; 111,4 ; 114,0 ; 121,9 ; 128,5 ; 128,9 ; 129,1 ; 129,2 ; 134,3 ; 154,6 ; 158,6 ; 159,4 ; 166,5 ; 171,5.

MS (ES, nég) : 365,4 $[\text{M-H}]^-$

189c 2-(3-hydroxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)2-(4-méthoxyphényl)acétate de benzyle


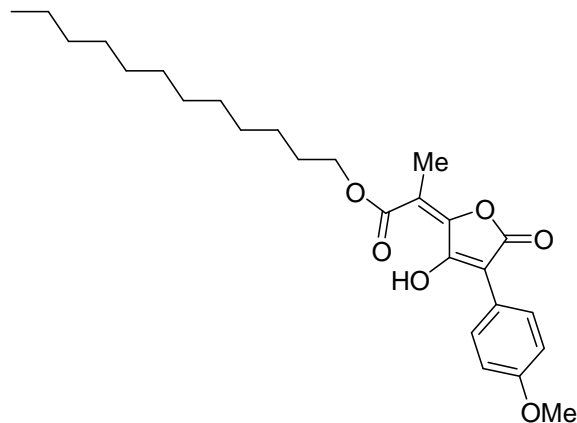
Formule brute : $C_{21}H_{18}O_6$
 Masse molaire (g/mol) : 366,36
 Rf : 0,26 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ : 1,88 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 5,29 (s, 2H) ; 6,89 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H) ; 7,13-7,36 (m, 7H) ; 12,78 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ : 6,6 ; 55,4 ; 68,9 ; 104,4 ; 113,6 ; 114,9 ; 124,2 ; 128,0 ; 128,8 ; 131,6 ; 134,5 ; 155,1 ; 159,7 ; 161,6 ; 168,2 ; 171,1.

Ouverture directe de la dilactone 170 par le dodécanol

Le dodécanol **188c** (0,031 mL, 0,14 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 2 mL de THF. La solution est refroidie à $-78^\circ C$ et le *n*-BuLi (1,6 M dans l'hexane, 0,08 mL, 0,14 mmol, 1 éq.) est ajouté. Le mélange est laissé remonter à $-35^\circ C$ et la dilactone **170** (36 mg, 0,14 mmol, 1 éq.) est ajoutée par portions en 1h. Après retour à température ambiante, la solution est hydrolysée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M. La phase aqueuse est extraite 2 fois à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10 à 70/30). Le produit de type I **189c** (21 mg, 34%) est obtenu sous forme d'un solide jaune. Le produit de type II **190c** (5 mg, 8%) est obtenu sous forme d'un solide blanc.

189c 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de dodécyle


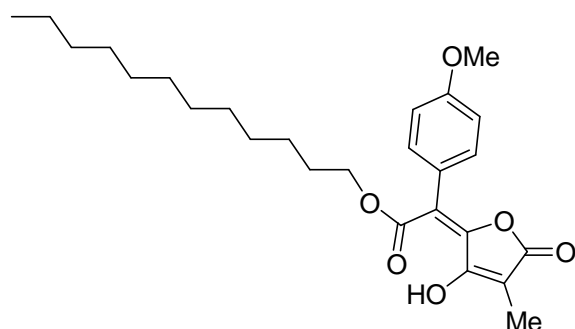
Formule brute : $C_{26}H_{36}O_6$
 Masse molaire (g/mol) : 444,56
 Rf : 0,87 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 0,89 (t, $J = 6,0$ Hz, 3H) ; 1,27-1,43 (m, 18H) ; 1,71-1,78 (m, 2H) ; 2,14 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 4,29 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H) ; 6,92 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H) ; 8,11 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H) ; 13,65 (s, 1H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) : δ : 13,9 ; 14,2 ; 22,8 ; 25,9 ; 28,3 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 32,0 ; 55,3 ; 67,8 ; 104,3 ; 111,6 ; 113,9 ; 122,0 ; 129,1 ; 154,2 ; 158,8 ; 159,3 ; 166,5 ; 171,7.

MS (ES, nég) : 443,3 $[\text{M}-\text{H}]^-$

190c 2-(3-hydroxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)2-(4-méthoxyphényl)acétate de dodécyle



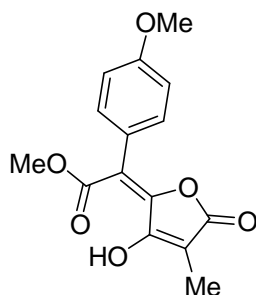
Formule brute : $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_6$
Masse molaire (g/mol) : 444,56
Rf : 0,68 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H) ; 1,22-1,25 (m, 18H) ; 1,53-1,59 (m, 2H) ; 1,88 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 4,29 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H) ; 6,89 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H) ; 7,15 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H) ; 12,96 (s, 1H).

Ouverture directe de la dilactone 170 par le méthanol

Une solution de dilactone **170** (35,4 mg, 0,14 mmol) dans 5 mL de MeOH est chauffée à reflux durant 12h. Après évaporation de l'excès de MeOH, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 80/20 à 70/30). Le produit de type I **162b** (21,9 mg, 54%) est obtenu sous forme d'un solide jaune. Le produit de type II **190d** (17,9 mg, 44%) est obtenu sous forme d'un solide blanc.

190d 2-(3-hydroxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)2-(4-méthoxyphényl)acétate de méthyle



Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$
Masse molaire (g/mol) : 290,27
Rf : 0,17 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

Procédure générale D: ouverture contrôlée par le TBAF* de la dilactone **170** par un alcool

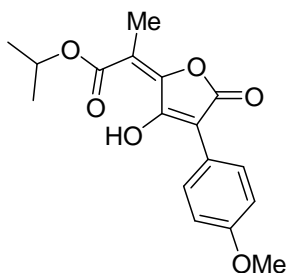
L'hexafluorobenzène est distillé sur CaH₂. Le cyanure de tétrabutylammonium est séché à 40°C pendant une nuit avant utilisation.

Le TBAF* est préparé comme suit¹⁰⁵: le TBACN (1 éq.) est dissout dans MeCN (1 mL/mmol TBACN). L'hexafluorobenzène (0,16 éq.) est ajouté et la solution est agitée 1h à température ambiante.

La dilactone **170** (1 éq.) est mise en solution dans 1,5 mL de THF. Le milieu est refroidi à -35°C et le TBAF* (1 M dans MeCN, 2 éq.) est ajouté au goutte à goutte. Après 15 min d'agitation à -35°C, la solution est refroidie à -78°C. L'alcool **188** (2,5 éq.) dans 1 mL de THF est alors ajouté. Après 15 min à -78°C, la solution est laissée revenir à température ambiante. Après concentration, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice.

189a 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate d'isopropyle

Le composé **189a** est préparé à partir de **170** (29,8 mg, 0,11 mmol, 1 éq.) et d'isopropanol **188a** (23 µL, 0,29 mmol, 2,5 éq.), suivant la procédure générale D. Après purification sur gel de silice (éluant : DCM), l'ester **189a** (25,5 mg, 69%) est obtenu sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₁₇H₁₈O₆

Masse molaire (g/mol) : 318,32

Rf : 0,62 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

Pf : 155-156°C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,38 (d, J = 6,4 Hz, 6H) ; 2,14 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 5,21 (spt, J = 6,4 Hz, 1H) ; 6,95 (d, J = 9,1 Hz, 2H) ; 8,10 (d, J = 9,1 Hz, 2H) ; 13,74 (s, 1H).

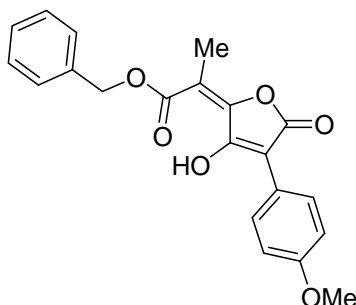
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 13,9 ; 21,7 ; 55,3 ; 72,0 ; 104,3 ; 112,1 ; 113,9 ; 122,1 ; 129,2 ; 154,2 ; 158,9 ; 159,3 ; 166,7 ; 171,2.

IR : 2957, 2399, 2350, 1783, 1767, 1601, 1296, 1250, 1074, 834 cm⁻¹.

HRMS (ES, pos) : Calculée pour C₁₇H₁₉O₆: 319,1149 [M+H]⁺
 Trouvée : 319,1167

189b 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de benzyle

Le composé **189b** est préparé à partir de **170** (27,3 mg, 0,10 mmol, 1 équ.) et d'alcool benzylique **188b** (28 µL, 0,26 mmol, 2,5 équ.), suivant la procédure générale D. Après purification sur gel de silice (éluant : DCM), l'ester **189b** (32,2 mg, 83%) est obtenu sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₂₁H₁₈O₆
Masse molaire (g/mol) : 366,36
Rf : 0,74 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)
Pf : 168-169°C

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,17 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 5,34 (s, 2H) ; 6,95 (d, J = 9,1 Hz, 2H) ; 7,41 (m, 5H) ; 8,11 (d, J = 9,1 Hz, 2H) ; 13,49 (s, 1H).

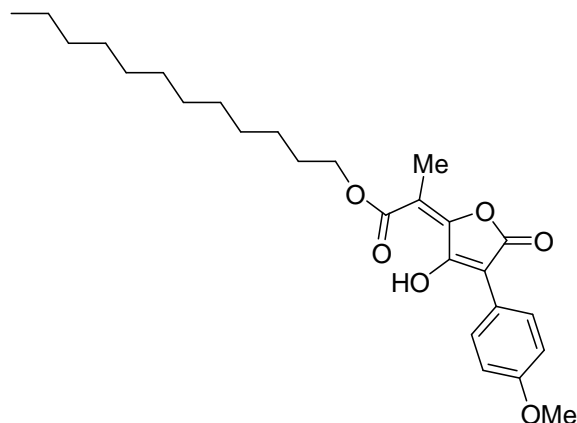
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 14,0 ; 55,4 ; 69,1 ; 104,6 ; 111,4 ; 114,0 ; 121,9 ; 128,5 ; 128,9 ; 129,1 ; 129,2 ; 134,3 ; 154,6 ; 158,6 ; 159,4 ; 166,5 ; 171,5.

IR : 3067, 2933, 2838, 2390, 2350, 2319, 1759, 1746, 1602, 1480, 1267, 1079, 693 cm⁻¹.

HRMS (ES, pos) : Calculée pour C₂₁H₁₉O₆ : 367,1176 [M+H]⁺
 Trouvée : 367,1170

189c 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de dodécyle

Le composé **189c** est préparé à partir de **170** (25,6 mg, 0,10 mmol, 1 équ.) et de dodécanol **188c** (56 µL, 0,25 mmol, 2,5 équ.), suivant la procédure générale D. Après purification sur gel de silice (éluant : DCM), l'ester **189c** (28,6 mg, 65%) est obtenu sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₂₆H₃₆O₆
Masse molaire (g/mol) : 444,56
Rf : 0,87 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)
Pf : 97-98°C

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 0,89 (t, $J = 6,0$ Hz, 3H) ; 1,27-1,43 (m, 18H) ; 1,71-1,78 (m, 2H) ; 2,14 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 4,29 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H) ; 6,92 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H) ; 8,11 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H) ; 13,65 (s, 1H).

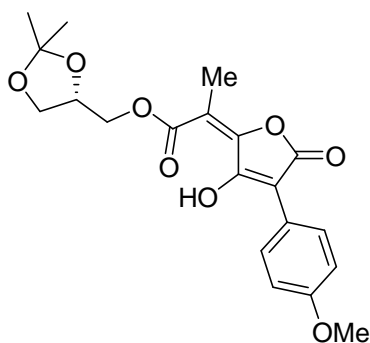
RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) : δ : 13,9 ; 14,2 ; 22,8 ; 25,9 ; 28,3 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 32,0 ; 55,3 ; 67,8 ; 104,3 ; 111,6 ; 113,9 ; 122,0 ; 129,1 ; 154,2 ; 158,8 ; 159,3 ; 166,5 ; 171,7.

IR : 2923, 2849, 1770, 1621, 1567, 1273, 1251, 1082, 846 cm^{-1} .

HRMS (ES, pos) : Calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_6$: 445,2585 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 Trouvée : 445,2563

189d (S)-(méthyl 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxo-furan-(2(5H)-ylidène) propanoate de 2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yle

Le composé **189d** est préparé à partir de **170** (31,2 mg, 0,12 mmol, 1 éq.) et de solketal **188d** (38 μL , 0,30 mmol, 2,5 éq.), suivant la procédure générale D. Après purification sur gel de silice (éluant : DCM), l'ester **189d** (27,2 mg, 58%) est obtenu sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_8$
Masse molaire (g/mol) : 390,38
Rf : 0,71 (DCM, UV + vanilline)
Pf : 123-124 $^{\circ}\text{C}$

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 1,38 (s, 3H) ; 1,45 (s, 3H) ; 2,19 (s, 3H) ; 3,81-3,88 (m, 4H) ; 4,10-4,18 (m, 1H) ; 4,35-4,44 (m, 3H) ; 6,95 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H) ; 8,10 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H) ; 13,32 (s, 1H).

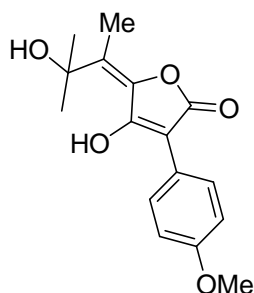
RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) : δ : 13,9 ; 25,3 ; 26,9 ; 55,4 ; 66,1 ; 67,2 ; 73,1 ; 104,9 ; 110,3 ; 111,0 ; 114,0 ; 121,9 ; 129,3 ; 154,8 ; 158,5 ; 159,5 ; 166,4 ; 171,6.

IR : 2975, 2932, 2851, 2397, 1760, 1623, 1605, 1309, 1248, 1080, 842 cm^{-1} .

HRMS (ES, pos) : Calculée pour $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_8$: 389,1242 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 Trouvée : 389,1251

193a 4-hydroxy-5-(3-hydroxy-3-méthylbutan-2-ylidène)-3-(4-méthoxyphényl) furan-2(5H)-one

La dilactone **170** (75,8 mg, 0,29 mmol, 1 éq.) est mise en suspension dans 2 mL de THF. La solution est refroidie à -78°C et une solution de MeLi (1,6 M dans l'éther, 0,27 mL, 0,44 mmol, 1,5 éq.) est ajouté lentement. Le milieu est agité 30 min à -78°C puis est laissé revenir à température ambiante. La réaction est hydrolysée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M et la phase aqueuse est extraite 2 fois à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 50/50) pour donner l'alcool **193a** (42 mg, 64%) sous forme d'un solide orange pâle.



Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_5$
Masse molaire (g/mol) : 290,31
Rf : 0,35 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

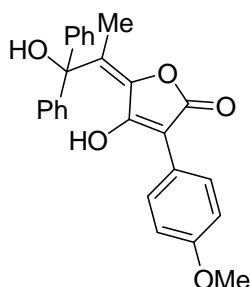
RMN ^1H (300 MHz, MeOD) : δ : 1,53 (s, 6H) ; 2,03 (s, 3H) ; 3,81 (s, 3H) ; 6,93 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H) ; 7,99 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (50 MHz, MeOD) : δ : 16,2 ; 29,1 ; 55,6 ; 75,3 ; 102,9 ; 114,5 ; 124,2 ; 126,6 ; 132,7 ; 140,9 ; 160,0 ; 162,0 ; 170,8.

MS (ES, pos) : 291,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

193b 4-hydroxy-5-(1-hydroxy-1,1-diphénylpropan-2-ylidène)-3-(4-méthoxyphényl) furan-2(5H)-one

La dilactone **170** (56,7 mg, 0,22 mmol, 1 éq.) est mise en suspension dans 3 mL de THF. La solution est refroidie à -78°C et une solution de PhLi (2 M dans Bu_2O , 0,11 mL, 0,22 mmol, 1 éq.) est ajouté lentement. Le milieu est agité 30 min à -78°C puis est laissé revenir à température ambiante. La réaction est hydrolysée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M et la phase aqueuse est extraite 2 fois à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 85/15 à 50/50) pour donner l'alcool **193b** (13 mg, 28%) sous forme d'une huile marron.



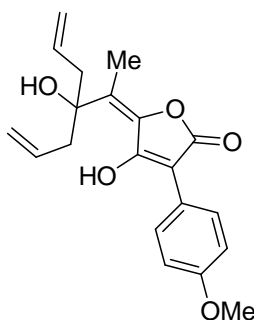
Formule brute : $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_5$
Masse molaire (g/mol) : 414,45
Rf : 0,35 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 1,80 (s, 3H) ; 3,79 (s, 3H), 6,87 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 7,31-7,41 (m, 10H) ; 7,97 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H).

MS (ES, pos) : 397 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$; 415 $[\text{M}+\text{H}]^+$

193c 5-(3-allyl-3-hydroxyhex-5-en-2-ylidène)-4-hydroxy-3-(4-méthoxyphényl) furan-2(5H)-one

La dilactone **170** (56,8 mg, 0,22 mmol, 1 éq.) est mise en suspension dans 3 mL de THF. La solution est refroidie à -78°C et une solution de chlorure d'allylmagnésium (2 M dans THF, 0,11 mL, 0,22 mmol, 1 éq.) est ajouté lentement. Le milieu est agité 30 min à -78°C puis est laissé revenir à température ambiante. La réaction est hydrolysée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M et la phase aqueuse est extraite 2 fois à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 85/15 à 50/50) pour donner l'alcool **193c** (10 mg, 26%) sous forme d'une huile marron.



Formule brute : $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_5$

Masse molaire (g/mol) : 342,39

Rf : 0,42 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

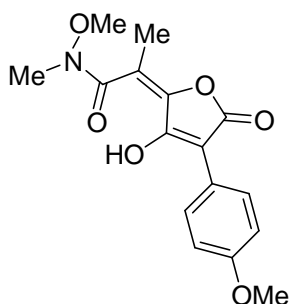
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 2,04 (s, 3H), 2,46 (dd, $J = 14,3$ Hz, $J = 6,4$ Hz, 2H) ; 2,69 (dd, $J = 14,3$ Hz, $J = 6,4$ Hz, 2H) ; 3,82 (s, 3H) ; 5,23-5,31 (m, 4H) ; 5,73-5,84 (m, 2H) ; 6,93 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H) ; 8,03 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H) ; 11,9 (sl, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 16,6 ; 44,4 ; 55,5 ; 78,8 ; 113,9 ; 122,0 ; 122,9 ; 125,8 ; 129,0 ; 131,3 ; 142,2 ; 158,8 ; 159,2 ; 168,4.

MS (ES, pos) : 343,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

195 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)-N-méthoxy-N-méthylpropanamide

La dilactone **170** (0,183 g, 0,71 mmol, 1 éq.) est mise en suspension dans 4 mL de DCM. Le chlorhydrate de la *N,O*-diméthylhydroxylamine **194** (0,069 g, 0,71 mmol, 1 éq.) et de la triéthylamine (0,1 mL, 0,71 mmol, 1 éq.) sont successivement ajoutés. Après 2h d'agitation à température ambiante, le milieu est hydrolysé par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M et la phase aqueuse est extraite 2 fois à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/MeOH : 100/0 à 90/10) pour donner l'amide de Weinreb **195** (0,204 g, 90%) sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₁₆H₁₇N₀₆
Masse molaire (g/mol) : 319,31
Rf : 0,20 (DCM, UV + ninhydrine)

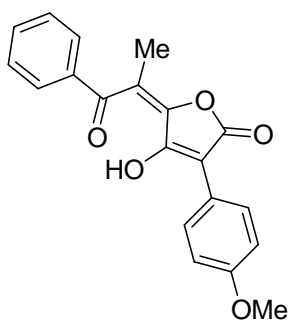
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 2,24 (s, 3H) ; 3,39 (s, 3H) ; 3,76 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 6,94 (d, J = 8,8 Hz, 2H) ; 8,07 (d, J = 8,8 Hz, 2H) ; 12,32 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 15,4 ; 34,0 ; 55,2 ; 62,0 ; 103,9 ; 113,5 ; 113,7 ; 122,0 ; 129,0 ; 151,0 ; 159,0 ; 166,9 ; 170,1.

MS (ES, nég) : 318,1 [M-H]⁻

191b 4-hydroxy-3-(4-méthoxyphényl)-5-(1-oxo-1-phénylpropan-2-ylidène)furan-2(5H)-one

L'amide de Weinreb **195** (50 mg, 0,15 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 3 mL de THF. La solution est refroidie à -78°C et une solution de PhLi (2 M dans Bu₂O, 0,16 mL, 0,31 mmol, 2 éq.) est ajoutée lentement. Le milieu est agité 30 min à -78°C puis est laissé revenir à température ambiante. La réaction est hydrolysée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M et la phase aqueuse est extraite 2 fois à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie préparative sur plaque de silice (éluant : Cy/AcOEt : 70/30) pour donner la cétone **191b** (6 mg, 12%) sous forme d'un solide rouge.



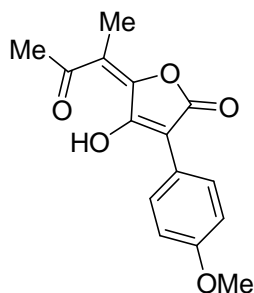
Formule brute : C₂₀H₁₆O₅
Masse molaire (g/mol) : 336,34
Rf : 0,35 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,29 (s, 3H) ; 3,85 (s, 3H) ; 6,97 (d, J = 9,1 Hz, 2H) ; 7,51-7,69 (m, 5H) ; 8,13 (d, J = 9,1 Hz, 2H) ; 12,93 (s, 1H).

MS (ES, pos) : 337,0 [M+H]⁺

191a 4-hydroxy-3-(4-méthoxyphényl)-5-(3-oxobutan-2-ylidène)furan-2(5H)-one

L'ester **162b** (52,8 mg, 0,18 mmol, 1 éq.) est dissout dans 2 mL de THF. La solution est refroidie à -78°C et une solution de MeLi (1,6 M dans l'éther, 0,22 mL, 0,36 mmol, 2 éq.) est ajoutée lentement. Le milieu est agité 30 min à -78°C puis est laissé revenir à température ambiante. La réaction est hydrolysée par ajout d'une solution aqueuse saturée en NH₄Cl et la phase aqueuse est extraite 2 fois à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie préparative sur plaque de silice (éluant : Cy/AcOEt : 80/20) pour donner la cétone **191a** (13 mg, 26%) sous forme d'un solide rouge et l'alcool **193a** (30 mg, 57%).



Formule brute : C₁₅H₁₄O₅

Masse molaire (g/mol) : 274,27

Rf : 0,68 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

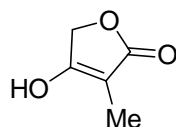
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 2,30 (s, 3H) ; 2,53 (s, 3H) ; 3,84 (s, 3H) ; 6,96 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 8,11 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 14,00 (s, 1H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : 15,7 ; 30,3 ; 55,4 ; 104,2 ; 114,0 ; 117,7 ; 122,0 ; 129,3 ; 155,4 ; 158,9 ; 159,5 ; 166,8 ; 206,3.

MS (ES, pos) : 275,0 [M+H]⁺

197 4-hydroxy-3-méthylfuran-2(5H)-one ¹¹⁰

Le 2-méthylacétoacétate de méthyle **194** (5,0 mL, 35,34 mmol, 1 éq.) est dissout dans 15 mL de CHCl₃. Le milieu est refroidi à 0°C et une solution de brome (1,92 mL, 37,46 mmol, 1,06 éq.) dans 5 mL de CHCl₃ est ajoutée. Après 1h d'agitation à température ambiante, le milieu est concentré. Le résidu est ensuite chauffé 2h à 130°C. Le solide qui se forme est lavé avec du cyclohexane, puis recristallisé dans le méthanol, pour donner le composé **197** (1,58 g, 39%) sous forme de cristaux blancs.

Formule brute : C₅H₆O₃

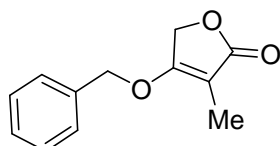
Masse molaire (g/mol) : 114,10

RMN ¹H (200 MHz, DMSO d₆) : δ : 1,57 (s, 3H) ; 4,56 (s, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO d₆) : δ : 6,0 ; 66,5 ; 94,5 ; 172,9 ; 175,3.

198 4-benzyloxy-3-méthylfuran-2(5H)-one

Le produit **197** (0,932 g, 8,17 mmol, 1 éq.) est mis en suspension dans 40 mL de THF. L'alcool benzylique (1,01 mL, 9,80 mmol, 1,2 éq.) et la triphénylphosphine (2,57 g, 9,80 mmol, 1,2 éq.) sont ajoutés successivement. La solution est ensuite refroidie à 0°C et le diazodicarboxylate d'isopropyle (1,94 mL, 9,80 mmol, 1,2 éq.) est ajouté lentement. La solution est agitée 12h à température ambiante puis le THF est évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM) pour fournir le produit protégé **198** (1,23 g, 74%) sous forme d'un solide beige.

Formule brute : C₁₂H₁₂O₃

Masse molaire (g/mol) : 204,22

Rf : 0,51 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

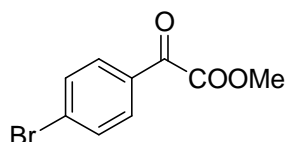
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 1,86 (s, 3H) ; 4,63 (s, 2H) ; 5,22 (s, 2H), 7,33-7,46 (m, 5H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 7,2 ; 65,9 ; 72,1 ; 99,3 ; 127,3 ; 128,8 ; 135,0 ; 171,5 ; 175,2.

MS (ES, pos) : 205,1 [M+H]⁺

36b 2-(4-bromophényl)-2-oxoacétate de méthyle ¹¹¹

Le 4-bromophénylacétate de méthyle **47c** (0,365 g, 1,59 mmol, 1 éq.) est mis en solution dans 12 mL de MeCN. La 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène (DBU, 0,17 mmol, 0,7 éq.) est ajoutée et la solution est agitée 15 min à température ambiante avant d'être refroidie à 0°C. L'azoture de *p*-acétamidobenzènesulfonyl (0,460 g, 1,91 mmol, 1,2 éq.) est alors ajouté et le milieu est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12h. Sont alors ajoutés successivement du benzène (12 mL), de l'acétone (8,3 mL), de l'eau (12 mL), de l'hydrogénocarbonate de sodium (5,12 g, 59,33 mmol, 37 éq.) et de l'oxone[®] (9,49 g, 15,42 mmol, 10 éq.). Le milieu est maintenu sous forte agitation pendant 30 min. Après ajout d'eau, le milieu est extrait 3 fois à l'éther. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Une purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10) fournit le cétoester **36b** (0,304 g, 79%) sous forme d'un solide blanc.

Formule brute : C₉H₇BrO₃

Masse molaire (g/mol) : 243,05

Rf : 0,39 (Cy/AcOEt : 90/10, UV + vanilline)

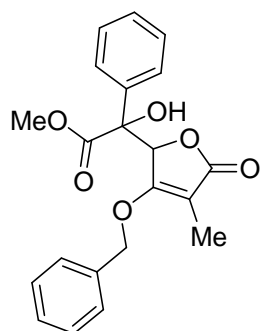
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 3,98 (s, 3H) ; 7,66 (d, J = 8,6 Hz, 2H) ; 7,91 (d, J = 8,6 Hz, 2H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ : 52,9 ; 130,5 ; 131,2 ; 131,4 ; 132,3 ; 163,3 ; 184,7.

GC-MS : tr = 7,3 min MS 260 ; 262 [M+NH₄]⁺

199a 2-(3-(benzyloxy)-4-méthyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-hydroxy-2-phényl acétate de méthyle

Une solution de DIPA (0,79 mL, 5,61 mmol, 1,5 éq.) dans 20 mL de THF est refroidie à -78°C, puis le *n*-BuLi (1,5 M dans l'hexane, 3,74 mL, 5,61 mmol, 1,5 éq.) est ajouté. La solution est agitée 20 min à -20°C avant d'être refroidie à -78°C. Le dérivé tétronique protégé **198** (0,764 g, 3,74 mmol, 1 éq.) dans 10 mL de THF est ajouté lentement. La solution est agitée 30 min à -78°C puis le formate de benzoyle (1,6 mL, 11,23 mmol, 3 éq.) est ajouté. Après 30 min d'agitation à -78°C, la solution est laissée revenir à température ambiante. Après ajout d'une solution aqueuse saturée en NH₄Cl, la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10 à AcOEt), l'alcool **199a** (0,950 g, 69%) est obtenu sous forme d'un mélange de formes diastéréomères (65/35 par intégration en RMN ¹H). Un isomère a pu être isolé et caractérisé.



Formule brute : C₂₁H₂₀O₆
Masse molaire (g/mol) : 368,38
Rf : 0,41 et 0,47 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

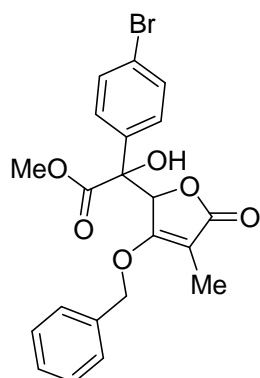
RMN ¹H (200 MHz, DMSO d₆) : δ : 1,94 (s, 3H) ; 3,29 (s, 3H) ; 5,47 (dd, J = 11,0 Hz, J = 4,2 Hz, 2H) ; 5,75 (s, 1H) ; 6,36 (s, 1H) ; 7,33-7,44 (m, 8H) ; 7,62 (d, J = 7,8 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO d₆) : δ : 8,5 ; 52,1 ; 72,9 ; 77,3 ; 80,1 ; 98,4 ; 126,1 ; 127,8 ; 128,0 ; 128,1 ; 128,3 ; 128,4 ; 135,7 ; 139,3 ; 169,5 ; 171,3 ; 174,1.

MS (ES, pos) : 391,0 [M+Na]⁺

199b 2-(3-(benzyloxy)-4-méthyl-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-(4-bromophényl)-2-hydroxyacétate de méthyle

Une solution de DIPA (0,23 mL, 1,66 mmol, 1,5 éq.) dans 10 mL de THF est refroidie à -78°C, puis le *n*-BuLi (1,5 M dans l'hexane, 1,23 mL, 1,66 mmol, 1,5 éq.) est ajouté. La solution est agitée 20 min à -20°C avant d'être refroidie à -78°C. Le dérivé tétronique protégé **198** (0,226 g, 1,11 mmol, 1 éq.) dans 3 mL de THF est ajouté lentement. La solution est agitée 30 min à -78°C puis le cétoester **36b** (0,807 mL, 11,23 mmol, 3 éq.) dans 3 mL de THF est ajouté. Après 30 min d'agitation à -78°C, la solution est laissée revenir à température ambiante. Après ajout d'une solution aqueuse saturée en NH₄Cl, la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10 à 50/50), l'alcool **199b** (0,329 g, 69%) est obtenu sous forme d'un mélange équimolaire de deux formes diastéréomères.



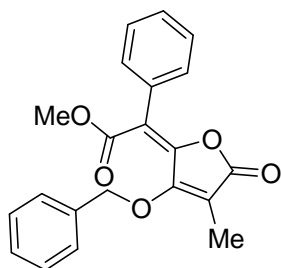
Formule brute : C₂₁H₁₉BrO₆
Masse molaire (g/mol) : 447,28
Rf : 0,50 et 0,60 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, 2 dia) : δ : 2,02 (s, 3H) ; 2,06 (s, 3H) ; 3,37 (s, 3H) ; 3,86 (s, 3H) ; 5,12 (s, 2H) ; 5,34 (s, 2H) ; 5,41 (s, 1H) ; 6,70 (s, 1H) ; 7,27-7,55 (m, 18H).

MS (ES, pos) : 447,1 ; 449,0 [M+H]⁺

200a 2-(3-(benzyloxy)-4-méthyl-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)-2-phénylacétate de méthyle

Suivant le mode opératoire de déshydratation décrit pour le composé **160**, la déshydratation de **199a** (0,356g, 0,89 mmol) fournit l'isomère *E* du composé **200a** (0,055 g, 18%) sous forme d'un solide beige.



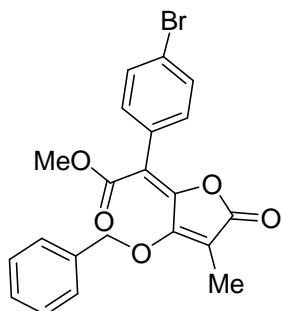
Formule brute : C₂₁H₁₈O₅
Masse molaire (g/mol) : 350,36
Rf : 0,67 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 2,14 (s, 3H) ; 3,29 (s, 3H) ; 5,40 (s, 2H) ; 7,32-7,60 (m, 10H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 9,3 ; 52,3 ; 74,4 ; 101,8 ; 115,4 ; 128,5 ; 128,8 ; 129,0 ; 129,2 ; 129,3 ; 131,3 ; 134,6 ; 141,4 ; 161,3 ; 166,8 ; 169,9.

200b 2-(3-(benzyloxy)-4-méthyl-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)-2-(4-bromo) phényl acétate de méthyle

Suivant le mode opératoire de déshydratation décrit pour le composé **160**, la déshydratation de **197b** (0,089g, 0,20 mmol) fournit le composé **200b** (0,038 g, 44%, *E/Z* : 75/25 par intégration en RMN ¹H) sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : C₂₁H₁₇BrO₅
Masse molaire (g/mol) : 429,26
Rf : 0,75 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

Isomère E :

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 2,14 (s, 3H) ; 3,27 (s, 3H) ; 5,40 (s, 2H) ; 7,31-7,38 (m, 2H) ; 7,42-7,52 (m, 8H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : 9,3 ; 52,4 ; 74,5 ; 102,2 ; 114,3 ; 123,6 ; 127,3 ; 128,7 ; 129,0 ; 129,2 ; 130,3 ; 131,1 ; 132,0 ; 141,9 ; 161,2 ; 166,5 ; 169,6.

MS (ES, pos) : 429 ; 431 [M+H]⁺

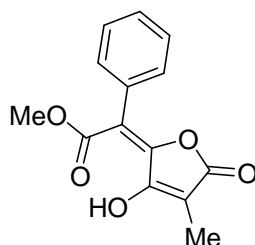
Isomère Z :

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 2,10 (s, 3H) ; 3,79 (s, 3H) ; 5,06 (s, 2H) ; 7,09-7,13 (m, 2H) ; 7,42-7,52 (m, 8H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : 9,4 ; 52,9 ; 74,1 ; 105,2 ; 114,5 ; 122,9 ; 128,5 ; 128,9 ; 129,0 ; 129,4 ; 130,5 ; 131,6 ; 134,6 ; 145,7 ; 161,9 ; 165,6 ; 168,9.

201a 2-(3-hydroxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)-2-phénylacétate de méthyle

Suivant le mode opératoire de d'hydrogénation catalytique décrit pour le composé **162b**, la déprotection du produit **200a** (0,121 g, 0,35 mmol) fournit, après chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM), le composé **201a** (0,046 g, 48%) sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_5$

Masse molaire (g/mol) : 260,24

Rf : 0,36 (DCM, UV + vanilline)

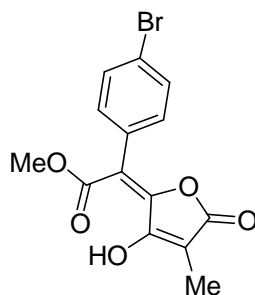
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 1,90 (s, 3H) ; 3,85 (s, 3H) ; 7,21-7,27 (m, 2H) ; 7,38-7,43 (m, 3H) ; 12,86 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 6,6 ; 54,3 ; 104,4 ; 114,8 ; 128,1 ; 128,5 ; 130,0 ; 132,0 ; 155,2 ; 161,5 ; 168,0 ; 171,4.

HRMS (ES, pos): Calculée pour $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_5$: 261,0757 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 Trouvée : 261,0753

201b 2-(4-bromophényl)-2-(3-hydroxy-4-méthyl-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)acétate de méthyle

Suivant le mode opératoire de d'hydrogénation catalytique décrit pour le composé **162b**, la déprotection du produit **200b** (0,035 g, 0,08 mmol) fournit, après chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM), le composé **201b** (0,018 g, 66%) sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrO}_5$

Masse molaire (g/mol) : 339,14

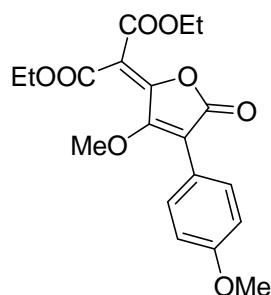
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 1,89 (s, 3H) ; 3,85 (s, 3H) ; 7,09 (d, J = 8,6 Hz ; 2H) ; 7,52 (d, J = 8,6 Hz ; 2H) ; 12,79 (s, 1H).

MS (ES, pos) : 339,0 ; 341,0 [M+H]⁺

205 2-(3-méthoxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)malonate de diéthyle

Une solution de *n*-BuLi (1,5 M dans l'hexane, 2,52 mL, 3,58 mmol, 1,5 éq.) dans 15 mL de THF est refroidie à -78°C. L'acide tétronique protégé **174** (0,555 g, 2,52 mmol, 1 éq.) dans 5 mL de THF est ajouté lentement. La solution est agitée 30 min à -78°C puis le cétomalonate de diéthyle **203** (1,15 mL, 7,57 mmol, 3 éq.) dans 5 mL de THF est ajouté. Après 30 min d'agitation à -78°C, la solution est laissée revenir à température ambiante. Après ajout d'une solution aqueuse saturée en NH₄Cl, la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée.

L'huile obtenue est solubilisée dans 20 mL de DCM. A cette solution refroidie à 0°C sont ajoutés successivement la triéthylamine (2,10 mL, 15,12 mmol, 6 éq.), le DMAP (0,01g, 0,36 mmol, 0,1 éq.) et lentement le TFAA (1,07 mL, 7,56 mmol, 3 éq.) dans 5 mL de DCM. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le milieu est hydrolysé par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M. La phase aqueuse est extraite au DCM. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/Et₂O : 100/0 à 90/10). Le produit **205** (0,610 g, 64%) est obtenu sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₁₉H₂₀O₈

Masse molaire (g/mol) : 376,35

R_f : 0,60 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

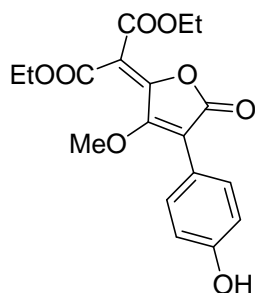
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,35 (q, J = 7,2 Hz, 2H) ; 3,76 (s, 3H) ; 3,84 (s, 3H) ; 4,33 (qd, J = 7,2 Hz, J = 2,8 Hz, 4H) ; 6,96 (d, J = 8,7 Hz, 2H) ; 7,47 (d, J = 8,7 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 14,1 ; 14,2 ; 55,4 ; 61,0 ; 62,0 ; 62,3 ; 107,2 ; 111,1 ; 114,2 ; 119,5 ; 131,3 ; 160,7 ; 161,1 ; 161,4 ; 163,4 ; 166,7.

MS (ES, pos) : 415,1 [M+K]⁺

207 2-(4-(4-méthoxyphényl)-3-méthoxy-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)malonate de diéthyle

Suivant la procédure générale B décrite pour le composé **162**, le traitement de **205** (26 mg, 0,07 mmol, 1 éq.) par BBr₃ donne le produit déprotégé **207** (15 mg, 61%) sous forme d'un solide jaune pâle.



Formule brute : C₁₈H₁₈O₈
Masse molaire (g/mol) : 362,33
Rf : 0,29 (Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

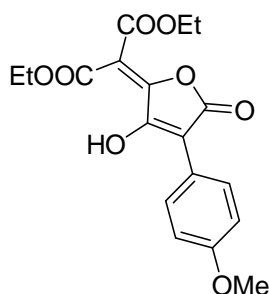
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 1,31 (q, J = 7,1 Hz, 2H) ; 3,75 (s, 3H) ; 4,33 (qd, J = 7,1 Hz, J = 2,6 Hz, 4H) ; 5,57 (sl, 1H) ; 6,90 (d, J = 8,6 Hz, 2H) ; 7,40 (d, J = 8,6 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 14,2 ; 61,1 ; 62,2 ; 62,4 ; 114,8 ; 115,8 ; 119,6 ; 149,3 ; 151,1 ; 155,4 ; 157,1 ; 168,7.

206 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)malonate de diéthyle

Une solution de *n*-BuLi (1,45 M dans l'hexane, 2,21 mL, 3,21 mmol, 3 équ.) dans 10 mL de THF est refroidie à -78°C. L'acide tétronique **173** (0,221 g, 1,07 mmol, 1 équ.) est ajouté par portions. La solution est agitée 1h à -78°C puis le cétomalonate de diéthyle **203** (0,49 mL, 3,21 mmol, 3 équ.) est ajouté. Après 30 min d'agitation à -78°C, la solution est laissée revenir à température ambiante et agitée 12h. Après ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M, la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée.

Le solide obtenu est mis en suspension dans 15 mL de DCM. A cette solution refroidie à 0°C est ajouté le TFAA (0,23 mL, 1,61 mmol, 2,1 équ.). Le milieu, devenu homogène, est agité 15 min puis la pyridine (0,43 mL, 5,37 mmol, 7 équ.) est ajoutée. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le milieu est hydrolysé par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M. La phase aqueuse est extraite au DCM. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : DCM/Et₂O : 100/0 à 90/10). Le produit attendu **206** (0,103 g, 27%) est obtenu sous forme d'un solide orange.



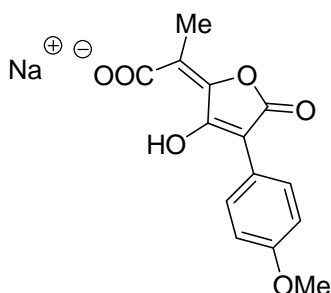
Formule brute : C₁₈H₁₈O₈
Masse molaire (g/mol) : 362,33
Rf : 0,31 (DCM/Et₂O : 50/50, UV + vanilline)

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 1,37 (q, J = 7,2 Hz, 2H) ; 3,84 (s, 3H) ; 4,42 (qd, J = 7,2 Hz, J = 2,7 Hz, 4H) ; 6,96 (d, J = 6,9 Hz, 2H) ; 8,11 (d, J = 6,9 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 13,9 ; 14,1 ; 55,4 ; 62,8 ; 64,4 ; 106,3 ; 108,8 ; 114,1 ; 121,2 ; 129,6 ; 156,2 ; 157,7 ; 160,0 ; 161,8 ; 165,2 ; 168,3.

210 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanate de sodium

L'acide **177** (66,8 mg, 0,24 mmol, 1 éq.) est dissout dans 6,5 mL d'acétone. Une solution d'hydroxyde de sodium (9,7 mg, 0,24 mmol, 1 éq.) dans 1 mL d'eau est ajoutée et le milieu est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12h. Après concentration, le résidu est lyophilisé pendant 24h, pour donner le sel **210** (71,5 mg, quantitatif) sous forme d'un solide orange.



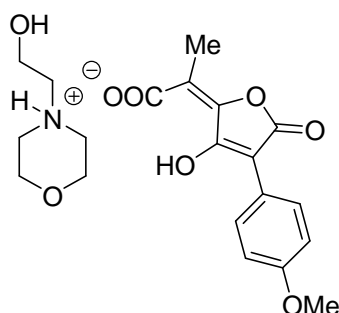
Formule brute : $C_{14}H_{11}NaO_6$
Masse molaire (g/mol) : 298,22

RMN 1H (200 MHz, DMSO d_6) : δ : 1,92 (s, 3H) ; 3,74 (s, 3H) ; 6,89 (d, J = 8,8 Hz, 2H) ; 8,07 (d, J = 8,8 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO d_6) : δ : 14,8 ; 54,9 ; 112,8 ; 123,3 ; 125,4 ; 126,3 ; 152,3 ; 156,6 ; 167,6 ; 168,7 ; 169,7.

211 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanate de N-(2-hydroxyéthyl)morpholinium

L'acide **177** (75,7 mg, 0,27 mmol, 1 éq.) est dissout dans 8 mL d'acétone. Une solution de N-(2-hydroxyéthyl)morpholine (33,0 mg, 0,27 mmol, 1 éq.) dans 1 mL d'eau est ajoutée et le milieu est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12h. Après concentration, le résidu est lyophilisé pendant 24h, pour donner le sel **211** (108 mg, quantitatif) sous forme d'un solide orange.



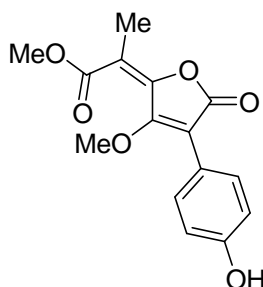
Formule brute : $C_{20}H_{25}NO_8$
Masse molaire (g/mol) : 407,41

RMN 1H (200 MHz, DMSO d_6) : δ : 1,92 (s, 3H) ; 3,10-3,21 (m, 4H) ; 3,37-3,44 (m, 2H) ; 3,64-3,74 (m, 7H) ; 3,91-3,98 (m, 2H) ; 6,89 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 8,07 (d, J = 9,0 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO d_6) : δ : 14,7 ; 51,3 ; 54,4 ; 54,9 ; 57,8 ; 63,0 ; 94,1 ; 112,8 ; 113,3 ; 125,4 ; 126,3 ; 152,3 ; 156,6 ; 167,6 ; 168,6 ; 169,6.

213 2-(4-(4-hydroxyphényl)-3-méthoxy-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

Suivant la procédure générale A décrite pour le composé **161**, la réaction de couplage entre le dérivé iodé **92** (0,147 g, 0,45 mmol, 1 éq.) et l'acide 4-hydroxyphénylboronique **212** (0,075 g, 0,54 mmol, 1,2 éq.), en utilisant 7 mol% de *cat*, permet d'obtenir, après purification sur gel de silice (éluant : Cy/ACOEt : 80/20 à 50/50), le composé **213** (0,074 g, 42%) sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₁₅H₁₄O₆
Masse molaire (g/mol) : 290,27
Rf : 0,29 (Cy/AcOEt : 60/40, UV + vanilline)

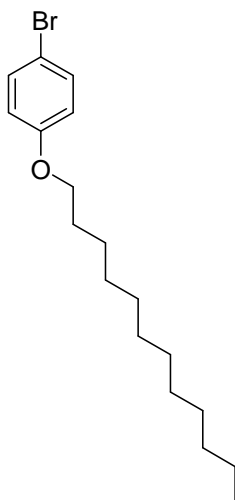
RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 2,14 (s, 3H) ; 3,71 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 5,18 (s, 1H) ; 6,81-6,85 (d, J = 8,6 Hz, 2H) ; 7,28-7,33 (d, J = 8,6 Hz, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 15,3 ; 46,0 ; 52,9 ; 61,2 ; 91,3 ; 108,9 ; 113,6 ; 115,9 ; 120,3 ; 131,6 ; 143,3 ; 157,1 ; 161,3 ; 168,8.

217 1-bromo-4-(dodécyloxy)benzène

Le 4-bromophénol **216** (3 g, 17,34 mmol, 1 éq.) est dissout dans 50 mL d'EtOH. Le bromure de dodécyle **213** (4,99 mL, 20,80 mmol, 1,2 éq.) et l'hydroxyde de potassium sont ajoutés successivement, et le milieu est chauffé à reflux pendant 12h. Après retour à température ambiante, une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ est ajoutée et la phase aqueuse est extraite à l'AcOEt. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy) pour donner le composé **217** (3,58 g, 60%) sous forme d'un liquide incolore.

Les données spectrales sont en accord avec celles de la littérature.¹⁴⁰



Formule brute : C₁₈H₂₉BrO
Masse molaire (g/mol) : 341,33
Rf : 0,65 (Cy, UV + vanilline)

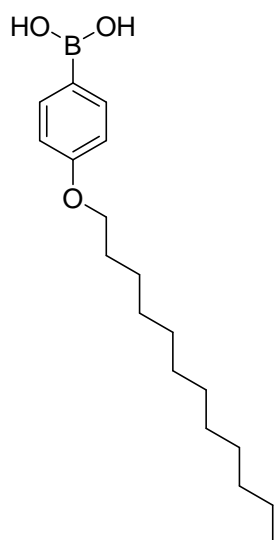
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H) ; 1,26-1,42 (m, 18H) ; 1,73-1,79 (m, 2H) ; 3,91 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H) ; 6,77 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H) ; 7,35 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H).

GC-MS : tr = 10,7 min

MS 340 ; 342 $[\text{M}]^+$

218 Acide 4-(dodécyloxy)phénylboronique

Le composé **217** (1,5 g, 4,39 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 80 mL de THF. La solution est refroidie à -78°C et le *t*-BuLi (1,5 M dans l'hexane, 4,1 mL, 6,14 mmol, 1,4 éq.) est ajouté. La solution est agitée 2h à -78°C , puis le tri-*isopropyl*borate (2,03 mL, 8,78 mmol, 2 éq.) est ajouté dans 10 mL de THF. Le milieu est agité 12h à température ambiante, puis 60 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M est ajouté. Après 2h d'agitation à température ambiante, 100 mL d'éther sont ajoutés. Après 30 min, le produit est extrait 3 fois à l'éther. Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 50/50) pour donner l'acide boronique **218** (0,659 g, 49%) sous forme d'un solide blanc.



Formule brute : $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{BO}_3$

Masse molaire (g/mol) : 306,25

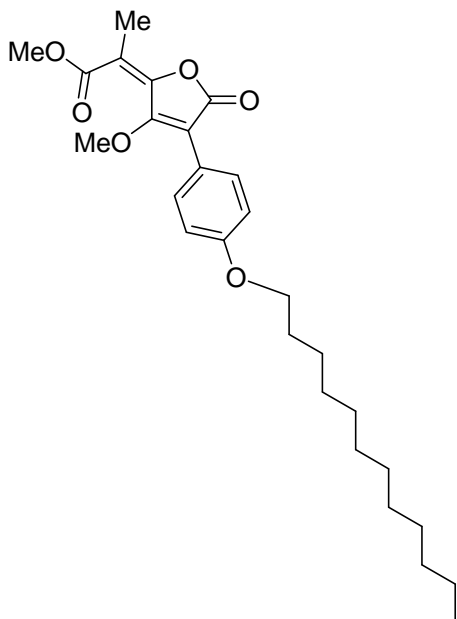
Rf : 0,31(Cy/AcOEt : 50/50, UV + vanilline)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 0,92 (t, $J = 5,0$ Hz, 3H) ; 1,31-1,51 (m, 18H) ; 1,81-1,86 (m, 2H) ; 4,03 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H) ; 7,00 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H) ; 8,15 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 14,5 ; 23,0 ; 26,4 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 ; 29,9 ; 30,0 ; 32,3 ; 68,2 ; 114,3 ; 122,4 ; 137,8 ; 163,1.

215 2-(4-(4-(dodécyloxy)phényl)-3-méthoxy-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

Suivant la procédure générale A décrite pour le composé **161**, la réaction de couplage entre le dérivé iodé **92** (0,212 g, 0,65 mmol, 1 éq.) et l'acide boronique **218** (0,254 g, 0,83 mmol, 1,2 éq.), en utilisant 1,4 mol% de *cat*, permet d'obtenir, après purification sur gel de silice (éluant : Cy/ACOEt : 90/10 à 80/20), le composé **215** (0,108 g, 36%) sous forme d'un solide jaune.



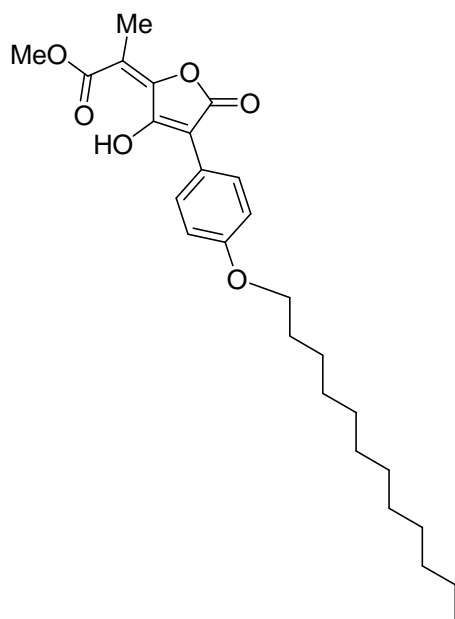
Formule brute : C₂₇H₃₈O₆
Masse molaire (g/mol) : 458,59
Rf : 0,77 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 0,87 (t, J = 5,8 Hz, 3H) ; 1,26-1,31 (m, 18H) ; 1,74-1,81 (m, 2H) ; 2,14 (s, 3H) ; 3,72 (s, 3H) ; 3,81 (s, 3H) ; 3,96 (t, J = 6,6 Hz, 2H) ; 6,92 (d, J = 8,7 Hz, 2H) ; 7,40 (d, J = 8,7 Hz, 2H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ : 14,4 ; 15,2 ; 23,0 ; 26,3 ; 29,5 ; 29,7 ; 29,9 ; 32,2 ; 52,8 ; 61,1 ; 68,4 ; 109,3 ; 113,3 ; 114,8 ; 115,9 ; 116,3 ; 120,6 ; 131,4 ; 143,4 ; 159,9 ; 161,2 ; 168,2 ; 168,7.

219 2-(4-(4-(dodécyloxy)phényl)-3-hydroxy-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)propanoate de méthyle

Suivant la procédure générale B décrit pour le composé **162**, le traitement de **215** (0,138 g, 0,30 mmol) par BBr₃ permet d'obtenir, après purification sur gel de silice (éluant : Cy/ACOEt : 90/10 à 80/20), le composé **219** (0,050 g, 37%) sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : C₂₆H₃₆O₆
Masse molaire (g/mol) : 444,56
Rf : 0,68 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ : 0,85-0,88 (m, 3H) ; 1,26-1,54 (m, 18H) ; 1,75-1,82 (m, 2H) ; 2,15 (s, 3H) ; 3,94-4,01 (m, 5H) ; 6,94 (d, J = 9,1 Hz, 2H) ; 8,08 (d, J = 9,1 Hz, 2H) ; 13,49 (s, 1H).

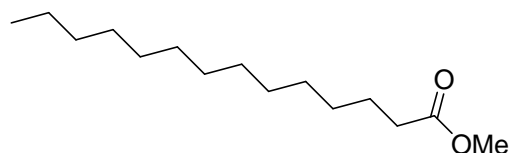
RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) : δ : 14,1 ; 14,5 ; 23,0 ; 26,4 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,9 ; 32,2 ; 54,4 ; 68,3 ; 104,8 ; 111,4 ; 114,7 ; 121,9 ; 129,4 ; 154,6 ; 158,7 ; 159,2 ; 166,7 ; 172,3.

MS (ES, pos) : 445,2 [M+H]⁺

221 Tétradécanoate de méthyle

L'acide tétradécanoïque **220** (5 g, 21,89 mmol) est mis en suspension dans 10 mL de MeOH. L'acide sulfurique (0,5 mL) est ajouté, la solution devient homogène et elle est chauffée à reflux pendant 12h. Après retour à température ambiante et concentration, le milieu est repris dans de l'éther. La phase organique est lavée 2 fois par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃, séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. L'ester **221** (5,41 g, quantitatif) est obtenu sous forme d'un liquide légèrement jaune.

Les données spectrales sont en accord avec celles de la littérature.¹⁴¹



Formule brute : C₁₅H₃₀O₂
Masse molaire (g/mol) : 242,40
Rf : 0,8 (DCM, DCIP)

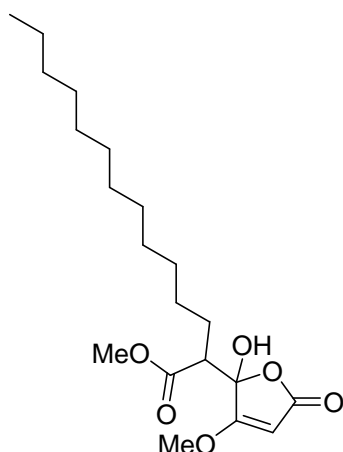
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 0,88 (t, J = 10,1 Hz, 3H) ; 1,18-1,27 (m, 20H) ; 1,59-1,64 (m, 2H) ; 2,30 (t, J = 7,5 Hz, 2H) ; 3,66 (s, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 14,1 ; 22,8 ; 25,1 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,6 ; 29,8 ; 32,1 ; 34,1 ; 51,3 ; 174,0.

GC-MS : tr = 7,8 min MS 260 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

222 2-(2-hydroxy-3-méthoxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)tétradécanoate de méthyle

Une solution de DIPA (1,27 mL, 9,08 mmol, 1,1 éq.) dans 60 mL de THF est refroidie à -78°C , puis le *n*-BuLi (1,5 M dans l'hexane, 6,05 mL, 9,08 mmol, 1,1 éq.) est ajouté. La solution est agitée 20 min à -20°C avant d'être refroidie à -78°C . L'ester **221** (1,268 g, 9,90 mmol, 1,2 éq.) dans 8 mL de THF est ajouté goutte à goutte. Après 45 min d'agitation à -78°C , le chlorure de zinc (1 M dans l'éther, 8,26 mL, 8,26 mmol, 1 éq.) puis l'anhydride méthoxymaléique (2,0 g, 8,26 mmol, 1 éq.) dans 2 mL de THF sont ajoutés. Après 30 min d'agitation, le milieu est laissé revenir à température ambiante et laissé sous agitation 2h. Après ajout d'une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium, la phase aqueuse est extraite 2 fois à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. L'alcool obtenu **222** (2,68 g) est engagé sans purification supplémentaire pour l'étape suivante.



Formule brute : $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_6$

Masse molaire (g/mol) : 370,48

Rf : 0,55 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 0,79 (t, J = 10,1 Hz, 3H) ; 1,17-1,20 (m, 20H) ; 1,59-1,70 (m, 2H) ; 2,83 (m, 1H) ; 3,64 (s, 3H) ; 3,84 (s, 3H) ; 5,02 (s, 1H) ; 6,02 (s, 1H).

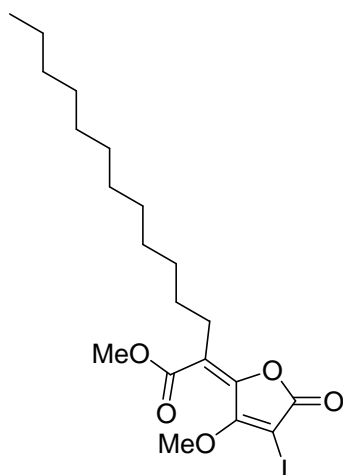
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 14,2 ; 22,8 ; 26,6 ; 27,6 ; 29,5 ; 29,7 ; 29,8 ; 32,0 ; 51,2 ; 52,4 ; 60,1 ; 89,8 ; 102,7 ; 170,7 ; 173,2 ; 178,9.

224 2-(4-iodo-3-méthoxy-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)tétradécanoate de méthyle

L'alcool **222** (2,68 g) est dissout dans 80 mL de DCM. La solution est refroidie à 0°C et la triéthylamine (6,03 mL, 43,51 mmol, 6 éq.), le DMAP (0,088g, 0,72 mmol, 0,1 éq.) et une solution de TFAA (3,07 mL, 21,76 mmol, 3 éq.) dans 15 mL de DCM sont ajoutés successivement. Après 12h d'agitation à température ambiante, le milieu est hydrolysé par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M. Après extraction, la phase aqueuse est extraite au DCM. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et

concentrées. Après une rapide filtration sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 70/30), le résidu est concentré.

Le résidu **223** est ensuite solubilisé dans 150 mL de MeCN, puis sont ajoutés successivement l'iode (5,12 g, 20,13 mmol, 2,8 équ.) et le CAN (1,07 g, 20,13 mmol, 2,8 équ.). La solution est chauffée à 40°C durant 3h. Après ajout d'une solution aqueuse saturée en thiosulfate de sodium, la phase aqueuse est extraite 3 fois à l'AcOEt. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée en thiosulfate de sodium, de la saumure, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10 à 80/20) et le produit iodé **224** (1,403 g, 36% sur les 3 étapes, *E/Z* : 90/10 par intégration en RMN ¹H) est obtenu sous forme d'un solide légèrement jaune.



Formule brute : C₂₀H₃₁IO₅
Masse molaire (g/mol) : 478,36
R_f : 0,65 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

Isomère E :

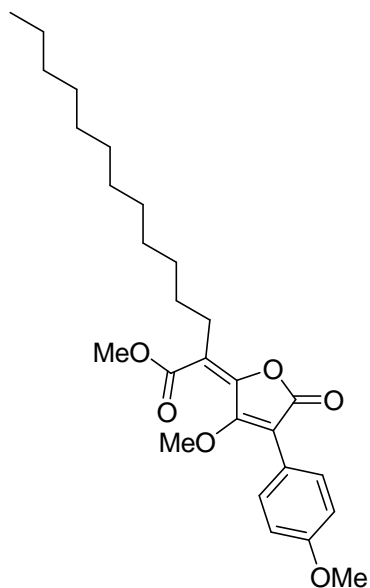
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ : 0,87 (t, J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,24-1,54 (m, 20H) ; 2,47 (t, J = 7,1 Hz, 2H) ; 3,79 (s, 3H) ; 4,35 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ : 14,2 ; 22,8 ; 27,6 ; 29,2 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 32,0 ; 51,9 ; 52,5 ; 60,5 ; 118,8 ; 143,5 ; 165,8 ; 166,9 ; 167,4.

GC-MS : tr = 12,7 min MS 479 [M+H]⁺

225 2-(3-méthoxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5*H*)-ylidène)tétradécanoate de méthyle

Suivant la procédure générale A décrite pour le composé **161**, la réaction de couplage entre le dérivé iodé **224** (0,288 g, 0,60 mmol, 1 équ.) et l'acide 4-méthoxyphénylboronique (0,109 g, 0,72 mmol, 1,2 équ.), permet d'obtenir, après purification sur gel de silice (éluant : Cy/ACOEt : 90/10 à 80/20), le composé **225** (0,148 g, 54%) sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : $C_{27}H_{38}O_6$
Masse molaire (g/mol) : 458,59
Rf : 0,70 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

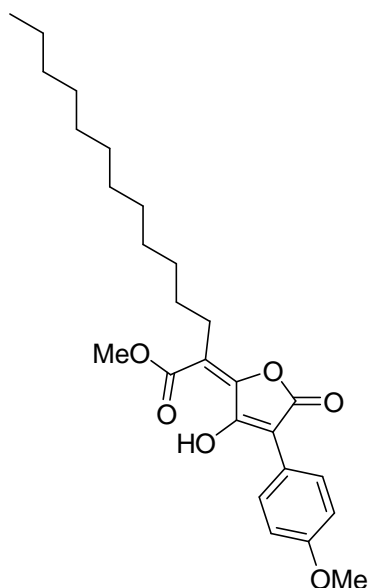
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ : 0,88 (m, 3H) ; 1,26-1,54 (m, 20H) ; 2,51-2,55 (m, 2H) ; 3,72 (s, 3H) ; 3,82 (s, 3H) ; 3,83 (s, 3H) ; 6,94 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H) ; 7,42 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ : 14,2 ; 22,8 ; 28,0 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,7 ; 29,8 ; 32,1 ; 52,5 ; 55,4 ; 60,9 ; 108,8 ; 114,1 ; 118,1 ; 120,8 ; 131,3 ; 142,7 ; 160,2 ; 161,2 ; 168,2.

GC-MS : tr = 15,9 min MS 459 $[M+H]^+$

226 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)tétradécanoate de méthyle

Suivant la procédure générale B décrit pour le composé **162**, le traitement de **225** (0,254 g, 0,55 mmol) par BBr_3 permet d'obtenir, après purification sur gel de silice (éluant : Cy/ACOEt : 90/10 à 80/20), le composé **226** (0,129 g, 53%) sous forme d'un solide jaune.



Formule brute : $C_{26}H_{36}O_6$
Masse molaire (g/mol) : 444,56
Rf : 0,69(Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 0,88 (t, $J = 10,1$ Hz, 3H) ; 1,26-1,54 (m, 20H) ; 2,56-2,61 (m, 2H) ; 3,84 (s, 3H) ; 3,96 (s, 3H) ; 6,96 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H) ; 8,10 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H) ; 13,50 (s, 1H).

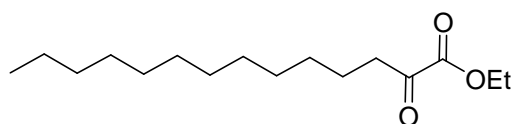
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 14,5 ; 23,0 ; 28,3 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 ; 29,9 ; 30,0 ; 32,3 ; 54,4 ; 53,6 ; 114,2 ; 116,4 ; 122,2 ; 123,9 ; 129,5 ; 154,8 ; 158,9 ; 159,6 ; 166,9 ; 172,4.

MS (ES, pos) : 445,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

228 2-oxotétradécanoate d'éthyle

Des copeaux de magnésium (0,4995 g, 20,55 mmol, 1,03 éq.) sont introduits dans un tricol et flambés sous vide. 1 mL de THF anhydre est ajouté, suivi de quelques gouttes de 1-bromododécane **214**, afin d'initier la réaction. Une fois la réaction activée, le 1-bromododécane **214** (4,78 mL, 19,96 mmol, 1 éq.) dans 20 mL de THF est ajouté goutte à goutte, de manière à conserver un doux reflux. A la fin de l'addition, l'agitation est maintenue jusqu'à ce que le milieu soit revenu à température ambiante. Une solution trouble grise est obtenue.

Une solution d'oxalate de diéthyle **12** (2,81 mL, 21,23 mmol, 1,03 éq.) dans 40 mL de THF est refroidie à -78°C . La solution du Grignard précédemment préparée est alors ajoutée. Après 1h d'agitation à -78°C , une solution aqueuse saturée en NH_4Cl est ajoutée et le milieu est laissé revenir à température ambiante. Après ajout d'eau, le milieu est extrait à l'éther. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 95/5 à 90/10) pour fournir le cétoester **228** (4,51 g, 84%) sous forme d'une huile légèrement jaune.



Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_3$
Masse molaire (g/mol) : 270,41
Rf : 0,67 (Cy/AcOEt : 90/10, UV + vanilline)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 0,84-0,90 (m, 3H) ; 1,25-1,40 (m, 21H) ; 1,55-1,62 (m, 2H) ; 2,82 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H) ; 4,31 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H).

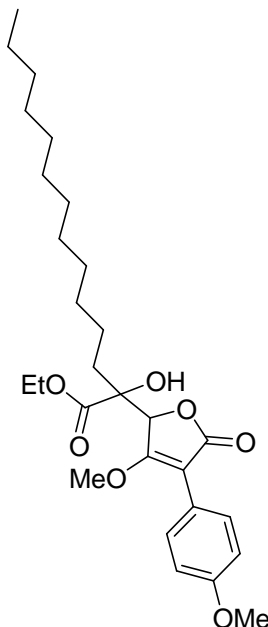
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 14,1, 14,2 ; 22,8 ; 23,1 ; 29,1 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 ; 32,1 ; 39,3 ; 62,3 ; 161,4 ; 194,7.

MS (ES, pos) : 271,2 $[\text{M} + \text{H}]^+$

229 2-hydroxy-2-(3-méthoxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl) tétradécanoate d'éthyle

Une solution de *n*-BuLi (1,5 M dans l'hexane, 5,7 mL, 8,52 mmol, 1,5 éq.) dans 10 mL de THF est refroidie à -78°C . L'acide tétronique protégé **174** (1,25 g, 5,68 mmol, 1 éq.) dans 20 mL de THF est ajouté lentement. La solution est agitée 30 min à -78°C puis le cétoester **228** (3,07 g, 11,36 mmol, 2 éq.) est ajouté. Après 30 min d'agitation à -78°C , la solution est laissée revenir à température ambiante. Après deux heures d'agitation à

température ambiante et ajout d'une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium, la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 95/5 à 60/40). L'alcool attendu **229** (2,21 g, 79%) est obtenu sous forme d'une huile jaune, mélange de formes diastéréoisomères (66/34 par intégration en RMN ^1H).



Formule brute : $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_7$

Masse molaire (g/mol) : 490,63

Rf : 0,39 et 0,50 (Cy/AcOEt : 90/10, UV + vanilline)

1er dia :

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 0,81-0,84 (m, 3H) ; 1,22-1,48 (m, 23H) ; 1,82-2,03 (m, 2H) ; 3,70 (s, 3H) ; 3,75 (s, 3H) ; 4,25 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H) ; 4,87 (s, 1H) ; 6,85 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H) ; 7,25 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 14,2 ; 22,8 ; 23,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 ; 32,0 ; 34,3 ; 55,4 ; 60,9 ; 62,9 ; 78,4 ; 80,5 ; 106,0 ; 113,8 ; 121,7 ; 131,8 ; 159,7 ; 171,4 ; 172,8 ; 173,0.

2e dia :

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ : 0,75-0,77 (m, 3H) ; 1,16-1,39 (m, 23H) ; 1,79-1,94 (m, 2H) ; 3,51 (s, 3H) ; 3,65 (s, 3H) ; 4,15 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H) ; 4,89 (s, 1H) ; 6,75 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H) ; 7,14 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H).

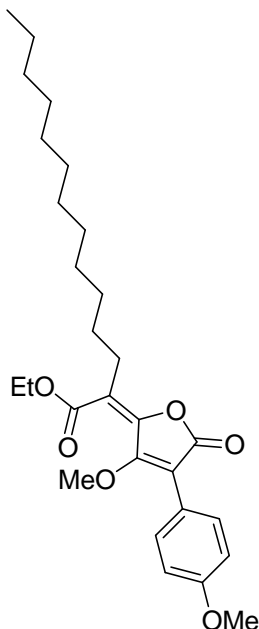
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ : 15,1 ; 22,8 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,7 ; 29,8 ; 32,0 ; 55,3 ; 60,6 ; 62,5 ; 78,0 ; 81,2 ; 105,8 ; 113,7 ; 121,6 ; 131,8 ; 159,6 ; 170,7 ; 171,4 ; 172,9.

MS (ES, pos) : 491,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

230 2-(3-méthoxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2(5H)-ylidène)tétradécanoate d'éthyle

L'huile **229** (1,4 g, 2,86 mmol, 1 éq.), mélange d'alcools, est solubilisée dans 60 mL de DCM. A cette solution refroidie à 0°C sont ajoutés successivement la triéthylamine (4 mL, 28,60 mmol, 10 éq.), le DMAP (35 mg, 0,29 mmol, 0,1 éq.) et lentement le TFAA (2 mL, 14,30 mmol, 5 éq.). Après 10h d'agitation à température ambiante, le milieu est

hydrolysé par ajout d'une solution aqueuse 1 M d'acide chlorhydrique. La phase aqueuse est extraite au DCM. Les phases organiques combinées sont séchées sur sulfate de magnésium et concentrées. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : Cy/AcOEt : 90/10 à 50/50). Le produit **230** (0,72 g, 82%, *E/Z* : 70/30 par intégration en RMN ^1H) est obtenu sous forme d'une huile orange. L'isomère *E* a pu être isolé.



Formule brute : $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_6$
Masse molaire (g/mol) : 472,61
Rf : 0,46 (Cy/AcOEt : 70/30, UV + vanilline)

Isomère E:

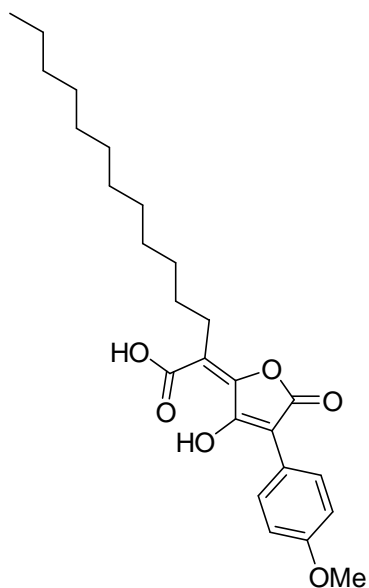
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 0,87 (t, $J = 6,3$ Hz, 3H) ; 1,25-1,37 (m, 23H), 2,55 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H) ; 3,71 (s, 3H), 3,82 (s, 3H) ; 4,28 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H) ; 6,93 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H) ; 7,41 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) : δ : 14,2 ; 14,3 ; 22,8 ; 27,9 ; 29,4 ; 29,6 ; 29,7 ; 32,0 ; 55,4 ; 60,7 ; 61,6 ; 108,5 ; 114,0 ; 118,6 ; 120,8 ; 131,3 ; 142,4 ; 160,1 ; 161,2 ; 167,7 ; 168,3.

MS (ES, pos) : 473,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Isomère Z:

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ : 0,87 (t, $J = 6,3$ Hz, 3H) ; 1,25-1,38 (m, 23H), 2,68 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H) ; 3,78 (s, 3H), 3,83 (s, 3H) ; 4,30 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H) ; 6,94 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H) ; 7,38 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H).



Formule brute : $C_{25}H_{34}O_6$

Masse molaire (g/mol) : 430,24

Rf : 0 (Cy/AcOEt : 80/20, UV + vanilline)

RMN 1H (300 MHz, acétone d_6) : δ : 0,87 (m, 3H) ; 1,27-1,60 (m, 20H) ; 2,59-2,64 (m, 2H) ; 4,83 (s, 3H) ; 6,99 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H) ; 8,08 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (75 MHz, acétone d_6) : 14,4 ; 23,4 ; 29,1 ; 29,3 ; 29,6 ; 29,9 ; 30,1 ; 30,3 ; 30,4 ; 30,6 ; 32,7 ; 55,6 ; 104,0 ; 114,6 ; 117,3 ; 123,0 ; 129,7 ; 153,3 ; 160,1 ; 160,3 ; 166,8 ; 174,4.

MS (ES, nég) : 429,1 $[M-H]^-$

Analyse Élémentaire :

| | | |
|--------------------|-----------|----------|
| <i>Théorique :</i> | C : 69,74 | H : 7,96 |
| <i>Calculée :</i> | C : 69,26 | H : 7,83 |

Partie tests biologiques :

Etude de la protection de la thymidine : tests immunoenzymatiques

Composition du tampon EIA : $[K_2HPO_4] = 0,08 \text{ M}$; $[KH_2PO_4] = 0,02 \text{ M}$; $[NaCl] = 0,15 \text{ M}$; $[BSA] = 145 \mu\text{M}$; $[NaN_3] = 1,5 \text{ mM}$.

Solution de lavage : $[tween20] = 0,05\%$ (v/v) ; tampon phosphate 10 mM pH 7,4. Le tween20 (polyoxyéthylènesorbitan) est un tensioactif.

Réactif d'Ellman : $[DTNB] = 250 \mu\text{M}$; $[acéthylthiocholine] = 76 \text{ mM}$; $[NaCl] = 1,45 \text{ M}$; tampon phosphate 10 mM pH 7,4. L'absorbance à 414 nm est lue par un lecteur de plaque Labsystem Miltiskan Biochromatique.

Tampon TAE : $[EDTA] = 1 \text{ mM}$; tampon Tris-acétate, 40 mM.

Protocole général des dosages par compétition :

Préparation des plaques : cette étape consiste à adsorber sur la surface des puits des anticorps polyclonaux de chèvre dirigés contre les immunoglobulines de souris. Dans chaque puits sont disposés 200 μL d'une solution d'anticorps (AffiniPure, Goat Anti-Mouse IgG+IgM, H+L) à 5 $\mu\text{g/mL}$ dans le tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Après 16 heures à température ambiante la plaque est lavée, remplie par 300 μL de tampon EIA, et recouverte d'un film adhésif. Les plaques peuvent être utilisées 24 heures après cette préparation pour assurer la saturation de la phase solide par la protéine BSA contenue dans le tampon EIA.

Dosage par compétition de la thymidine : Dans chaque puits sont additionnés, 50 μL de la solution de thymidine à doser dans le tampon EIA, 50 μL d'une solution d'anticorps mAc72 contre l'AMT à 9,6 ng/mL dans le tampon EIA, 50 μL d'une solution de traceur enzymatique AMT-AChE à 2 UEll/mL dans le tampon EIA. La liaison non spécifique LNS est mesurée par le mélange de 50 μL de la solution du traceur enzymatique et de 100 μL de tampon EIA et le signal B_0 (obtenu en l'absence de thymidine) par le mélange de 50 μL de la solution d'anticorps, de 50 μL de la solution du traceur enzymatique et de 50 μL de tampon EIA. La plaque est agitée 2 heures à température ambiante, lavée 3 fois, puis 200 μL du réactif d'Ellman sont additionnés. Après une heure d'agitation, l'absorbance à 414 nm est lue dans chaque puits.

Protocole général du test « UV » :

Témoins LNS, B₀, et colonnes 3 et 4 : dosage par compétition de la thymidine (calibrage du test) ;
 Témoins T_{ox} : expérience en l'absence d'agent protecteur (calibrage du test) ;
 Colonnes 5 à 12 : étude des agents protecteurs (2 puits par molécule testée)

| | | | | | | | | | | | | |
|--|---|-----------------|-----|------|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| | | LNS | 560 | 35 | | | | | | | | |
| | | LNS | 560 | 35 | | | | | | | | |
| | | B ₀ | 280 | 17,5 | | | | | | | | |
| | | B ₀ | 280 | 17,5 | | | | | | | | |
| | | B ₀ | 140 | 8,75 | | | | | | | | |
| | | B ₀ | 140 | 8,75 | | | | | | | | |
| | | T _{ox} | 70 | 4,4 | | | | | | | | |
| | | T _{ox} | 70 | 4,4 | | | | | | | | |

μM

Plaque I : 96 puits de 300μL.

Colonne 1 : vide.

Colonne 2 : LNS et B₀ : 100 μL d'eau. T_{ox} : 50 μL, thymidine à 140 μM, Tp phosphate pH 7,4, 50 mM ; 25 μL d'eau ; 25 μL, H₂O₂ à 20 mM, eau.

Colonnes 3 et 4 : 50 μL, thymidine (concentration variable), Tp phosphate pH 7,4, 50 mM ; 50μL d'eau.

Colonnes 5 à 12 : 50 μL, thymidine à 140 μM, Tp phosphate pH 7,4, 50 mM ; 25 μL, agent protecteur, eau ; 25 μL, H₂O₂ à 20 mM, eau.

Irradiation à 254 nm, 1,75 J/cm². Irradiateur Bio-Sun 3W, Vilbert Lourmat (Marne la Vallée).

Plaque II : recouverte d'anticorps anti-Ig de souris

Colonne 1 : témoins : vide.

Colonne 2 à 12 : 50 μL de Tp EIA ; addition de 5 μL des solutions des puits de la plaque I ; 50 μL, mAc72 à 9,6 ng/mL, Tp EIA (saut LNS, 50 μL de Tp EIA) ; 50 μL, AMT-AChE à 2 UEll/mL, Tp EIA.

Agitation 2h à 20°C. Lavage trois fois par du tampon de lavage. Addition de 200 μL du réactif d'Ellman. Lecture de la densité optique à 414 nm après 1h.

Protocole général des tests Fenton :

Témoins LNS, B₀, et colonnes 3 et 4 : dosage par compétition de la thymidine (calibrage du test) ;
 Témoins T_{ox} : expérience en l'absence d'agent protecteur (calibrage du test) ;
 Colonnes 5 à 12 : étude des agents protecteurs (2 puits par molécule testée)
 Fe/EDTA = FeSO₄/EDTA (1:1) pour le test « Fenton »

| | | | | | | | | | | | | |
|--|---|-----------------|-----|------|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| | | LNS | 560 | 35 | | | | | | | | |
| | | LNS | 560 | 35 | | | | | | | | |
| | | B ₀ | 280 | 17,5 | | | | | | | | |
| | | B ₀ | 280 | 17,5 | | | | | | | | |
| | | B ₀ | 140 | 8,75 | | | | | | | | |
| | | B ₀ | 140 | 8,75 | | | | | | | | |
| | | T _{ox} | 70 | 4,4 | | | | | | | | |
| | | T _{ox} | 70 | 4,4 | | | | | | | | |

μM

Plaque I : 96 puits de 300μL.

Colonne 1 : vide.

Colonne 2 : LNS et B₀ : 110 μL d'eau. T_{ox} : 50 μL, thymidine à 140 μM, Tp phosphate pH 7,4, 50 mM ; 25 μL d'eau ; 25 μL, Fe/EDTA à 2,8 mM, eau ; 10 μL, H₂O₂ à 770 mM, eau.

Colonnes 3 et 4 : 50 μL, thymidine (concentration variable), Tp phosphate pH 7,4, 50 mM ; 60 μL d'eau.

Colonnes 5 à 12 : 25 μL , agent protecteur, eau ; 25 μL , Fe/EDTA à 2,8 mM, eau ; 50 μL , thymidine à 140 μM , Tp phosphate pH 7,4, 50 mM ; 10 μL , H_2O_2 à 770 mM, eau.

Agitation 30 minutes test Fenton à 20°C.

Plaque II : recouverte d'anticorps anti-Ig de souris

Colonne 1 : témoins : vide.

Colonne 2 à 12 : 50 μL de Tp EIA ; addition de 5 μL des solutions des puits de la *plaque I* ; 50 μL , mAc72 à 9,6 ng/mL, Tp EIA (saut LNS, 50 μL de Tp EIA) ; 50 μL , AMT-AChE à 2 UEll/mL, Tp EIA.

Agitation 2h à 20°C. Lavage trois fois par du tampon de lavage. Addition de 200 μL du réactif d'Ellman. Lecture de la densité optique à 414 nm après 1h.

Etude de la protection du plasmide pEGFPLuc:

Etude en présence d'un mélange $\text{FeSO}_4/\text{EDTA}/\text{H}_2\text{O}_2$: Le mélange de 1 μL d'une solution de pEGFPLuc à 3,12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans l'eau, de 4 μL de Tp phosphate 25 mM pH 7,4, de 5 μL d'agent protecteur étudié (concentrations variables) dans l'eau, de 5 μL d'une solution de $\text{FeSO}_4/\text{EDTA}$ (1:1) 1,6 mM dans l'eau et de 5 μL d'une solution d' H_2O_2 16 mM dans l'eau est agité 30 minutes à température ambiante. Puis 1 μL d'une solution de protéine BSA à 2 mg/mL dans l'eau est additionnée.

Gel d'électrophorèse : Le gel à 0,8% est préparé en solubilisant à chaud 1,2 g d'agarose dans 150 mL de tampon TAE 1 M dans l'eau. Ensuite 1 μL de bromure d'éthydiu est ajouté, et le gel est placé à 4°C pendant 2 heures pour solidification. La solution de chargement est 6x Gel-loading Buffer Type III (0,25% bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol FF et 30% (p/v) de glycérol dans l'eau). La migration est réalisée en courant imposé à 70 mA.

Dépôt des solutions étudiées : dépôt de 5 μL du mélange et de 1 μL de la solution de chargement.

Langmuir : protocole général

Les isothermes de compression ont été enregistrés sur une cuve de Langmuir (Riegler & Kirstein, Postdam) équipée de deux barrières mobiles (vitesse : 2 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$). La pression de surface est mesurée par la méthode de la lame de Wilhelmy.

La cuve est remplie d'eau milli-Q (purifiée par un système Millipore, pH 5,5, résistivité 18 $\text{m}\Omega\cdot\text{cm}$). La température de la cuve est réglée à 30°C par un système de circulation d'eau thermostatée. 40 μL de la solution du produit à analyser (solution à 1M dans CHCl_3) sont déposés à la surface de l'eau. Après 5 min (évaporation du solvant), l'acquisition des données débute.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aubin, F.; Humbert, P., *Rayonnement Ultraviolet et Peau*. John Libbey Eurotext: 2001.
2. Prystowsky, J. H.; Muzio, P. J.; Sevrans, S.; Clemens, T. L. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1996**, *35*, 690-695.
3. Berg, M.; Ros, A. M. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **1994**, *10*, 217-220.
4. Laustriat, G. *Biochimie* **1986**, *68*, 771-778.
5. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Oxford: Clarendon Press* **1989**, 22-85.
6. Fenton, H. J. *J. Chem. Soc.* **1894**, *65*, 899.
7. Haber, F.; Weiss, J. J. *Proc. Roy. Soc. London Ser. A* **1934**, *147*, 332.
8. Coohill, T. P.; Peak, M. J.; Peak, J. G. *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 1043-1050.
9. Zhang, X. S.; Rosenstein, B. S.; Wang, Y.; Lebwohl, M.; Mitchell, D. L.; Wei, H. C. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 119-124.
10. Douki, T.; Cadet, J. *Interface between Chemistry and Biology* **1995**, 173-197.
11. Cadet, J.; Berget, M.; Douki, T.; Ravanat, J. L. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1997**, *131*, 1-87.
12. Sheu, C.; Foote, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *1177*, 6439-6442.
13. Zigman, S. *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 1060-1068.
14. Kligman, L. H.; Gebre, M. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *39*, 233-237.
15. Kappus, H. *Oxidative Stress* **1985**, Orlando: Academic Press, 273-310.
16. Girotti, A. W. *Free Rad. Biol. Med.* **1985**, *1*, 87-95.
17. Mukai, F. H.; Goldstein, B. D. *Science* **1976**, *191*, 868-869.
18. Vaca, C. E.; Harms-Ringdahl, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1001*, 35-43.
19. Frederick, J. E.; Snell, H. E.; Haywood, E. K. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *50*, 443-450.
20. Kurban, R.; Bhawan, J. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* **1990**, *16*, 908-912.
21. Yaar, M.; Gilchrist, B. A. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **1998**, *3*, 47-51.
22. Armstrong, B. K.; Kricke, A. *Cancer Surv. Skin Cancer* **1996**, *26*, 133-153.
23. Kelly, J. W.; Rivers, J. K.; Mc Lennan, R.; Harrison, S.; Lewis, A. E.; Tate, B. J. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1994**, *30*, 40-48.
24. Elwood, J. M.; Jopson, J. *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 198-203.
25. Salvador, A.; Chisvert, A. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *537*, 1-14.
26. Tailer, J. A.; Getzoff, E. D.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *Nature* **1983**, *306*, 284-287.
27. Bowler, C.; Slooten, L.; Vandenbranden, S.; De Rycke, R.; Botterman, J.; Sybesma, C.; Van Montagu, M.; Inzé, D. *EMBO J.* **1991**, *10*, 1723-1732.
28. Moysan, A.; Marquis, I.; Gaboriau, F.; Santus, R.; Dubertret, L.; Morlière, P. *J. Invest. Dermatol.* **1993**, *100*, 692-698.
29. Comporti, M. *Chem. Phys. Lipids* **1987**, *45*, 143-169.
30. Maiorino, M.; Chu, F. F.; Ursini, F.; Davies, K. J. A.; Doroshov, J. H.; Esworthy, R. S. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7728-7732.
31. Sies, H.; Krinsky, N. I. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1299-1300.
32. Niki, E. *Chem. Phys. Lipids* **1987**, *44*, 227-253.
33. Borg, D. C.; Schaich, K. M. *Handbook of Free Radicals and Antioxydants in Biomedecine* **1989**, Vol. I, (CRC Press), 63-80.
34. Vina, J. R.; Saez, G. T.; Vina, J. 1989. *Handbook of Free Radicals and Antioxydants in Biomedecine Vol. II*, (CRC Press), 29-44.
35. Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1173-1183.
36. Litwinienko, G.; Ingold, K. U. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3433-3438.
37. Litwinienko, G.; Ingold, K. U. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5888-5896.
38. Litwinienko, G.; Ingold, K. U. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8982-8990.

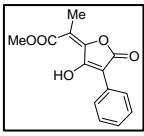
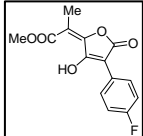
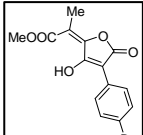
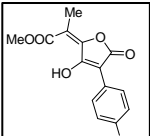
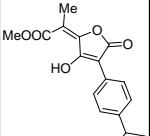
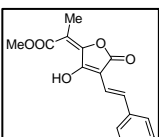
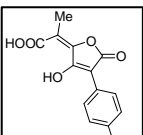
39. Foti, M. C.; Daquino, C.; Geraci, C. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2309-2314.
40. Musialik, M.; Litwinienko, G. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4951-4954.
41. Ziyatdinova, G. K.; Gil'metdinova, D. M.; Budkinov, G. K. *Journal of Analytical Chemistry* **2005**, *60*, 49-52.
42. Murias, M.; Jäger, W.; Handler, N.; Erker, T.; Horvath, Z.; Szekerer, T.; Nohl, H.; Gill, L. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 903-912.
43. Meunier, S.; Desage-El Murr, M.; Nowaczyk, S.; Le Gall, T.; Pin, S.; Renault, J. P.; Boquet, D.; Créminon, C.; Saint-Aman, E.; Valleix, A.; Taran, F.; Mioskowski, C. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 832-840.
44. Meunier, S.; Hanédanian, M.; Desage-El Murr, M.; Nowaczyk, S.; Le Gall, T.; Pin, S.; Renault, J. P.; Boquet, D.; Créminon, C.; Mioskowski, C.; Taran, F. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1234-1241.
45. Yamazaki, I.; Piette, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7588-7593.
46. Podmore, I. D.; Griffiths, H. R.; Herbert, K. E.; Mistry, N.; Mistry, P.; Lunec, J. *Nature* **1998**, *392*, 559.
47. Weinstock, J.; Blank, J. E.; Oh, H. J.; Sutton, B. M. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 673-676.
48. Gill, M.; Steglich, W. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1987**, *51*, 1-317.
49. Huneck, S. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **2001**, *81*, 1.
50. Zografos, A. L.; Georgadis, D. *Synthesis* **2006**, *19*, 3157-3188.
51. Volhard, J. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1894**, *282*, 1.
52. Asano, M.; Kameda, Y. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1933**, *53*, 67.
53. Akermark, B. *Acta. Chem. Scand.* **1961**, *15*, 1695.
54. Foden, F. R.; Mc Cormick, J.; O'Mant, D. M. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 199-203.
55. Ramage, R.; Griffiths, G. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1984**, 1547-1553.
56. Heurtaux, B.; Lion, C.; Le Gall, T.; Mioskowski, C. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1474-1477.
57. Begley, J. M.; Knight, D. W.; Pattenden, G. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *48*, 4279-4282.
58. Knight, D. W.; Pattenden, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1979**, 62-69.
59. Kayser, M. M.; Breau, L. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *48*, 6203-6206.
60. Kayser, M. M.; Breau, L.; Eliev, S.; Morand, P.; Ip, H. S. *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 104-109.
61. Knight, D. W.; Pattenden, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1979**, 84-88.
62. Pattenden, G.; Peig, N.; Smith, A. G. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 403-406.
63. Gegde, D. R.; Pattenden, G.; Smith, A. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1986**, 2127-2131.
64. Pattenden, G.; Turvill, M. W.; Chorlton, A. P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1991**, 2357-2361.
65. Langer, P.; Stoll, M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 1803-1805.
66. Langer, P.; Schneider, T.; Stoll, M. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3204-3214.
67. Ahmed, Z.; Langer, P. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3753-3757.
68. Ahmed, Z.; Langer, P. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2055-2063.
69. Ahmed, Z.; Albrecht, U.; Langer, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3469-3474.
70. Desage-El Murr, M.; Nowaczyk, S.; Le Gall, T.; Mioskowski, C.; Amekraz, B.; Moulin, C. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 1289-1293.
71. Desage-El Murr, M.; Nowaczyk, S.; Le Gall, T.; Mioskowski, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1489-1498.
72. Bourdreux, Y.; Nowaczyk, S.; Billaud, C.; Mallinger, A.; Willis, C.; Desage-El Murr, M.; Toupet, L.; Lion, C.; Le Gall, T.; Mioskowski, C. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 22-26.
73. Willis, C.; Bodio, E.; Bourdreux, Y.; Billaud, C.; Le Gall, T.; Mioskowski, C. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6421-6424.

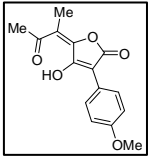
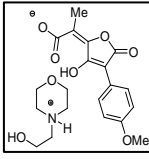
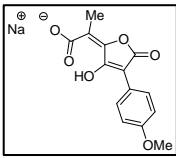
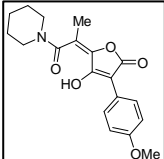
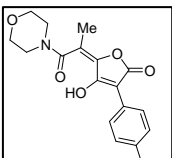
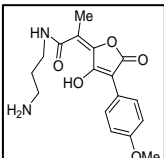
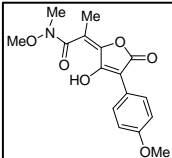
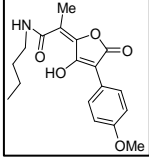
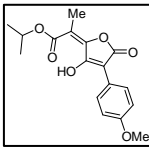
74. Haslam, E., *Shikimic Acid Metabolism and Metabolites*. New York, 1993.
75. Moore, H. W.; Wikholm, R. J. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *48*, 1568.
76. Wikholm, R. J.; Moore, H. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6152.
77. Kögl, F.; Becker, H.; Detzel, A.; de Voss, G. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *465*, 211-242.
78. Franck, R. L.; Clark, G. R.; Coker, J. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 1824-1826.
79. Moore, H. W.; Shelden, H. R.; Deters, D. W.; Wikholm, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1675-1681.
80. Snieckus, V. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 879-933.
81. Goetz, G.; Meschkat, E.; Le Poittevin, J.-P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1141-1146.
82. Rabideau, P. W.; Marcinov, Z. *Org. React.* **1992**, *42*, 1.
83. Pernenalm, P.-A.; Dence, C. W. *Acta. Chem. Scand.* **1974**, *28*, 453-464.
84. Stetter, H.; Mohrmann, K. H. *Synthesis* **1981**, 981-982.
85. Shimizu, M.; Mizukoshi, H.; Hiyama, T. *Synthesis* **2004**, 1363-1368.
86. Dreher, S. D.; Ikemito, N.; Liu, J.; Gresham, V.; Dormer, P. G.; Balsells, J.; Mathre, D.; Armstrong, J. D. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6023-6025.
87. Srogl, J.; Allred, G. D.; Liebeskind, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12376-12377.
88. Zhang, S.; Marshall, D.; Liebeskind, L. S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2796-2804.
89. Brandänge, S.; Holmgren, E.; Leijonmarck, H.; Rodriguez, B. *Acta. Chem. Scand.* **1995**, *49*, 922-928.
90. Sahoo, M. K.; Mhaske, S. B.; Argade, N. P. *Synthesis* **2003**, *3*, 346-349.
91. Thiot, C.; Schmutz, M.; Wagner, A.; Mioskowski, C. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 2868-2871.
92. Dupont, J.; Consorti, C.; Spencer, J. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 337.
93. Sheldon, R. *Chem. Commun.* **2001**, 2399.
94. Dupont, J.; De Souza, R. F.; Suarez, P. A. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3667.
95. Wasserscheid, P.; Keim, W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3772.
96. Tejedor, D.; Garcia-Tellado, F. *Org. Prep. Proc. Int.* **2004**, *36*, 33-59.
97. Sato, T.; Yoshimatsu, K.; Otera, J. *Synlett* **1995**, *8*, 843-845.
98. Paintner, F.; Allmendiger, L.; Bauschke, G. *Synlett* **2003**, *1*, 83-87.
99. Poon, K. W. C.; Dudley, G. B. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3923-3927.
100. Agarwal, S. C.; Seshadri, T. R. *Tetrahedron* **1964**, *20*, 17-24.
101. Maass, T. *Phytochemistry* **1970**, 2477-2481.
102. Raju, K. R.; Rao, P. S. *Indian J. Chem. Sect. B* **1986**, *25*, 97-99.
103. Venkateshwar Rao, G.; Rao, P. S. *J. Indian Chem. Soc.* **1983**, *60*, 94-96.
104. Franck, R. L.; Cohen, J.; Coker, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4455-4457.
105. Sun, H.; DiMugno, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *127*, 2050-2051.
106. Sharma, R. K.; Fry, J. L. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2112-2114.
107. Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815-3818.
108. Rubottom, G. M.; Kim, C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1550-1552.
109. Cooke, M. P. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 951-953.
110. Tetsuji, K.; Tadashi, K.; Masayoshi, T.; Toshio, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 2334-2338.
111. Ma, M.; Li, C.; Peng, L.; Xie, F.; Zhang, X.; Wang, J. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3927-3929.
112. Dahle, L. K.; Hill, E. G.; Holman, R. T. *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, *98*, 253-261.
113. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933-956.
114. C., M. G. J.; Powell, T.; Raw, R. *J. Chem. Soc.* **1959**, 3103-3110.

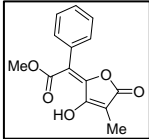
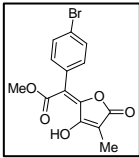
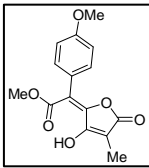
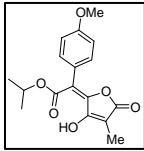
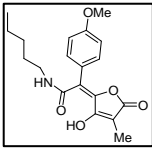
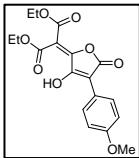
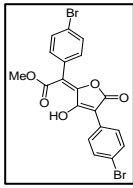
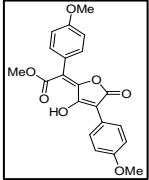
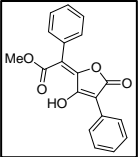
115. Yoshimura, Y.; Inomata, T.; Nakasawa, H.; Yamaguchi, F.; Ariga, T. *J. Agric. Food. Chem.* **1999**, *47*, 4653-4656.
116. Visioli, F.; Galli, C. *Anal. Biochem.* **1997**, *249*, 244-246.
117. Saint-Cricq de Gaulejac, N.; Provost, C.; Vivas, N. *J. Agric. Food. Chem.* **1999**, *47*, 425-431.
118. Sierens, J.; Hartley, J. A.; Campbell, M. J.; Leathern, A. J. C.; Woodside, J. V. *Mut. Res.* **2001**, *485*, 169-176.
119. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95.
120. Saramet, A.; Danila, G.; Paduraru, I.; Petrariu, D.; Olinescu, R. *Arzneimittel-Forschung* **1996**, *46*, 501-504.
121. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1995**, *28*, 25-30.
122. Nair, V.; Turner, G. A. *Lipids* **1984**, *19*, 804-805.
123. Young, I. S.; Trimble, E. R. *Ann. Clin. Biochem.* **1991**, *28*, 504-508.
124. Mosmann, T. *J. Immunol. Meth.* **1983**, *65*, 55-63.
125. Roberts, G., *Langmuir-Blodgett Films*. Plenum Press: New York, 1990.
126. Petty, M. C. *Thin Solid Films* **1992**, *210*, 417.
127. Pockels, A. *Nature* **1892**, *46*, 418.
128. Pockels, A. *Nature* **1891**, *43*, 437.
129. Langmuir, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, *39*, 1848.
130. Blodgett, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 1007.
131. Laughlin, R. G., *The Aqueous Phase Behaviour of Surfactants*. Academic Press Inc.: San Diego, 1994.
132. Gaines, G. L., *Insoluble Monolayers at the Liquid-Gas Interface*. Wiley-Interscience: New York, 1966.
133. Binks, B. P. *Colloid Interface Sci.* **1991**, *34*, 343.
134. Ten Grotenhuis, E.; Demel, R. A.; Ponec, M.; Boer, D. R.; Van Miltenburg, J. C.; Bouwstra, J. A. *Biophysical J.* **1996**, *71*, 1389-1399.
135. Albrecht, O.; Gruler, H.; Sackmann, E. *J. Phys.* **1978**, *39*, 301-303.
136. Agharahimi, M. R.; LeBel, N. A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1856-1863.
137. Palotai, I. M.; Stephenson, G. R.; Ross, W. J.; Tupper, D. E. *J. Organomet. Chem.* **1989**, *364*, C11-C14.
138. Oda, T.; Notoya, K.; Gotoh, M.; Taketomi, S.; Fujisawa, Y.; Makino, H.; Sohda, T. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 751-760.
139. Campbell, A. C.; Maidment, M. S.; Pick, J. H.; Stevenson, D. F. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1985**, 1567-1576.
140. Iare, J. E.; Tulevski, G. S.; Sugo, K.; de Picciotto, A.; White, K. A.; Nuckolls, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6030-6031.
141. Yu, J. G.; Ho, D. K.; Cassady, J. M.; Xu, L.; Chang, C. J. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6198-6202.

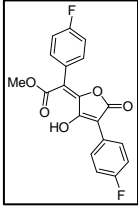
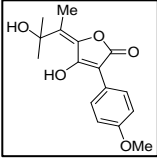
ANNEXES

Annexe 1 : Résultats des tests de protection de la thymidine

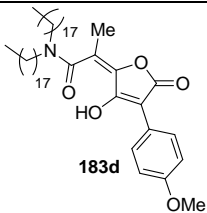
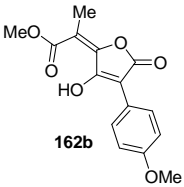
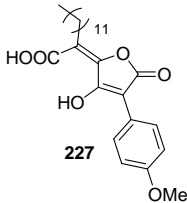
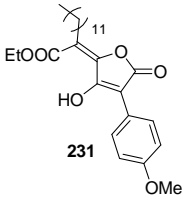
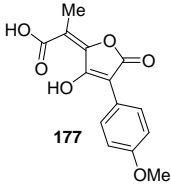
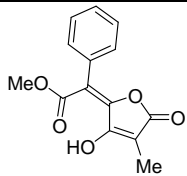
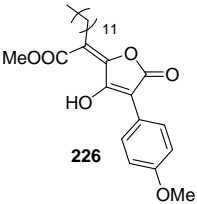
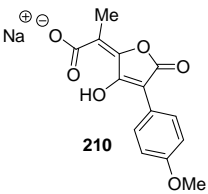
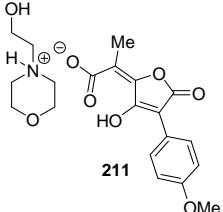
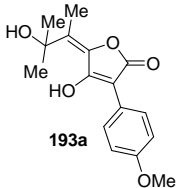
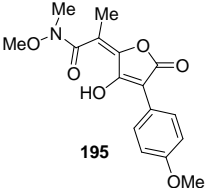
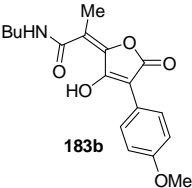
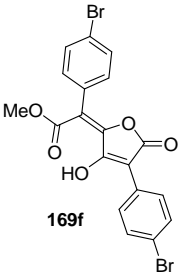
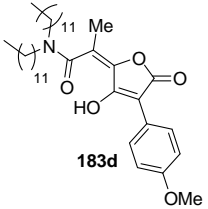
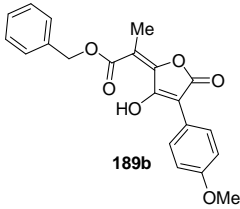
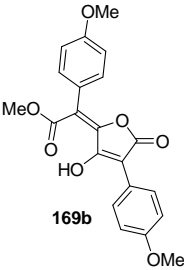
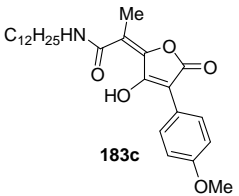
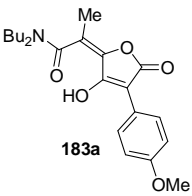
| Num | Structure | FENTON | | | | UV | | | |
|----------|---|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|------------|--------|
| | | 500 μ M | | 250 μ M | | 100 μ M | | 50 μ M | |
| | | % prot | Erreur | % prot | Erreur | % prot | Erreur | % prot | Erreur |
| 1 | NBA | 13 | 0 | 3 | 1 | 52 | 4 | 29 | -2 |
| 2 | Trolox | 81 | 3 | 80 | 1 | 10 | 0 | 1 | 0 |
| 3 |  | 91 | -9 | 48 | -1 | 34 | 1 | 15 | 0 |
| 4 |  | 84 | 2 | 74 | 11 | 29 | -1 | 12 | 1 |
| 5 |  | 68 | 3 | 30 | 13 | 26 | -3 | 11 | 0 |
| 6 |  | 89 | 3 | 65 | 16 | 38 | -4 | 12 | 1 |
| 7 |  | 59 | -1 | 36 | 21 | 29 | -8 | 12 | 0 |
| 8 |  | 36 | 2 | 0 | 0 | 31 | -4 | 12 | 0 |
| 9 |  | 69 | -2 | 2 | 0 | 28 | -1 | 14 | 0 |

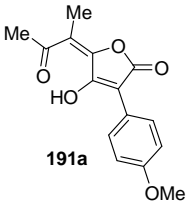
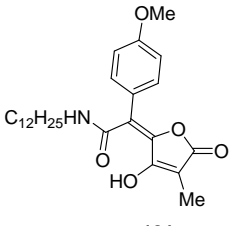
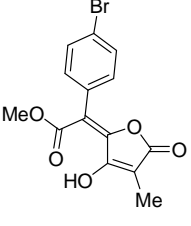
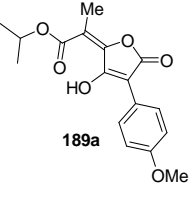
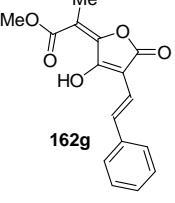
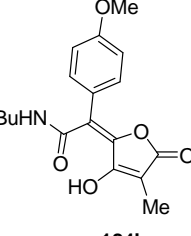
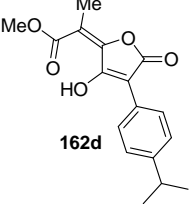
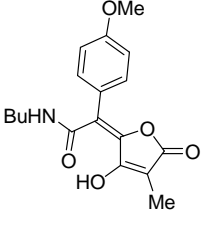
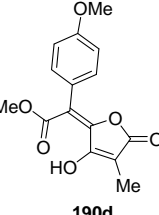
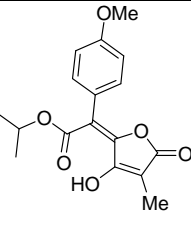
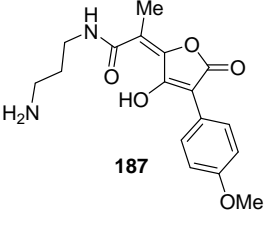
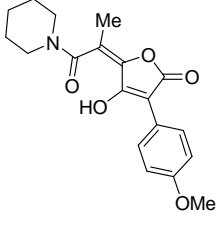
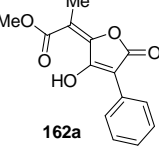
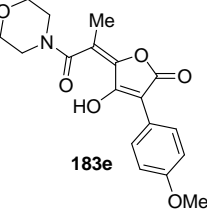
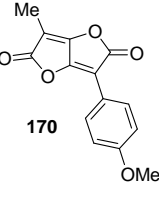
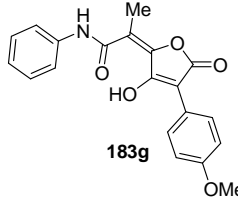
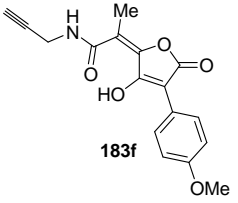
| | | | | | | | | | |
|-----------|---|-----|-----|----|----|----|----|----|----|
| 10 |  | 62 | 1 | 13 | 2 | 25 | 1 | 10 | 0 |
| 11 |  | 76 | -2 | 7 | -3 | 35 | -2 | 15 | 1 |
| 12 |  | 72 | 0 | 12 | 0 | 30 | -1 | 12 | 0 |
| 13 |  | 83 | 4 | 53 | 3 | 39 | 3 | 12 | 0 |
| 14 |  | 74 | -2 | 33 | 1 | 31 | 3 | 10 | -1 |
| 15 |  | 37 | -10 | 2 | 2 | 39 | 4 | 13 | 1 |
| 16 |  | 84 | -2 | 26 | 7 | 47 | -4 | 17 | 0 |
| 17 |  | 100 | 5 | 49 | 2 | 47 | 1 | 20 | -2 |
| 18 |  | 36 | -3 | 35 | 7 | 27 | 1 | 10 | -1 |

| | | | | | | | | | |
|-----------|---|-----|-----|----|-----|----|----|----|----|
| 19 |  | 19 | -1 | 0 | 0 | 23 | 3 | 9 | 0 |
| 20 |  | 11 | 1 | 0 | 0 | 21 | -4 | 7 | 0 |
| 21 |  | 7 | 0 | 0 | 0 | 19 | 2 | 7 | 1 |
| 22 |  | 11 | 0 | 0 | 0 | 19 | 2 | 6 | -1 |
| 23 |  | 57 | -15 | 19 | -13 | 25 | 3 | 8 | 0 |
| 24 |  | 68 | -13 | 19 | -21 | 18 | 1 | 3 | 0 |
| 25 |  | 100 | 5 | 45 | 11 | 50 | -2 | 25 | -3 |
| 26 |  | 92 | 2 | 71 | 0 | 45 | 0 | 20 | -2 |
| 27 |  | 93 | 0 | 68 | -4 | 42 | -2 | 19 | -1 |

| | | | | | | | | | |
|-----------|---|----|----|----|-----|----|----|----|----|
| 28 |  | 90 | -2 | 71 | -1 | 40 | -1 | 19 | -3 |
| 29 |  | 67 | 5 | 32 | -17 | 41 | 2 | 14 | 0 |

Annexe 2 : Références des produits pour le test MTT

| Num | Produit | Num | Produit | Num | Produit |
|-----|---|-----|---|-----|---|
| 1 |  183d | 2 |  162b | 3 |  227 |
| 4 |  231 | 5 |  177 | 6 |  201a |
| 7 |  226 | 8 |  210 | 9 |  211 |
| 10 |  193a | 11 |  195 | 12 |  183b |
| 13 |  169f | 14 |  183d | 15 |  189b |
| 16 |  169b | 17 |  183c | 18 |  183a |

| | | | | | |
|----|--|----|--|----|---|
| 19 |  191a | 20 |  184c | 21 |  201b |
| 22 |  189a | 23 |  162g | 24 |  184b |
| 25 |  162d | 26 |  184b | 27 |  190d |
| 28 |  190a | 29 |  187 | 30 |  170 |
| 31 |  162a | 32 |  183e | 33 |  170 |
| 34 |  183g | 35 |  183f | | |

